



Università degli studi di Padova

Facoltà di Scienze MM.FF.NN.

Dipartimento di Scienze Chimiche

Scuola di Dottorato in Scienza e Ingegneria dei Materiali

XXII ciclo

Nanoparticelle fluorescenti per applicazioni biomediche

Direttore: Ch.mo Prof. Gaetano Granozzi

Supervisore: Dott. Fabrizio Mancin

Dottorando: Luca Baù

31 Gennaio 2010

A mio padre e a mia madre

Riassunto

Le applicazioni della fluorescenza rivestono un ruolo chiave in un numero crescente di discipline, dalla biologia molecolare, alla chimica analitica, all'optoelettronica. L'elevata risoluzione spaziale e temporale, insieme a un eccellente rapporto segnale-rumore, rendono la fluorescenza un metodo ideale per lo studio della struttura e della dinamica della materia e dei sistemi viventi su scala molecolare e nanometrica.

I fluorofori più comunemente usati, molecole organiche o complessi metallici, presentano di frequente problemi di luminosità e fotostabilità. Questi limiti possono essere superati attraverso l'incapsulazione in nanoparticelle ceramiche o polimeriche. L'inclusione di fluorofori organici in nanoparticelle di silice, in particolare, offre numerosi vantaggi. La silice rappresenta una matrice ideale, trasparente alla luce visibile e relativamente inerte rispetto ai processi fotofisici. I fluorofori, protetti dall'ambiente esterno, godono di una elevata resistenza al photobleaching, mentre la loro presenza in numero elevato all'interno di ogni particella conferisce a queste un'elevata luminosità.

Le nanoparticelle di silice sono anche sistemi estremamente versatili. La facilità della sintesi consente la realizzazione di strutture complesse attraverso architetture core-shell a strati multipli, ciascuno drogato con una specie diversa. La superficie, a sua volta, può essere funzionalizzata con molecole o macromolecole che ne controllino l'interazione chimica con l'ambiente e la stabilità colloidale in diversi solventi, o fungere da piattaforma multivalente per la realizzazione di sistemi supramolecolari.

Questi sistemi trovano applicazione soprattutto nei campi del drug delivery, dell'imaging cellulare e della sensoristica. L'emissione di fluorescenza intensa e stabile consente infatti di seguire il movimento delle nanoparticelle nell'ambiente intracellulare tramite microscopia ottica. Queste si prestano quindi ad essere sfruttate, ad esempio, come vettori per il trasporto di carichi terapeutici che fungano allo stesso tempo da traccianti per l'imaging dei tessuti malati, oppure come sonde fluorescenti per l'imaging cellulare in vitro, applicato allo studio di problemi biologici di base. Questo lavoro di tesi tratta, in particolare, dello sviluppo di vettori per un farmaco antitumorale e di nuove strategie sintetiche che aprono la strada alla realizzazione di vettori più complessi.

Nel capitolo 1 sono illustrate le proprietà, i metodi di sintesi e alcune applicazioni delle nanoparticelle di silice drogate con specie fluorescenti. Particolare attenzione è dedicata alle applicazioni biologiche.

Nel capitolo 2 viene introdotta la terapia fotodinamica (o PDT, acronimo di photodynamic therapy), un trattamento non invasivo per la cura di una varietà di malattie tumorali e di altra natura. Le sue potenzialità cliniche sono note da più di un secolo, ma l'uso in terapia oncologica è relativamente recente. Il trattamento si articola in due fasi: la somministrazione di un farmaco fotoattivo (un fotosensibilizzatore) che si accumula nei tessuti malati, e l'irraggiamento selettivo di questi con luce focalizzata. La fotoattivazione del farmaco innesca una cascata di eventi che conduce alla distruzione dei tessuti irraggiati.

Nel capitolo 3 vengono descritti la sintesi e la caratterizzazione di vettori per fotosensibilizzatori basati su nanoparticelle di silice nelle quali il farmaco è legato covalentemente alla matrice. La coniugazione con molecole che conferiscano al vettore le funzionalità desiderate è uno dei vantaggi chiave dell'uso di nanoparticelle in terapia fotodinamica. Per facilitare queste modifiche e renderle il più possibile versatili, è stato progettato un vettore modulare la cui superficie fosse decorata con siti di ancoraggio per molecole recanti una funzionalità complementare. Questa strategia di funzionalizzazione è stata messa alla prova funzionalizzando le nanoparticelle con un derivato del polietilenglicole.

Nel capitolo 4 viene descritta la preparazione di nanoparticelle di silice modificate con gruppi organici (ORMOSIL) drogate con meta-tetra(idrossifenil)clorina (mTHPC), un fotosensibilizzatore di seconda generazione. Lo studio del destino di questi nanovettori e della molecola incapsulata al loro interno in seguito all'esposizione a fluidi biologici e cellule viventi ha fornito risultati inattesi. I risultati ottenuti suggeriscono che il trasporto di farmaci incapsulati in nanosistemi possa essere più complesso di come appare. Viene presentato un saggio fluorimetrico basato sul trasferimento energetico che può essere utile per determinare senza ambiguità se un farmaco intrappolato fisicamente venga trasportato nelle cellule ancora associato al nanosistema o segua una strada diversa.

Nel capitolo 5 vengono illustrate le caratteristiche salienti delle nanoparticelle di silice mesoporese e i problemi legati alla loro sintesi. Vengono inoltre presentate alcune applicazioni nel campo del drug delivery e della sensoristica.

Nel capitolo 6 viene presentato un vettore alternativo, basato su nanoparticelle di silice mesoporese. È stata concepita una strategia sintetica innovativa, nella quale l'agente

templante è una fase inorganica idroliticamente instabile, e il trattamento di rimozione del templante consiste nel semplice scambio di solvente con acqua a temperatura ambiente. La sintesi proposta è la trasposizione su scala nanometrica di un processo noto da decenni: la produzione di vetri di silice con pori di dimensioni nanometriche a partire da vetri borosilicati, ottenuta inducendo una separazione di fase e rimuovendo selettivamente la fase ricca di boro per idrolisi.

Nel capitolo 7 sono raccolte le procedure sperimentali relative all'attività di ricerca descritta in questo lavoro di tesi.

Abstract

Fluorescence plays a key role in an increasing number of disciplines, from molecular biology, to analytical chemistry, to optoelectronics. Its high spatial and temporal resolution and excellent signal-to-noise ratio, make fluorescence an ideal tool for studying the structure and dynamics of matter and living systems on a molecular and nanometric scale.

The most common fluorophores, organic molecules or metal complexes, are plagued by low brightness and photostability. These limitations can be overcome by embedding in ceramic or polymeric nanoparticles. Most notably, inclusion of organic fluorophores in silica nanoparticles offers several advantages. Silica is an ideal matrix, transparent to visible light and relatively inert to photophysical processes. The embedded fluorophores, protected from the environment, enjoy a high resistance to photobleaching, while their presence in large numbers inside each nanoparticle makes for a much higher brightness.

Silica nanoparticles are also extremely versatile. The ease of synthesis allows for the creation of complex structures through core-shell architectures with multiple layers, each doped with a different species. The surface can in turn be functionalized with molecules or macromolecules, which can control the chemical interactions of the nanoparticles with the environment and their colloidal stability in various solvents, or act as multivalent scaffold for the realization of supramolecular systems.

These systems find application especially in the fields of drug delivery, intracellular imaging and sensing. Their intense and stable emission allows for the trafficking of nanoparticles in the intracellular environment to be easily tracked by fluorescence microscopy. Dye-doped silica nanoparticles are therefore ideally suited as vehicles for the delivery of therapeutic payloads, acting at the same time as tracers for in vivo imaging, or as fluorescent probes for in vitro imaging applied to fundamental biological problems. This thesis, in particular, deals with the development of vehicles for the delivery of an antitumor drug and with novel synthetic strategies paving the way for the realization of more complex vehicles.

Chapter 1 presents the properties, synthesis and some applications of dye-doped silica nanoparticles. Special attention is given to biological applications.

Chapter 2 briefly introduces photodynamic therapy (PDT), a non-invasive modality for the treatment of various diseases. Its clinical potential has been known for more than a century, but its use in oncological therapy is relatively recent. The treatment is administered in two stages: administration of a photoactive drug (a photosensitizer) which accumulates in the target tissues, and selective irradiation of the target area with focalized light. The photoactivation of the drug triggers a cascade of events leading to the destruction of the irradiated tissues.

Chapter 3 describes the synthesis and characterization of silica-based carriers for covalently-linked photosensitizers. Conjugation with molecules capable of endowing the carrier with the desired functionality is one of the key advantages of using nanoparticles in photodynamic therapy. In order to make this kind of modification easier and more versatile, a modular carrier was conceived, its surface decorated with grafting sites for molecules bearing a complementary functionality. This functionalization strategy was tested by coating the nanoparticles with a poly(ethylene glycol) derivative.

Chapter 4 reports the preparation of organically modified silica nanoparticles (ORMOSIL) doped non-covalently with meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (mTHPC), a second generation photosensitizer. The investigation of the fate of these nanocarriers and of the embedded molecule after exposure to biological fluids and living cells yielded unexpected results. These results suggest that the delivery of drugs embedded in nanosystems may be more complex than it seems. A fluorimetric assay is presented, based on intraparticle energy transfer processes, which can be used to tell unambiguously whether a physically embedded drug is delivered into living cells still associated with the nanosystem or follows a different path.

Chapter 5 presents some peculiar features of mesoporous silica nanoparticles and the problems associated with their synthesis. Some ingenious applications in the fields of controlled release and sensing are also shown.

Chapter 6 describes an alternative carrier, based on mesoporous silica nanoparticles. A novel synthetic route was conceived, where the templating agent is a hydrolytically unstable inorganic phase, and the template removal treatment is a simple solvent exchange with water at room temperature. The proposed synthesis is an adaptation on a nanometric scale of a process that has been known for decades: the production of silica glasses with nanometric pores starting from borosilicates melts, obtained by inducing a phase separation and hydrolytically removing the boron-rich phase.

Chapter 7 collects the experimental procedures related to the research reported in this thesis.

Indice

Capitolo 1

Nanoparticelle di silice fluorescenti

Le nanoparticelle di silice	1
Stabilità colloidale	2
Forze attrattive: la formula di Hamaker	3
Forze repulsive: il doppio strato elettrico	3
La teoria DLVO e la stabilità colloidale	4
La stabilizzazione sterica	5
Sintesi	6
Sintesi di Stöber	6
Sintesi in microemulsioni inverse	9
Sintesi in micelle	9
Nanoparticelle fluorescenti	10
Saggi biochimici	11
Sonde intracellulari: sensori PEBBLE	14
Bibliografia	19

Capitolo 2

La terapia fotodinamica

Curare con la luce: le origini della fototerapia	27
Fotochemoterapia e terapia fotodinamica	28
I meccanismi chimico-fisici della terapia fotodinamica	30
Reattività dei ROS	33
I meccanismi biologici della terapia fotodinamica	35
Danno cellulare diretto	36

Danno vascolare	37
Risposta immunitaria	37
Le porfirine	38
Spettri di assorbimento dei porfirinoidi	39
Il modello di Gouterman	40
Spettri delle clorine	44
Spettri degli aggregati	45
Fotosensibilizzatori	48
Fotosensibilizzatori di prima generazione	48
Fotosensibilizzatori di terza generazione e sistemi di trasporto	53
Bibliografia	57

Capitolo 3

Vettore modulare

Scopo	61
Risultati	63
Sintesi delle nanoparticelle	63
Individuazione e modificazione chimica del fotosensibilizzatore	63
Inclusione del fotosensibilizzatore in particelle di silice	64
Funzionalizzazione delle particelle con PEG	66
Azidazione della superficie delle particelle	67
Sintesi del PEG derivato	68
PEGilazione delle particelle	69
Caratterizzazione fotofisica	73
Proprietà fotofisiche	73
Rese quantiche	76
Cinetica di produzione di $^1\text{O}_2$	77
Prove di stabilità colloidale	79
Microscopia di fluorescenza	80

Capitolo 4

Vettore ORMOSIL

Scopo	83
Risultati	85
Sintesi delle nanoparticelle drogate con mTHPC	85
Caratterizzazione fotofisica	86
Stabilità colloidale	87
Produzione di ossigeno singoletto	87
Curve dose-risposta di fototossicità	89
Tossicità al buio del fotosensibilizzatore	pag 90
Tossicità al buio e fototossicità del vettore vuoto	pag 91
Localizzazione intracellulare	92
Uptake	94
Meccanismo di uptake	95
Rilascio di mTHPC dalle nanoparticelle	96
Individuazione del fluoroforo sonda	97
Saggi di rilascio	100
Rilascio nelle cellule	103
PEGilazione del vettore	104
Saggi di rilascio sul vettore non modificato	104
Il mistero della fototossicità e il ruolo dell'aggregazione	106
Conclusioni	109
Bibliografia	112

Capitolo 5

Nanoparticelle mesoporose

Materiali mesoporosi	115
Nanoparticelle mesoporose	116
Applicazioni	118
Sensori molecolari basati su nanoparticelle mesoporose	119

Vettori controllati a distanza: rilascio stimolato e gatekeeping	121
Bibliografia	124

Capitolo 6

Vettore mesoporoso

Scopo	127
Risultati	130
Strategia sintetica	130
Sintesi delle nanoparticelle di borosilicati	131
Caratterizzazioni morfologiche e controllo della dimensione	pag 132
Caratterizzazioni chimiche e controllo del contenuto di boro	133
Caratterizzazioni strutturali	pag 134
Rimozione del templante	135
Caratterizzazioni morfologiche	pag 135
Caratterizzazione chimica e strutturale	136
Nanocapsule di silice	137
Conclusioni	139
Bibliografia	141

Capitolo 7

Parte sperimentale

Strumentazione	143
Materiali	145
Vettore modulare	147
Sintesi di N-(3-trietossisililpropil)-N'-[4-(10,15,20-trifenilporfirin-5-il)-fenil]urea	147
Sintesi di N-butil-N'-[4-(10,15,20-trifenilporfirin-5-il)-fenil]urea	147
Sintesi di nanoparticelle di silice drogate con N-(3-trietossisililpropil)-N'-[4-	

(10,15,20-trifenilporfirin-5-il)-fenil]urea	151
Funzionalizzazione superficiale di NP con N-(3-trietossisililpropil)-N'-(11-azido-3,6,9-triossaundecil)urea	151
Funzionalizzazione superficiale di NP-N3 con O-(2-(4-pentinammido)etil)-O'-metilpolietilenglicole 2000 per via catalitica	152
Funzionalizzazione di NP-N3 con O-(2-(4-pentinammido)etil)-O'-metilpolietilenglicole 2000 per via termica	153
Funzionalizzazione superficiale di NP-N3 con O-(2-(4-pentinammido)etil)-O'-metilpolietilenglicole 2000 assistita da microonde	154
Studi in vitro	
Linea cellulare	155
Prove di stabilità	155
Misura della produzione di ossigeno singoletto	156
Microscopia di fluorescenza	157
Vettore ORMOSIL	159
mTHPC	
Nanoparticelle ORMOSIL	159
Linee cellulari	162
Saggio di vitalità cellulare MTS	162
Test di vitalità cellulare con Trypan Blue	165
Produzione di ossigeno singoletto	166
Photobleaching	167
Studi di rilascio dell'mTHPC dalle nanoparticelle	168
Fluorescence energy transfer	168
Sintesi di IR775-Sil	168
Ultracentrifugazione	169
Cinetiche di disaggregazione dell'mTHPC	170
Accumulo cellulare dell'mTHPC mediante quantificazione fluorimetrica e dosaggio proteico con saggio BCA	171
Microscopia di fluorescenza	172
Studio del meccanismo di accumulo cellulare dell'mTHPC	174
Vettore multifunzionale	175
Sintesi tipica di nanoparticelle di borosilicati	175
Sintesi di nanoparticelle di silice mesoporose	175

Capitolo 1

Nanoparticelle di silice fluorescenti

Le nanoparticelle di silice

Molti anni prima che le nanotecnologie si affermassero come disciplina, la produzione e l'uso di particelle di dimensioni nanometriche erano già pratica comune in diversi settori industriali.¹ Le nanoparticelle di diossido di silicio (silice), in particolare, hanno sempre rivestito un ruolo di primo piano. La preparazione di soluzioni colloidali di silice, descritta per la prima volta nel XIX secolo, è stata adattata alla produzione industriale nel 1933.² Da allora, le particelle di silice sono state usate in moltissime applicazioni che includono, per citarne solo alcune, la preparazione di materiali compositi, la pulizia dei *wafer* di silicio e la chiarificazione delle bevande.

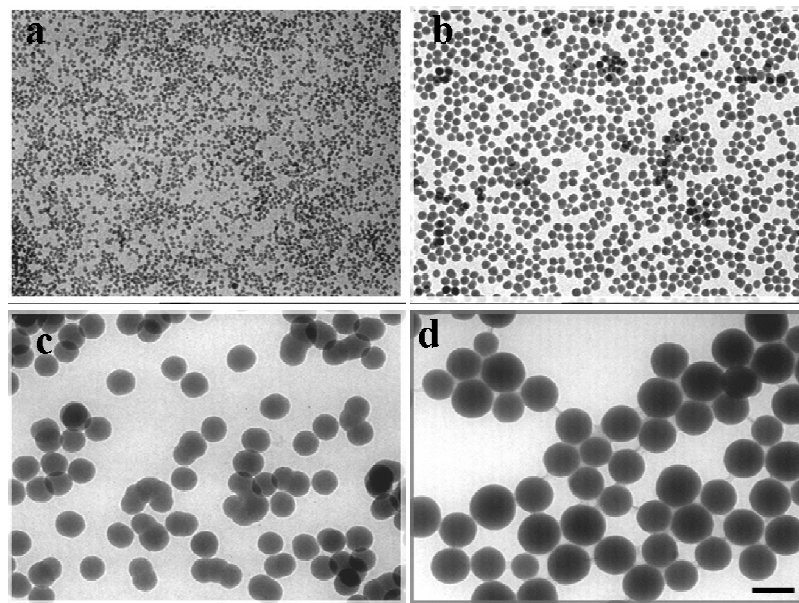


Figura 1. Immagini TEM di nanoparticelle di silice di dimensioni diverse: a) 20 nm, b) 50 nm, c) 200 nm, d) 290 nm, preparate con il metodo di Stöber (la barra di scala nell'angolo dell'inserito d corrisponde a 300 nm).

A differenza di quanto accade in altri nanomateriali, la riduzione delle dimensioni su scala nanometrica non è associata, nella silice, all'emergere di nuove proprietà fisiche. Le nanoparticelle di silice possono essere considerate semplicemente come minuscole sfere di vetro un po' più poroso, che si distinguono dal materiale *bulk* per proprietà che derivano esclusivamente da fattori geometrici. L'aumento dell'area superficiale comporta che diversi comparti spaziali (*bulk*, superficie, pori, eventualmente strati) abbiano, nelle nanoparticelle, un'estensione paragonabile e possano quindi essere sfruttati simultaneamente per organizzare strutture complesse. La funzionalizzazione differenziale di queste regioni con specie organiche diverse permette di costruire sistemi nei quali molte componenti interagiscono per svolgere funzioni complesse, realizzando, per esempio, nuovi motivi di riconoscimento molecolare, o sistemi in grado di rispondere agli stimoli esterni.^{3,4} Quello che rende le nanoparticelle di silice così interessanti, però, non sono solo le piccole dimensioni: il basso costo, la facile preparazione, la trasparenza alla luce, l'inerzia chimica, la biocompatibilità e la stabilità colloidale in acqua sono tutti vantaggi decisivi.

Stabilità colloidale

Una delle proprietà più interessanti delle nanoparticelle è la possibilità di realizzare sistemi basati su piattaforme solide che possano funzionare in soluzione. La capacità di questi solidi di dimensioni nanometriche di rimanere sospesi in un liquido è il risultato di un delicato equilibrio. Per comprendere meglio le implicazioni della stabilità colloidale è utile conoscere i principi fisici alla base di questo fenomeno.

Per effetto del moto browniano, le nanoparticelle in soluzione collidono continuamente. Sono i potenziali a corto raggio, attrattivi e repulsivi, a determinare se una dispersione colloidale è stabile^a o instabile rispetto all'aggregazione. Nelle dispersioni instabili le collisioni portano alla formazione di aggregati, che possono crescere fino a che l'effetto della gravità vince l'agitazione termica e li fa sedimentare.

Tramite un'opportuna funzionalizzazione della superficie è possibile controllare le interazioni repulsive, stabilizzando le nanoparticelle. Esistono due tipi di stabilizzazione: la stabilizzazione elettrostatica, e la stabilizzazione sterica, che si ottiene funzionalizzando la superficie con catene polimeriche (idrofobiche o idrofiliche, come il polietilenglicole, a seconda del solvente).

^a Non necessariamente in senso termodinamico: spesso la stabilità di un sistema colloidale è solo cinetica.

Forze attrattive: la formula di Hamaker

I potenziali di van der Waals tra due molecole decadono con la distanza come r^{-6} . Il calcolo dell'interazione tra due corpi estesi non è banale; l'approccio più semplice, suggerito da Hamaker nel 1937,⁵ consiste nel sommare tutte le interazioni tra coppie di atomi nei due corpi per determinare il potenziale di coppia^b. Il risultato per due sfere identiche di raggio R le cui superfici si trovano a distanza $d \ll R$ tra loro è

$$V_A = \sum_i \sum_j - \frac{const}{\|\vec{r}_i - \vec{r}_j\|} \cong \frac{AR}{12d}$$

dove \vec{r}_i e \vec{r}_j sono le posizioni degli atomi in ciascuna sfera, e A è la costante di Hamaker, che dipende dal materiale ma è tipicamente dell'ordine dei 10–20 J. Per tenere conto della presenza di un mezzo tra le particelle si usa una costante di Hamaker efficace.⁵

Forze repulsive: il doppio strato elettrico

Le superfici dei colloidali possono essere cariche per diversi motivi: adsorbimento di specie cariche, equilibri acido-base di gruppi superficiali, accumulo o impoverimento di elettroni vicino alla superficie. Nel caso delle nanoparticelle di silice la carica superficiale deriva dalla deprotonazione dei silanoli.

Il campo elettrico generato dalla superficie tende a separare gli ioni in soluzione, attraendo una nuvola di controioni (di carica opposta). Al tempo stesso, l'agitazione termica tende a ripristinare una distribuzione uniforme delle diverse specie ioniche. La distribuzione complessiva delle cariche è determinata dal bilancio di queste due tendenze e può essere descritta con un modello detto del doppio strato elettrico:⁵ in una sottile zona prossima alla superficie (strato di Stern) sono presenti solo controioni fortemente legati e il potenziale elettrostatico decade linearmente con la distanza. Oltre questo strato, separata da una superficie chiamata piano di Stern, c'è una zona più spessa (strato di Gouy o strato diffuso) in cui la concentrazione di controioni diminuisce e quella di coioni aumenta fino ad eguagliare asintoticamente la concentrazione n_0 nel *bulk* della soluzione. In questa zona il potenziale decade esponenzialmente secondo la legge di Deybe-Hückel, che per una superficie piana ha la forma

$$V(d) = V_0 e^{-\kappa d}$$

^b Il potenziale di coppia rappresenta l'energia necessaria per portare due corpi dall'infinito fino ad una determinata distanza reciproca.

dove V_0 è il potenziale sul piano di Stern, d la distanza dal piano di Stern, e κ il reciproco della lunghezza caratteristica dello smorzamento, detta lunghezza di Debye-Hückel,

$$\kappa^{-1} = \sqrt{\frac{\epsilon k_B T}{2e^2 I}}$$

con ϵ costante dielettrica del solvente e $I = \frac{1}{2} \sum_i c_i z_i^2$ forza ionica della soluzione, cioè la somma su tutte le specie ioniche del prodotto della molarità c_i per il quadrato della carica z_i .

Le cariche libere in soluzione quindi schermano il campo generato dalle cariche sul colloide, con un'efficacia che si può misurare con lo spessore del doppio strato e che quindi diminuisce con l'aumentare della forza ionica. Quando due colloidi carichi si avvicinano non sentono repulsione elettrostatica finché i doppi strati non si sovrappongono. A quel punto, il potenziale elettrostatico diventa, per due sfere di raggio uguale e potenziali di Stern uguali,

$$V_0 \cong 2\pi\epsilon R V_0^2 e^{-\kappa d}$$

La teoria DLVO e la stabilità colloidale

Per valutare la stabilità colloidale occorre conoscere il potenziale d'interazione di coppia in funzione della distanza tra due particelle. La stabilità dipende dall'esistenza di minimi profondi di potenziale, e dall'altezza di eventuali barriere di potenziale che le particelle devono attraversare per giungervi. Da questi fattori dipende l'efficienza delle collisioni, ovvero la probabilità che in seguito ad una collisione due particelle rimangano legate, e quindi la velocità con cui le particelle si aggregano. Un sistema colloidale è stabile se non esistono minimi profondi (efficienza nulla, le particelle non si aggregano) o se esiste una barriera di potenziale sufficientemente alta rispetto al quanto termico ($5 k_B T$) da rendere trascurabile l'efficienza delle collisioni e quindi la velocità di aggregazione. In questo caso il sistema è metastabile. Se il potenziale è sempre attrattivo tutte le collisioni risultano nella formazione di un legame, e la velocità di aggregazione è limitata solamente dalla diffusione dei colloidi in soluzione.⁵

Nella teoria DLVO^c si assume che le forze di van der Waals (attrattive) e le forze elettrostatiche (repulsive) siano indipendenti e che il potenziale d'interazione tra due colloidi sia quindi pari alla somma dei due potenziali:

^c Il nome deriva dagli autori che l'hanno formulata negli anni '40: Derjaguin e Landau e, indipendentemente, Verweij e Overbeek.

$$V(d) = V_A(d) + V_R(d) = -\frac{AR}{12d} + 2\pi\epsilon RV_0^2 \ln(1 + e^{-\kappa d})$$

Si ottengono così delle curve di potenziale come quelle rappresentate in figura 2.

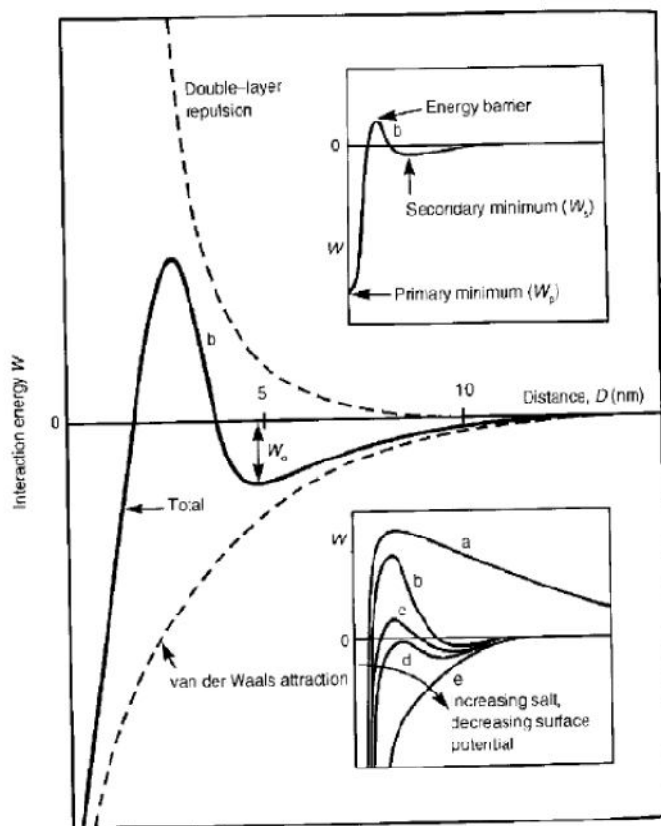


Figura 2. Potenziali di interazione di coppia nella teoria DLVO.

Si può osservare che esiste sempre un minimo profondo dovuto alle forze di van der Waals, mentre l'esistenza di un'eventuale barriera di potenziale dipende dalla componente elettrostatica: l'altezza della barriera dipende dalla carica superficiale (attraverso V_0) e dalla forza ionica della soluzione (attraverso κ). Al diminuire della carica o all'aumentare della forza ionica, la barriera di potenziale tende ad abbassarsi (curve b, c, d in figura 2) fino a scomparire (curva e).

Una caratteristica peculiare di questi potenziali è la possibilità che esista di un minimo secondario (curve b, c, d). Se il minimo è poco profondo rispetto a $k_B T$, le collisioni danno luogo ad una flocculazione facilmente reversibile.

La stabilizzazione sterica

La stabilizzazione sterica si ottiene decorando la superficie delle particelle con polimeri o lunghe catene alchiliche, ed è dovuta a due effetti concomitanti, uno entropico, l'altro

osmotico. Se due particelle si avvicinano abbastanza da permettere alle catene di interpenetrarsi, la restrizione del loro moto diminuisce l'entropia configurazionale e quindi (assumendo trascurabile l'entalpia di *mixing*) aumenta l'energia libera. Nello stesso tempo, nello spazio tra le due particelle aumenta la concentrazione di molecole adsorbite; questo causa una repulsione osmotica, dovuta al solvente che fluisce per ristabilisce l'equilibrio diluendo le molecole e allontanando le particelle.⁵

Il termine entropico è significativo solo a distanze molto corte, mentre il termine osmotico è dominante a distanze intermedie. Il termine osmotico del potenziale di repulsione dipende soprattutto da χ , il parametro di Flory-Huggins, che misura l'interazione tra il solvente e il polimero, e dalla lunghezza della catena.

Sintesi

Le nanoparticelle di silice sono comunemente preparate per polimerizzazione di opportuni precursori, come silicati e alcossidi o cloruri di silicio (figura 3).² Oltre ai processi industriali, che si basano per lo più sulla condensazione del sodio silicato in acqua indotta dalla rimozione del sodio per scambio ionico, sono note tre diverse metodologie sintetiche, attualmente usate nei laboratori di ricerca per preparare nanoparticelle di silice drogate con specie organiche.

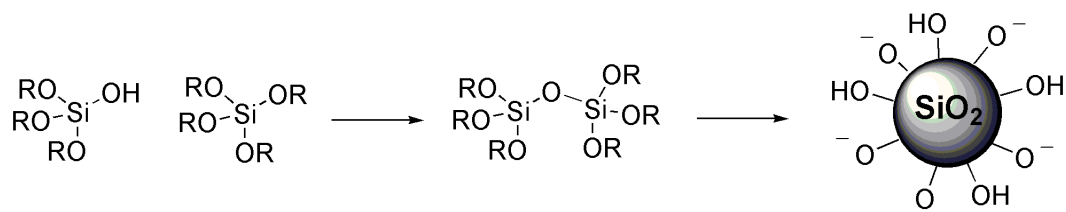


Figura 3. Sintesi generale di nanoparticelle di silice (R = H, gruppo alchilico)

Sintesi di Stöber

Il primo metodo, proposto da Kolbe nel 1956⁶ e sviluppato da Stöber nei tardi anni '60,⁷ consente di preparare nanoparticelle di silice di diametro compreso tra 50 e 100 nm per idrolisi e condensazione di un alcossido di silicio (il più comune è il tetraetossilano, o TEOS) in soluzioni etanoliche contenenti acqua e ammoniaca. L'alcol serve per solubilizzare gli alcossisilani, mentre l'ammoniaca funge da catalizzatore secondo il meccanismo rappresentato in figura 4.

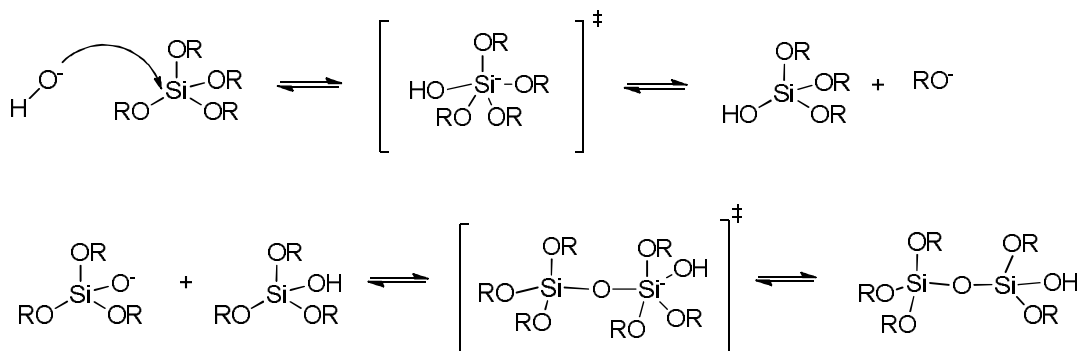


Figura 4. Meccanismo delle reazioni di idrolisi e condensazione degli alcossisilani catalizzate da una base.

Il meccanismo della reazione è stato studiato in dettaglio via $^{29}\text{Si-NMR}$ e $^{13}\text{C-NMR}$, *light scattering* e microscopia elettronica in trasmissione (TEM).⁸ Una volta idrolizzati, i monomeri condensano immediatamente formando piccoli oligomeri che agiscono come centri di nucleazione. Dopo un periodo iniziale di aggregazione degli oligomeri, la crescita delle nanoparticelle prosegue per condensazione dei monomeri idrolizzati sulla superficie dei nuclei già formati. La crescita delle particelle mediante reazioni monomero-polimero produce una distribuzione finale delle dimensioni relativamente stretta.

Queste osservazioni sperimentali possono essere spiegate considerando il meccanismo dell'idrolisi e della condensazione degli alcossisilani, schematizzato in figura 4. Entrambe sono reazioni di sostituzione nucleofila bimolecolare che decorrono attraverso uno stato di transizione pentacoordinato carico negativamente. La velocità della reazione dipende dalla capacità dei gruppi che circondano l'atomo di silicio di stabilizzare cariche negative. Poiché l'effetto elettronattrattore dei sostituenti sull'atomo di silicio cresce secondo l'ordine $-\text{OEt} < -\text{OH} < -\text{OSi}(\text{O})_3$, l'idrolisi del primo legame Si-OEt del TEOS è la reazione più lenta.

La condensazione dei monomeri idrolizzati e parzialmente idrolizzati, più veloce dell'idrolisi, avviene per attacco di un gruppo Si-O^- all'atomo di silicio di un'altra specie. In questo caso, i sostituenti legati agli atomi di silicio agiscono modulando l'acidità dei gruppi Si-OH : i gruppi ossidrilici di specie condensate risultano più acidi, a causa dell'effetto elettronattrattore dei gruppi $-\text{OSi}(\text{O})_3$. I monomeri idrolizzati, meno deprotonati, reagiscono preferenzialmente con le specie polimerizzate piuttosto che con altri monomeri. Questa considerazione spiega il verificarsi, osservato sperimentalmente, di sole reazioni di condensazione monomero-polimero e la stretta distribuzione delle dimensioni.

Le dimensioni finali dipendono principalmente dalla quantità di acqua e ammoniaca nella miscela di reazione e possono essere controllate in un intervallo compreso tra 20 e diverse centinaia di nanometri. Il controllo sulle dimensioni è determinato essenzialmente dalla stabilità colloidale nelle condizioni di reazione, e dalla quantità di precursore introdotto. Nei primi stadi della reazione, i piccoli oligomeri formati tendono ad aggregare per formare nanoparticelle di dimensioni maggiori. L'aggregazione si interrompe, per cedere il posto alle reazioni monomero-polimero, solo quando le nanoparticelle raggiungono la stabilità colloidale. Come già accennato, la stabilizzazione delle particelle di silice dipende principalmente dalla repulsione elettrostatica tra le superfici cariche negativamente. In presenza di concentrazioni elevate di ammoniaca, l'aumento della forza ionica indebolisce le repulsioni elettrostatiche. L'aggregazione degli oligomeri, perciò, continua fino a dimensioni maggiori, e si ottengono poche nanoparticelle di dimensioni notevoli e di forma sferica. A basse concentrazioni di ammoniaca, invece, l'aggregazione degli oligomeri si interrompe velocemente producendo un numero elevato di particelle più piccole che agiscono come centri di nucleazione. Queste condizioni forniscono molte nanoparticelle di piccola dimensione e di forma non perfettamente sferica.

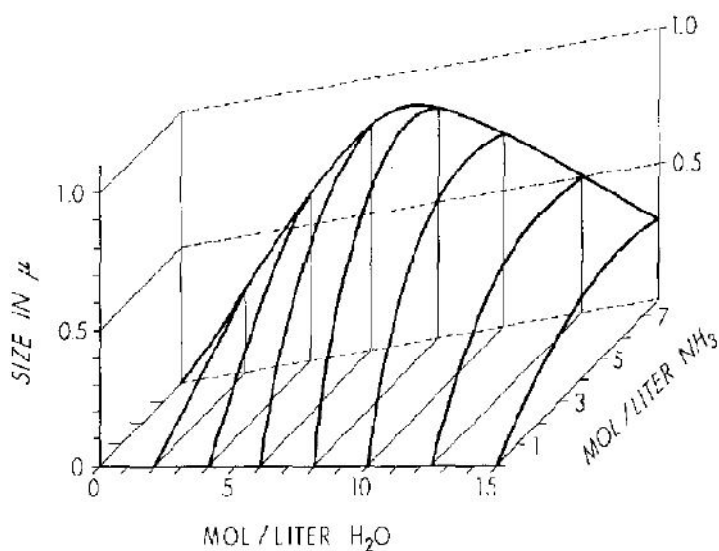


Figura 5. Dimensione finale delle particelle sintetizzate in etanolo a una concentrazione di 0.28 M di TEOS, in presenza di concentrazioni diverse di acqua ed ammoniaca.

Le nanoparticelle preparate con il metodo di Stöber sono meno dense, e quindi più porose, rispetto alla silice amorfa.^{8,9} Dal punto di vista morfologico, sono relativamente monodisperse e di forma variabile, da quella irregolare delle particelle più piccole a quella quasi perfettamente sferica delle più grandi (figura 1).

Gli approfonditi studi condotti da van Blaaderen nei primi anni '90 hanno dimostrato la possibilità di includere specie organiche nel reticolo di silice attraverso legami covalenti, semplicemente aggiungendo organoalcossisilani alla miscela di reazione.^{10,11} La funzionalizzazione della superficie può essere condotta anche in un secondo tempo, per condensazione di organoalcossisilani con i silanoli superficiali di particelle pre-formate.¹² Gli stessi autori hanno anche dimostrato come aggiunte successive di precursori alla miscela di reazione permettano di ottenere facilmente strutture a strati con una procedura *one-pot*, condotta cioè senza isolare le strutture intermedie.¹⁰

Sintesi in microemulsioni inverse

Il secondo metodo di sintesi, sviluppato nei primi anni '90 da Arriagada e Osseo-Asare, prevede la polimerizzazione del TEOS in microemulsioni inverse, in condizioni di catalisi basica.^{13,14} Le piscine acquose delle microemulsioni forniscono uno spazio confinato per la crescita delle particelle, agendo come una sorta di "nanoreattori". Questa procedura permette di ottenere particelle perfettamente sferiche e altamente monodisperse, le cui dimensioni finali sono determinate dal rapporto tra acqua e solvente organico, e possono variare tra 20 e 100 nm. Molecole idrofiliche o persino nanoparticelle più piccole aggiunte alla miscela di reazione rimangono intrappolate nella matrice di silice dando origine a strutture drogate.¹⁵ A differenza del metodo di Stöber, la funzionalizzazione del drogante con gruppi trialcossisilano in questo caso non è necessaria. Le nanoparticelle possono essere funzionalizzate in superficie e coniugate con biomolecole per condensazione con organoalcossisilani o direttamente per trasformazione dei gruppi silanoliche superficiali in siti dotati di una diversa reattività.¹⁶

Sintesi in micelle

Una terza strategia sintetica è stata proposta recentemente da Prasad, che ha dimostrato la polimerizzazione di organoalcossisilani lipofili come il viniltrietossisilano (VTES) in soluzioni micellari acquose. Come il metodo delle microemulsioni inverse, descritto nel paragrafo precedente, anche questa procedura fornisce particelle sferiche altamente monodisperse con diametri compresi tra 10 e 80 nm. Diversamente dai metodi appena descritti, la procedura di Prasad non fornisce nanoparticelle di silice pura, ma reticoli di silice modificata con gruppi organici (ORMOSIL, *ORGanically MODified SILica*). Poiché gli organoalcossisilani usati come precursori possono partecipare alla formazione del reticolo con non più di tre legami a ponte di ossigeno, le particelle risultano più porose di

quelle ottenute da alcossisilani inorganici. Le nanoparticelle possono essere drogate aggiungendo alla miscela di reazione molecole lipofile, che rimangono intrappolate nella struttura in crescita.^{17,18}

Nanoparticelle fluorescenti

Le applicazioni della fluorescenza rivestono un ruolo chiave in un numero crescente di discipline, dalla biologia molecolare, alla chimica analitica, all'optoelettronica. L'elevata risoluzione spaziale e temporale, insieme a un eccellente rapporto segnale-rumore, rendono la fluorescenza un metodo ideale per lo studio della struttura e della dinamica della materia e dei sistemi viventi su scala molecolare e nanometrica.

I fluorofori più comunemente usati, molecole organiche o complessi metallici, presentano di frequente problemi di luminosità e fotostabilità. Questi limiti possono essere superati attraverso l'incapsulazione in nanoparticelle ceramiche o polimeriche. L'inclusione di fluorofori organici in nanoparticelle di silice, in particolare, offre numerosi vantaggi. La silice rappresenta una matrice ideale, trasparente alla luce visibile e relativamente inerte rispetto ai processi fotofisici. I fluorofori, protetti dall'ambiente esterno, godono di una elevata resistenza al *photobleaching*. L'esclusione del solvente dal loro microintorno può impedire il quenching collisionale e aumentare la resa quantica di fluorescenza.¹⁹ Anche l'esclusione dell'ossigeno dal nucleo delle particelle idrofiliche può causare un aumento della fotostabilità.¹⁶ Una singola particella, inoltre, drogata con un numero elevato di molecole di colorante, è ovviamente molto più facile da rivelare rispetto a una singola molecola.²⁰ Per lo stesso motivo, la luminosità delle nanoparticelle di silice drogate con fluorofori può, in certi casi, avvicinarsi persino a quella dei *quantum dot* (Figure 6).²¹ Infine, la preparazione, funzionalizzazione superficiale e bioconiugazione delle nanoparticelle di silice sono molto più facili rispetto a quelle dei *quantum dot* o delle nanoparticelle polimeriche.¹⁶

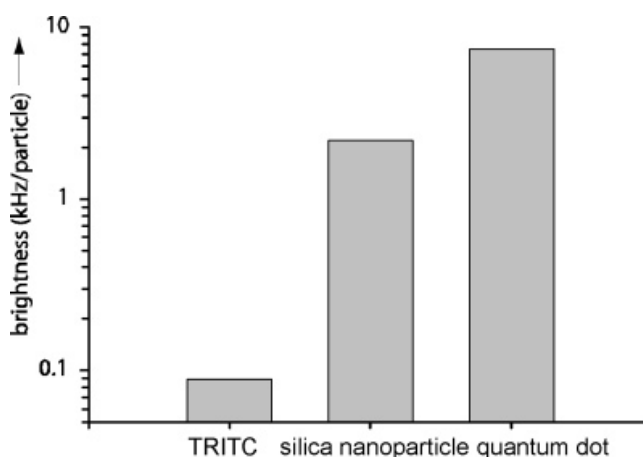


Figura 6. Confronto della luminosità di tetrametilrodamina isotiocianato (TRITC), nanoparticelle di silice drogate con TRITC (20 nm) e *quantum dot* di CdSe/ZnS (28 nm di diametro).²¹

La disponibilità di protocolli sintetici per ottenere nanoparticelle di silice drogate con molecole organiche ha aperto la strada all'applicazione di questi nanosistemi fluorescenti in una varietà di campi. Per esempio, l'uso di nanoparticelle di silice contenenti fluorofori e coniugate con molecole biologicamente attive, come agenti di *targeting* o anticorpi, ha consentito di migliorare la sensibilità di diversi saggi fluorimetrici come ELISA, FIA e saggi basati su microarray.^{22,16}

L'inclusione di fluorofori nelle nanoparticelle di silice ha permesso anche di realizzare sonde intracellulari più efficienti, nelle quali la silice trasporta la specie sensibile attraverso la membrana cellulare e la protegge dalle interferenze della matrice.^{23,24,25,26} Come vedremo più avanti, la possibilità di confinare fluorofori diversi dentro la stessa particella permette la progettazione di schemi di *sensing* più complessi.

Infine, le nanoparticelle di silice sono state recentemente usate come piattaforme per auto-organizzare unità di *sensing*, per esempio ottenendo funzioni complesse dall'organizzazione spaziale di diverse entità molecolari nei compartimenti della particella.^{3,27,28,4}

Il trasporto e il rilascio di farmaci, altri importanti campi di applicazione, saranno presentati nei capitoli 2 e 5.

Saggi biochimici

La sensibilità dei saggi fluorimetrici può essere migliorata significativamente usando nanoparticelle di silice drogate con coloranti fluorescenti. Questo approccio è stato sfruttato per la prima volta, e successivamente investigato a fondo, da Tan e

collaboratori. Il fluoroforo scelto da questi autori è il tris(2,2'-bipiridil)diclororutenio(II) cloridrato (RuBPY), carico positivamente e idrosolubile, che può essere facilmente incluso in nanoparticelle di silice preparate usando il metodo delle microemulsioni inverse. La complementarità di carica con la matrice di silice ne impedisce la fuoriuscita dalle particelle.¹⁶

I gruppi silanolicci sulla superficie delle particelle possono quindi essere funzionalizzati seguendo diverse procedure. Le nanoparticelle possono essere fatte reagire dopo la sintesi con alcossisilani commercialmente disponibili recanti gruppi tiolici o amminici.^{29,30} In alternativa, gli stessi reagenti possono essere aggiunti alla microemulsione per ottenere nanoparticelle funzionalizzate in superficie con una procedura *one-pot*.³¹ Le funzioni amminiche possono essere convertite in gruppi carbossilici o aldeidici per reazione con anidride succinica o glutaraldeide.^{29,32} Per la coniugazione con biomolecole contenenti altri gruppi amminici, a questo punto, si possono sfruttare reazioni di *coupling* standard.³⁰ Recentemente è stata riportata la preparazione diretta di nanoparticelle carbossi-funzionalizzate per semplice aggiunta di carbossietilsilantriolo alla microemulsione.³³ Un diverso approccio alla funzionalizzazione della superficie prevede l'attivazione diretta dei gruppi silanolicci per reazione con bromuro di cianogeno. I gruppi isocianato risultanti possono essere immediatamente sfruttati per l'immobilizzazione covalente di biomolecole.³⁴

Le nanoparticelle coniugate con anticorpi possono essere usate per biomarcatura o *bioimaging*. Sono state riportate, per esempio, diverse applicazioni per la rivelazione di cellule leucemiche e di altri tipi di cancro.^{34,35,36} In esempi molto recenti, piccole nanoparticelle magnetiche e *quantum dot* sono state incluse in nanoparticelle di silice più grandi per realizzare sistemi di *imaging* multimodale (emissione duale, fluorescenza e risonanza magnetica).^{37,38,39,40} In un approccio simile, di nuovo proposto da Tan e collaboratori, nanoparticelle di silice drogate con nanoparticelle magnetiche o specie fluorescenti, coniugate con anticorpi in entrambi i casi, sono state usate per la separazione magnetica e la rivelazione fluorescente di cellule tumorali (figura 7).^{41,42}

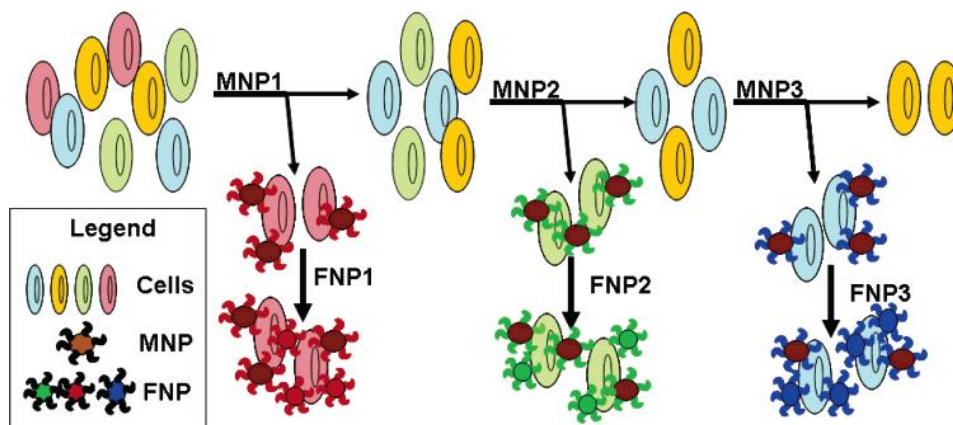


Figura 7. Rappresentazione schematica della procedura di estrazione multipla con nanoparticelle di silice coniugate con anticorpi e drogate con nanoparticelle magnetiche (MNP), che vengono aggiunte ed estratte passo passo, e le corrispondenti nanoparticelle di silice coniugate con anticorpi drogate con specie fluorescenti (FNP), che vengono aggiunte dopo l'estrazione magnetica di campioni di cellule.⁴²

Le nanoparticelle fluorescenti bioconiugate possono essere molto utili anche come sonde fluorescenti in saggi immunologici, il più popolare dei quali è il metodo del saggio immunologico a *sandwich*. Secondo questo protocollo (figura 8), una soluzione contenente l'antigene viene introdotta nel pozzetto di analisi, la cui superficie è ricoperta con il corrispondente anticorpo. Si aggiungono quindi nanoparticelle coniugate con lo stesso anticorpo per formare complessi *sandwich* con gli antigeni legati alla superficie. Dopo il lavaggio finale, l'emissione di fluorescenza residua misurata nella soluzione di lavaggio viene convertita nella concentrazione dell'analita. L'elevata fotostabilità e luminosità delle nanoparticelle fluorescenti, permette un decisivo miglioramento della sensibilità del saggio spingendo il limite di rivelabilità fino a discriminare la presenza di analiti in tracce.^{32,30,43,44,45,46}

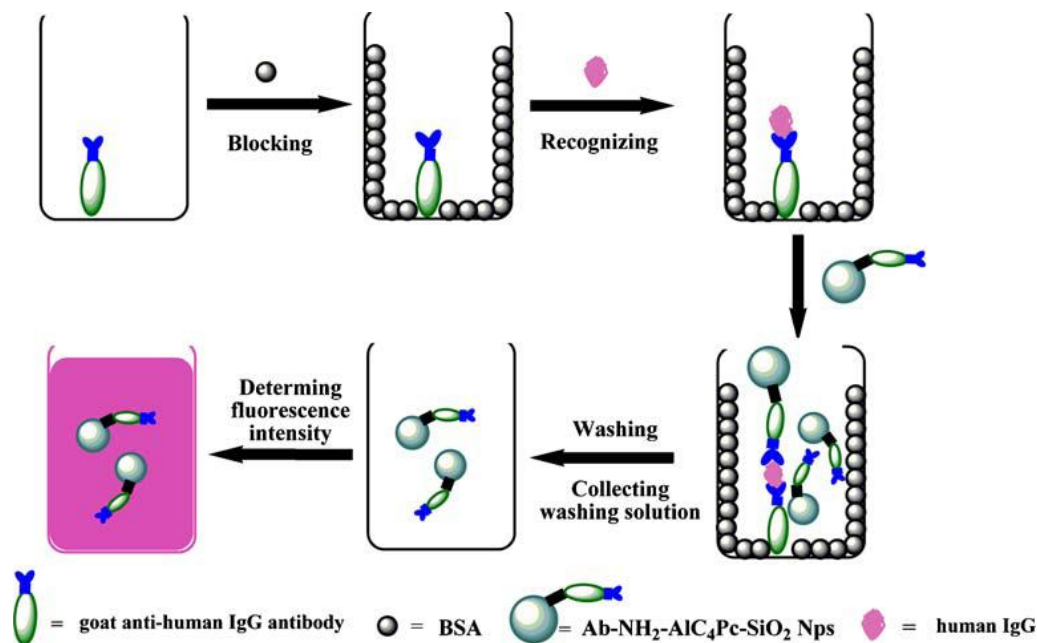


Figura 8. Schema del saggio fluoroimmunologico a *sandwich* per la determinazione di IgG (Immunoglobulina G) umana con nanoparticelle di silice coniugate con anticorpo IgG di capra anti-umano (Ab-NH₂-AlC₄Pc-SiO₂ Nps).⁴³

L'uso di nanoparticelle di silice drogate con complessi tra lantanidi e leganti antenna può garantire ulteriori vantaggi. I lunghi tempi di vita di questi fluorofori inorganici consentono una migliore discriminazione tra segnale e rumore in misure risolte nel tempo. Inoltre, gli ampi *Stokes shift* e le strette bande di emissione contribuiscono a eliminare ulteriormente le interferenze. L'emissione di fluorescenza è comunque generalmente più debole rispetto alle specie fluorescenti organiche, precludendone l'uso in saggi biochimici che richiedono sensibilità elevata. L'inclusione di un numero elevato di complessi in una singola nanoparticella fornisce una eccellente soluzione a questo problema.^{47,48,49,50}

Sonde intracellulari: sensori PEBBLE

Nella ricerca medica e biologica, quando le dimensioni dei campioni si riducono alle dimensioni delle cellule o dei loro compartimenti, poter effettuare in tempo reale misure non invasive dei parametri fisici e chimici con elevata risoluzione spaziale diventa estremamente importante e altrettanto difficile. Le sonde convenzionali sono basate su chemosensori,⁵¹ molecole che possono riconoscere selettivamente e segnalare la presenza di un analita specifico, o fibre ottiche chimicamente modificate.⁵² Le dimensioni molecolari dei chemosensori evitano la perturbazione fisica delle cellule ma li espongono a interferenze chimiche, quali legami con proteine o membrane, che possono dare luogo

ad alterazioni della risposta, al sequestro della sonda o a risposte citotossiche. Al contrario, le fibre ottiche chimicamente modificate proteggono il fluorescente dalle interferenze chimiche ma sono estremamente invasive. Nei tardi anni '90 Kopelman e collaboratori hanno proposto un nuovo approccio al *sensing* intracellulare, che combina la minuscola impronta fisica dei chemosensori liberi con l'inerzia chimica dei sensori a fibra ottica.⁵³ Questi nuovi sensori sono stati chiamati PEBBLE, acronimo di *Probes Encapsulated By Biologically Localized Embedding* o, più recentemente, *Photonic Explorers for Bioanalysis with Biologically Localized Embedding*.^{24,25}

I sensori PEBBLE sono nanoparticelle solubili in acqua basate su matrici biologicamente inerti di polimeri reticolati, tipicamente poliacrilammide, polidecilmacrilato, silice, o silice modificata con gruppi organici (ORMOSIL), che incapsulano un chemosensore fluorescente e, spesso, un fluorescente di riferimento. Queste matrici sono state usate per realizzare sensori per il pH, per ioni metallici, e persino per specie non ioniche. Le piccole dimensioni dei sensori PEBBLE (da 20 a 600 nm) consentono loro un ingresso non invasivo nelle cellule, con interferenze fisiche minime. La natura semi-permeabile e trasparente della matrice consente all'analita di interagire con chemosensore, che riporta l'interazione attraverso una variazione della fluorescenza emessa. Un'altra importante caratteristica dei sensori PEBBLE è la possibilità di combinare fluorescenti e ionofori multipli in modo da realizzare schemi di *sensing* complessi, per esempio usando fluorescenti di riferimento per il sensing raziometrico o combinazioni ionoforo/fluoroforo che consentono l'uso di ionofori altamente selettivi ma non fluorescenti.

I sensori PEBBLE di silice sono tipicamente preparati, seguendo una variazione del protocollo di Stöber, per condensazione di TEOS e polietilenglicole (PEG) in presenza dei componenti di *sensing* che rimangono fisicamente intrappolati nella matrice della nanoparticella. I sensori vengono ricoperti con PEG allo scopo di aumentarne la biocompatibilità.⁵⁴ Una variazione di questo schema è rappresentata dai sensori ORMOSIL preparati crescendo uno strato di metiltrimetossisilano su una particella preformata ottenuta per condensazione di feniltrimetossisilano. I componenti di *sensing* vengono aggiunti prima della formazione del secondo strato e rimangono intrappolati in questo guscio esterno. Entrambi i tipi di sensori sono particolarmente adatti alla realizzazione di sistemi raziometrici, ottenuti generalmente intrappolando un fluorescente sensibile all'analita e uno di riferimento insensibile all'analita. Per esempio, Kopelman e collaboratori⁵⁵ hanno riportato la realizzazione di un sensore raziometrico per ossigeno intracellulare ottenuto includendo in PEBBLE di silice, con diametri compresi tra 100 e 400 nm, il complesso di rutenio $[\text{Ru}(\text{dpp})_3]^{2+}$ e il fluorescente Oregon

Green 488 (figura 9). L'ossigeno, che spegne l'emissione di fluorescenza di $[\text{Ru}(\text{dpp})_3]^{2+}$ ma non quella dell'Oregon Green, può così essere determinato in modo raziometrico. Questi sensori PEBBLE sono stati inseriti in cellule viventi per seguire le variazioni del livello di ossigeno nel citosol. Risultati simili sono stati riportati dallo stesso gruppo di ricerca⁵⁶ usando PEBBLE ORMOSIL di 120 nm di diametro drogati con una porfirina di platino sensibile all'ossigeno (platino(II) ottaetilporfirina chetone) e ottaetilporfirina come fluorescente di riferimento. Rispetto al sensore precedente, il sensore ORMOSIL mostra una sensibilità più alta, una più ampia risposta lineare e lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione più adatte alle misure intracellulari.

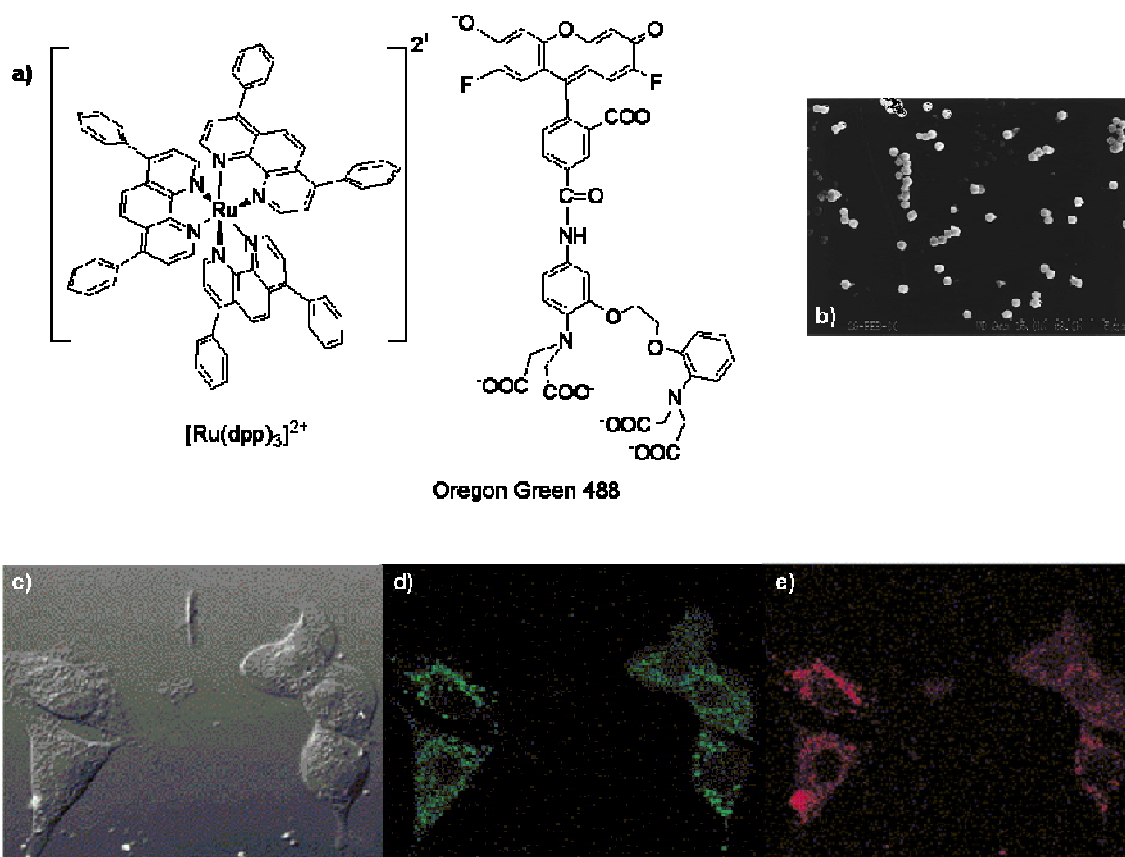


Figura 9. a) Strutture chimiche dei fluorescenti usati per la preparazione del sensore di ossigeno PEBBLE riportato da Kopelman. b) Immagini SEM che mostrano la distribuzione dimensionale di particelle funzionalizzate con PEG prodotte con il metodo di Stöber modificato. Barra di scala 5 μm . c-e) Immagini confocali di cellule C6 di glioma di ratto caricate con PEBBLE che mostrano la colocalizzazione dei due fluorescenti. c) Immagine in *bright field*. d) Fluorescenza dell'Oregon Green nei PEBBLE all'interno delle cellule. e) Fluorescenza del $[\text{Ru}(\text{dpp})_3]^{2+}$ nei PEBBLE all'interno delle cellule.⁵⁵

Il confinamento di un numero relativamente elevato di molecole fluorescenti nel piccolo volume delle nanoparticelle può dare origine a fenomeni collettivi non osservabili in

soluzione. Questo effetto è stato sfruttato da Prasad e collaboratori per realizzare un sensore di pH basato su una matrice ORMOSIL.⁵⁷ La co-condensazione in soluzione micellare acquosa di un trietossisilil derivato fluorescente della naftalenvinilpiridina (NVP) con VTES dà origine a nanoparticelle di silice di forma sferica di 33 nm di diametro nelle quali il fluorescente è legato covalentemente alla matrice di silice e uniformemente distribuito nel volume della nanoparticella. I fluorescenti NVP rispondono in modo raziometrico al pH, con uno spostamento batocromico della fluorescenza dal blu della forma neutra al giallo della forma protonata. L'assorbimento della specie protonata, inoltre, si sposta anch'esso a lunghezze d'onda più alte sovrapponendosi all'emissione blu della specie neutra. La sovrapposizione spettrale e le piccole dimensioni delle nanoparticelle rendono possibile un trasferimento di energia di tipo FRET (*Förster Resonance Energy Transfer*) dalle molecole protonate, concentrate in uno strato superficiale, alle molecole neutre, concentrate nel nucleo. Il processo FRET, reso possibile dall'organizzazione spaziale del fluorescente nello spazio della nanoparticella, amplifica il segnale emesso aumentando la sensibilità del sensore. Inoltre, questo processo aumenta il pK_a apparente del fluorescente a 6.4, un valore particolarmente adatto alle applicazioni biologiche.

Un secondo esempio di processi collettivi resi possibili dall'organizzazione dei fluorofori nelle nanoparticelle è stato riportato da Montalti e collaboratori.⁵⁸ Questi autori hanno preparato nanoparticelle di silice (30 nm di diametro) drogate con una poliammina dansilata, ottenuta per reazione del dansil cloruro con 3-[2-(2-amminoetilammino)etilammino]propiltrimetossisilano. Il recettore poliamminico lega con affinità relativamente elevata gli ioni metallici, e l'aggiunta di rame(II), cobalto(II) e nickel(II) provoca lo spegnimento dell'emissione di fluorescenza dell'unità dansilica. È interessante che lo spegnimento osservato sia molto più intenso del previsto, consentendo la rivelazione di concentrazioni nanomolari di metalli. Questo effetto è stato attribuito a processi fotofisici cooperativi favoriti dal denso impaccamento dei fluorescenti nella nanoparticella. Il riconoscimento di un singolo analita provoca cioè lo spegnimento di molti fluorofori vicini. Un singolo ione rame, per esempio, è in grado di spegnere 13 unità dansiliche, e il risultato è una forte amplificazione del segnale.

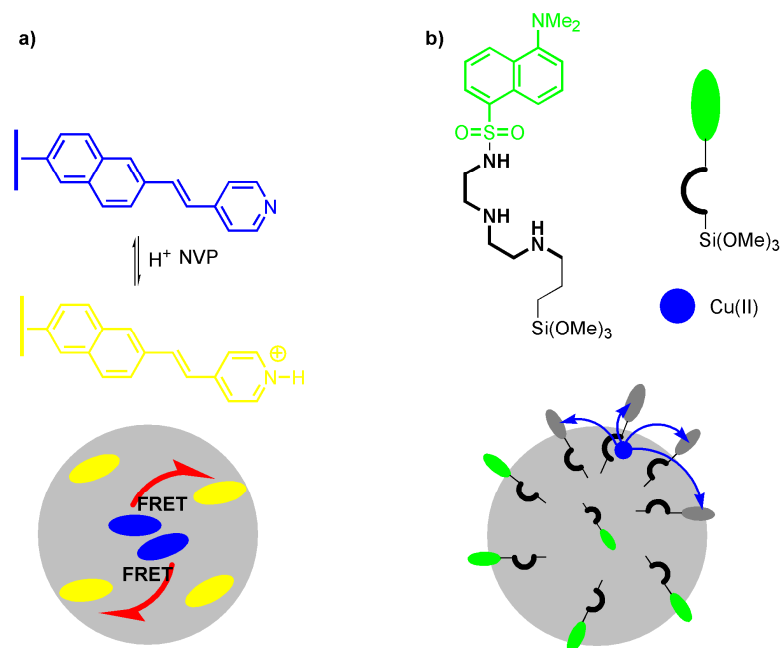


Figura 10. Esempi di effetti collettivi in nanoparticelle di silice. a) Un processo di trasferimento energetico dall’NVP neutro all’interno delle particelle a quello protonato sulla superficie amplifica il segnale emesso;⁵⁷ b) la complessazione di un singolo ione $Cu(II)$ (cerchio blu) spegne l’emissione di diversi (fino a 13) fluorescenti dansilammidici situati in prossimità, dando origine a un aumento della sensibilità.⁵⁸

Bibliografia

1. Feldheim, D.L. & Foss, C.A. *Metal Nanoparticles: Synthesis, Characterization and Applications* 1-14 (2002)
2. Bergna, H.E. & Roberts, W.O. *Colloidal silica*. (CRC Press: 2006).
3. Burns, A., Ow, H. & Wiesner, U. Fluorescent core-shell silica nanoparticles: towards "Lab on a Particle" architectures for nanobiotechnology. *Chemical Society Reviews* **35**, 1028-1042 (2006).
4. Slowing, I., Trewyn, B.G., Giri, S. & Lin, V.S.Y. Mesoporous silica nanoparticles for drug delivery and biosensing applications. *Advanced Functional Materials* **17**, 1225-1236 (2007).
5. Israelachvili, J.N. *Intermolecular and Surface Forces, Third Edition*. (Academic Press: 2010).
6. Kolbe, G. *Ph.D. Thesis* (1956).
7. Stöber, W., Fink, A. & Bohn, E. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *Journal of Colloid and Interface Science* **26**, 62-69 (1968).
8. Vanblaaderen, A., Vangeest, J. & Vrij, A. Monodisperse Colloidal Silica Spheres From Tetraalkoxysilanes - Particle Formation And Growth-Mechanism. *Journal Of Colloid And Interface Science* **154**, 481-501 (1992).
9. Vanblaaderen, A. & Kentgens, A.P.M. Particle Morphology And Chemical Microstructure Of Colloidal Silica Spheres Made From Alkoxysilanes. *Journal Of Non-Crystalline Solids* **149**, 161-178 (1992).
10. Vanblaaderen, A. & Vrij, A. Synthesis And Characterization Of Colloidal Dispersions Of Fluorescent, Monodisperse Silica Spheres. *Langmuir* **8**, 2921-2931 (1992).
11. Verhaegh, N.A.M. & Vanblaaderen, A. Dispersions Of Rhodamine-Labeled Silica Spheres - Synthesis, Characterization, And Fluorescence Confocal Scanning Laser Microscopy. *Langmuir* **10**, 1427-1438 (1994).
12. Vanblaaderen, A. & Vrij, A. Synthesis And Characterization Of Monodisperse Colloidal Organo-Silica Spheres. *Journal Of Colloid And Interface Science* **156**, 1-18 (1993).

13. Arriagada, F.J. & Osseo-Asare, K. Synthesis of nanosize silica in a nonionic water-in-oil microemulsion: Effects of the water/surfactant molar ratio and ammonia concentration. *Journal Of Colloid And Interface Science* **211**, 210-220 (1999).
14. Osseo-Asare, K. & Arriagada, F.J. Growth kinetics of nanosize silica in a nonionic water-in-oil microemulsion: A reverse micellar pseudophase reaction model. *Journal Of Colloid And Interface Science* **218**, 68-76 (1999).
15. Zhao, X.J., Bagwe, R.P. & Tan, W.H. Development of organic-dye-doped silica nanoparticles in a reverse microemulsion. *Advanced Materials* **16**, 173 (2004).
16. Santra, S., Xu, J.S., Wang, K.M. & Tan, W.H. Luminescent nanoparticle probes for bioimaging. *Journal Of Nanoscience And Nanotechnology* **4**, 590-599 (2004).
17. Roy, I. et al. Ceramic-based nanoparticles entrapping water-insoluble photosensitizing anticancer drugs: A novel drug-carrier system for photodynamic therapy. *Journal Of The American Chemical Society* **125**, 7860-7865 (2003).
18. Roy, I. et al. Optical tracking of organically modified silica nanoparticles as DNA carriers: A nonviral, nanomedicine approach for gene delivery. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **102**, 279-284 (2005).
19. Montalti, M. et al. Size effect on the fluorescence properties of dansyl-doped silica nanoparticles. *Langmuir* **22**, 5877-5881 (2006).
20. Zhou, X.C. & Zhou, J.Z. Improving the signal sensitivity and photostability of DNA hybridizations on microarrays by using dye-doped core-shell silica nanoparticles. *Analytical Chemistry* **76**, 5302-5312 (2004).
21. Ow, H. et al. Bright and stable core-shell fluorescent silica nanoparticles. *Nano Letters* **5**, 113-117 (2005).
22. He, L. & Toh, C.S. Recent advances in analytical chemistry - A material approach. *Analytica Chimica Acta* **556**, 1-15 (2006).
23. Lu, J.Z. & Rosenzweig, Z. Nanoscale fluorescent sensors for intracellular analysis. *Fresenius Journal Of Analytical Chemistry* **366**, 569-575 (2000).
24. Buck, S.M. et al. Optochemical nanosensor PEBBLEs: photonic explorers for bioanalysis with biologically localized embedding. *Current Opinion In Chemical Biology* **8**, 540-546 (2004).

25. Buck, S.M., Xu, H., Brasuel, M., Philbert, M.A. & Kopelman, R. Nanoscale probes encapsulated by biologically localized embedding (PEBBLEs) for ion sensing and imaging in live cells. *Talanta* **63**, 41-59 (2004).
26. Prodi, L. Luminescent chemosensors: from molecules to nanoparticles. *New Journal Of Chemistry* **29**, 20-31 (2005).
27. Mancin, F., Rampazzo, E., Tecilla, P. & Tonellato, U. Self-assembled fluorescent chemosensors. *Chemistry-A European Journal* **12**, 1844-1854 (2006).
28. Basabe-Desmonts, L., Reinhoudt, D.N. & Crego-Calama, M. Design of fluorescent materials for chemical sensing. *Chemical Society Reviews* **36**, 993-1017 (2007).
29. Ohobosheane, M., Santra, S., Zhang, P. & Tan, W.H. Biochemically functionalized silica nanoparticles. *Analyst* **126**, 1274-1278 (2001).
30. Lian, W. et al. Ultrasensitive detection of biomolecules with fluorescent dye-doped nanoparticles. *Analytical Biochemistry* **334**, 135-144 (2004).
31. Wang, L., Yang, C.Y. & Tan, W.H. Dual-luminophore-doped silica nanoparticles for multiplexed signaling. *Nano Letters* **5**, 37-43 (2005).
32. Yang, W., Zhang, C.G., Qu, H.Y., Yang, H.H. & Xu, J.G. Novel fluorescent silica nanoparticle probe for ultrasensitive immunoassays. *Analytica Chimica Acta* **503**, 163-169 (2004).
33. Wang, L., Yang, C.Y. & Tan, W.H. Dual-luminophore-doped silica nanoparticles for multiplexed signaling. *Nano Letters* **5**, 37-43 (2005).
34. Santra, S., Zhang, P., Wang, K.M., Tapeç, R. & Tan, W.H. Conjugation of biomolecules with luminophore-doped silica nanoparticles for photostable biomarkers. *Analytical Chemistry* **73**, 4988-4993 (2001).
35. He, X.X., Chen, J.Y., Wang, K.M., Qin, D.L. & Tan, W.H. Preparation of luminescent Cy5 doped core-shell SFNPs and its application as a near-infrared fluorescent marker. *Talanta* **72**, 1519-1526 (2007).
36. Peng, J.F. et al. Identification of live liver cancer cells in a mixed cell system using galactose-conjugated fluorescent nanoparticles. *Talanta* **71**, 833-840 (2007).
37. Selvan, S.T., Patra, P.K., Ang, C.Y. & Ying, J.Y. Synthesis of silica-coated semiconductor and magnetic quantum dots and their use in the imaging of live cells. *Angewandte Chemie-International Edition* **46**, 2448-2452 (2007).
38. Jana, N.R., Earhart, C. & Ying, J.Y. Synthesis of water-soluble and functionalized nanoparticles by silica coating. *Chemistry Of Materials* **19**, 5074-5082 (2007).

39. Rieter, W.J. et al. Hybrid silica nanoparticles for multimodal Imaging. *Angewandte Chemie-International Edition* **46**, 3680-3682 (2007).
40. Lu, C.W. et al. Bifunctional magnetic silica nanoparticles for highly efficient human stem cell labeling. *Nano Letters* **7**, 149-154 (2007).
41. Herr, J.K., Smith, J.E., Medley, C.D., Shangguan, D.H. & Tan, W.H. Aptamer-conjugated nanoparticles for selective collection and detection of cancer cells. *Analytical Chemistry* **78**, 2918-2924 (2006).
42. Smith, J.E. et al. Aptamer-conjugated nanoparticles for the collection and detection of multiple cancer cells. *Analytical Chemistry* **79**, 3075-3082 (2007).
43. Chen, X.L., Zou, J.L., Zhao, T.T. & Li, Z.B. Preparation and fluoroimmunoassay application of new red-region fluorescent silica nanoparticles. *Journal Of Fluorescence* **17**, 235-241 (2007).
44. Hun, X. & Zhang, Z.J. Fluoroimmunoassay for tumor necrosis factor-alpha in human serum using Ru(bpy)(3)Cl-2-doped fluorescent silica nanoparticles as labels. *Talanta* **73**, 366-371 (2007).
45. Hun, X. & Zhang, Z.J. Preparation of a novel fluorescence nanosensor based on calcein-doped silica nanoparticles, and its application to the determination of calcium in blood serum. *Microchimica Acta* **159**, 255-261 (2007).
46. Hun, X. & Zhang, Z.J. A novel sensitive staphylococcal enterotoxin C, fluoroimmunoassay based on functionalized fluorescent core-shell nanoparticle labels. *Food Chemistry* **105**, 1623-1629 (2007).
47. Tan, M.Q., Wang, G.L., Hai, X.D., Ye, Z.Q. & Yuan, J.L. Development of functionalized fluorescent europium nanoparticles for biolabeling and time-resolved fluorometric applications. *Journal Of Materials Chemistry* **14**, 2896-2901 (2004).
48. Tan, M.Q., Ye, Z.Q., Wang, G.L. & Yuan, J.L. Preparation and time-resolved fluorometric application of luminescent europium nanoparticles. *Chemistry Of Materials* **16**, 2494-2498 (2004).
49. Xu, Y. & Li, Q.G. Multiple fluorescent labeling of silica nanoparticles with lanthanide chelates for highly sensitive time-resolved Immunofluorometric assays. *Clinical Chemistry* **53**, 1503-1510 (2007).

50. Zhang, H., Xu, Y., Yang, W. & Li, Q.G. Dual-lanthanide-chelated silica nanoparticles as labels for highly sensitive time-resolved fluorometry. *Chemistry Of Materials* **19**, 5875-5881 (2007).
51. Domaille, D.W., Que, E.L. & Chang, C.J. Synthetic fluorescent sensors for studying the cell biology of metals. *Nat Chem Biol* **4**, 168-175 (2008).
52. Wolfbeis, O.S. Fiber-Optic Chemical Sensors and Biosensors. *Analytical Chemistry* **80**, 4269-4283 (2008).
53. Clark, H.A. et al. Subcellular optochemical nanobiosensors: probes encapsulated by biologically localised embedding (PEBBLEs). *Sensors and Actuators B: Chemical* **51**, 12-16 (1998).
54. Xu, H., Yan, F., Monson, E.E. & Kopelman, R. Room-temperature preparation and characterization of poly (ethylene glycol)-coated silica nanoparticles for biomedical applications. *Journal Of Biomedical Materials Research Part A* **66A**, 870-879 (2003).
55. Xu, H., Aylott, J.W., Kopelman, R., Miller, T.J. & Philbert, M.A. A Real-Time Ratiometric Method for the Determination of Molecular Oxygen Inside Living Cells Using Sol-Gel-Based Spherical Optical Nanosensors with Applications to Rat C6 Glioma. *Analytical Chemistry* **73**, 4124-4133 (2001).
56. Koo, Y.L. et al. Real-time measurements of dissolved oxygen inside live cells by organically modified silicate fluorescent nanosensors. *Anal. Chem* **76**, 2498-2505 (2004).
57. Kim, S., Pudavar, H.E. & Prasad, P.N. Dye-concentrated organically modified silica nanoparticles as a ratiometric fluorescent pH probe by one- and two-photon excitation. *Chemical Communications* 2071-2073 (2006).
58. Montalti, M., Prodi, L. & Zaccheroni, N. Fluorescence quenching amplification in silica nanosensors for metal ions. *Journal Of Materials Chemistry* **15**, 2810-2814 (2005).

Capitolo 2

La terapia fotodinamica

La terapia fotodinamica (o PDT, acronimo di photodynamic therapy) è un trattamento non invasivo per la cura di una varietà di malattie tumorali, cardiovascolari, dermatologiche e oftalmiche. Le sue potenzialità cliniche sono note da più di un secolo, ma l'uso in terapia oncologica è relativamente recente. Il trattamento si articola in due fasi: la somministrazione di un farmaco fotoattivo che si accumula nei tessuti malati, e l'irraggiamento selettivo di questi con luce focalizzata. La fotoattivazione del farmaco innesca una cascata di eventi che conduce alla distruzione dei tessuti irraggiati.

Curare con la luce: le origini della fototerapia

Curare le malattie con la luce è una pratica antica, che risale alle origini della civiltà. Questo non sorprende se si pensa alla diffusione dei culti del sole, venerato da sempre come fonte di vita. Così, già dal quarto millennio A.C., in Egitto, Babilonia, India e Cina, malattie come vitiligine, psoriasi e rachitismo venivano curate con lunghi bagni di sole.¹

Nella Grecia classica ed ellenistica, e in seguito a Roma, l'esposizione alla luce solare rimane una pratica molto diffusa. L'elioterapia (questo il nome greco) era praticata dai greci con bagni di sole integrali, mentre molte case romane venivano edificate con spazi adibiti a *solarium*. Adottata da Ippocrate e documentata da Erodoto (V secolo A.C.), viene menzionata in numerose testimonianze scritte che si susseguono ininterrottamente fino alla caduta dell'Impero Romano, nel V secolo D.C.

Nell'Europa medievale l'elioterapia è considerata una pratica pagana e viene abbandonata. Nelle fonti dell'epoca non se ne trova traccia, fatta eccezione per uno scritto di Avicenna (X secolo D.C.). La luce torna alla ribalta della ricerca medica solo nella Francia illuminista. Da qui, un rinnovato interesse si diffonde progressivamente nel resto d'Europa, aprendo la strada ai primi studi condotti con rigore scientifico negli ultimi anni del XIX secolo dal medico faroese Niels Finsen. Considerato il padre della

fototerapia moderna, Finsen consegue importanti successi nel trattamento del vaiolo, e soprattutto del *lupus vulgaris*, una malattia della pelle allora molto diffusa in Scandinavia, per la quale mette anche a punto una sorgente di luce particolarmente efficiente.² Per le sue scoperte viene insignito del premio Nobel per la medicina e la fisiologia nel 1903.

Dopo un breve periodo di grande entusiasmo, la fototerapia viene nuovamente dimenticata, complice anche la scomparsa del *lupus vulgaris*. L'uso della luce ultravioletta come germicida è l'unico contributo di questo periodo rimasto in uso nella medicina moderna. Solo negli ultimi decenni la fototerapia è tornata ad assumere un ruolo importante, sebbene limitato a un ristretto numero di patologie come rachitismo, iperbilirubinemia neonatale e alcuni disturbi mentali.³

Fotochemoterapia e terapia fotodinamica

La fotochemoterapia è una forma di fototerapia nella quale l'esposizione alla luce "attiva" un farmaco somministrato in precedenza. Come la fototerapia, ha origini antiche: l'uso di piante contenenti sostanze fotoattive, come la *psoralea corylifolia* menzionata nell'Atharava-Veda (1400 A.C.) o l'*ammi majus* usata dagli Egizi^a, era pratica diffusa.⁴ La fotochemoterapia rimane dimenticata per millenni, fino agli anni a cavallo tra il XIX e il XX secolo, quando lo spirito di osservazione di uno studente di medicina tedesco pone le basi per la sua rinascita.

Nel 1898, Oscar Raab studiava la tossicità dell'acridina sui parameci nel laboratorio del fotobiologo von Tappeiner. Quando due esperimenti identici forniscono risultati inspiegabilmente diversi, Raab ipotizza che in uno di essi, condotto durante un violento temporale, la luce avesse giocato un ruolo fondamentale.⁵ Gli studi successivi danno ragione allo studente, e chiariscono un principio fondamentale del fenomeno appena scoperto: farmaco, luce e ossigeno devono essere presenti contemporaneamente perché si osservi un aumento di tossicità. Questo effetto viene chiamato da von Tappeiner "azione fotodinamica" (*photodynamische Wirkung*),⁶ e a tutt'oggi il termine "terapia fotodinamica" (PDT) indica tutte le forme di fotochemoterapia che dipendono dalla presenza di ossigeno.

Nel 1903 von Tappeiner è anche il primo a sperimentare la PDT sull'uomo.⁷ I risultati incoraggianti ottenuti irraggiando pazienti affetti da cancro della pelle, lupus eritematoso e condilomi genitali ai quali era stata somministrata eosina fanno esplodere l'interesse

^a Curiosamente, le due piante contengono lo stesso principio attivo (lo psoralene, una furocumarina) ed erano usate per la cura della stessa malattia, la vitiligine.

per l'effetto fotodinamico. Una svolta importante giunge nel 1912, quando il tedesco Meyer-Betz sperimenta su di sé quello che diventerà il primo farmaco moderno per la terapia fotodinamica. Incoraggiato dai risultati ottenuti sui topi, tra le 5:45 e le 6:15 del 14 ottobre 1912, Meyer-Betz si somministra per via endovenosa 200 mg di ematoporfirina, un derivato del sangue isolato settant'anni prima. Nei giorni successivi documenta le conseguenze: le fotografie mostrano un uomo sfigurato da eritemi ed edemi diffusi.⁸ Dopo qualche settimana gli effetti svaniscono. La strada è ormai aperta: nei decenni successivi la ricerca si concentrerà su derivati e analoghi di questo capostipite.

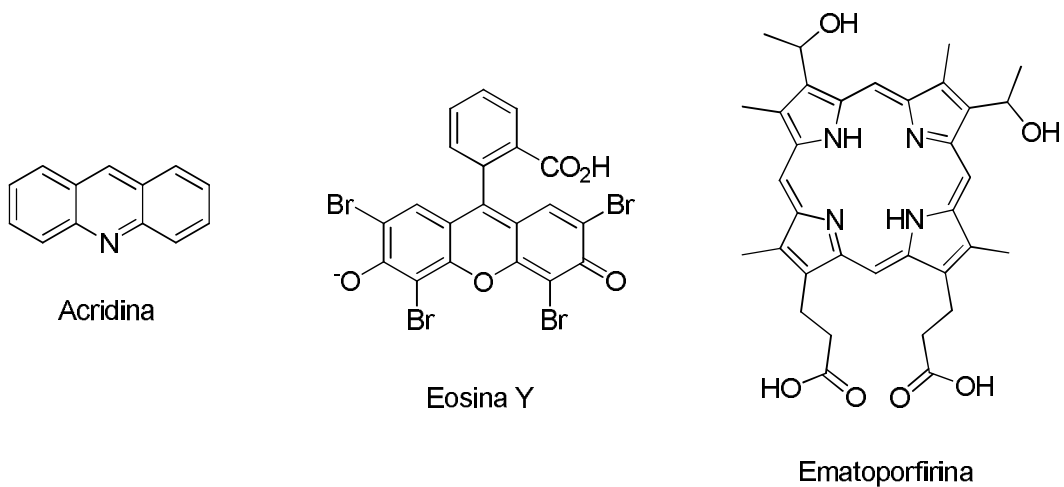


Figura 1. Alcuni fotosensibilizzatori usati negli studi pionieristici sulla terapia fotodinamica.

La successiva pietra miliare nella ricerca sulla terapia fotodinamica è la scoperta dell'accumulo preferenziale delle porfirine nei tumori. Tutto ha inizio nel 1924, quando il francese Policard osserva l'emissione di fluorescenza di un tumore e la attribuisce alla presenza di porfirine endogene, che egli ritiene erroneamente dovuta a un'infezione batterica secondaria.⁹ Negli anni successivi il fenomeno viene studiato a fondo, e l'affinità delle porfirine per i tessuti tumorali viene dimostrata inequivocabilmente. La guerra rallenta la ricerca, e solo negli anni '50 si arriva a provare la localizzazione selettiva dell'ematoporfirina in tumori umani.

È il lavoro pionieristico di un medico americano, Samuel Schwarz, che pone le basi per lo sviluppo di farmaci più efficaci. Studiando l'effetto combinato delle porfirine e delle radiazioni ionizzanti, Schwarz si rende conto della scarsa purezza delle forniture commerciali di ematoporfirina.¹⁰ Dopo averle purificate, scopre che non è l'ematoporfirina pura ad essere responsabile della localizzazione preferenziale nei tumori, e mette a punto una procedura basata su trattamenti con acido acetico e solforico per la preparazione di un derivato con migliori proprietà di localizzazione.

Il nuovo farmaco, chiamato HpD (*hematoporphyrin derivative*), viene usato estesamente da Lipson, un medico della clinica Mayo che negli anni '60 dà un vasto contributo alla ricerca sulla terapia fotodinamica.¹¹ Lipson sperimenta l'uso dell'HpD per scopi diagnostici, utilizzando sistemi endoscopici e fibre ottiche per identificare diversi tipi di tumori nei suoi pazienti e, almeno in un caso, curarli con successo.

La storia moderna della terapia fotodinamica inizia negli anni '70, con il lavoro di Dougherty, che organizza i primi veri *trial* clinici.¹² Lo stesso Dougherty, eliminando i monomeri dall'HpD per ultrafiltrazione, ottiene quello che è ancora oggi il farmaco più usato nella pratica clinica, il Photofrin. Nello stesso periodo, Kelly dimostra l'efficacia della terapia fotodinamica nei confronti del cancro alla vescica, che sarà la prima patologia per la quale verrà ottenuta, nel 1993, l'approvazione di questo trattamento (con Photofrin) da parte dell'ente di controllo canadese.

Gli ultimi 20 anni vedono il moltiplicarsi dei *trial* clinici: per i tumori broncopolmonari ostruttivi, quelli dell'esofago, della pelle, della testa e collo, e molti altri la terapia fotodinamica è ormai un'alternativa concreta, sebbene poco nota, alle cure tradizionali. Nel frattempo, la ricerca si concentra sulla ricerca di nuovi farmaci, che permettano di superare i gravi limiti di HpD e Photofrin, *in primis* la scarsa efficienza e il prolungato accumulo che lascia i pazienti sensibili alla luce per settimane.

I meccanismi chimico-fisici della terapia fotodinamica

La terapia fotodinamica, come aveva dimostrato von Tappeiner, si basa sull'interazione tra un farmaco, la luce e l'ossigeno molecolare. Queste tre componenti sono coinvolte simultaneamente in un processo detto di fotosensibilizzazione, ovvero un processo nel quale una specie, eccitata per assorbimento di luce, trasferisce l'energia di eccitazione a una seconda specie. La specie donatrice è chiamata fotosensibilizzatore. Nella terapia fotodinamica il farmaco funge da fotosensibilizzatore, mentre l'ossigeno molecolare è l'accettore del trasferimento energetico. L'ossigeno viene convertito in specie reattive collettivamente note come ROS (*Reactive Oxygen Species*), che esercitano l'azione terapeutica. In termini farmacologici, l'ossigeno è un pro-farmaco che viene attivato dal fotosensibilizzatore e convertito nei principi attivi veri e propri.

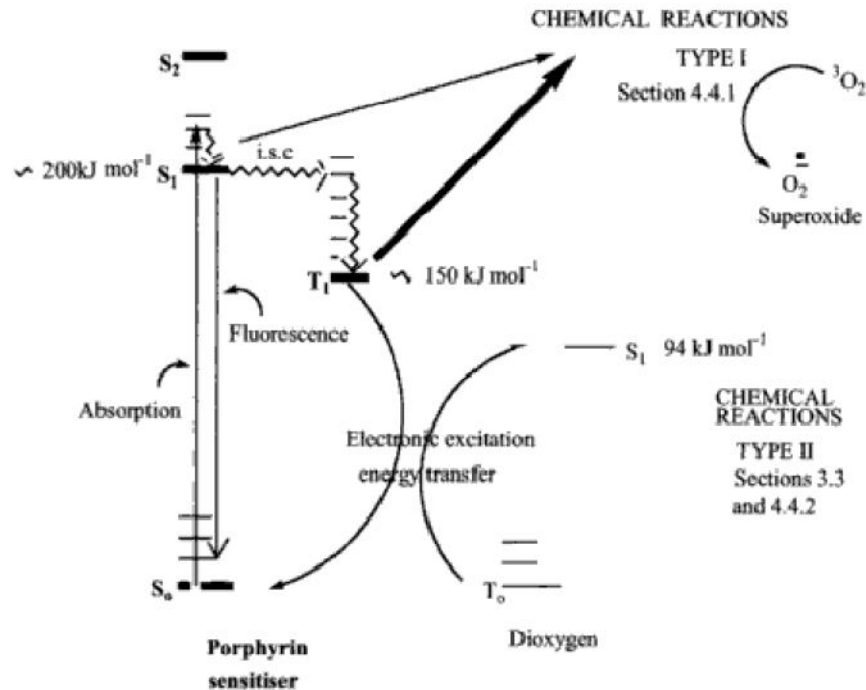


Figura 2. Diagramma di Jablonski modificato che illustra l'effetto fotodinamico.

Il meccanismo dei processi di fotosensibilizzazione dell'ossigeno può essere illustrato schematicamente in un diagramma di Jablonski modificato (figura 2), dove a sinistra sono rappresentati i livelli energetici del fotosensibilizzatore e a destra quelli dell'ossigeno. Il fotosensibilizzatore assorbe un fotone in una transizione allo stato di singoletto eccitato S_1 . Questo stato ha vita breve, ma un processo di *intersystem crossing* può portare la molecola allo stato di tripletto eccitato T_1 , dotato di una vita molto più lunga e in grado di trasferire l'energia all'ossigeno molecolare. Il trasferimento di energia può procedere attraverso due meccanismi (non mutuamente esclusivi):

- **Reazioni di tipo I (trasferimento elettronico):** Il fotosensibilizzatore eccitato genera una specie radicalica, per trasferimento elettronico da o verso un substrato o per astrazione di un atomo di idrogeno. La specie radicalica reagisce quindi con l'ossigeno molecolare, in una reazione netta di autossidazione fotochimica. Quando il substrato è l'ossigeno, la reazione genera il radicale anione superossido $O_2^{\cdot -}$, che può dare origine a sua volta ad altri ROS come OOH^{\cdot} , H_2O_2 e OH^{\cdot} .
- **Reazioni di tipo II (trasferimento energetico):** Il fotosensibilizzatore trasferisce direttamente l'energia di eccitazione all'ossigeno molecolare, che viene promosso al suo stato eccitato di singoletto. Si ritiene che sia questo il meccanismo preponderante in terapia fotodinamica.

Per comprendere meglio questi meccanismi possono essere utili alcune considerazioni quantomeccaniche. L'HOMO dello stato fondamentale dell'ossigeno molecolare è un orbitale π^* doppiamente degenere, che accomoda due elettroni con lo stesso spin. Lo stato fondamentale è quindi uno stato di tripletto, a differenza della maggior parte delle molecole che hanno uno stato fondamentale di singoletto. I primi due stati eccitati, invece, sono entrambi stati di singoletto. Quello a energia più alta, denominato $^1\Sigma_g^+$, ha vita brevissima ($\sim 10^{-9}$ s). L'altro, denominato $^1\Delta_g$, è quello di interesse in terapia fotodinamica. L'ossigeno in questo stato elettronico, 94.5 kJ mol^{-1} al di sopra dello stato fondamentale, è chiamato ossigeno singoletto e indicato come $^1\text{O}_2$. Lo stato $^1\Delta_g$ ha un tempo di vita che varia, in assenza di altre specie, da pochi microsecondi in solventi protici a centinaia di microsecondi in solventi fluorurati^b.

Tabella 1. Parametri chimico-fisici degli stati elettronici dell'ossigeno molecolare.

Simbolo	Nome	Energia/ kJ mol^{-1}	Tempo di vita	HOMO	
$^1\Sigma_g^+$	-	155	$\sim 10^{-9}$ s	\uparrow	\downarrow
$^1\Delta_g$	Ossigeno singoletto, $^1\text{O}_2$	94.5	$\sim 2 \mu\text{s} \div 4 \text{ ms}$	$\uparrow\downarrow$	
$^1\Sigma_g^-$	Ossigeno, $^3\text{O}_2$	0	∞	\uparrow	\uparrow

Nel meccanismo prima descritto il fotosensibilizzatore trasferisce l'energia all'ossigeno con una transizione tripletto-singoletto. Questo è un requisito generale nella fotosensibilizzazione dell'ossigeno. La ragione si comprende alla luce della regola di conservazione dello spin di Wigner, che stabilisce che in una reazione chimica lo spin totale dei reagenti deve essere uguale allo spin totale dei prodotti^c. Si può dimostrare facilmente che in un processo di trasferimento energetico nel quale un reagente effettua una transizione da tripletto a singoletto, come nel caso dell'ossigeno, l'altro reagente (il fotosensibilizzatore) deve necessariamente effettuare una transizione da tripletto a singoletto.

^b La grande variabilità dei tempi di vita dipende dall'estensione della sovrapposizione delle transizioni vibrazionali del solvente con le transizioni vibroniche 0-0 e 1-0 dell'ossigeno singoletto a 1270 e 1027 nm. Una più estesa sovrapposizione favorisce la disattivazione dello stato eccitato per trasferimento di energia al solvente.

^c Più precisamente, i possibili valori della somma vettoriale degli spin totali dei reagenti e della somma vettoriale degli spin totali dei prodotti devono avere almeno un elemento in comune.

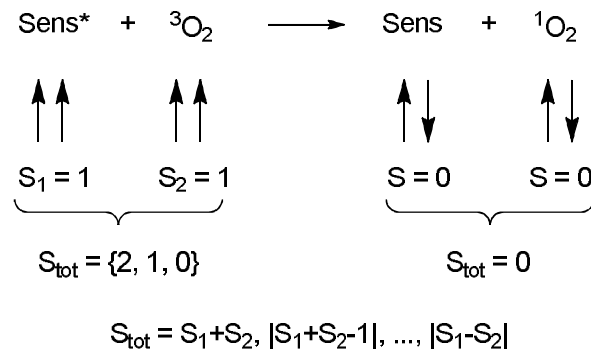


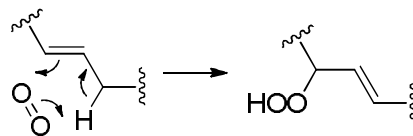
Figura 3. Reazioni di fotosensibilizzazione e regola di Wigner.

Reattività dei ROS

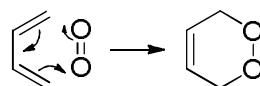
La regola di Wigner spiega anche la reattività dell'ossigeno singoletto. La maggior parte delle reazioni dell'ossigeno con composti organici forniscono un prodotto in uno stato di singoletto a partire da un reagente in uno stato di singoletto (il substrato) e un reagente in uno stato di tripletto (l'ossigeno). Queste reazioni sono proibite dalla regola di Wigner, e di conseguenza non avvengono se non in condizioni drastiche o in presenza di un catalizzatore. Se invece l'ossigeno si trova in uno stato di singoletto, le stesse reazioni sono permesse e decorrono con velocità molto elevate.

Le reazioni di interesse biologico dell'ossigeno singoletto sono soprattutto reazioni di ossidazione di solfuri (per esempio quelli dei residui metioninici delle proteine), ammine e doppi legami. Queste ultime, in particolare, possono essere distinte in tre categorie:¹³

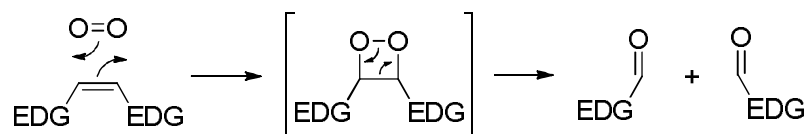
- **Reazione ene:** È una reazione periciclica che avviene su substrati recanti un protone allilico. Porta alla formazione di perossidi allilici.



- **Reazione di Diels-Alder:** È anche questa una reazione periciclica che avviene su dieni coniugati e porta alla formazione di endoperossidi.



- **Cicloaddizione 2π+2π:** È un'altra reazione di cicloaddizione che interessa le olefine elettrone-ricche. Dà luogo a intermedi 1,2-diossetanici che frammentano spontaneamente in composti carbonilici.



Il radicale anione superossido, invece, pur non essendo particolarmente reattivo, è il precursore di altri ROS più aggressivi.

- **Radicale idroperossido OOH^\bullet** : È l'acido coniugato del superossido (pKa 4.88); reagisce con i doppi legami dei lipidi per dare prodotti di perossidazione allilica.
- **Perossido di idrogeno H_2O_2** : È prodotto dalla dismutazione del superossido, che può essere spontanea o catalizzata da enzimi chiamati superossido dismutasi.
- **Perossinitrito ONOO^-** : Il superossido reagisce velocemente con l'ossido nitrico (un'altra specie radicalica) per formare questo forte agente ossidante e nitrante.
- **Radicale ossidrilico OH^\bullet** : Può essere formato dal perossinitrito per scissione omolitica dell'acido coniugato o, in presenza di ferro, dal perossido di idrogeno attraverso la reazione di Fenton.

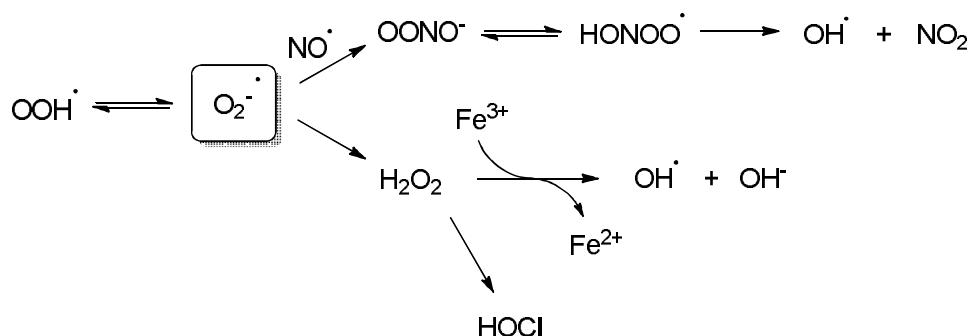
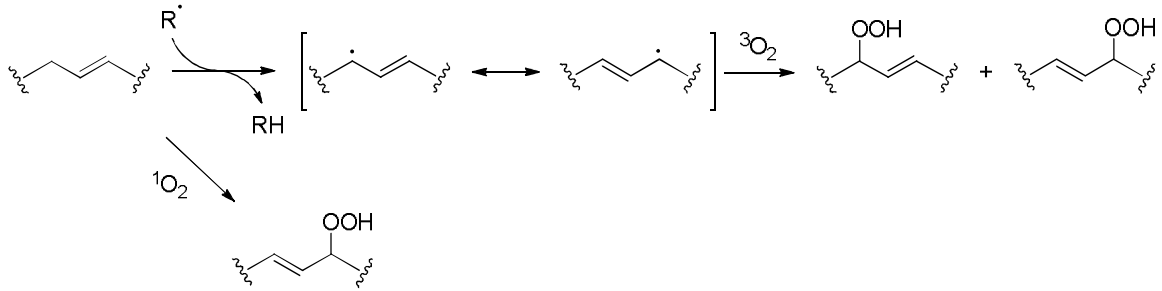


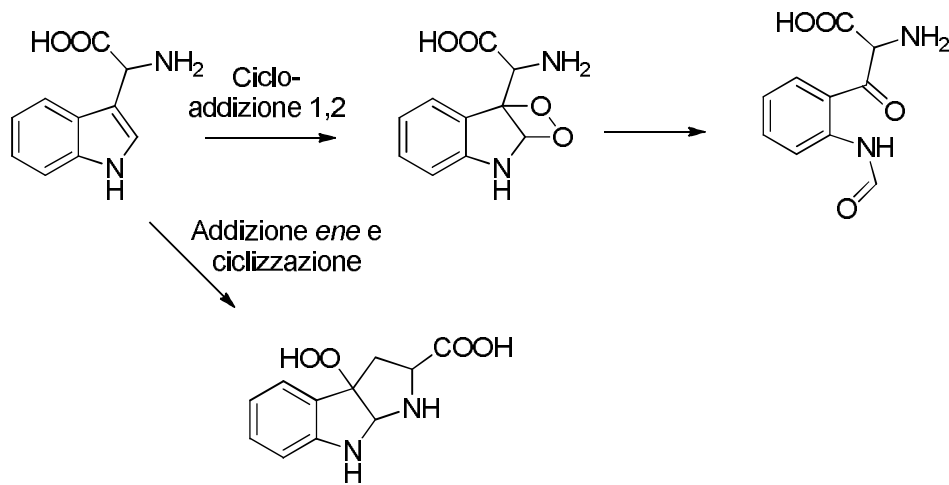
Figura 4. Formazione dei ROS dall'anione superossido.

I bersagli cellulari dei ROS sono soprattutto i lipidi di membrana, che subiscono perossidazione, le proteine, che subiscono modifiche post-traslazionali sui residui metioninici, triptofanici e istidinici, e le basi puriniche degli acidi nucleici.

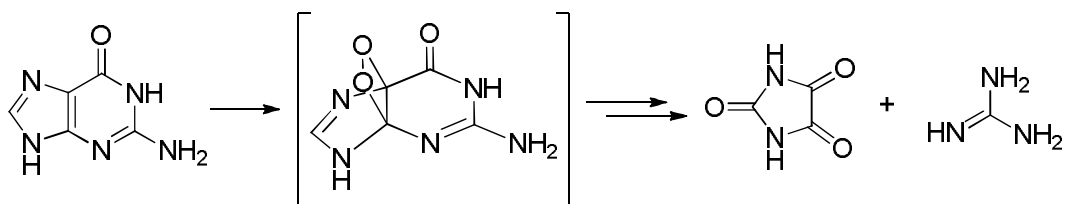
La perossidazione dei lipidi può essere innescata sia dall'ossigeno singoletto, per addizione *ene*, sia dai ROS radicalici. In questo caso il processo è particolarmente dannoso, dal momento che un singolo radicale può innescare una reazione a catena che finisce per coinvolgere molti lipidi.



Il principale responsabile della modifica post-traslazionale delle proteine, invece, è l'ossigeno singoletto. I residui metioninici subiscono ossidazione a solfossidi e solfoni, mentre quelli triptofanici e istidinici reagiscono con meccanismi più complessi.



Anche le basi puriniche degli acidi nucleici vengono attaccate dall'ossigeno singoletto. Il primo step è la formazione di un intermedio tricyclico 1,2-diossetanico che si decompone spontaneamente.



I meccanismi biologici della terapia fotodinamica

La distruzione dei tessuti malati da parte dei ROS generati dal fotosensibilizzatore procede secondo tre diversi meccanismi interdipendenti: danno cellulare diretto, danno alla vascolatura e attivazione della risposta immunitaria. Sebbene il contributo relativo dei singoli meccanismi non sia ancora completamente chiarito, ognuno di essi è indispensabile per ottenere risultati a lungo termine.¹⁴

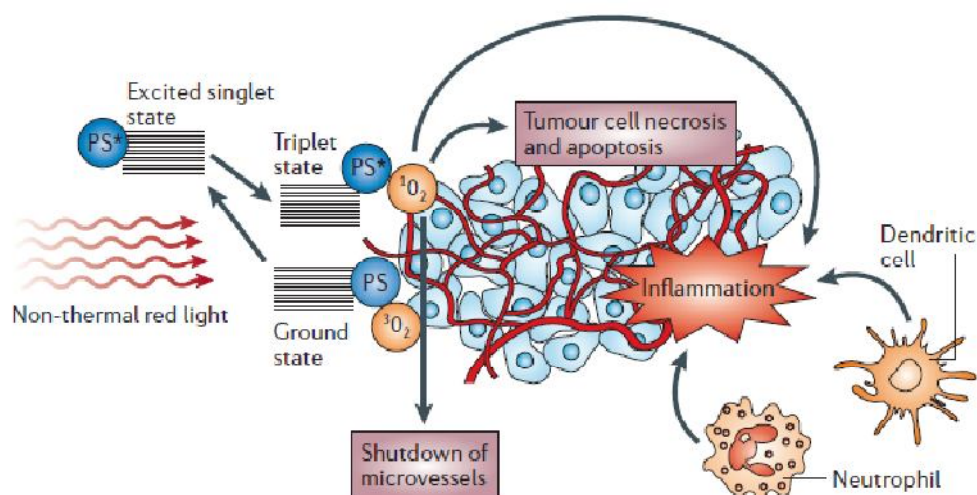


Figura 5. Schema di azione della terapia fotodinamica.¹⁵

Danno cellulare diretto

La morte delle cellule tumorali indotta direttamente dai ROS può avvenire per apoptosi o necrosi. L'apoptosi è una forma di morte cellulare programmata, nel corso della quale la cellula attiva dei processi di degradazione controllata e altera la sua morfologia fino a scindersi in vescicole chiamate corpi apoptotici che possono essere smaltiti dall'organismo senza conseguenze. La necrosi, invece, è un processo traumatico che porta alla disgregazione incontrollata della cellula.

I bersagli del danno ossidativo causato dai ROS riflettono strettamente la localizzazione intracellulare del fotosensibilizzatore. Il brevissimo tempo di vita dei ROS, infatti, impedisce loro di percorrere distanze più lunghe di poche decine di nanometri. Questo cortissimo raggio d'azione ha due conseguenze importanti: oltre a prevenire danni ai tessuti sani, permette in linea di principio di controllare il meccanismo d'azione della terapia fotodinamica ottimizzando la localizzazione intracellulare dei fotosensibilizzatori. Per esempio, la localizzazione nelle membrane o nei lisosomi favorisce una morte necrotica, mentre la localizzazione nei mitocondri o nel reticolo endoplasmatico sembra favorire l'apoptosi. Anche il citoscheletro è un importante bersaglio per la PDT, a causa del ruolo ricoperto in processi cruciali per la proliferazione delle cellule tumorali, come divisione, motilità e trasporto di vescicole. Infine, sebbene i ROS siano in grado di attaccare gli acidi nucleici, ciò avviene raramente, dal momento che i fotosensibilizzatori non riescono generalmente a oltrepassare la membrana nucleare. Questo spiega perché la terapia fotodinamica non abbia significativi effetti mutageni.

In ogni caso, la distruzione diretta delle cellule malate non è sufficiente, da sola, per l'eradicazione completa di un tumore. Una ragione è l'accumulo non omogeneo del fotosensibilizzatore nel tessuto malato, che diminuisce con la distanza dai vasi sanguigni. Un altro motivo è la limitata disponibilità di ossigeno all'interno del tessuto bersaglio, dovuta al consumo fotochimico durante il processo fotodinamico ma anche agli effetti della PDT sulla microvascolatura.

Danno vascolare

La vitalità delle cellule tumorali dipende dalla quantità di nutrienti e ossigeno che riescono a raggiungerle attraverso la vascolatura, che rappresenta anche la principale via per la disseminazione del tumore ad organi distanti. Si capisce quindi come questa rappresenti un bersaglio particolarmente promettente nelle terapie antitumorali. La terapia fotodinamica causa danni vascolari di tipo emorragico o trombotico, che portano al collasso della microvascolatura e alla morte del tessuto malato per ischemia.

Risposta immunitaria

Le forme più comuni di terapia antitumorale, chemioterapia o 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.¹⁵

La risposta immunitaria è una conseguenza del danno cellulare diretto e della risposta infiammatoria che ne deriva: le cellule necrotiche e apoptotiche esprimono proteine chiamate *heat shock proteins* e rilasciano citochine che innescano la risposta infiammatoria. Le cellule dendritiche accumulate nel sito dell'infiammazione processano gli antigeni legati alle *heat shock proteins* delle cellule morenti, maturano e si dirigono verso i linfonodi locali dove presentano gli antigeni ai linfociti T. I linfociti T attivati migrano quindi verso il tumore e ne distruggono le cellule.

Il ruolo della risposta immunitaria nella terapia fotodinamica non è ancora del tutto chiaro. È noto infatti che la PDT può anche avere un effetto di immunosoppressione, e in ogni caso, nonostante il gran numero di pazienti trattati, poca attenzione è stata prestata a questo aspetto della terapia. Non è ancora chiaro se questi fenomeni, studiati finora solo in modelli animali, si verificano anche nell'uomo, e se il regime terapeutico ottimale

per suscitare la risposta immunitaria non sia diverso da quello usato per distruggere direttamente i tumori.

Le porfirine

La parola "porfirina" deriva dal greco *πορπηυρα*, che significa "viola", e denota una classe di molecole intensamente colorate, caratterizzate da una struttura macrociclica nella quale quattro anelli pirrolici sono uniti da ponti metinici. Le porfirine sono protagoniste di processi biologici fondamentali, come la fotosintesi e la respirazione cellulare: sono loro a rendere il sangue rosso e le foglie verdi. Sono anche leganti forti e versatili, in grado di complessare quasi tutti i metalli del sistema periodico.¹⁶

Il padre della chimica delle porfirine è Hans Fischer, che per primo nel 1912 ne intuì la struttura. Fischer riuscì a dimostrare la sua ipotesi solo nel 1929, con la sua classica sintesi totale dell'eme, una ferro-porfirina che funge da cofattore in molte proteine tra cui l'emoglobina e il citocromo *c*.¹⁷ La nomenclatura di Fischer unisce un sistema di nomi comuni per le porfirine di origine naturale, i cui isomeri sono classificati con lettere romane, a una numerazione dei siti di sostituzione basata su numeri e lettere greche. Nel 1979 la vecchia nomenclatura è stata sostituita da quella IUPAC, che assegnando un numero ad ogni atomo dello scheletro permette di identificare univocamente qualsiasi variazione strutturale rispetto al macrociclo capostipite. La nomenclatura di Fischer rimane comunque in uso per le porfirine più semplici.

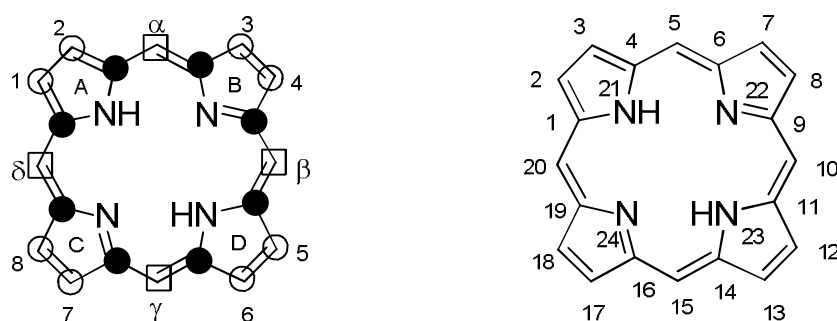


Figura 6. Nomenclatura di Fischer (a sinistra) e IUPAC (a destra) delle porfirine. I cerchi vuoti nella struttura di sinistra indicano le posizioni β , i cerchi pieni le posizioni α , i quadrati le posizioni *meso*.

Sono possibili molte variazioni dello scheletro macrociclico. Per esempio, la riduzione di un doppio legame tra i carboni 17 e 18 genera una clorina, caratterizzata da uno spettro di assorbimento con un assorbimento nel rosso accentuato rispetto alla porfirina corrispondente. La clorofilla ne è un esempio. La riduzione di due legami di questo tipo

genera una batterioclorina. Un'altra importante variazione naturale è rappresentata dalle corrine, di cui la vitamina B₁₂ è un esempio, strutture ad elevata saturazione nelle quali l'assenza di uno dei carboni *meso* genera un macrociclo contratto. Esistono molte altre variazioni, alcune delle quali di particolare rilevanza nella terapia fotodinamica, come i porfificeni, isomeri strutturali delle porfirine nei quali i ponti metinici sono sostituiti da due ponti etilenici e due legami diretti.

La struttura planare^d delle porfirine e il numero di elettroni π nel loro sistema coniugato ne suggeriscono la natura aromatica. La prova sperimentale più diretta del loro carattere aromatico è fornita dallo spettro ¹H-NMR: i protoni pirrolici risuonano a campo più alto per l'effetto schermante della corrente d'anello del macrociclo, mentre i protoni in posizione β e *meso* risuonano a campo più basso per un analogo effetto deschermante. Anche la reattività è tipica dei composti aromatici: le porfirine subiscono reazioni di sostituzione elettrofila, come nitratura, alogenazione, solfonazione, formilazione e acilazione, preferenzialmente in posizione β^e (o *meso* se coordinate a metalli divalenti). L'ossidazione in posizione *meso* genera idrossiporfirine, in equilibrio tautomerico con la forma chetonica.

Sebbene il macrociclo porfirinico conti 22 elettroni π , solo 18 di essi giacciono sul percorso di delocalizzazione principale. Entrambi i numeri soddisfano la condizione di aromaticità di Huckel $4n + 2$, rispettivamente con $n = 5$ e con $n = 4$ (come nel 18-annulene). Questo spiega la persistenza dell'aromaticità nelle clorine e nelle batterioclorine, che hanno solo 20 e 18 elettroni π , rispettivamente.¹⁶

Spettri di assorbimento dei porfirinoidi

Gli spettri di assorbimento UV-Vis delle porfirine presentano un'intensa ($\epsilon \sim 10^5$) banda nella regione intorno ai 400 nm, denominata "banda B" o "banda di Soret", e una serie di bande meno intense ($\epsilon \sim 10^4$) nella regione tra i 500 e i 700 nm, denominate "bande Q".¹⁶

La banda di Soret è una transizione elettronica pura dallo stato di singoletto fondamentale al secondo stato di singoletto eccitato. Le bande Q, invece, derivano da due tipi di transizioni: le Q(0,0) (chiamate anche "bande α ") sono anch'esse transizioni elettroniche pure corrispondenti all'eccitazione al livello vibrazionale fondamentale del

^d Conformazioni non planari possono essere assunte in seguito a riduzione, complessazione di metalli ingombranti o protonazione degli azoti pirrolici.

^e Fu R.B. Woodward a osservare come, mentre i due anelli pirrolici hanno sei elettroni π , i due anelli pirrolici ne hanno solo cinque, e tendono per questo ad attrarre densità elettronica dai carboni *meso*, rendendoli questi ultimi elettroni-deficienti.

primo stato di singoletto eccitato, mentre le $Q(1,0)$ (o "bande β ") sono transizioni vibroniche al primo livello vibrazionale del primo stato di singoletto eccitato.

Nelle porfirine doppiamente protonate e nelle metalloporfirine le bande Q sono due, poiché entrambe le transizioni sono doppiamente degeneri per ragioni di simmetria. Nella base libera, invece, le bande Q sono quattro: la rottura di simmetria (che passa da D_{4h} a D_{2h}) rimuove la degenerazione e ognuna delle due bande si sdoppia in Q_x e Q_y .

Le bande Q sono denotate anche con i numeri romani I, II, III, IV da quella a lunghezza d'onda più alta a quella a lunghezza d'onda più bassa. Le intensità relative delle quattro bande Q dipendono dalla sostituzione dello scheletro porfirinico: se sei o più posizioni β sono sostituite con gruppi privi di elettroni π le intensità decrescono nell'ordine $IV > III > II > I$ e lo spettro è detto di tipo *etio*; se invece i sostituenti hanno elettroni π , allora l'ordine diventa $III > IV > II > I$ e lo spettro è detto di tipo *rhodo*. Quando almeno quattro posizioni β non sono sostituite, l'ordine è $IV > II > III > I$ e lo spettro è detto di tipo *phyllo*.¹⁶

La natura e la posizione dei sostituenti influenza anche lo spettro della forma dicationica: le porfirine sostituite in posizione β cambiano colore da rosso a magenta, quelle sostituite in posizione *meso* lo cambiano in verde a causa di uno spostamento batocromico della Soret (che può arrivare a 40 nm). Questo è dovuto a estesi cambiamenti conformazionali che coinvolgono una rotazione del sostituito *meso*.

Il modello di Gouterman

La natura delle transizioni elettroniche delle porfirine è stata spiegata con successo dal chimico teorico americano Martin Gouterman, il cui modello è stato il primo a rendere conto correttamente dell'intensità e della molteplicità delle bande di assorbimento, e della loro dipendenza dalla struttura chimica dello scheletro e dei sostituenti dell'anello porfirinico. La teoria di Gouterman è chiamata "modello a quattro orbitali", poiché considera solo i due orbitali occupati più alti (HOMO) e i due non occupati più bassi (LUMO).¹⁸

Il modello a quattro orbitali può essere compreso meglio alla luce delle teorie precedenti. Nel modello a elettroni liberi (FET), gli elettroni eccitati sono considerati alla stregua di particelle in moto in un potenziale periodico unidimensionale (l'anello porfirinico). L'anello contiene 18 punti reticolari, uno per ogni atomo del sistema π coniugato, e i 18 elettroni π si muovono lungo di esso in senso orario o antiorario. Gli elettroni si trovano in stati quantici caratterizzati da un momento angolare orbitale L crescente: due in $L = 0$,

e quattro in ciascuno degli altri orbitali doppiamente degeneri $L = \pm 1, \pm 2, \pm 3, \pm 4$. In questo modello, i due orbitali HOMO hanno momento angolare ± 4 e i due LUMO ± 5 . L'eccitazione di un elettrone da un HOMO a un LUMO comporta quindi una variazione di momento angolare pari a ± 1 o ± 9 , quest'ultima proibita dalle regole di selezione. Sono possibili quindi due transizioni, ciascuna doppiamente degenera. Per la regola di Hund^f, la transizione corrispondente a $\Delta L = \pm 9$ è quella a energia più bassa e dà quindi origine alla banda Q, mentre quella corrispondente a $\Delta L = \pm 1$ dà origine alla banda di Soret. L'intensità della banda Q, derivante da una transizione proibita, è correttamente prevista essere molto più debole di quella della banda di Soret.

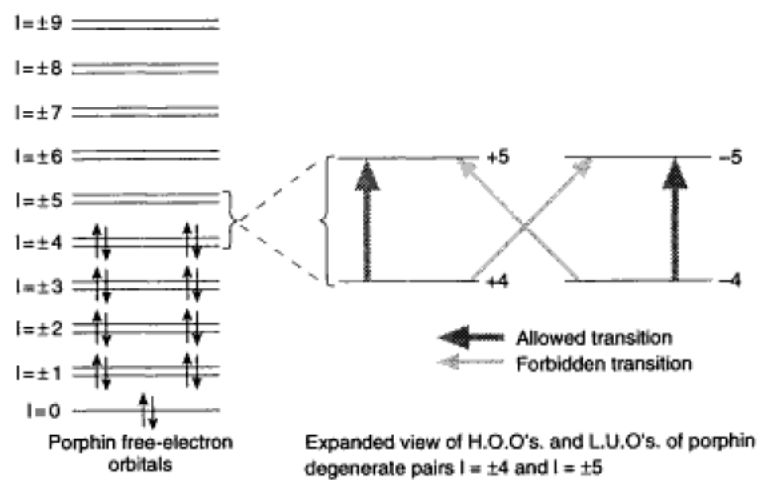


Figura 7. Modello a elettroni liberi.

Il modello a elettroni liberi, pur prevedendo correttamente la differente intensità delle bande di assorbimento, non rende conto della molteplicità delle bande Q. Inoltre, non tiene conto dell'effetto di eventuali variazioni della struttura chimica della molecola. Il modello del poliene ciclico (CPT) risolve il primo problema considerando il macrociclo porfirinico come un poliene coniugato a 16 o 18 membri (rispettivamente nel caso di metalloporfirine o dicazioni, e della base libera). Gli orbitali molecolari che ne derivano sono molti simili a quelli FET. In questo caso, però, dopo aver applicato l'interazione di configurazione^g, la degenerazione degli stati eccitati è sollevata e si ottiene una coppia di stati a energia più alta e una a energia più bassa. La banda di Soret è data da una transizione monoelettronica dallo stato fondamentale alla coppia di stati a energia più

^f Lo stato a energia più bassa è quello a più alto momento angolare.

^g Le transizioni elettroniche possono essere descritte approssimativamente come la promozione di un singolo elettrone dall'HOMO al LUMO (o viceversa). Tuttavia, questa descrizione assume che il movimento di un elettrone da un orbitale a un altro non abbia effetto sugli altri elettroni nella molecola, che è un'assunzione molto semplicistica. Una transizione che coinvolge perturbazioni complesse della struttura elettronica spesso può essere descritta più accuratamente come una combinazione lineare di transizioni tra vari orbitali occupati e non occupati. Ognuna di queste combinazioni di orbitali è chiamata una configurazione elettronica, e il mescolamento di configurazioni diverse per descrivere la transizione è chiamato interazione di configurazione. In altre parole, la funzione d'onda è descritta usando gli spin-orbitali di tutti i possibili stati elettronici (o solo di una parte di essi) come set di base.

alta, le bande Q da una transizione alla coppia di stati a energia più bassa. La CPT si differenzia tuttavia dalla FET per la rimozione della degenerazione della coppia di stati a energia più bassa che si verifica nei macrocicli a 18 membri (base libera), e prevede quindi correttamente la molteplicità delle bande Q.

La CPT, come la FET, non rende tuttavia conto dell'effetto delle variazioni strutturali. L'applicazione della teoria di Huckel alle porfirine permette, a differenza dei modelli precedenti, di tenere conto della geometria del macrociclo. Gli orbitali molecolari calcolati in questo modello sono due HOMO non degeneri, denominati a_{1u} e a_{2u} in base alla loro simmetria, e due degeneri denominati e_g . Si spiegano quindi le bande di Soret e le bande Q. Tuttavia, i calcoli forniscono un'intensità delle bande di assorbimento che risulta uguale. La teoria di Huckel, quindi, supera i limiti delle teorie precedenti ma ne introduce un altro.

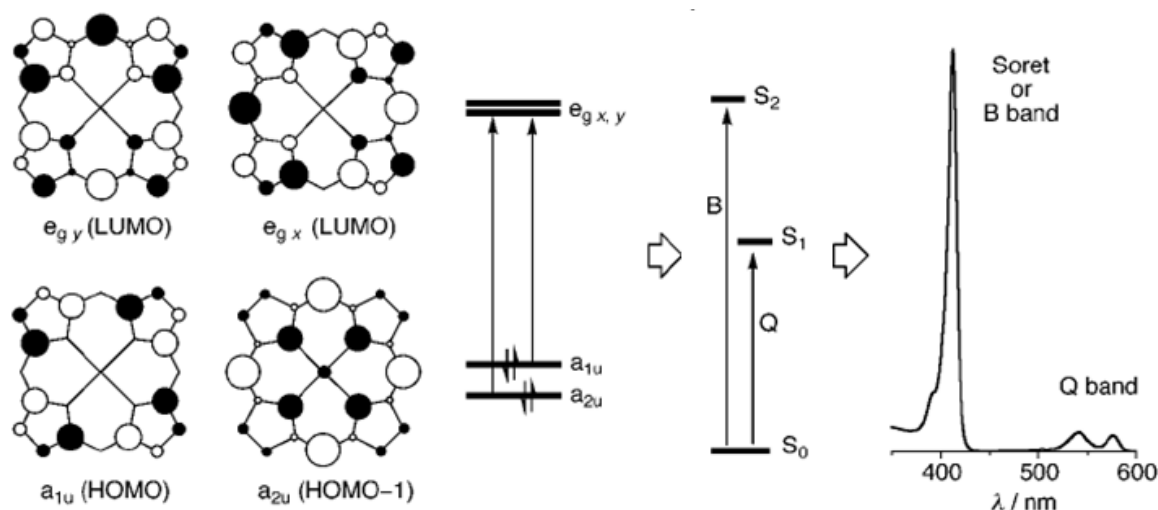


Figura 8. Orbitali molecolari, stati elettronici e spettro di assorbimento di una porfirina metallata.

Gouterman risolve brillantemente il problema costruendo il suo modello da una sintesi dei precedenti. Il modello a quattro orbitali usa i due HOMO e i due LUMO generati dalla teoria di Huckel, rinominati in modo da poterli usare in situazioni a simmetria ridotta (a_{1u} diventa b_2 , a_{2u} diventa b_1 e i due e_g diventano c_1 e c_2). Gouterman osserva innanzitutto l'equivalenza topologica tra gli orbitali di Huckel e quelli del poliene ciclico: gli orbitali corrispondenti hanno, cioè, lo stesso numero di nodi. La prima importante assunzione della teoria di Gouterman è di forzare questa analogia, imponendo ai due HOMO di Huckel una degenerazione accidentale.

A questo punto, Gouterman include l'effetto della correlazione elettronica applicando l'interazione di configurazione alle quattro transizioni monoelettroniche degeneri: le configurazioni elettroniche prodotte da transizioni con la stessa simmetria vengono cioè

mescolate. I momenti di dipolo di transizione, e quindi le intensità relative, delle quattro nuove transizioni sono adesso:

$$\begin{aligned} \frac{1}{2} (b_1c_1 + b_2c_2) &= B_y^0 & \frac{1}{2} (b_1c_2 + b_2c_1) &= B_x^0 \\ \frac{1}{2} (b_1c_1 - b_2c_2) &= Q_y^0 & \frac{1}{2} (b_1c_2 - b_2c_1) &= Q_x^0 \end{aligned}$$

dove b_1c_1 denota il momento di dipolo di transizione dello stato di singoletto prodotto dalla transizione da b_1 a c_1 , b_1c_2 quello prodotto dalla transizione da b_1 a c_2 e così via, mentre x e y denotano le direzioni (ortogonali) dei momenti di dipolo di transizione.

Le transizioni B_x e B_y , descritte dalla somma di due transizioni pure, coincidono sempre in energia e intensità e corrispondono a una banda di assorbimento rafforzata. Allo stesso modo, le transizioni Q_x e Q_y descritte dalla differenza di due transizioni pure, corrispondono a bande di assorbimento indebolite (la molteplicità dipende dall'eventualità che le direzioni x e y siano o meno equivalenti per simmetria). In particolare, dal momento che una delle assunzioni della teoria è che l'HOMO sia degenere (così come il LUMO), risulta

$$b_1c_1 - b_2c_2 = b_1c_2 - b_2c_1 = 0$$

In questo modello, cioè, le bande Q corrispondono a transizioni proibite e dovrebbero avere intensità nulla. L'esistenza di queste bande è dovuta all'accoppiamento con le transizioni vibrazionali, che rimuove leggermente la degenerazione di b_1 e b_2 , rendendo non nulla la differenza dei dipoli di transizione.

L'ispezione degli HOMO e dei LUMO permette di prevedere come variano i livelli energetici in seguito alla protonazione o alla metallazione: solo b_2 , che non ha densità elettronica sugli azoti centrali, non ne è influenzato. Nelle metalloporfirine, gli elettroni del metallo repellono elettrostaticamente quelli di tutti gli altri orbitali, aumentandone l'energia. Nel dicatione, al contrario, i due azoti protonati attraggono gli elettroni degli altri orbitali, stabilizzandoli. Quanto più è rimossa la degenerazione di b_1 e b_2 , tanto più diminuisce il rapporto tra l'intensità della Soret e quella delle bande Q . Inoltre, poiché l'intensità della banda $Q(0,1)$ non varia con la differenza di energia tra b_1 e b_2 , il rapporto tra $Q(0,0)$ e $Q(0,1)$ è anch'esso una misura di questa differenza energetica.

Anche i sostituenti in posizione β o *meso* hanno un effetto sullo spettro delle porfirine, a causa del miscelamento degli orbitali π dei carboni in α del sostituito con gli orbitali molecolari della porfirina. Per esempio, l'acido propionico, i vinili e metili presenti come sostituenti β nella protoporfirina IX hanno l'effetto di aumentare l'energia di a_{1u} rispetto all'energia di a_{2u} . I fenili in posizione *meso* (come nella TPP), invece, aumentano l'energia dell'orbitale a_{2u} rispetto all' a_{1u} .

Il modello a quattro orbitali, insomma, rende conto del numero, della molteplicità e dell'intensità relativa delle bande di assorbimento e della loro variazione in seguito a protonazione, metallazione o variazioni della struttura. Questo modello rappresenta un prezioso strumento per l'interpretazione degli spettri ottici delle porfirine.

Spettri delle clorine

Le clorine, come si è visto, hanno un doppio legame in meno rispetto alle porfirine, e la principale differenza spettroscopica che ne risulta riguarda le bande Q. La banda I aumenta fortemente di intensità, e subisce un esteso spostamento verso il rosso (di più di 25 nm, fino a circa 660 nm) rispetto alla stessa banda delle porfirine corrispondenti. Così, mentre nelle porfirine neutre e nelle metalloporfirine il rapporto tra le intensità della banda di Soret e della banda I può arrivare a 50:1, nelle clorine lo stesso rapporto può scendere a 5:1.

Il modello di Gouterman permette di spiegare facilmente queste differenze. Gli orbitali più affetti dalla riduzione dell'anello D sono b_1 e c_1 . Questi due orbitali sono gli unici che, nella porfirina corrispondente, hanno densità elettronica sulle posizioni 17 e 18. L'energia di questi orbitali aumenta a causa del maggior confinamento degli elettroni dovuto alla minore estensione del sistema coniugato.

Come nelle porfirine, le transizioni elettroniche polarizzate lungo l'asse x (b_1c_2 e b_2c_1) sono quasi degeneri, così che la loro somma e differenza producono rispettivamente una forte banda B_x e una debole banda Q_x . Tuttavia, la grande differenza in energia tra le transizioni elettroniche polarizzate lungo y (b_1c_1 e b_2c_2) fa sì che la loro somma e differenza producano, rispettivamente, bande B_y e Q_y di energia comparabile. Le bande B_x e B_y coincidono in energia e intensità, ma ora la banda Q_y è molto più intensa della Q_x .

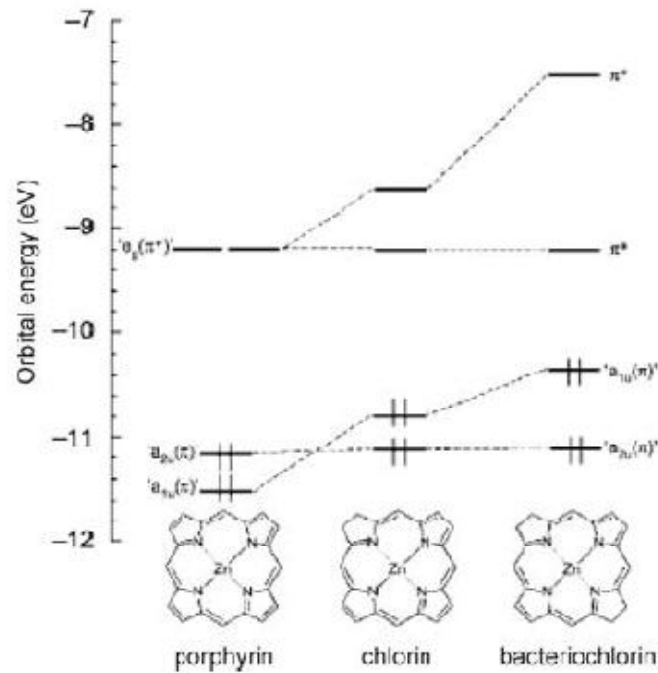


Figura 9. Livelli energetici degli orbitali molecolari di frontiera di porfirine, clorine e batterioclorine.

Spettri degli aggregati

L'aggregazione è un fenomeno di associazione reversibile tra le molecole di un soluto che si assemblano in strutture ordinate (aggregati) di unità individuali (monomeri) attraverso legami non covalenti. Gli aggregati possono essere dimeri, trimeri, oligomeri e, al limite, diventare abbastanza grandi da rendere la soluzione opalescente e precipitare come particolato.

Il fenomeno insorge quando le interazioni tra molecole di soluto diventano energeticamente più favorevoli delle interazioni tra soluto e solvente. Gli aggregati sono tenuti insieme da forze intermolecolari deboli, che possono includere, a seconda della struttura, legami a idrogeno, interazioni elettrostatiche, interazioni π - π , forze di van der Waals e interazioni idrofobiche. Nelle porfirine, in particolare, sono le interazioni π - π e π - σ a dare il contributo più significativo al legame. La geometria più comune negli aggregati porfirinici è lo stacking π sfalsato, con una separazione di 3.5-4 Å tra i piani dei macrocicli. Tipicamente, un anello pirrolico elettron-ricco si sovrappone alla cavità centrale elettron-deficiente della molecola vicina.¹⁶

Gli spettri elettronici degli aggregati mostrano un comportamento piuttosto complesso, osservato per la prima volta nelle cianine negli anni '30. Gli effetti più evidenti

coinvolgono la banda di Soret, che può essere affetta da uno spostamento del massimo di assorbimento (λ_{\max}), un allargamento e una diminuzione del coefficiente di estinzione molare in corrispondenza di λ_{\max} (ϵ_{\max}).

Lo spostamento di λ_{\max} è dovuto all'accoppiamento eccitonico delle transizioni di cromofori vicini. La prima spiegazione teorica di questo fenomeno è stata fornita da Kasha, che ha sviluppato un modello basato sulle interazioni tra dipoli puntuali.¹⁹ Il modello di Kasha è stato successivamente modificato, ma offre ancora un utile approccio qualitativo.

L'accoppiamento tra i dipoli di transizione provoca, in un dimero, uno *splitting* del livello energetico del LUMO. A seconda dell'orientazione relativa dei dipoli di transizione, e quindi della geometria dell'aggregato, una sola delle due transizioni dallo stato fondamentale è permessa. Nella geometria rappresentata a sinistra in figura 10, la transizione permessa è quella al livello energetico più basso, mentre quella al livello più alto è proibita per simmetria. La banda di assorbimento del dimero subisce in questo caso uno spostamento batocromico (verso il rosso). Al contrario, nella geometria rappresentata a destra in figura 10, quella permessa è la transizione al livello più alto, e l'assorbimento del dimero mostra uno spostamento ipsocromico (verso il blu). Estensioni di questo trattamento prevedono una diminuzione della fluorescenza dell'aggregato, in concomitanza a un aumento della probabilità di *intersystem crossing*.

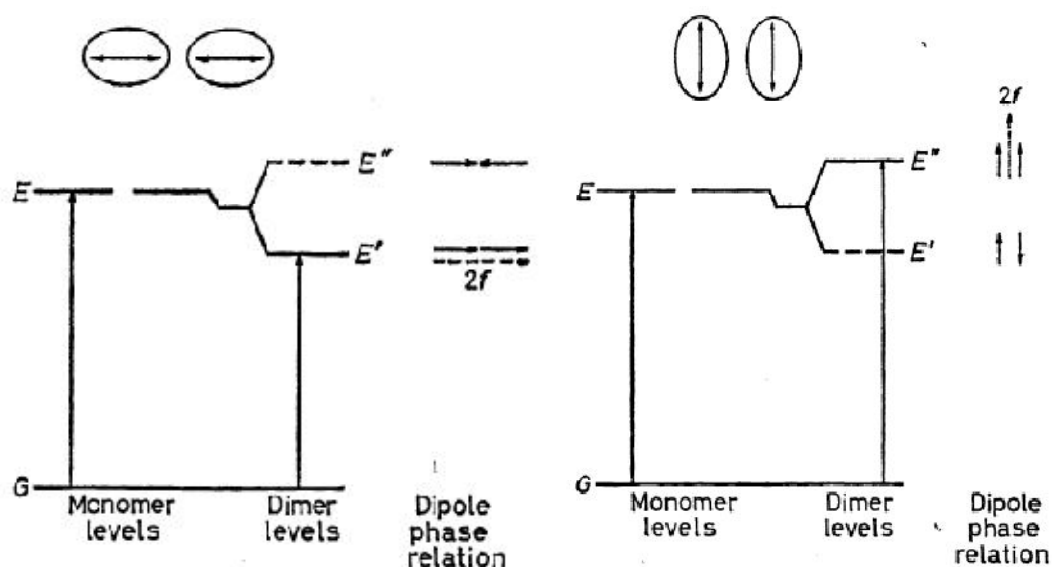


Figura 10. Modello dell'eccitone di Kasha per dipoli di transizione allineati (a sinistra) e paralleli (a destra).

Nel caso più generale, l'angolo θ tra dipoli di transizione coplanari e l'asse che interconnette le unità del dimero o dell'aggregato può variare (figura 11). Per un

particolare valore di θ (54.7°) lo *splitting* eccitonico è nullo: aggregati con angoli θ più bassi (al limite spigolo-spigolo) sono indicati come J, quelli con angoli più alti (al limite faccia-faccia) sono indicati come H. Le designazioni J e H derivano rispettivamente dal nome di Jelley, che con Scheibe ha descritto per primo questo fenomeno negli anni '30, e dallo spostamento ipsocromico (*hypsochromic* in inglese) che mostrano gli aggregati H.

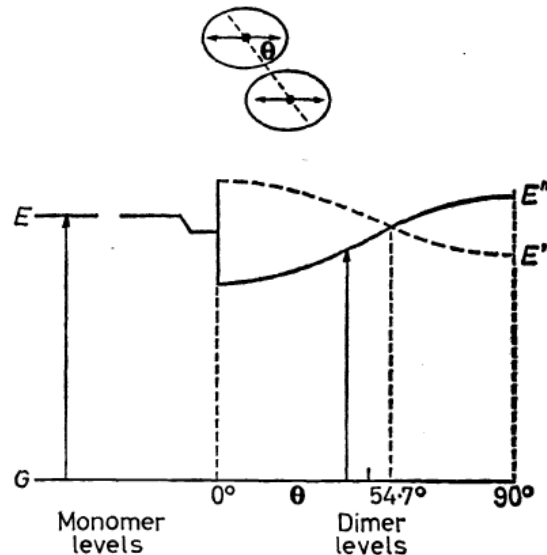


Figura 11. Modello dell'eccitone di Kasha con geometria variabile.

L'aggregazione è particolarmente importante nella PDT, dal momento che i fotosensibilizzatori porfirinici più comuni, generalmente caratterizzati da estesi sistemi aromatici, aggregano facilmente nell'ambiente acquoso dei sistemi biologici. Le specie aggregate hanno proprietà diverse da quelle dei monomeri: in particolare, l'aggregato ha un diverso spettro di assorbimento, una più bassa resa quantica di fluorescenza, e nonostante il previsto aumento di Φ_T , una minore resa quantica di produzione di ossigeno singoletto (Φ_Δ). In ogni caso, nonostante gli aggregati siano in genere meno efficienti come fotosensibilizzatori (almeno in meccanismi di tipo II), possono comunque fungere da serbatoio di monomeri, con i quali sono in equilibrio.

L'aggregazione può essere rivelata da deviazioni dalla legge di Lambert-Beer, dall'allargamento dei picchi di assorbimento e dalla diminuzione di ϵ_{\max} con l'aumento della concentrazione. Questo comportamento, in particolare, è tipico degli aggregati H, nei quali la variazione della forma della banda è accompagnata da uno spostamento ipsocromico. Gli aggregati J, invece, mostrano uno spostamento batocromico ma non l'allargamento. Un altro indice dell'aggregazione è la variazione dei *chemical shift* con la concentrazione negli spettri NMR. Anche questo fenomeno (utile per esplorare concentrazioni più elevate) permette di dedurre la geometria dell'aggregato, grazie all'effetto altamente direzionale della corrente d'anello.¹⁶

Fotosensibilizzatori

Fotosensibilizzatori di prima generazione

I primi fotosensibilizzatori moderni usati in terapia fotodinamica sono stati l'ematoporfirina e i suoi derivati, HpD e Photofrin. I due centri chirali e la reattività della posizione benzilica rendono l'ematoporfirina una delle porfirine naturali più difficili da ottenere in forma pura (Schwarz aveva individuato 15 componenti nelle forniture commerciali). Come si è già detto, l'ematoporfirina pura non ha buone capacità di localizzazione nei tumori.²⁰

Per ottenere un farmaco più potente Schwarz ha ideato una procedura in due stadi, che consiste in un breve trattamento a temperatura ambiente con una miscela di acido solforico e acido acetico in rapporto 1:19, seguito da un trattamento alcalino e neutralizzazione a pH 7.4. Il primo stadio fornisce una miscela di prodotti di acetilazione ed eliminazione, mentre il secondo stadio fornisce prodotti di idrolisi, eliminazione e una frazione ad alto peso molecolare responsabile dell'attività biologica.²⁰

È proprio questa frazione ad alto peso molecolare che viene isolata per produrre il Photofrin. L'elettroforesi capillare ne ha individuato almeno 60 componenti. La ragione di questa complessità risiede di nuovo nella reattività benzilica dell'ematoporfirina. In seguito al trattamento alcalino, la posizione benzilica è coinvolta nella formazione di tre tipi di legame interporfirina: estereo, etereo, e carbonio-carbonio. Si può facilmente capire come i tre tipi di legame interporfirina, le due posizioni benziliche non equivalenti, e i due centri chirali, uniti alla variabilità della lunghezza degli oligomeri, possano dare origine a un numero potenzialmente enorme di prodotti.

Il Photofrin è stato il primo fotosensibilizzatore ad ottenere l'approvazione di un ente regolatore (Canada, 1993), ed è tuttora il più usato nella pratica clinica. La sua popolarità si spiega facilmente: si tratta di un materiale che si prepara con una procedura semplice da materiali di partenza di facile reperibilità, la cui attività clinica è stata ampiamente dimostrata e documentata in letteratura e che gode del maggior numero di approvazioni da parte di enti regolatori.

I limiti di questo fotosensibilizzatore, tuttavia, sono molti e gravi. Innanzitutto, l'HpD e il Photofrin sono miscele estremamente complesse in termini di isomerismo posizionale, stereoisomerismo, composizione oligomerica, natura dei legami interporfirina. La composizione esatta è di fatto impossibile da riprodurre esattamente, e di conseguenza risulta impossibile correlare la struttura molecolare con l'attività biologica.

Proprio l'attività biologica, poi, è piuttosto modesta: la banda I a 630 nm, l'unica che permette di eccitare il fotosensibilizzatore con una lunghezza d'onda in grado di penetrare sufficientemente nei tessuti, ha un coefficiente di estinzione molto basso ($\epsilon \sim 1170 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Le dosi elevate di fotosensibilizzatore che è necessario somministrare per compensare il debole assorbimento comportano un rischio più alto di effetti collaterali gravi.

Il terzo grave limite del Photofrin è la scarsa selettività per i tumori: la fotosensibilizzazione della pelle può perdurare per molte settimane, durante le quali i pazienti sono impossibilitati a condurre una vita normale.²⁰

Fotosensibilizzatori di seconda generazione

Non appena ci si accorse che l'ematoporfirina era difficile da purificare e che l'HpD era una miscela estremamente complessa ebbe inizio la ricerca di sostanze pure. I fotosensibilizzatori di seconda generazione in fase clinica o pre-clinica appartengono alle classi delle porfirine, delle ftalocianine e delle clorine. Sono stati proprio i limiti dei fotosensibilizzatori di prima generazione a dettare i criteri per lo sviluppo dei nuovi farmaci.

- **Tossicità al buio:** La citotossicità in assenza di luce deve essere minima, in modo da prevenire effetti collaterali ad alte dosi.
- **Composizione:** Il fotosensibilizzatore dovrebbe avere una composizione ben definita e riproducibile, o preferibilmente essere una sostanza pura priva di centri stereogenici. Questo è molto più importante nella terapia fotodinamica rispetto alle terapie farmacologiche tradizionali, per il numero molto più elevato di variabili che influenzano la risposta biologica (tempi di accumulo e di irradiazione, dose di luce, eccetera).
- **Solubilità:** Il farmaco ideale ha una buona selettività per il tumore, ma viene rapidamente eliminato dal corpo dopo la fototerapia, in modo che la fotosensibilizzazione generale sia minima. È emerso che i fotosensibilizzatori con queste caratteristiche sono spesso anfifilici: poiché i nuclei porfirinici sono idrofobici, la presenza di sostituenti idrofilici è necessaria per ottenere il corretto bilancio tra regioni idrofobiche e idrofiliche.
- **Proprietà fotofisiche:** I parametri fotofisici devono rispondere a tre requisiti fondamentali: lo stato di tripletto deve avere un'energia superiore a 94 kJ mol⁻¹ (l'energia della transizione tra lo stato fondamentale dell'ossigeno e il primo stato

eccitato di singoletto), deve essere generato con resa quantica soddisfacente e deve avere un tempo di vita abbastanza lungo da poter reagire efficacemente con l'ossigeno. In ogni caso, è richiesto un valore di Φ_{Δ} di almeno 0.3^h. Questi criteri si applicano ai fotosensibilizzatori che operano con un meccanismo di tipo II (la maggior parte, anche se esistono eccezioni).

- **Assorbimento nel rosso:** Lo scattering e l'assorbimento dei cromofori endogeni, come la melanina e l'emoglobina, limita la penetrazione della luce nei tessutiⁱ. Perché la luce sia assorbita con efficienza da un fotosensibilizzatore in vivo, questo deve avere una forte banda di assorbimento a lunghezze d'onda superiori a 600 nm. Non ci si può tuttavia spingere troppo nel rosso e nell'infrarosso, per tre ragioni. Primo, l'assorbimento da parte dell'acqua, il componente principale dei tessuti, limita la penetrazione a lunghezze d'onda troppo alte. In secondo luogo, aumentando la λ_{\max} del fotosensibilizzatore, se ne abbassa generalmente anche il potenziale redox e quindi se ne aumenta la sensibilità all'ossidazione e al *photobleaching*. Infine, poiché la λ_{\max} della banda I corrisponde approssimativamente all'energia di S1, e poiché l'energia di T1 è sempre più bassa (nelle porfirine lo è di circa 40-50 kJ mol⁻¹), se si sposta la banda I oltre gli 830 nm (corrispondenti a 144 kJ mol⁻¹) l'energia del tripletto diventa inferiore a 94 kJ mol⁻¹, e quindi insufficiente a generare ossigeno singoletto.

^h Per le applicazioni diagnostiche, nelle quali si sfrutta la fluorescenza del fotosensibilizzatore per evidenziare il tumore, il parametro fondamentale è la resa quantica di fluorescenza Φ_f . I fotosensibilizzatori che hanno elevati valori di Φ_f non possono avere valori di Φ_T (e quindi Φ_{Δ}) elevati, poiché $\Phi_f + \Phi_T \leq 1$ (legge dell'equivalenza fotochimica di Stark-Einstein). Di conseguenza, la ricerca di composti per uso diagnostico deve essere distinta da quella di composti terapeutici.

ⁱ La dose di luce diminuisce esponenzialmente con la profondità d come $e^{-d/\delta_{\text{eff}}}$. L'effetto terapeutico della PDT raggiunge una profondità pari a circa 3-5 volte la lunghezza di penetrazione efficace δ_{eff} , che per luce di 630 nm è tipicamente 1-2 mm, e diventa circa il doppio a 700-850 nm.

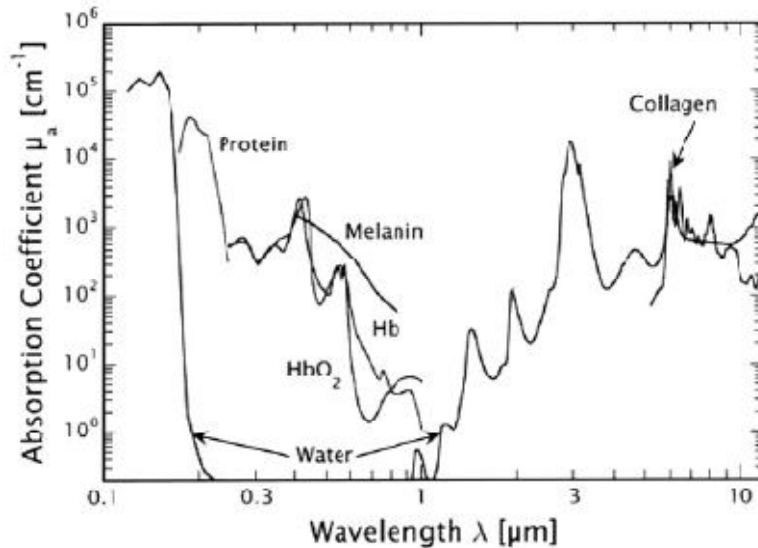


Figura 13. Assorbimento dei tessuti viventi.

Sono state le tetraarilporfirine, facili da preparare e purificare, ad aprire la strada alla seconda generazione di fotosensibilizzatori. La tetrafenilporfirina (TPP) ha un massimo di assorbimento della banda I a 630 nm e una buona resa quantica di produzione di ossigeno singoletto, ma una solubilità limitata. La solfonazione della TPP fornisce i solfonati TPPS_n (n = 1-4), che rimangono ottimi fotosensibilizzatori ($\Phi_{\Delta} = 0.71$) e hanno una elevata solubilità in acqua. Nonostante si siano rivelate tossiche *in vivo*, le tetraarilporfirine offrono una versatilità sintetica che le rende ottimi fotosensibilizzatori modello.²⁰

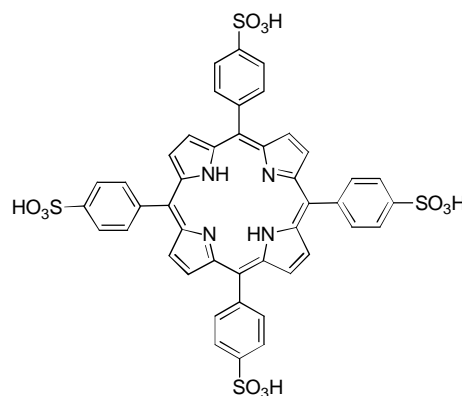


Figura 14. Tetrafenilporfirina tetrasolfonato.

Anche le porfirine naturali possono essere facilmente modificate per migliorarne le proprietà. La cicloaddizione di dimetil acetilenedicarbossilato alla protoporfirina IX, per esempio, fornisce un derivato benzoporfirinico chiamato Verteporfin, con un massimo di assorbimento spostato a lunghezza d'onda più alta (690 nm) e una ϵ di circa 35000 M⁻¹ cm⁻¹. Questo derivato, attualmente in fase clinica di sperimentazione per il carcinoma

delle cellule basali, provoca una limitata fotosensibilizzazione della pelle e viene eliminato rapidamente dai tessuti (in non più di 3-5 giorni).

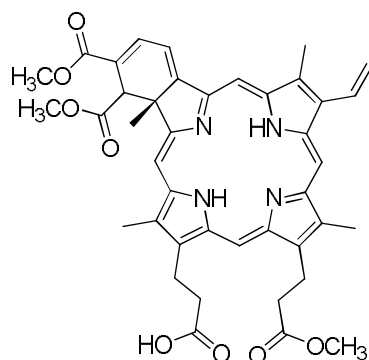


Figura 15. Verteporfin.

Un'altra importante classe di fotosensibilizzatori di seconda generazione è rappresentata dalle ftalocianine. Queste molecole hanno caratteristiche spettrali ideali, con massimi di assorbimento a lunghezze d'onda che arrivano al vicino infrarosso (670-780 nm) e valori di ϵ dell'ordine di $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, e possono essere facilmente rese idrosolubili per solfonazione. La ftalocianina di silicio Pc 4 è attualmente in fase clinica di sperimentazione. Ftalocianine e porfirine condividono una SAR simile: l'uptake e l'efficacia sono direttamente correlate al numero di gruppi idrofilici.

Anche le clorine e le batterioclorine, di origine sia naturale che sintetica, sono fotosensibilizzatori molto promettenti. Per esempio, l'aggiunta di alcol diversi al gruppo vinilico del pirofeoforbide *a* metil estere fornisce una serie di alchil eteri, tra i quali l'etere esilico HPPH (Photochlor) si è distinto come potente fotosensibilizzatore *in vivo*. Questo derivato ha un massimo di assorbimento della banda I a 665 nm ed è attualmente in fase di *trial* clinico per il trattamento del carcinoma delle cellule basali.

La 5,10,15,20-tetra(3-idrossifenil)-2,3-diidroporfirina (mTHPC, o Foscan), caratterizzato da una potenza particolarmente elevata, è probabilmente la più utile delle clorine sintetiche. L'mTHPC è stata approvata in Europa per l'uso contro i tumori della testa e del collo, e sono state richieste estensioni per tumori della prostata e del pancreas. Uno degli inconvenienti più gravi è la prolungata fotosensibilizzazione della pelle, che può durare fino a sei settimane. L'mTHPC ha un massimo di assorbimento della banda I a 652 nm con un coefficiente di estinzione di circa $30000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. I quattro gruppi ossidrilici fenolici hanno valori di pKa più alti di quelli degli acidi carbossilici di altri fotosensibilizzatori clorinici. L'uptake cellulare non è comunque influenzato dal pH nell'intervallo 6.5-8.0. 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.

Una strategia alternativa per la terapia fotodinamica si basa sull'azione di un fotosensibilizzatore endogeno, la protoporfirina IX (Pp IX). La Pp IX è un intermedio nella biosintesi dell'eme, il cui stadio lento è la formazione dell'acido 5-ammino levulinico (ALA). Questo collo di bottiglia può essere aggirato somministrando ALA esogeno come profarmaco. In queste condizioni lo stadio limitante diventa l'inserzione del ferro nella Pp IX catalizzata dalla ferrochelatasi, e la concentrazione di protoporfirina può aumentare fino a livelli utili per la terapia fotodinamica. La Pp IX non ha proprietà spettrali migliori rispetto al Photofrin (λ_{\max} 635 nm, $\epsilon_{\max} < 5000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), ma ha il grande vantaggio di causare una fotosensibilizzazione della pelle più moderata e di durata molto più breve (1-2 giorni). L'ALA (Levulan) è stato approvato in Europa per il trattamento del carcinoma delle cellule basali e della cheratosi attinica. Sono stati sviluppati anche derivati dell'ALA capaci di penetrare più efficacemente la barriera cellulare: l'estere metilico (Metvix), per esempio, ha ricevuto anch'esso l'approvazione dell'ente regolatore europeo.

Fotosensibilizzatori di terza generazione e sistemi di trasporto

I fotosensibilizzatori di seconda generazione sono generalmente dotati di migliori proprietà fotofisiche, che si traducono in un aumento della potenza. Solo alcuni di essi vengono eliminati più rapidamente dall'organismo rispetto ai loro predecessori. Nonostante questi miglioramenti cruciali, la selettività per i tessuti malati rimane ancora scarsa, non molto diversa da quella di HpD e Photofrin. Se i farmaci fossero più selettivi, una dose minore basterebbe per suscitare la stessa risposta e gli effetti collaterali dovuti alla fotosensibilizzazione della pelle non sarebbero più il grave problema che sono adesso.

Lo sviluppo dei fotosensibilizzatori ha preso a questo punto una direzione diversa: invece di modificare ulteriormente molecole che già possiedono caratteristiche fotofisiche ideali, o progettarne di nuove, si è cercato di conferire maggiore selettività ai farmaci già noti coniugandoli a sistemi di trasporto selettivi, quali anticorpi monoclonali o ligandi per recettori sovraespressi dalle cellule tumorali.²¹

Le proteine del siero, per esempio, sono sistemi di trasporto naturali: è noto che molti fotosensibilizzatori, una volta somministrati, si associano rapidamente a diversi tipi di proteine del siero (quelli idrofilici all'albumina, quelli idrofobici alle lipoproteine) che li trasportano nel circolo sanguigno. In molti casi, sono proprio le proteine del siero a determinare l'*uptake* e la localizzazione intracellulare dei farmaci.²¹

L'albumina è la proteina di gran lunga più abbondante nel siero, dove funge da trasportatore "universale", grazie alla sua peculiare capacità di legare reversibilmente e con elevata affinità un'ampia varietà di ligandi. Essa inoltre rappresenta una importante fonte di amminoacidi per le cellule, in particolare per quelle tumorali, che ne hanno bisogno per sostenere la loro proliferazione accelerata. I coniugati fotosensibilizzatore-albumina sono stati tra i primi ad essere proposti come farmaci di terza generazione.^{22,23} Le lipoproteine, invece, sono sistemi micellari costituiti da lipidi e apoproteine, responsabili del trasporto dei lipidi. In particolare, le *Low Density Lipoproteins* (LDL) sono i principali trasportatori del colesterolo, un componente fondamentale delle membrane cellulari: le cellule tumorali, la cui rapida divisione richiede un efficiente assemblaggio di nuove aree di membrana, sovraesprimono i recettori per queste lipoproteine, che rappresentano un altro importante sistema di *targeting*.^{24,25} Alcuni tipi di cellule tumorali sovraesprimono anche i recettori per un'altra proteina del siero, la transferrina, responsabile del trasporto del ferro. Coniugati fotosensibilizzatore-transferrina sono stati studiati *in vitro*.²⁶

Oltre alle proteine del siero, molte altre biomolecole si prestano a fungere da sistemi di trasporto per i fotosensibilizzatori: quelle usate nel tentativo di migliorare la selettività di farmaci noti e, in qualche caso, di modificarne la localizzazione intracellulare, includono steroidi, tossine, insulina e fattori di crescita. L'uso di anticorpi monoclonali, un approccio inizialmente promettente, si è rivelato purtroppo scarsamente efficace *in vivo*, soprattutto a causa dell'elevata eterogeneità dei tessuti tumorali, che difficilmente mostrano un'espressione omogenea degli antigeni bersaglio, e della localizzazione sfavorevole dei coniugati che rimangono per lo più all'esterno delle membrane cellulari.²¹

Negli ultimi anni, la versatilità di questi farmaci modulari è stata estesa ulteriormente incapsulando i fotosensibilizzatori in sistemi colloidali come micelle, liposomi o nanoparticelle, a loro volta eventualmente coniugate con agenti di *targeting*. Numerosi esempi di incapsulazione di fotosensibilizzatori in nanoparticelle di varia natura (polimeriche biodegradabili, polimeriche non biodegradabili, ceramiche e metalliche) sono noti in letteratura.^{27,28}

Le nanoparticelle polimeriche biodegradabili sono state le prime ad essere oggetto di attenzione come possibile mezzo di trasporto di agenti antineoplastici. I loro vantaggi principali risiedono in un alto *loading* del farmaco, nella possibilità di controllarne il rilascio, e nell'ampia varietà di materiali e metodi a disposizione per la loro sintesi. La composizione chimica e l'architettura dei polimeri possono essere facilmente progettate per il trasporto di farmaci di varia idrofobicità, peso molecolare e carica. Inoltre, le proprietà di superficie, la morfologia e la composizione delle matrici polimeriche

possono essere ottimizzate in modo da controllare la degradazione del vettore (e quindi la cinetica di rilascio) e offrire siti di funzionalizzazione per la coniugazione di agenti di *targeting* o di catene di polietilenglicole, che aumentano il tempo di permanenza nel circolo sanguigno.

Lo studio delle particelle polimeriche biodegradabili per l'uso in terapia fotodinamica cominciò nel 1990, ma i primi risultati furono deludenti: il primo, pionieristico, lavoro stabilì che l'ematoporfirina incapsulata in nanoparticelle di policianoacrilato veniva rilasciata troppo velocemente e il sistema si rivelò inadatto all'uso *in vivo*.²⁹ Negli anni successivi, le tecniche vennero affinate e molti problemi risolti. L'uso dei policianoacrilati continuò ad essere esplorato ma l'attenzione generale si concentrò su altri materiali. Le prime microparticelle di acido polilattico drogate con una ftalocianina erano ancora penalizzate da un basso *loading* (0.6 %),³⁰ ma presto si arrivò a formulare vettori più efficienti: l'incapsulazione di p-THPP in nanoparticelle di PLGA (un copolimero di acido lattico e glicolico) di dimensioni inferiori a 150 nm fornisce sistemi con *loading* elevato (7 %), efficienti già a basse concentrazioni. Lo stesso studio dimostrò anche un effetto della composizione della matrice sulla risposta biologica, variando il rapporto molare tra copolimeri e modulando così l'idrofilicità. Un lavoro successivo chiarì l'effetto della dimensione, confrontando l'attività di Verteporphin incapsulato in nanoparticelle di PLGA di dimensioni diverse (167 e 370 nm).³¹ Le nanoparticelle più piccole si dimostrarono più efficaci, probabilmente per l'effetto sull'endocitosi e la cinetica di rilascio più veloce dovuta alla più alta area superficiale. McCarthy ha dimostrato anche come le nanoparticelle biodegradabili possano svolgere funzioni che vanno oltre il semplice trasporto: il meso-tetrafenilporfollato incapsulato in nanoparticelle di PLGA di 98 nm (con un *loading* del 12 %) esiste sotto forma di aggregati fotofisicamente inerti, che si dissociano solo con la degradazione della matrice all'interno delle cellule.³²

Le nanoparticelle biodegradabili sono vettori molto efficaci, e rappresentano una direzione naturale nella ricerca di un sistema di trasporto per i farmaci che traggono beneficio da un rilascio controllato. Il caso della terapia fotodinamica, tuttavia, è diverso: a differenza dei farmaci convenzionali, quelli usati in terapia fotodinamica non interagiscono direttamente con i loro bersagli e di conseguenza non devono necessariamente essere rilasciati per esercitare la loro azione terapeutica. La possibilità di mantenere il farmaco isolato all'interno di un vettore non biodegradabile offre importanti vantaggi: disaccoppiando del tutto le proprietà fotofisiche dalle interazioni chimiche, ora completamente mascherate, si prevengono sia la degradazione del fotosensibilizzatore, sia eventuali effetti collaterali responsabili della tossicità al buio. Ovviamente i requisiti dei vettori non biodegradabili sono diversi da quelli dei vettori

biodegradabili: è importante soprattutto che l'ossigeno riesca a diffondere all'interno, e che l'ossigeno singoletto prodotto non reagisca con il vettore stesso.

Negli ultimi anni, un particolare tipo di vettore non biodegradabile si è imposto all'attenzione della comunità scientifica. Trasparenti alla luce visibile e relativamente inerti rispetto ai processi fotofisici, abbastanza porose da essere permeabili all'ossigeno, le nanoparticelle di silice rappresentano un sistema di trasporto ideale per la terapia fotodinamica. La strada è stata aperta dai lavori pionieristici di Prasad e Kopelman: entrambi hanno proposto, indipendentemente e contemporaneamente, l'uso di nanoparticelle di silice come vettori per fotosensibilizzatori.^{33,34} In entrambi i vettori il fotosensibilizzatore è intrappolato fisicamente. Nelle particelle di Kopelman, prodotte con un metodo di Stöber modificato in modo da includere gruppi amminici, il fotosensibilizzatore (mTHPC) è trattenuto attraverso legami a idrogeno,³⁴ mentre nelle particelle di Prasad, prodotte per polimerizzazione di viniltrietossisilano in micelle, il fotosensibilizzatore (HPPH) è probabilmente trattenuto mediante interazioni idrofobiche.³³ Negli anni successivi, Prasad ha proposto diverse variazioni del vettore originario, sfruttando processi di trasferimento di energia intraparticella tra un assorbitore a due fotoni e il fotosensibilizzatore,³⁵ oppure legando covalentemente il fotosensibilizzatore alla matrice del vettore,³⁶ o ancora drogando la matrice con atomi pesante allo scopo di aumentare la resa quantica del processo di *intersystem crossing*.³⁷ La varietà delle modifiche proposte dimostra ancora una volta la grande versatilità della silice come piattaforma per la realizzazione di vettori per farmaci.

Bibliografia

1. Spikes, J. The historical development of ideas on applications of photosensitized reactions in the health sciences. *Primary Photo-Processes in Biology and Medicine* (1985).
2. Finsen, N.R. *Phototherapy*. (Edward Arnold: London, 1901).
3. Moan, J. & Peng, Q. An outline of the hundred-year history of PDT. *Anticancer Res* **23**, 3591-3600 (2003).
4. Spikes, J.D. Photodynamic Action: From Paramecium to Photochemotherapy*. *Photochemistry and Photobiology* **65**, 142S-147S (1997).
5. Raab, O. Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien. *Z. Biol.* **39**, (1900).
6. von Tappeiner, H. & Jodlbauer, A. *Die Sensibilisierende Wirkung fluoreszierender Substanzen. Gesammte Untersuchungen über die photodynamische Erscheinung*. (F. C. W. Vogel: Leipzig, 1907).
7. von Tappeiner, H. & Jesionek, A. Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen. *Muench. Med. Wochenschr.* **47**, 2042-2044 (1903).
8. Meyer-Betz, F. Untersuchungen über die Biologische (photodynamische) Wirkung des Hamatoporphyrins und anderer Derivative des Blut- und Galenfarbstoffs. *Dtsch. Arch. Klin. Med.* **112**, 476-503 (1913).
9. Policard, A. Etudes sur les aspects offerts par des tumeurs experimentales examinees a la lumiere de Wood. *C. R. Soc. Biol.* **91**, 1423-1428 (1924).
10. Schwartz, S.K., Absolon, K. & Vermund, H. Some relationships of porphyrins, x-rays and tumours. *Univ. Minn. Med. Bull.* **27**, 7-8 (1955).
11. Lipson, R.L. & Baldes, E.J. The photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivative. *Arch. Dermatol.* **82**, 508-516 (1960).
12. Dougherty, T.J. et al. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res* **38**, 2628-2635 (1978).
13. Bonnett, R. *Chemical aspects of photodynamic therapy*. (CRC Press: 2000).
14. Dolmans, D.E.J.G.J., Fukumura, D. & Jain, R.K. Photodynamic therapy for cancer. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 380-387 (2003).

15. Castano, A.P., Mroz, P. & Hamblin, M.R. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 535-545 (2006).
16. Milgrom, L.R. *The Colours of Life: An Introduction to the Chemistry of Porphyrins and Related Compounds*. (Oxford University Press, USA: 1997).
17. Fischer, H. & Zeile, K. *Liebigs Ann. Chem.* **468**, 98 (1929).
18. Gouterman, M. Spectra of porphyrins. *Journal of Molecular Spectroscopy* **6**, 138-163 (1961).
19. Kasha, M., Rawls, H.R. & Ashraf El-Bayoumi, M. The exciton model in molecular spectroscopy. *Pure Appl. Chem.* **11**, 371-392 (1965).
20. Nyman, E.S. & Hynninen, P.H. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **73**, 1-28 (2004).
21. Sharman, W.M., van Lier, J.E. & Allen, C.M. Targeted photodynamic therapy via receptor mediated delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* **56**, 53-76 (2004).
22. Larroque, C., Pelegrin, A. & Van Lier, J. Serum albumin as a vehicle for zinc phthalocyanine: Photodynamic activities in solid tumour models. *British Journal of Cancer* **74**, 1886-1890 (1996).
23. Hamblin, M.R. & Newman, E. Photosensitizer targeting in photodynamic therapy I. Conjugates of haematoporphyrin with albumin and transferrin. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **26**, 45-56 (1994).
24. Mazière, J., Morlière, P. & Santus, R. New trends in photobiology. The role of the low density lipoprotein receptor pathway in the delivery of lipophilic photosensitizers in the photodynamic therapy of tumours. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology* **8**, 351-360 (1991).
25. Hamblin, M. & Newman, E. Photosensitizer targeting in photodynamic therapy. II. Conjugates of haematoporphyrin with serum lipoproteins. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **26**, 147-157 (1994).
26. Cavanaugh, P. Synthesis of chlorin e6-transferrin and demonstration of its light-dependent in vitro breast cancer cell killing ability. *Breast Cancer Research and Treatment* **72**, 117-130 (2002).
27. Chatterjee, D.K., Fong, L.S. & Zhang, Y. Nanoparticles in photodynamic therapy: An emerging paradigm. *Advanced Drug Delivery Reviews* **60**, 1627-1637 (2008).

28. Bechet, D. et al. Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents. *Trends in Biotechnology* **26**, 612-621 (2008).
29. Brasseur, N., Brault, D. & Couvreur, P. Adsorption of hematoporphyrin onto polyalkylcyanoacrylate nanoparticles: Carrier capacity and drug release. *International Journal of Pharmaceutics* **70**, 129-135 (1991).
30. Allemann, E. et al. PEG-coated poly(lactic acid) nanoparticles for the delivery of hexadecafluoro zinc phthalocyanine to EMT-6 mouse mammary tumours. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **47**, 382-387 (1995).
31. Konan-Kouakou, Y., Boch, R., Gurny, R. & Allémann, E. In vitro and in vivo activities of verteporfin-loaded nanoparticles. *Journal of Controlled Release* **103**, 83-91 (2005).
32. McCarthy, J., Perez, J., Brückner, C. & Weissleder, R. Polymeric nanoparticle preparation that eradicates tumors. *Nano Letters* **5**, 2552-2556 (2005).
33. Roy, I. et al. Ceramic-based nanoparticles entrapping water-insoluble photosensitizing anticancer drugs: A novel drug-carrier system for photodynamic therapy. *Journal of the American Chemical Society* **125**, 7860-7865 (2003).
34. Yan, F. & Kopelman, R. The embedding of meta-tetra(hydroxyphenyl)-chlorin into silica nanoparticle platforms for photodynamic therapy and their singlet oxygen production and pH-dependent optical properties. *Photochem. Photobiol* **78**, 587-591 (2003).
35. Kim, S., Ohulchansky, T., Pudavar, H., Pandey, R. & Prasad, P. Organically modified silica nanoparticles co-encapsulating photosensitizing drug and aggregation-enhanced two-photon absorbing fluorescent dye aggregates for two-photon photodynamic therapy. *Journal of the American Chemical Society* **129**, 2669-2675 (2007).
36. Ohulchansky, T. et al. Organically modified silica nanoparticles with covalently incorporated photosensitizer for photodynamic therapy of cancer. *Nano Letters* **7**, 2835-2842 (2007).
37. Kim, S. et al. Organically Modified Silica Nanoparticles with Intraparticle Heavy-Atom Effect on the Encapsulated Photosensitizer for Enhanced Efficacy of Photodynamic Therapy. *The Journal of Physical Chemistry C* **113**, 12641-12644 (2009).

Capitolo 3

Scopo

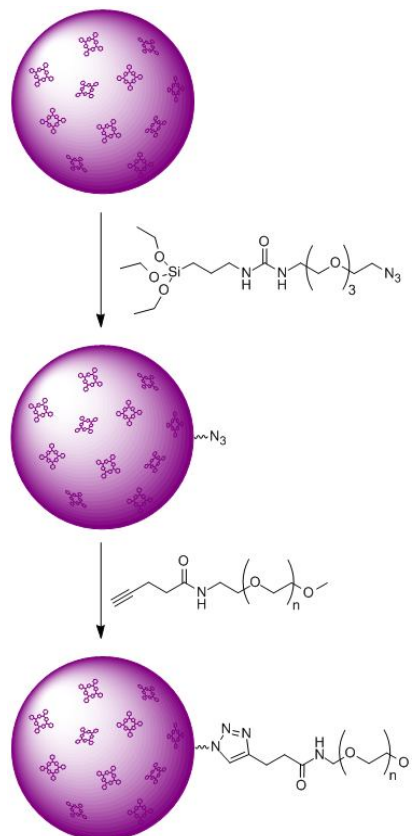
Come abbiamo visto nel capitolo precedente, le nanoparticelle di silice stanno emergendo come vettore innovativo per i fotosensibilizzatori per la terapia fotodinamica. Nel momento in cui mi trovavo ad iniziare l'attività sperimentale collegata al mio percorso di dottorato, ma anche a tutt'oggi, la grande maggioranza degli esempi riportati in letteratura sono basati sull'approccio di Prasad, che prevede la preparazione delle particelle di silice drogate con il fotosensibilizzatore mediante polimerizzazione del derivato viniltriethossisilano (VTES) in micelle di AOT o Tween-80. Questa procedura presenta diversi vantaggi, primo tra i quali il fatto che il fotosensibilizzatore non necessita di essere chimicamente modificato per venire inglobato nelle particelle (almeno così appariva a quel momento), ma anche alcuni inconvenienti. Il più importante è probabilmente proprio l'uso dei tensioattivi, che sono generalmente citotossici e la cui rimozione completa dai campioni di nanoparticelle si presenta problematica.

Per ovviare a questi problemi, ho deciso di investigare metodi alternativi di preparazione delle particelle. Il metodo delle microemulsioni è stato scartato immediatamente per diverse ragioni: in primo luogo anch'esso utilizza tensioattivi, in secondo luogo è del tutto inadatto all'introduzione di specie idrofobiche nelle particelle dal momento che la polimerizzazione del TEOS avviene nella piscina d'acqua delle micelle inverse. Il metodo di Stöber appariva invece molto promettente: la reazione non richiede tensioattivi ed avviene in etanolo, che è un solvente scarsamente tossico. L'utilizzo di questo metodo richiede però l'uso di derivati dei fotosensibilizzatori dotati di gruppi trialkossisilano in grado di copolimerizzare con il precursore della silice, il TEOS.

Esistono peraltro derivati monofunzionali di porfirine che possono essere agevolmente modificati introducendo gruppi alcossisilano.

Mi sono quindi proposto di preparare un trietossisilil derivato di una tetrafenilporfirina, e con questo preparare nanoparticelle di silice utilizzando il metodo di Stoeber e van Blaaderen per studiarne le caratteristiche e l'efficacia nel generare ossigeno di singoletto.

Il passo successivo sarebbe stata la funzionalizzazione della superficie di queste particelle con catene di PEG (polietilenglicole), allo scopo di nasconderle al sistema immunitario e alterarne favorevolmente la farmacocinetica. I tentativi diretti di preparare particelle di silice funzionalizzate PEG hanno portato a risultati insoddisfacenti, probabilmente a causa dell'elevata tendenza del PEG ad aderire in modo aspecifico alle superfici vetrose (e quindi anche alla silice) per mezzo di legami a idrogeno. Ho quindi ideato una strategia di funzionalizzazione a due stadi: le nanoparticelle sarebbero state funzionalizzate in superficie con piccole molecole contenenti un gruppo azide e poi coniugate con il PEG sfruttando la reazione di cicloaddizione tra le azidi ed il triplo legame di un derivato acetilenico del PEG 2000.



Risultati

Sintesi delle nanoparticelle

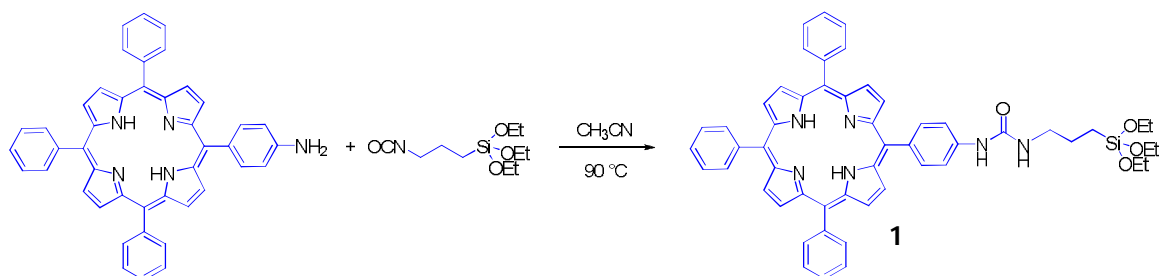
Individuazione e modificazione chimica del fotosensibilizzatore

L'obiettivo che mi ero proposto, come ho appena illustrato, era di progettare e realizzare un agente per la terapia fotodinamica basato su nanoparticelle di silice contenenti un fotosensibilizzatore covalentemente legato. Nel progettare il sistema, la scelta della procedura da utilizzare e dei materiali di partenza è stata guidata dal desiderio di soddisfare diversi importanti requisiti. Il primo di questi era la semplicità di realizzazione, in modo da consentire la facile preparazione di grosse quantità di vettore. Era, quindi, importante individuare un fotosensibilizzatore di facile preparazione, o meglio ancora commercialmente disponibile, che fosse modificabile per introdurre il gruppo trialcossisilano necessario per l'aggancio alla matrice di silice delle particelle. Individuato il fotosensibilizzatore, era necessario impostare una strategia sintetica per la preparazione del trialcossisilil derivato che fosse il più semplice possibile e che non richiedesse purificazioni cromatografiche, dal momento che i gruppi trialcossisilano sono caratterizzati da una bassa stabilità e dalla possibilità di reagire con la silice utilizzata come fase stazionaria nelle colonne cromatografiche.

Sulla base delle considerazioni appena esposte, la scelta del fotosensibilizzatore è caduta sulla 5-(4-amminofenil)-10,15,20-trifenilporfirina (TPPNH₂): questo derivato porfirinico, infatti, è disponibile in commercio e al contempo la presenza di un gruppo amminico può essere sfruttata per la necessaria funzionalizzazione. Le porfirine sono state ampiamente utilizzate come fotosensibilizzatori per la PDT e, sebbene le loro caratteristiche fotochimiche siano meno favorevoli di quelle dei fotosensibilizzatori di ultima generazione, costituiscono un buon punto di partenza per l'elaborazione di nuovi vettori.

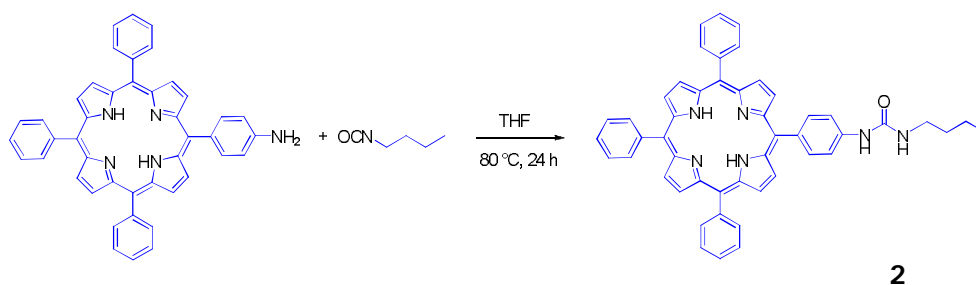
Il trietossisilil derivato della TPPNH₂ è stato sintetizzato semplicemente facendo reagire la porfirina con il 3-trietossisililpropilisocianato, anch'esso disponibile in commercio, con la conseguente formazione di un legame ureidico. Questa

particolare reazione, tra un'ammina e un isocianato, può rientrare tra le reazioni considerate di "click-chemistry", dal momento che consente di coniugare molecole differenti in assenza di catalizzatori o cofattori e senza formare sottoprodotti. In questo modo viene minimizzata la necessità e anche la difficoltà di purificare i prodotti finali.



La reazione viene condotta in acetonitrile a $90\text{ }^\circ\text{C}$ e il prodotto **1** viene isolato puro per precipitazione con esano. Questa strategia sintetica permette di ottenere il prodotto in alte rese, mentre l'assenza di sottoprodotti evita la necessità di ricorrere a separazioni cromatografiche, particolarmente inefficienti per gli alcossisilani.

La stessa metodologia è stata impiegata anche per la sintesi del derivato **2**, privo del gruppo trietossisilano e utilizzato come composto di riferimento per le caratterizzazioni fotofisiche.

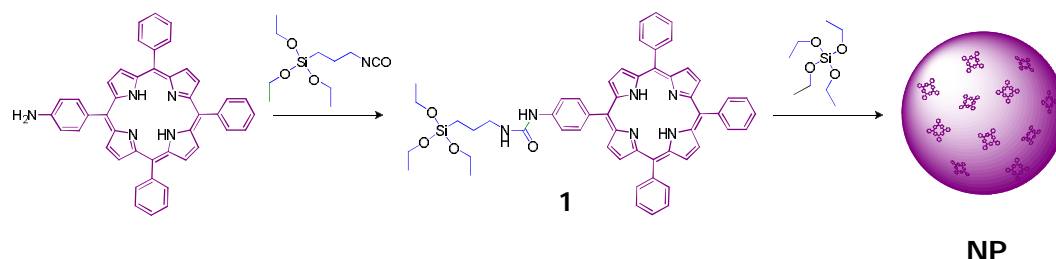


Il derivato è stato sintetizzato facendo reagire la TPPNH_2 con butilisocianato in THF a $80\text{ }^\circ\text{C}$ e il prodotto **2** è stato isolato puro per precipitazione con esano.

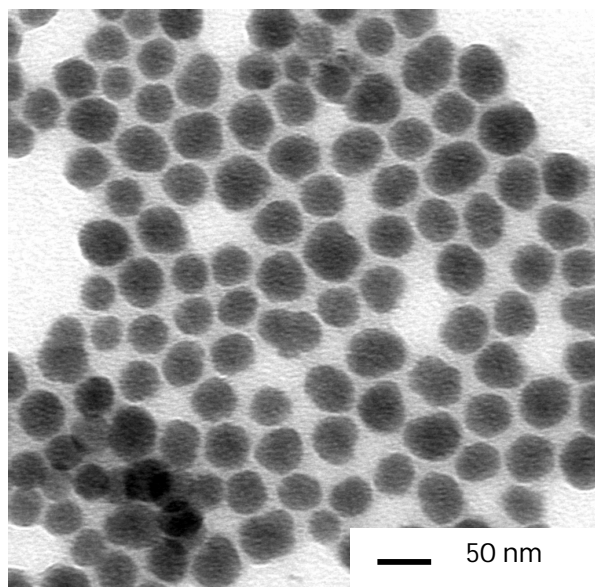
Inclusione del fotosensibilizzatore in particelle di silice

Le nanoparticelle di silice drogate con il derivato **1** sono state sintetizzate attraverso il protocollo di Stöber e van Blaaderen, come già precedentemente

accennato. Un largo eccesso di tetraetossisilano (TEOS) è stato fatto reagire con il trietossisilil derivato **1** (0.1 % in moli rispetto al TEOS) in una miscela acqua/etanolo 1:20 in presenza di ammoniaca che funge da catalizzatore.



La dimensione finale delle nanoparticelle viene controllata variando la concentrazione di ammoniaca. Per ottenere particelle del diametro di circa 40 nm è stata usata una concentrazione di ammoniaca pari a 0.37 M. Le nanoparticelle sono state separate dai componenti non reagiti e trasferite in soluzione acquosa tramite ultrafiltrazione su membrana in cellulosa rigenerata (cut-off 10 kDa). Va, infatti, ricordato che non è possibile allontanare il solvente da una soluzione di nanoparticelle di silice senza provocare la formazione irreversibile di legami Si-O-Si tra particella e particella. Le tecniche di ultrafiltrazione e dialisi sono quindi particolarmente adatte, poichè consentono di rimuovere impurezze e solventi mantenendo sempre in soluzione le particelle.



Le nanoparticelle sono state caratterizzate mediante microscopia elettronica in trasmissione (TEM) e Dynamic Light Scattering (DLS). Le immagini TEM evidenziano nanoparticelle sferiche lievemente irregolari, non aggregate, con un diametro medio di 42.4 ± 17.1 nm.

Le misure DLS effettuate confermano questi dati (diametro di 44.9 ± 15.4 nm)

Figura 1. Immagine TEM di NP

Funzionalizzazione delle particelle con PEG

La stabilità colloidale delle nanoparticelle di silice è dovuta a interazioni repulsive di natura elettrostatica: i gruppi silanolici presenti sulla superficie sono deprotonati e conferiscono alle particelle una carica netta negativa che impedisce loro di aggregare. Tali interazioni sono, però, dipendenti dalla costante dielettrica del solvente e per questo motivo la stabilità delle particelle di silice nei confronti dell'aggregazione è minore in presenza di sali disciolti. Una volta introdotte in un fluido biologico, le particelle tendono ad essere ricoperte da alcune proteine del reticolo endoteliale (RES), che attivano la risposta dei macrofagi e ne diminuiscono il tempo di permanenza nella circolazione sanguigna. Per migliorare la stabilità delle particelle in ambiente biologico e prevenirne la cattura da parte del reticolo endoteliale, si è tentato di funzionalizzarne la superficie con catene di polietilenglicole (PEG).

In alcuni esperimenti preliminari, si era tentata la funzionalizzazione diretta delle particelle con derivati del PEG dotati di un gruppo trialcossisilano, ma questi avevano dato esito negativo probabilmente poiché l'ingombro sterico del polimero sfavorisce la reazione di condensazione dei gruppi trialcossisilano con i silanoli superficiali delle particelle a favore dell'adsorbimento non covalente.

La funzionalizzazione superficiale è stata quindi condotta tramite un approccio modulare che sfrutta una reazione di cicloadizione di Huisgen tra una funzione azide e un triplo legame ("*click chemistry*"). Per applicare questa strategia è stato necessario ricoprire la superficie delle nanoparticelle con specie dotate di gruppi azide, in grado di reagire con un derivato acetilenico del PEG.

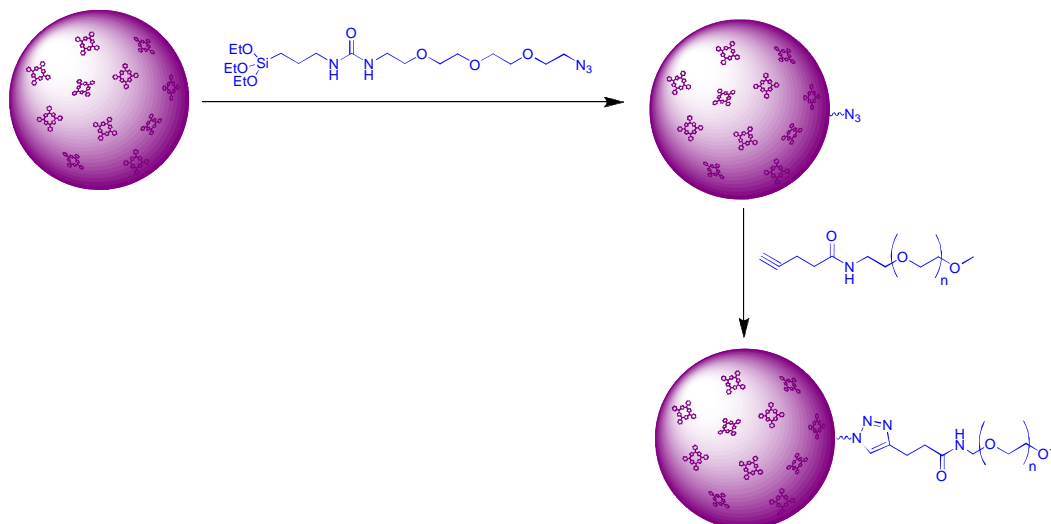
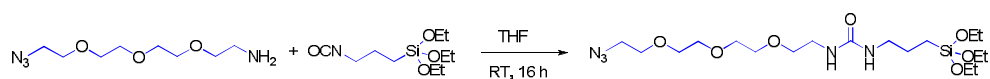


Figura 2. Schema generale della funzionalizzazione superficiale.

Azidazione della superficie delle particelle

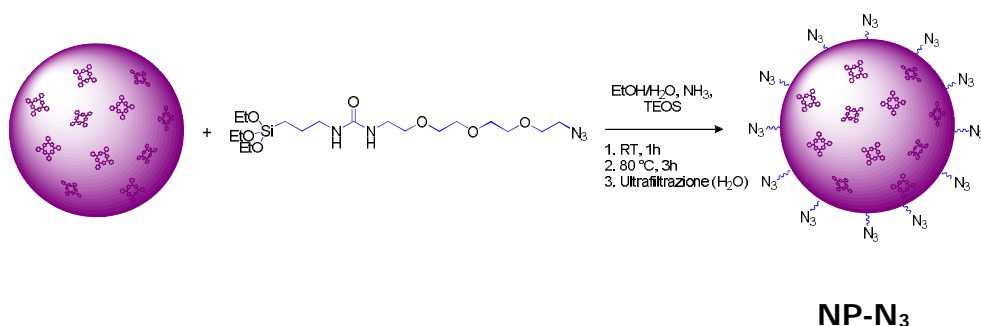
La molecola impiegata per il ricoprimento (**TEG-N₃**) è costituita da un gruppo trietossisilano unito tramite un legame ureidico ad uno spaziatore idrofilico (trietilenglicole) terminante con un gruppo azide.



TEG-N₃

La sintesi di **TEG-N₃** è stata condotta facendo reagire 11-azido-3,6,9-triossaundecan-1-ammina, disponibile in commercio, con 3-trietossisililpropilisocianato in THF a temperatura ambiente in atmosfera di N₂. Come nel caso dei derivati porfirinici **1** e **2**, questa strategia sintetica permette di evitare la separazione mediante cromatografia. Il prodotto si isola con resa quasi quantitativa senza necessità di purificazione.

Le nanoparticelle di silice sono state modificate per condensazione di **TEG-N₃** con i silanoli superficiali in una miscela acqua/etanolo 1:20, lasciando decorrere la reazione per un'ora a temperatura ambiente e per altre tre ore a riflusso.



Le particelle **NP-N₃** sono state quindi separate dai componenti non reagiti e trasferite in soluzione acquosa tramite ultrafiltrazione su membrana in cellulosa rigenerata (cut-off 10 kDa).

L'avenuto ricoprimento è stato confermato da misure di spettroscopia IR, che evidenziano la comparsa della banda caratteristica dello stretching asimmetrico delle azidi a 2114 cm⁻¹.

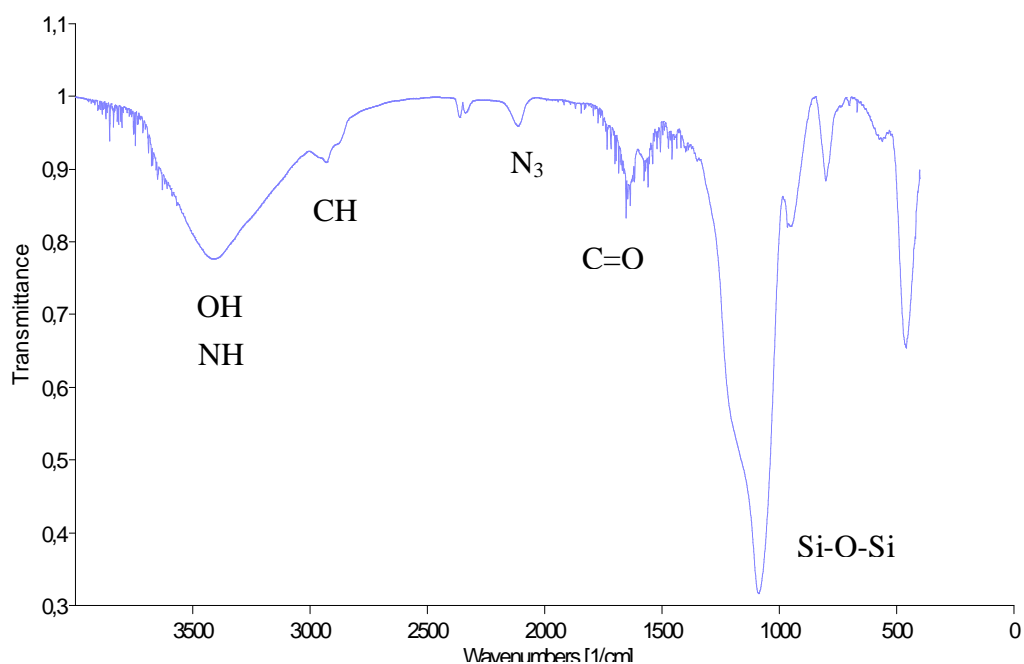


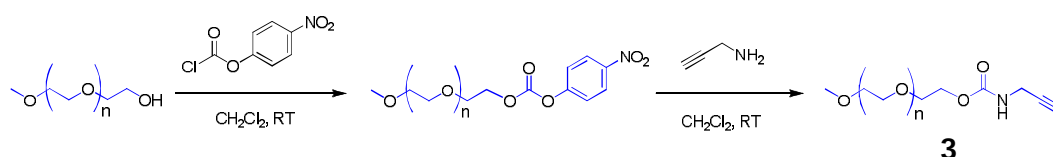
Figura 4. Spettro di assorbimento IR di nanoparticelle **NP-N₃**.

Sintesi del PEG derivato

Diversi derivati del PEG sono disponibili commercialmente in un ampio assortimento di pesi molecolari. Per questo lavoro sono stati impiegati un PEG con peso molecolare di 2 kDa (**PEG-NH₂**), funzionalizzato con un gruppo

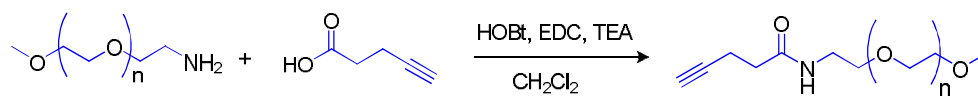
metossi e un gruppo amminico, e un PEG con peso molecolare di 5 kDa (**PEG-OH**), funzionalizzato ad un'estremità con un gruppo metossi.

Il primo tentativo di sintesi del derivato acetilenico da ancorare alle particelle è stato condotto con una strategia in due stadi (Bonora et al., 2003): dapprima si attiva il gruppo ossidrilico del **PEG-OH** con 4-nitrofenilcloroformato, formando un carbonato che va quindi fatto reagire con propargilammina per ottenere il carbammato **3**.



La sintesi del primo intermedio è stata condotta trattando **PEG-OH** con 4-nitrofenilcloroformato in diclorometano a temperatura ambiente. L'analisi $^1\text{H-NMR}$ della miscela di reazione non ha evidenziato però la presenza del prodotto desiderato. Si è deciso quindi di abbandonare ogni ulteriore tentativo.

La seconda strategia adottata sfrutta la funzione amminica di **PEG-NH₂**: il triplo legame è stato introdotto attraverso una reazione di *coupling* tra **PEG-NH₂** e acido 4-pentinoico, promossa da HOBt e EDC in presenza di trietilammina, condotta in diclorometano a temperatura ambiente.



PEG-alkino

Il prodotto **PEG-alkino** è stato isolato in alte rese per precipitazione da etanolo, indotta dall'aggiunta di metil-terbutil-etero.

PEGilazione delle particelle

L'ultimo stadio della funzionalizzazione superficiale delle nanoparticelle consiste nella coniugazione di **PEG-alchino** a **NP-N₃** attraverso la reazione di cicloaddizione di Huisgen e conseguente formazione di un derivato del triazolo.

La reazione è stata condotta in acqua in tre modi diversi (Figura 5).

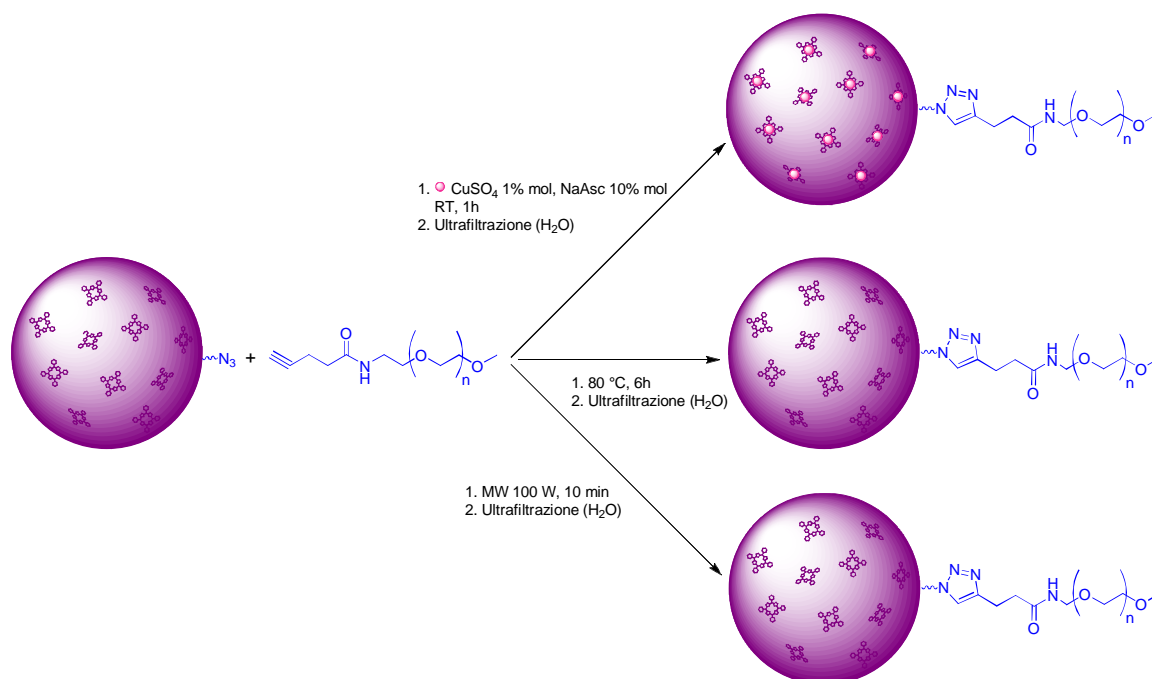


Figura 5. Schema riassuntivo delle reazioni di PEGilazione impiegate.

Il primo tentativo è stato effettuato utilizzando come catalizzatore un sale di rame(I) (condizioni catalitiche), prodotto in situ dalla riduzione di CuSO_4 con sodio ascorbato. Il decorso della reazione è stato seguito osservando la scomparsa della banda caratteristica dello stretching asimmetrico delle azidi a 2114 cm^{-1} , che si è compiuta in tempi molto brevi (poche decine di minuti). Le particelle PEGilate sono state separate poi dai componenti non reagiti e trasferite in soluzione acquosa tramite ultrafiltrazione su membrana in cellulosa rigenerata (cut-off 10 kDa).

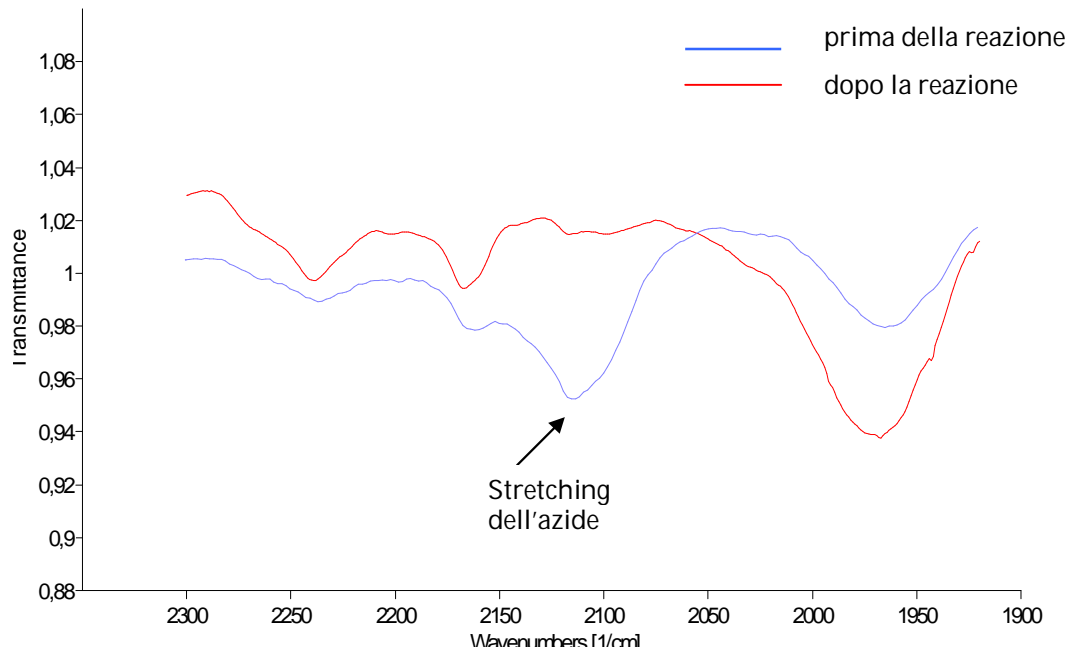


Figura 6. Confronto tra lo spettro di assorbimento IR di nanoparticelle **NP-N₃** prima e dopo la reazione di PEGilazione.

La caratterizzazione tramite spettroscopia UV-Vis ha, però, evidenziato la parziale metallazione delle porfirine da parte del rame, indicata dallo spostamento della banda di Soret a lunghezze d'onda inferiori e dalla riduzione del numero di bande Q.

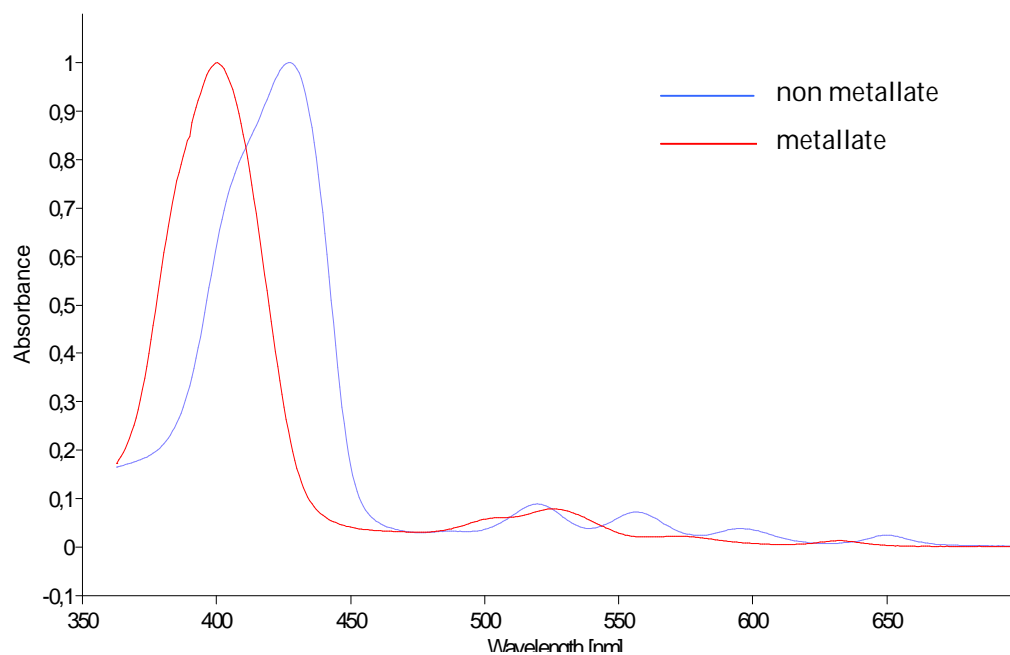


Figura 7. Confronto tra lo spettro di assorbimento UV-Vis di nanoparticelle **NP-N₃** in acqua prima e dopo la reazione di PEGilazione per via catalitica.

Sono state quindi esplorate condizioni di reazione alternative che consentissero di evitare l'uso del sale di rame come catalizzatore, ed in dettaglio la reazione ad alta temperatura e reazione assistita da microonde.

Nel caso della reazione termica la coniugazione è stata condotta trattando la miscela di **PEG-alchino** e **NP-N₃** a 80 °C per alcune ore in acqua/etanolo 1:1. Anche in questo caso il decorso della reazione è stato seguito osservando la scomparsa della banda caratteristica dello stretching asimmetrico delle azidi a 2114 cm⁻¹. Le particelle PEGilate sono state quindi separate dai componenti non reagiti e trasferite in soluzione acquosa tramite ultrafiltrazione su membrana in cellulosa rigenerata (cut-off 10 kDa).

Nel caso della reazione assistita da microonde la coniugazione è stata condotta in un reattore a microonde irradiando la miscela di **PEG-alchino** e **NP-N₃** alla potenza costante di 100 W per 10 minuti. La temperatura non è mai salita oltre i 130 °C. Il decorso della reazione è stato seguito osservando la scomparsa della banda caratteristica delle azidi. Le particelle PEGilate sono state dunque separate dai componenti non reagiti e trasferite in soluzione acquosa tramite ultrafiltrazione su membrana in cellulosa rigenerata (cut-off 10 kDa).

La caratterizzazione mediante spettroscopia UV-Vis delle particelle PEGilate, ottenute con questi due metodi, non mostra una significativa variazione delle caratteristiche spettrali della porfirina inclusa. Entrambi i metodi permettono, pertanto, di ottenere nanoparticelle PEGilate senza alterare le proprietà delle porfirine incluse.

Le analisi effettuate al DLS evidenziano un piccolo aumento del diametro idrodinamico in seguito alla funzionalizzazione superficiale con PEG (diametro misurato: 51.5 ± 24.6 nm).

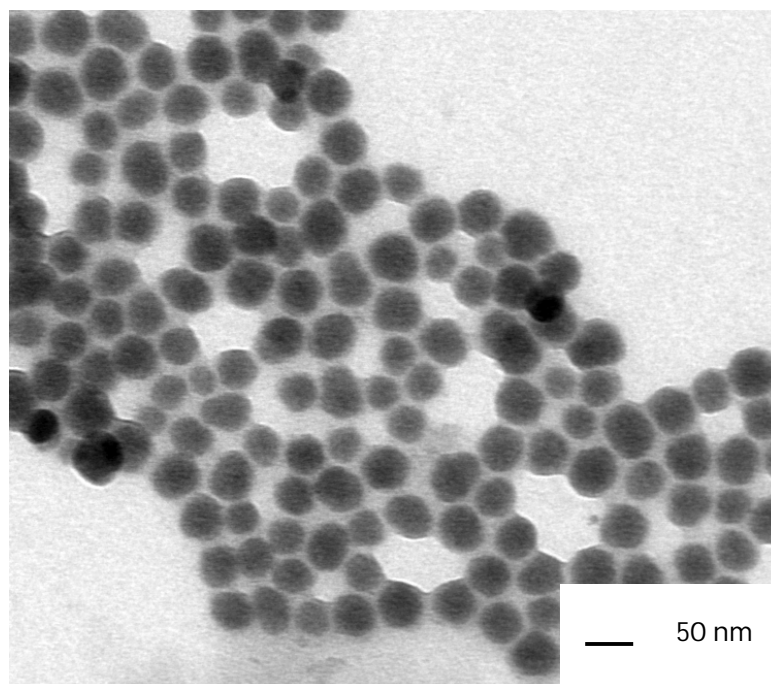


Figura 8. Immagine TEM di nanoparticelle **NP-PEG**

Caratterizzazione fotofisica

Proprietà fotofisiche

L'inclusione del fotosensibilizzatore nella matrice di silice delle particelle ed i successivi trattamenti ricevuti potrebbero modificarne le caratteristiche e di conseguenza l'efficacia nella PDT. Le proprietà fotofisiche delle particelle preparate sono state, perciò, investigate in dettaglio attraverso la misura degli spettri di assorbimento UV-Vis, di emissione, di eccitazione e la determinazione della resa quantica di emissione.

Lo spettro di assorbimento UV-Vis del composto di riferimento **2** in etanolo presenta la tipica banda di Soret a 416 nm e quattro bande Q a 513, 549, 591 e 646 nm. Il coefficiente di estinzione molare a 416 nm in questo solvente è pari a 489600 M⁻¹.

Gli spettri di assorbimento delle nanoparticelle **NP**, **NP-N₃** e **NP-PEG** in acqua sono tra loro simili e presentano una banda di Soret a 416 nm e quattro bande Q a 515, 555, 592 e 650 nm. Non si evidenziano quindi significative alterazioni in

seguito ai trattamenti effettuati per ottenere la funzionalizzazione della superficie delle particelle. Va però notato che, confrontando gli spettri di assorbimento di tutte le preparazioni di nanoparticelle con quello del composto **2**, si osservano un significativo allargamento e spostamento verso il rosso della banda di Soret e una diminuzione dell'intensità della stessa banda rispetto alle bande Q. Anche queste ultime presentano massimi di assorbimento leggermente spostati verso il rosso. Questo comportamento si osserva solitamente in presenza di aggregati di porfirine. Il fenomeno dell'aggregazione, frequente quando le porfirine si trovano in ambienti polari, è però nocivo alla terapia fotodinamica poiché provoca il quenching dello stato eccitato e la conseguente diminuzione della resa di produzione dell'ossigeno di singoletto.

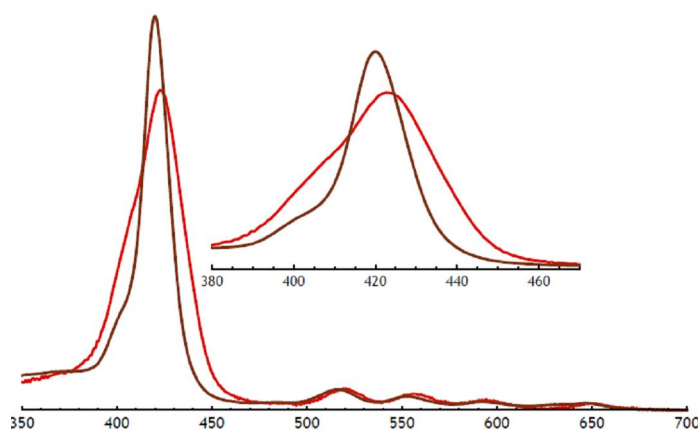


Figura 9. Spettro di assorbimento UV-Vis del composto di riferimento **2** in etanolo e di **NP-PEG** in acqua.

Gli spettri di eccitazione (misurati a 650 nm) registrati per le nanoparticelle sono però simili ai rispettivi spettri di assorbimento UV-Vis (riportato in Figura 22 per **NP-PEG**). Questo dato contraddice il precedente: infatti, poiché gli aggregati porfirinici sono scarsamente emissivi, lo spettro di eccitazione di un aggregato è solitamente differente da quello di assorbimento.

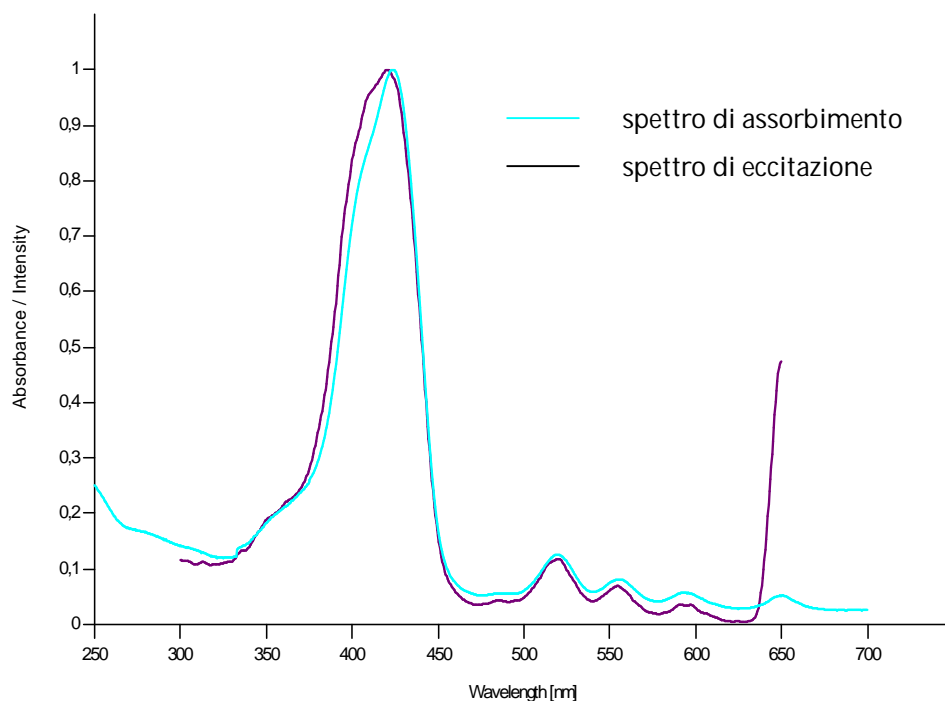


Figura 10. Confronto tra lo spettro di assorbimento UV-Vis e lo spettro di eccitazione (emissione a 650 nm) di **NP-PEG** in acqua.

Gli spettri di emissione del composto di riferimento **2** in etanolo e delle nanoparticelle **NP**, **NP-N₃** e **NP-PEG** in acqua sono stati registrati eccitando il fluoroforo a 415 nm (banda di Soret). Il confronto degli spettri, riportati in Figura 21, evidenzia un modesto red-shift delle due bande di emissione da 650 e 712 nm a 654 e 714 nm in seguito all'inclusione della porfirina nelle nanoparticelle. Le successive funzionalizzazioni superficiali non alterano ulteriormente le caratteristiche spettrali.

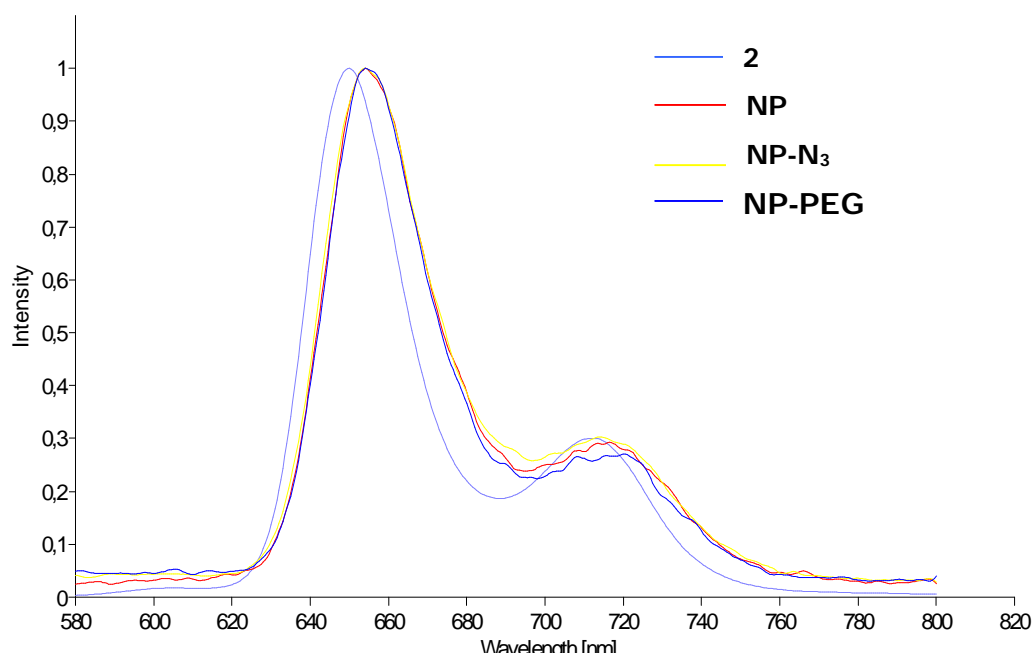


Figura 11. Spettri di emissione (eccitazione a 415 nm) del composto di riferimento **2** in etanolo e delle nanoparticelle **NP**, **NP-N₃** e **NP-PEG** in acqua.

Rese quantiche

Sono state misurate le rese quantiche di fluorescenza del composto di riferimento **2** in etanolo e delle nanoparticelle **NP**, **NP-N₃** e **NP-PEG** in acqua, impiegando come standard la porfirina TPPNH₂, la cui resa quantica è nota e le cui caratteristiche spettrali sono simili a quelle della porfirina in esame.

La resa quantica è stata determinata applicando la formula:

$$\Phi = \Phi_{std} \cdot \frac{I}{I_{std}} \cdot \frac{A_{std}}{A} \cdot \left(\frac{n}{n_{std}}\right)^2$$

dove Φ , I , A e n sono rispettivamente la resa quantica, l'intensità della banda di emissione, l'assorbanza alla lunghezza d'onda di eccitazione del campione e l'indice di rifrazione del solvente nel quale il campione è solubilizzato; Φ_{std} , I_{std} , A_{std} e n_{std} sono rispettivamente la resa quantica, l'intensità della banda di emissione, l'assorbanza alla lunghezza d'onda di eccitazione dello standard e l'indice di rifrazione del solvente nel quale si trova lo standard.

I valori ottenuti, riportati in tabella 4, evidenziano una forte diminuzione (di più di un ordine di grandezza) della resa quantica in seguito all'inclusione del fluoroforo nelle nanoparticelle. Anche questo effetto, come l'alterazione degli spetti di assorbimento riscontrata in precedenza, indica l'aggregazione delle porfirine all'interno delle particelle.

Tabella 4. Valori di resa quantica.

	Φ
2	7.2%
NP-nude	0.4%
NP-N₃	0.6%
NP-PEG	0.3%

Cinetica di produzione di ¹O₂

Un importante parametro che determina l'efficacia di un fotosensibilizzatore per la terapia fotodinamica è la sua capacità di favorire la produzione di ossigeno di singoletto. È stata quindi svolta una serie di esperimenti, volti a misurare la costante cinetica di produzione dell'ossigeno di singoletto da parte del composto di riferimento **2** in soluzione e del derivato **1** incluso nelle nanoparticelle.

La velocità di produzione dell'ossigeno di singoletto durante l'irraggiamento del fotosensibilizzatore è stata determinata seguendo per via spettrofotometrica l'ossidazione di un derivato idrofilico dell'antracene (acido 9,10-antracenedipropionico, ADPA). Infatti, l'ossigeno di singoletto dà una reazione di addizione all'antracene in posizione 9,10, portando alla formazione di un endoperossido ciclico. E' possibile seguire con facilità la reazione, monitorando la scomparsa della banda di assorbimento a 379 nm, che è caratteristica dell'ADPA, ma non del suo prodotto di ossidazione. La velocità di scomparsa dell'ADPA è ovviamente proporzionale alla velocità di produzione dell'ossigeno di singoletto.

Le cinetiche di produzione di ossigeno di singoletto sono state misurate sia per il fotosensibilizzatore modello **2** che per il derivato **1** incluso nelle nanoparticelle.

Per poter confrontare i due esperimenti è ovviamente necessario impiegare un solvente nel quale entrambi i sistemi siano solubili. Per questo motivo sono state preparate soluzioni in una miscela acqua/etanolo 1:1, in modo da evitare l'aggregazione della porfirina **2**, che si verifica in ambiente acquoso.

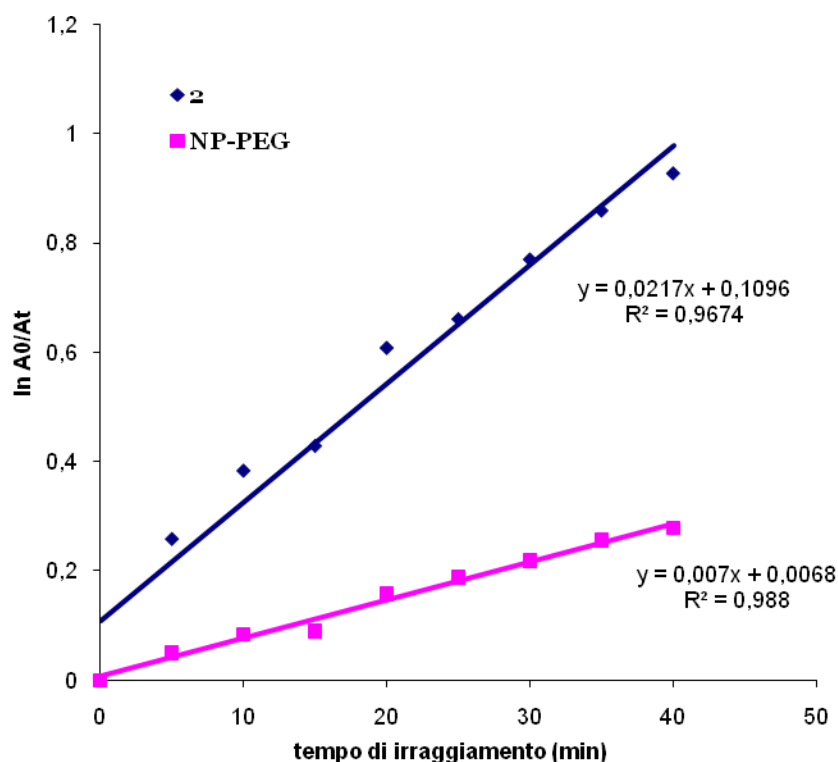


Figura 12. Confronto tra le cinetiche di produzione di ossigeno di singoletto di **2** e di **NP-PEG**.

Come si osserva dalla figura 12, la costante cinetica relativa alla produzione di ossigeno di singoletto da parte del fotosensibilizzatore libero (0.022 s^{-1}) è circa tre volte superiore a quella relativa al fotosensibilizzatore legato alle nanoparticelle (0.007 s^{-1}). Ciò è sicuramente collegato alla diminuita resa quantica del fotosensibilizzatore incluso nelle particelle, che è stata esaminata nel paragrafo precedente. Effetti della matrice di silice possono essere invece esclusi dal momento che diversi esempi riportati in letteratura dimostrano che la silice non interferisce nel rilascio dell'ossigeno di singoletto.

Prove di stabilità colloidale

Nella previsione di effettuare ulteriori studi *in vitro*, le nanoparticelle **NP-PEG** sono state sottoposte a prove preliminari di stabilità nel mezzo di coltura cellulare.

Per eseguire tali esperimenti le nanoparticelle sono state diluite in PBS, in un terreno di coltura cellulare privo di siero e in un terreno di coltura cellulare contenente siero fetale bovino al 3% (v/v) e ciascun campione è stato sottoposto a misure di *Dynamic Light Scattering* (DLS), prima e dopo filtrazione su filtro sterile in cellulosa Minisart® con diametro dei pori pari a 0.2 µm.

Per quanto concerne il campione diluito in PBS, l'analisi DLS eseguita prima della filtrazione ha evidenziato un'aggregazione delle particelle in PBS, dato che è stato poi confermato dalla mancanza di diffusione della luce da parte della soluzione filtrata e dalla sua completa decolorazione. L'esperimento dimostra quindi la formazione di aggregati di dimensioni superiori a 0.2 µm, che vengono trattenuti dal filtro.

Con il secondo campione, diluito in terreno senza siero, sono stati ottenuti risultati analoghi a quelli sopra descritti: le nanoparticelle diluite in terreno in assenza di siero hanno dato luogo a fenomeni di aggregazione e, pertanto, sono state rimosse con la filtrazione.

La soluzione del campione in terreno in presenza di siero al 3%, invece, ha presentato una buona misura di DLS, sia prima che dopo la filtrazione. La soluzione, inoltre, ha mantenuto il colore originario anche dopo il passaggio attraverso il filtro. Il diametro idrodinamico delle particelle risulta, inoltre, più elevato rispetto a quello rilevato in acqua (diametro di 104.8 ± 66.2 nm).

La formazione di aggregati e la successiva precipitazione delle nanoparticelle nei primi due esperimenti condotti sono spiegabili con il fatto che, in entrambi i casi, l'ambiente ricco di sali ha diminuito l'efficacia della stabilizzazione elettrostatica delle particelle. La funzionalizzazione con il PEG avrebbe dovuto, in teoria, sostituire la stabilizzazione elettrostatica delle particelle con una di tipo sterico. Il risultato negativo ottenuto con questi esperimenti sembra, pertanto, indicare che il grado di funzionalizzazione ottenuto sia insufficiente agli scopi prefissati.

Nel terzo esperimento, invece, la presenza del siero sembra contribuire a mantenere le particelle in dispersione, probabilmente per effetto dell'adsorbimento di uno strato di proteine, che fornisce un ulteriore contributo di stabilizzazione elettrostatica e sterica. L'aumento del diametro idrodinamico delle particelle, evidenziato negli esperimenti, conferma ulteriormente questa ipotesi.

Microscopia di fluorescenza

Per studiare le possibili applicazioni delle nanoparticelle alla PDT, è necessario prima di tutto valutare la loro capacità di internalizzazione nelle cellule. A questo scopo cellule della linea KYSE-510 sono state fatte crescere su vetrini e successivamente incubate con campioni di nanoparticelle che includevano una concentrazione di fotosensibilizzatore corrispondente rispettivamente a 1 μM ed a 5 μM . Dopo 24 ore di incubazione, i vetrini sono stati osservati al microscopio a fluorescenza. Si è notato un accumulo di nanoparticelle all'interno delle cellule, probabilmente dovuto a fenomeni di endocitosi. Tale ipotesi è supportata dal fatto che la fluorescenza delle nanoparticelle è distribuita in diversi *spot* all'interno del citoplasma cellulare (Figura 13). Questa distribuzione potrebbe corrispondere ad una localizzazione all'interno dei lisosomi: la questione verrà comunque affrontata nei successivi sviluppi di questo progetto di tesi. Tuttavia, gli studi di localizzazione cellulare del nanosistema potrebbero essere complicati dal fatto che il derivato porfirinico incluso nelle nanoparticelle presenta una scarsa emissione di fluorescenza.



Figura 13. Cellule KYSE-510 incubate con una soluzione acquosa 5 μ M di nanoparticelle **NP-PEG**.

Conclusioni

In conclusione, l'utilizzo della sintesi di Stöber nella preparazione di particelle drogate con porfirine da utilizzare nella terapia fotodinamica non hanno riposto positivamente alle attese. Da un lato, l'aggregazione del fotosensibilizzatore all'interno della particella ne diminuisce l'efficienza di produzione dell'ossigeno di singoletto. Tale aggregazione è dimostrata dalla modificazione della forma della banda di Soret negli spettri di assorbimento, dalla drastica diminuzione di resa quantica del fluoroforo intrappolato nelle particelle e dalla minor efficienza nel processo di generazione dell'ossigeno di singoletto. Tutte queste modificazioni delle proprietà delle particelle e del fotosensibilizzatore rendono il vettore poco promettente come agente per la PDT.

Anche la tecnica di funzionalizzazione superficiale con PEG si è rivelata laboriosa e scarsamente efficace. Le nanoparticelle di silice contenenti il derivato porfirinico sono state funzionalizzate in superficie con trietossisilil derivati idrofilici recanti un gruppo azide, e successivamente coniugate con il PEG sfruttando una reazione di cicloadizione, promossa da microonde, tra le azidi e il triplo legame di un derivato acetilenico di un PEG.

La stabilizzazione sterica che il PEG avrebbe dovuto conferire si è dimostrata insufficiente a impedire l'aggregazione delle particelle nei primi due ambienti. In presenza del siero, invece, le particelle mostrano un'elevata stabilità, dovuta probabilmente all'adsorbimento di proteine sulla superficie. Tutto ciò sembra indicare che la densità dello strato di PEG ottenuto non è sufficiente a impedire alle particelle di aggregare in ambiente fisiologico in assenza di siero.

Capitolo 4

In questo capitolo viene descritta la preparazione di nanoparticelle di silice modificate con gruppi organici (ORMOSIL) drogate con meta-tetra(idrossifenil)clorina (mTHPC), un fotosensibilizzatore di seconda generazione. Lo studio del destino di questi nanovettori e della molecola incapsulata al loro interno in seguito all'esposizione a fluidi biologici e cellule viventi ha fornito risultati inattesi. I risultati ottenuti suggeriscono che il trasporto di farmaci incapsulati in nanosistemi possa essere più complesso di come appare. Viene presentato un saggio fluorimetrico basato sul trasferimento energetico che può essere utile per determinare senza ambiguità se un farmaco intrappolato fisicamente venga trasportato nelle cellule ancora associato al nanosistema o segua una strada diversa.

Scopo

Alla luce dei risultati ottenuti nello studio del vettore presentato nel capitolo precedente, che hanno messo in evidenza come le proprietà di un fotosensibilizzatore modello risultino degradate in seguito all'incapsulamento nel reticolo di silice (capitolo 3), si è pensato di sviluppare un nuovo vettore basato su un materiale più adatto. Individuata la causa dell'inefficienza del primo vettore nell'aggregazione del fotosensibilizzatore, è stato naturale considerare matrici più porose e più idrofobiche nelle quali l'aggregazione fosse sfavorita. Vettori di questo tipo sono noti in letteratura, sebbene non siano caratterizzati a fondo per quel che riguarda il comportamento *in vitro* e risultino difficili da funzionalizzare. Il lavoro verso la sintesi di un vettore alternativo è partito dunque dallo studio dettagliato di uno dei sistemi esistenti, che avrebbe dovuto costituirne la base.

Il vettore prescelto è una nanoparticella di silice modificata con gruppi organici (*organically modified silica*, ORMOSIL). Il metodo di sintesi, proposto nel 2003 da Prasad, prevede la crescita delle particelle nel core idrofobico di micelle di AOT (sodio bis(2-etilesil)solfosuccinato), per idrolisi e condensazione di un precursore idrofobico (viniltrietossisilano). Aggiungendo un fotosensibilizzatore lipofilo alla miscela di reazione, questo rimane intrappolato nella struttura delle particelle in crescita, dove viene efficacemente trattenuto. In questo studio è stato utilizzato un fotosensibilizzatore

di seconda generazione, la meso-tetra(idrossifenil)clorina (mTHPC), approvato per l'uso clinico nella terapia fotodinamica dei tumori e commercializzato con il marchio Foscan.

Le nanoparticelle sono state caratterizzate mediante microscopia elettronica in trasmissione e *dynamic light scattering*, e le proprietà fotofisiche del fotosensibilizzatore incapsulato (spettro di assorbimento UV-Vis e spettri di emissione e di eccitazione di fluorescenza) studiate in dettaglio e confrontate con le misure effettuate sulla molecola libera. L'efficacia del vettore è stata studiata in via preliminare misurando la velocità di produzione di ossigeno singoletto, e quindi attraverso la determinazione della curva dose-risposta su cellule KYSE 510 in condizioni di irradiazione controllata. La localizzazione intracellulare è stata studiata mediante microscopia confocale, con l'ausilio di marcatori per compartimenti cellulari specifici quali lisosomi, apparato di Golgi, reticolo endoplasmatico e nucleo.

Risultati

Sintesi delle nanoparticelle drogate con mTHPC

La sintesi delle nanoparticelle di silice modificata con gruppi organici (ORMOSIL) è stata condotta secondo il metodo di Roy e collaboratori,¹ che ha il vantaggio di permettere di includere coloranti lipofilici senza dover introdurre modifiche nella loro struttura chimica. La procedura prevede la polimerizzazione del precursore idrofobico vinitrietossisilano (VTES), in condizioni di catalisi basica, nel nucleo idrofobico di micelle di AOT/n-butanolo drogate con mTHPC. La crescita delle particelle è stata seguita mediante *dynamic light scattering*. A crescita terminata, le miscele di reazione sono state sottoposte a un'estesa ultrafiltrazione su membrana in cellulosa rigenerata (cut-off 10 kDa, con pori di circa 3 nm), fino alla completa rimozione delle specie non reagite e non incapsulate e alla riduzione della concentrazione di AOT a valori non tossici. Il limite di citotossicità dell'AOT è stato determinato su cellule KYSE 510, che hanno mostrato di risentire della presenza del tensioattivo in concentrazioni superiori a 30 μM nel mezzo di coltura.

Le nanoparticelle sono state caratterizzate mediante microscopia elettronica in trasmissione (TEM) e *dynamic light scattering* (DLS). Le immagini TEM evidenziano nanoparticelle sferiche regolari, non aggregate, con un diametro medio di 33 ± 9 nm (figura 1). Le misure di *dynamic light scattering* forniscono un diametro idrodinamico di 41 ± 6 nm, in buon accordo con le immagini TEM.

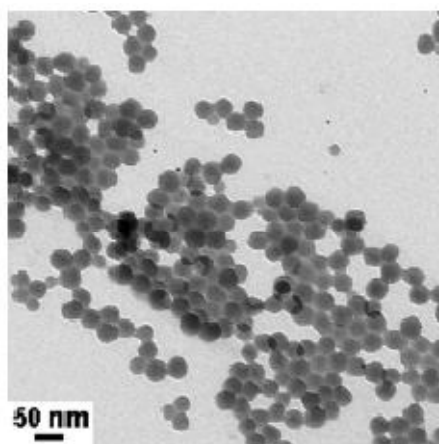


Figura 1. Microscopia elettronica in trasmissione di nanoparticelle ORMOSIL drogate con mTHPC.

Caratterizzazione fotofisica

Come nel caso del vettore descritto nel capitolo 3, è fondamentale valutare se e come l'incapsulazione abbia alterato le proprietà fotofisiche del fotosensibilizzatore, analizzando gli spettri di assorbimento e di emissione ed eccitazione di fluorescenza (figura 2). In questo caso occorre anche accertare con più attenzione l'avvenuta incapsulazione, dal momento che il fotosensibilizzatore non è covalentemente legato alla matrice.

Lo spettro di assorbimento della soluzione acquosa di nanoparticelle ultrafiltrata mostra un'intensa banda di Soret intorno a 420 nm e quattro bande Q a lunghezze d'onda più alte, la più intensa delle quali è centrata intorno a 650 nm. L'emissione di fluorescenza è centrata intorno a 652 nm.

È noto che in acqua l'mTHPC forma aggregati.² La formazione degli aggregati è segnalata dall'allargamento della banda di Soret e dallo spegnimento dell'emissione di fluorescenza. L'assenza di questi segni caratteristici conferma l'incapsulazione del fotosensibilizzatore che, non potendo esistere in forma monomericamente in acqua, deve trovarsi nella matrice del vettore, l'unico altro ambiente a sua disposizione. L'assenza di aggregazione è confermata anche dall'ottima corrispondenza tra gli spettri di assorbimento e di eccitazione di fluorescenza nelle soluzioni acquose di nanoparticelle drogate con mTHPC (figura 2).

Inoltre, la corrispondenza delle caratteristiche spettrali (forma degli spettri e lunghezza d'onda dei massimi di assorbimento) dell'mTHPC incapsulato con quelle dell'mTHPC libero in toluene suggerisce che la polarità dell'interno del vettore sia simile a quella del toluene, in accordo con osservazioni precedenti effettuate su altri coloranti intrappolati in ORMOSIL di uguale composizione.³ Per questo motivo, tutte le concentrazioni di mTHPC incapsulato nel presente lavoro sono state determinate per via spettrofotometrica usando i coefficienti di estinzione molare misurati in toluene ($\epsilon_{420} = 166000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\epsilon_{650} = 38300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

La resa del processo di sintesi e il *loading* del farmaco sono stati quantificati per pesata e per via spettrofotometrica. Un tipico campione di nanoparticelle ha una concentrazione in peso di circa 0.5 mg/mL e una concentrazione di mTHPC di circa 7 μM . Questi valori corrispondono ad un *loading* dell'1%.

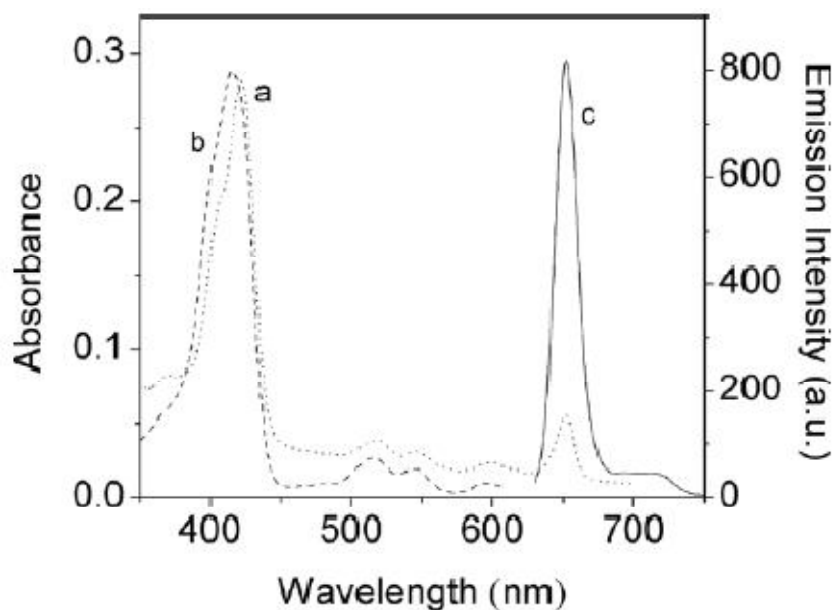


Figura 2. Spettri di assorbimento (a, linea a punti), eccitazione di fluorescenza (b, linea tratteggiata, $\lambda_{\text{max}} = 652 \text{ nm}$) ed emissione di fluorescenza (c, linea solida, $\lambda_{\text{exc}} = 420 \text{ nm}$) di mTHPC $1 \mu\text{M}$ incapsulata in nanoparticelle ORMOSIL sospese in acqua.

Stabilità colloidale

Prima di effettuare gli esperimenti *in vitro*, è stato necessario verificare che le nanoparticelle non aggregassero nelle condizioni di coltura delle cellule. Gli esperimenti di stabilità colloidale sono stati condotti come per il vettore descritto nel capitolo 3, confrontando i risultati ottenuti da misure di *dynamic light scattering* su campioni di nanoparticelle diluiti in diversi mezzi, prima e dopo la filtrazione su filtri in PVDF (diametro dei pori $0.22 \mu\text{m}$).

Le nanoparticelle, stabili in acqua, aggregano e precipitano sia in PBS che nel mezzo di coltura cellulare RPMI, a causa dell'elevata forza ionica di entrambi gli ambienti. La presenza di FBS al 3% nel mezzo di coltura, tuttavia, impedisce l'aggregazione e la precipitazione, probabilmente per l'effetto dell'adsorbimento di proteine del siero che conferiscono alle particelle una stabilizzazione di natura elettrostatica e sterica.

Produzione di ossigeno singoletto

L'efficacia del vettore è stata studiata in via preliminare misurando la velocità di produzione di ossigeno singoletto. L'ossigeno singoletto generato dall'mTHPC in diversi

tipi di microambienti (acqua, etanolo/acqua 1:1, PBS + 3% FBS) è stato determinato indirettamente seguendo la scomparsa di una banda di assorbimento caratteristica dell'acido antracendipropionico (ADPA), come descritto nel capitolo 3. L'ADPA è un derivato idrofilico dell'antracene che reagisce velocemente con l'ossigeno singoletto producendo un 9,10-endoperossido incolore.

Le costanti cinetiche per il *photobleaching* dell'ADPA nei diversi mezzi sono state calcolate come la pendenza del *fit* lineare dei grafici di $\ln(A_0/A(t))$ in funzione del tempo di irradiazione t , dove A_0 e $A(t)$ sono rispettivamente l'assorbanza a 378 nm prima dell'irradiazione e l'assorbanza al tempo t . Questa analisi si basa sull'assunzione che l'ossidazione dell'ADPA sia un processo di primo ordine, assunzione confermata dalla bontà del *fit* lineare almeno per brevi tempi di irradiazione. Infatti, fatta eccezione per gli esperimenti condotti in etanolo/acqua, l'mTHPC ha subito in tutti i casi una degradazione durante l'irradiazione, come già osservato da Belitchenko e collaboratori.⁴ Le costanti di velocità del *photobleaching* dell'ADPA sono riportate in tabella 1.

Tabella 1. Costanti di velocità (k) per il *photobleaching* dell'ADPA (20 μM) irradiato con luce di 600-700 nm (50 mW/cm^2) in presenza di mTHPC (1 μM). La cinetica è stata misurata in diversi ambienti, per aggiunta di mTHPC veicolato dal solvente standard o da nanoparticelle. I dati sono riportati come medie \pm deviazione standard ($n = 3$).

Mezzo	mTHPC stock	$k \cdot 10^2 \pm \text{s.d.} (\text{min}^{-1})$
ethanol/water 1:1	standard solvent	5.64 ± 1.42
	NPs suspension	5.47 ± 0.45
PBS + 3% FBS	standard solvent	1.78 ± 0.12
	NPs suspension	2.13 ± 0.77
Water	NPs suspension	1.42 ± 0.32

Le costanti cinetiche di *photobleaching* misurate in etanolo/acqua sono più alte di quelle misurate in acqua o PBS e siero, in accordo con i risultati attesi in base ai diversi tempi di vita dell'ossigeno singoletto in quegli ambienti. Le costanti cinetiche misurate in etanolo/acqua in presenza del fotosensibilizzatore incapsulato sono risultate uguali a quelle misurate in presenza del fotosensibilizzatore veicolato con il solvente standard (etanolo/polietilenglicole 400/acqua 20:30:50 in volume) entro l'errore sperimentale. Similmente, le costanti cinetiche misurate in PBS e siero in presenza del fotosensibilizzatore incapsulato non sono risultate significativamente diverse da quelle misurate in presenza del fotosensibilizzatore libero. Entrambe le costanti cinetiche misurate in siero e PBS sono leggermente più alte di quelle misurate in acqua.

Un esperimento di controllo condotto in condizioni identiche eccetto che per l'assenza di mTHPC, nel quale non sono state registrate variazioni dello spettro di assorbimento, ha permesso di escludere che la luce, da sola, potesse influenzare il *photobleaching* dell'ADPA.

La microstruttura e la composizione chimica del vettore sembrano, alla luce di questi risultati, non interferire con il processo di fotosensibilizzazione: le particelle hanno una porosità tale da consentire un'efficiente diffusione dell'ossigeno in entrata e dei ROS in uscita, e un'inerzia chimica sufficiente a non consumare i ROS prima che raggiungano la superficie.

Curve dose-risposta di fototossicità

La valutazione dell'efficienza di un farmaco richiede la determinazione di una curva dose-risposta, ovvero un grafico che correla una risposta biologica alla dose di farmaco somministrata. Nello studio *in vitro* dei farmaci per terapia fotodinamica, la risposta biologica più rilevante è la fototossicità, ovvero la tossicità del farmaco in combinazione con l'altra componente della terapia fotodinamica, la luce. La fototossicità è riportata nelle curve dose-risposta come la percentuale di vitalità cellulare rispetto alle cellule non trattate.

Cellule KYSE 510 sono state incubate per 24 ore in RPMI con il 10% di FBS, e quindi per altre 24 ore, al buio, in un mezzo fresco contenenti concentrazioni diverse di mTHPC (fino a 1.7 μM) veicolato in nanoparticelle o in solvente standard. Le cellule sono state quindi irradiate con una dose di luce di 0.12 J/cm², e la vitalità cellulare quantificata, dopo altre 24 ore, con il saggio MTS oppure con il saggio di esclusione del Trypan Blue.

Sorprendentemente, le curve dose-risposta relative all'mTHPC veicolato dal solvente standard sono risultate perfettamente sovrapposte a quelle relative all'mTHPC incapsulato nelle nanoparticelle. Una significativa riduzione della vitalità cellulare è evidente già a una concentrazione di mTHPC di 0.2 μM , e diventa completa a 1.25 μM .

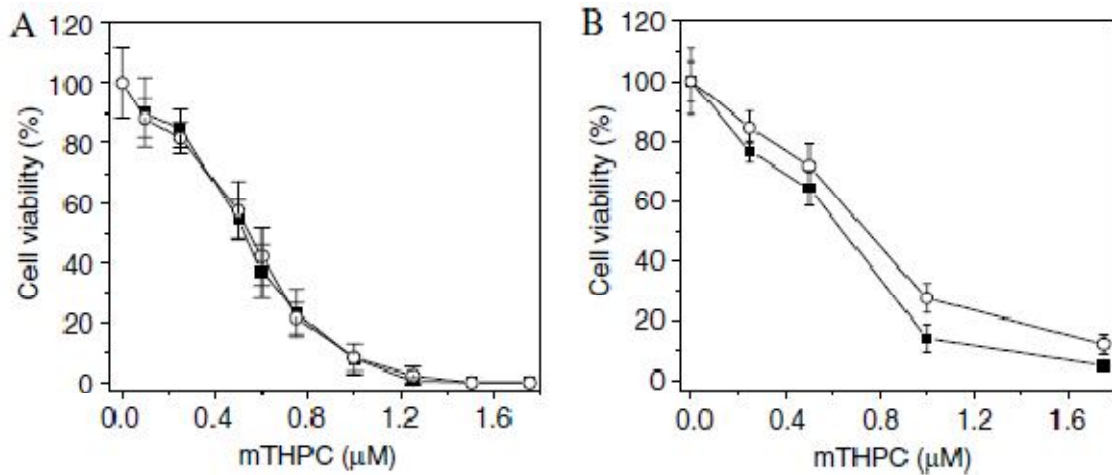


Figura 3. Vitalità di cellule KYSE 510 irradiate con 0.12 J cm^{-2} di luce di 600-700 nm dopo 24 ore di incubazione con concentrazioni crescenti di mTHPC trasportata dal solvente standard (quadrati pieni) o incapsulata in nanoparticelle (cerchi vuoti). La vitalità cellulare è stata determinata a 24 ore dall'irradiazione con il saggio di esclusione del Trypan Blue (A) e il saggio MTS (B). I dati rappresentano le medie \pm deviazioni standard ($n = 6$).

Tossicità al buio del fotosensibilizzatore

La selettività della terapia fotodinamica deriva in larga parte dalla sua natura di terapia binaria, ovvero basata sull'azione sinergica di due componenti individualmente inerti (il fotosensibilizzatore e la luce). È fondamentale quindi, per prevedere eventuali effetti collaterali della terapia, controllare gli effetti del fotosensibilizzatore in assenza di luce. Questi studi sono serviti anche come controllo per gli esperimenti di fototossicità, in modo da escludere che un'eventuale componente indipendente dall'irradiazione abbia potuto contribuire alla risposta cellulare.

Per studiare la tossicità al buio, cellule KYSE 510 sono state incubate per 24 ore in RPMI con il 10% di FBS, e quindi per altre 24 ore, al buio, in un mezzo fresco contenenti concentrazioni diverse di mTHPC (fino a $5 \mu\text{M}$) veicolato in nanoparticelle o in solvente standard. La vitalità cellulare è stata quantificata con il test MTS, subito e dopo altre 24 ore di incubazione in mezzo fresco privo di mTHPC. Alcune colture sono state esposte solamente al solvente standard in concentrazione pari a quella usata per veicolare la più alta dose di mTHPC. I risultati di questi esperimenti sono mostrati in figura 4.

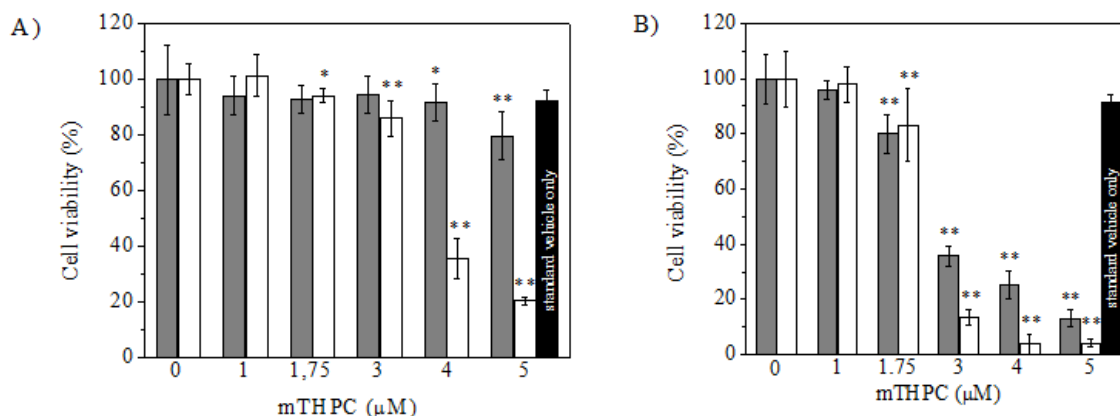


Figura 4. Vitalità di cellule KYSE 510 esposte per 24 ore al buio a concentrazioni crescent di THPC veicolate con il solvent standard (colonne bianche) o in nanoparticelle (colonne grigie), oppure esposte al solo solvent standard (colonne nere). La vitalità è relativa alle cellule di controllo trattate secondo lo stesso protocollo ma non esposte all'mTHPC o al solvente standard. In A) e B) sono mostrate le vitalità cellulari misurate rispettivamente a 24 e 24 + 24 ore. I dati rappresentano la media \pm deviazione standard (n = 6) *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ rispetto alle cellule di controllo.

Tossicità al buio e fototossicità del vettore vuoto

In una serie di esperimenti di controllo, è stata studiata anche la tossicità del vettore vuoto, ovvero privo di fotosensibilizzatore. Il protocollo è analogo a quello descritto nel paragrafo precedente per la tossicità al buio del fotosensibilizzatore: cellule KYSE 510 sono state incubate per 24 ore in RPMI con il 10% di FBS, e quindi per altre 24 ore, al buio, in un mezzi freschi contenenti concentrazioni diverse di nanoparticelle vuote (fino a 0.35 mg/mL). La vitalità cellulare è stata quantificata con il test MTS, subito e dopo altre 24 ore di incubazione in mezzo fresco privo di nanoparticelle.

In un ulteriore controllo, la fototossicità del vettore vuoto è stata determinata irradiando le cellule con 0.12 J/cm² dopo 24 ore di incubazione al buio insieme al vettore (alla sola concentrazione di 0.2 mg/mL). L'esperimento ha evidenziato solo una leggera diminuzione della vitalità (89.5 \pm 6.2 %) rispetto alle cellule non esposte alla luce.

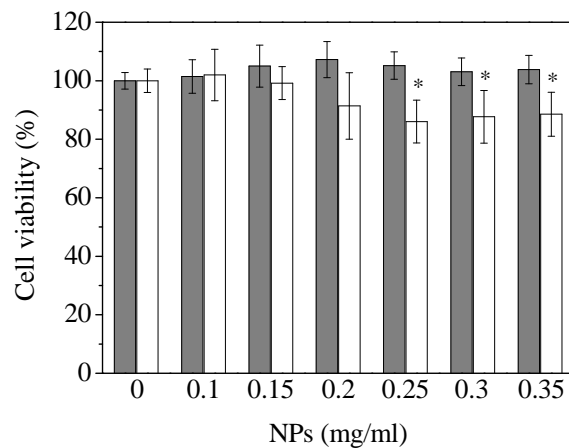


Figura 5. Vitalità di cellule KYSE 510 esposte per 24 ore a diverse concentrazioni di vettore vuoto, misurata a 24 ore (colonne grigie) o a 24 + 24 ore (colonne bianche). I dati rappresentano la media \pm deviazione standard ($n = 9$) *: $p < 0.01$ rispetto alle cellule di controllo.

Localizzazione intracellulare

La distribuzione spaziale del fotosensibilizzatore al momento dell'irradiazione è un fattore determinante per l'esito del trattamento: i ROS generati dal fotosensibilizzatore esercitano la loro azione entro un raggio di poche decine di nanometri, danneggiando solo componenti cellulari specifici. Il meccanismo che porta alla morte della cellula bersaglio, quindi, dipende criticamente dalla localizzazione intracellulare del farmaco.

Lo studio della localizzazione intracellulare è stato condotto mediante microscopia di fluorescenza su cellule KYSE 510 incubate a 37 °C con mTHPC (0.75 μ M) veicolato dalle nanoparticelle o dal solvente standard. Le immagini riportate in figura 4 mostrano una fluorescenza rossa distribuita in tutto il citoplasma, ma particolarmente intensa nella regione perinucleare. Il confronto delle distribuzioni del fotosensibilizzatore trasportato dal solvente standard o dalle nanoparticelle non evidenzia differenze significative.

Per individuare esattamente quali siano i compartimenti cellulari nei quali si accumula il farmaco sono stati condotti esperimenti di colocalizzazione con sonde fluorescenti specifiche per apparato di Golgi, reticolo endoplasmatico, mitocondri e lisosomi. Le immagini delle cellule coincubate con mTHPC e marcatori del Golgi (NBD- C_6 ceramide) oppure del reticolo endoplasmatico (ER-Tracker Green) mostrano solo zone di colore giallo, indicative della completa colocalizzazione della fluorescenza rossa del fotosensibilizzatore e di quella verde del marcatore (figura 4, immagini D-1). Nelle

immagini delle cellule coincubate con mTHPC e marcatori dei mitocondri (Rodamina 123) o dei lisosomi (LysoTracker Green), invece, la distribuzione della fluorescenza del fotosensibilizzatore e di quella marcatore appaiono per lo più scorrelate (figura 6, immagini A-C e J-L).

I risultati degli esperimenti di colocalizzazione suggeriscono che l'mTHPC sia localizzata nell'apparato di Golgi e nel reticolo endoplasmatico, ma non nei lisosomi o nei mitocondri. È noto che l'mTHPC, veicolato con il solvente standard, si associa con diverse proteine del siero^{5,6} e mostra la stessa localizzazione anche in altre linee cellulari.⁷ L'identica localizzazione dell'mTHPC veicolato con le nanoparticelle potrebbe essere mediata dalle stesse proteine.

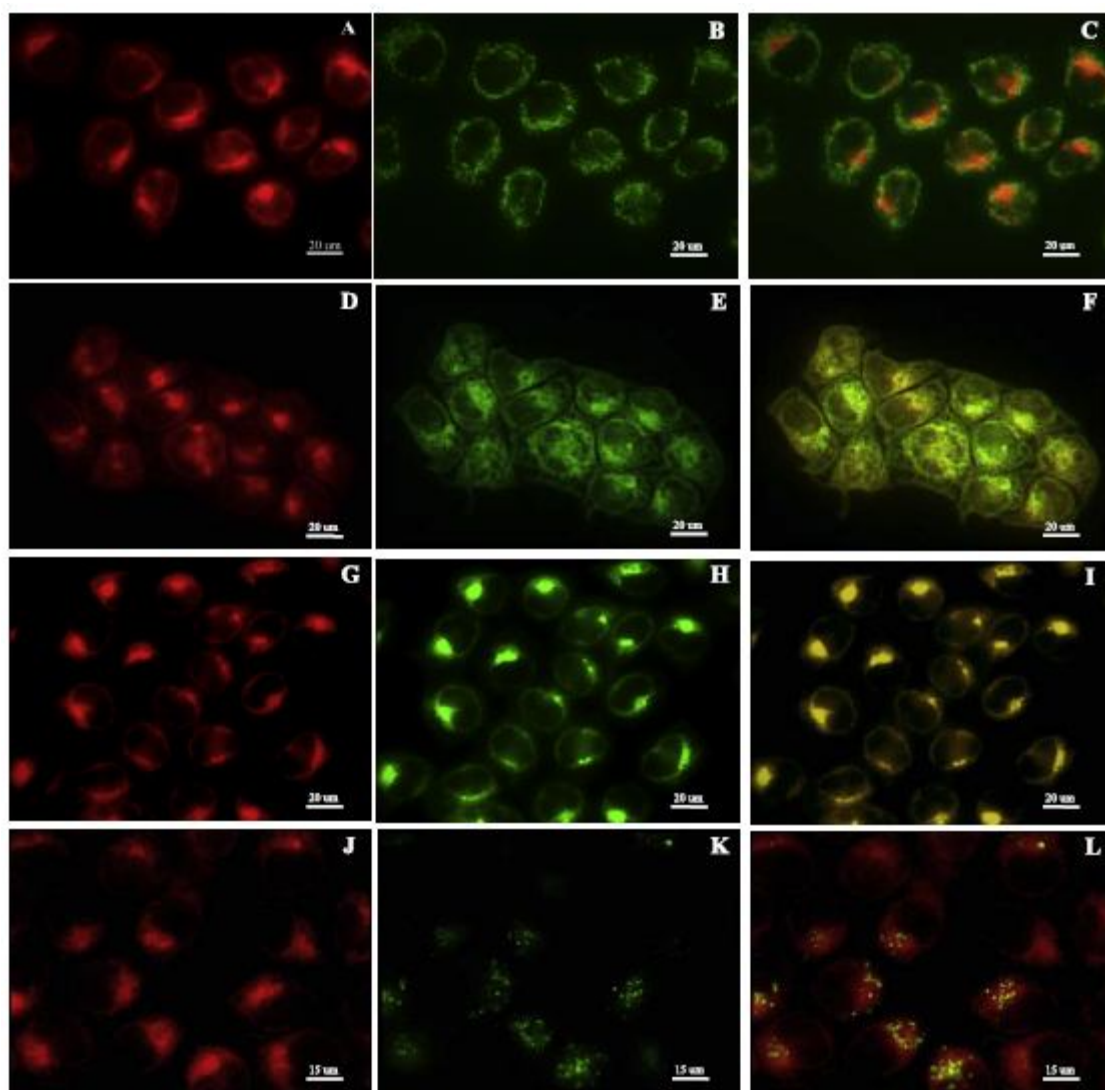


Figura 6. Localizzazione di mTHPC (0.75 μ M) trasportato in nanoparticelle in cellule KYSE 510 dopo 24 ore di incubazione a 37 °C. La fluorescenza rossa dell'mTHPC (A, D, G

e J) si colocalizza ampiamente con la fluorescenza verde di ER-Tracker Green (E) e NBD-C6 ceramide (H), usate rispettivamente come sonde del reticolo endoplasmatico e dell'apparato di Golgi, mentre la colocalizzazione con il LysoTracker Green (K) o la rodamina 123 (B) non è molto evidente. Le immagini sovrapposte per ciascuna sonda sono mostrate in C, F, I e L.

Le osservazioni sono state effettuate a tempi diversi per valutare la dinamica dell'accumulo intracellulare del farmaco. La distribuzione di fluorescenza osservata dopo mezz'ora e dopo due ore di incubazione a 37 °C è sostanzialmente identica a quella osservata dopo 24 ore (figura 7). Questi risultati indicano che la localizzazione dell'mTHPC nell'apparato del Golgi e nel reticolo endoplasmatico è molto rapida.

Per studiare un'eventuale redistribuzione o efflusso del fotosensibilizzatore a lungo termine, sono state registrate immagini di cellule incubate con mTHPC per 24 ore e poi coltivate per altre 24 ore in un mezzo privo di mTHPC. La localizzazione non sembra cambiare significativamente (figura 7, immagine D).

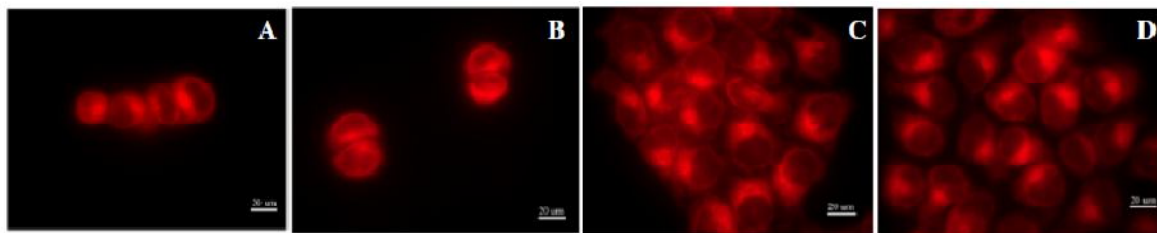


Figura 7. Localizzazione dell'mTHPC in cellule KYSE 510 in funzione del tempo di incubazione a 37 °C. La distribuzione della fluorescenza intracellulare dell'mTHPC è stata analizzata a 0.5 (A), 2 (B) e 24 ore (C) di incubazione e a 24 ore seguite da ulteriori 24 ore in un mezzo di coltura privo di mTHPC (D).

Uptake

Quantificare l'*uptake* dell'mTHPC nelle cellule è importante per interpretare i risultati degli esperimenti di fototossicità disaccoppiando i due fattori da cui dipende la risposta osservata: l'effetto della concentrazione intracellulare e l'effetto intracellulare del farmaco. In altre parole, la concentrazione intracellulare più bassa di un farmaco più potente potrebbe provocare gli stessi effetti di una concentrazione intracellulare più alta di uno meno potente. Per distinguere questi due scenari è necessario correlare la dose intracellulare alla dose somministrata. Un altro motivo per cui la determinazione dell'*uptake* è importante è lo studio di un eventuale efflusso di farmaco dalle cellule, che potrebbe segnalare lo sviluppo di una forma di resistenza.

Cellule KYSE 510, dopo 24 ore di incubazione con due diverse concentrazioni di mTHPC (0.5 e 1 μM) veicolato con il solvente standard o con le nanoparticelle, sono state lisate e analizzate per determinarne il contenuto di fotosensibilizzatore e di proteine. Alcune colture sono state incubate per altre 24 ore in un mezzo fresco privo di mTHPC prima di essere analizzate. I risultati sono riportati in tabella 2, insieme alle picomoli di mTHPC per microgrammo di proteine, che chiameremo "contenuto specifico", una quantità virtualmente riconducibile alla concentrazione intracellulare di mTHPC.

Il confronto del contenuto specifico di mTHPC veicolato con il solvente standard e di quello incapsulato rivela una significativa differenza: l'*uptake* del farmaco incapsulato è circa metà di quello del farmaco non incapsulato. Il confronto del contenuto di mTHPC (veicolato in entrambi i modi) determinato dopo 24 ore con quello determinato dopo 24 più 24 ore mostra che non c'è efflusso di farmaco. Il contenuto assoluto rimane invariato, mentre il contenuto specifico risulta dimezzato per il raddoppiamento del contenuto di proteine (che è in accordo con l'aumento atteso in base al tempo di raddoppiamento delle cellule di circa 24 ore).

Tabella 2. *Uptake* e ritenzione di mTHPC da parte di cellule KYSE 510. I dati rappresentano le medie \pm deviazioni standard (n = 6).

mTHPC		24 h			24 + 24 h		
		pmol mTHPC	μg cell proteins	pmol μg^{-1} proteins	pmol mTHPC	μg cell proteins	pmol μg^{-1} proteins
Free	0.5 μM	37 \pm 1	130 \pm 13	0.29 \pm 0.03	38 \pm 3	354 \pm 22	0.11 \pm 0.01
	1 μM	110 \pm 12	138 \pm 11	0.80 \pm 0.09	105 \pm 4	364 \pm 24	0.29 \pm 0.01
NPs	0.5 μM	21 \pm 1 ^a	137 \pm 19	0.15 \pm 0.01 ^a	21 \pm 3 ^a	385 \pm 12	0.05 \pm 0.01 ^a
	1 μM	49 \pm 3 ^a	134 \pm 17	0.37 \pm 0.03 ^a	49 \pm 3 ^a	380 \pm 28	0.13 \pm 0.01 ^a

^a $p < 0.001$ when compared to the free form at the same concentration.

Meccanismo di uptake

Il meccanismo di ingresso nelle cellule è stato studiato osservando l'effetto della temperatura di incubazione sull'*uptake*. Le cellule sono state incubate per 2 ore a 4 oppure a 37 °C e osservate mediante microscopia di fluorescenza o lisate per determinare la quantità di mTHPC.

L'incubazione per 2 ore a 4 °C ha ridotto l'*uptake* di mTHPC di circa l'80%, indipendentemente dalla formulazione. L'impercettibilità della fluorescenza rossa dell'mTHPC nelle immagini registrate con il microscopio di fluorescenza conferma la drastica diminuzione dell'*uptake* (figura 8).

L'effetto di inibizione dell'*uptake* esercitato dall'incubazione a bassa temperatura suggerisce che il coinvolgimento di un meccanismo un processo dipendente dall'energia. Sembra, quindi, che le particelle entrino nelle cellule mediante endocitosi.

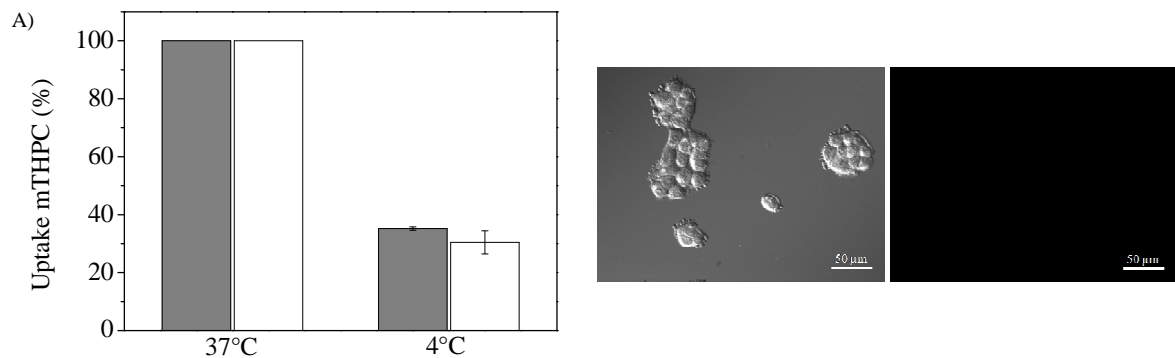


Figura 8. *Uptake* dell'mTHPC in cellule KYSE 510 dopo 2 ore di incubazione a 4 °C. In A) i dati sono riportati come percentuale rispetto all'*uptake* a 37 °C. L'mTHPC è stato trasportato nelle cellule con il solvente standard (colonne grigie) o incapsulato nel vettore (colonne bianche). I dati sono riportati come media \pm deviazione standard (n = 3). Le immagini DIC (*differential interference contrast*, a sinistra) e di fluorescenza (a destra) delle cellule mostrate in B) dimostrano l'inibizione dell'*uptake* dell'mTHPC a 4 °C.

Rilascio di mTHPC dalle nanoparticelle

La corrispondenza della produzione di ossigeno singoletto, delle curve dose-risposta e della localizzazione intracellulare del fotosensibilizzatore incapsulato nelle nanoparticelle con i risultati degli esperimenti di controllo, effettuati usando il fotosensibilizzatore non incapsulato, è sorprendente e inaspettata. Queste apparenti coincidenze sollevano domande fondamentali su quale sia il destino del fotosensibilizzatore *in vitro*: i risultati ottenuti sono compatibili con uno scenario nel quale il fotosensibilizzatore viene rilasciato dal vettore nel terreno di coltura o nell'ambiente intracellulare. Dal momento che l'mTHPC è associato al vettore mediante legami non covalenti, infatti, non si può escludere a priori l'eventualità di un suo trasferimento ad altre entità biologiche, come proteine del siero o componenti cellulari.

È stato quindi messo a punto un metodo per valutare la validità di questa ipotesi e studiare il meccanismo e la cinetica di un eventuale rilascio del fotosensibilizzatore dalle

particelle. Il metodo si basa sul trasferimento energetico tra due membri di una coppia FRET (*Forster Resonance Energy Transfer*), uno dei quali è il fotosensibilizzatore e l'altro un fluoroforo sonda legato covalentemente alla matrice di silice della nanoparticella. Poiché questo tipo di trasferimento energetico è efficace solo a distanze inferiori a pochi nanometri, l'eventuale rilascio del fotosensibilizzatore può essere direttamente ricondotto all'efficienza del processo misurata con un comune spettrofluorimetro.

Individuazione del fluoroforo sonda

La scelta del fluoroforo sonda è stata guidata prima di tutto dalla necessità di ottenere una buona sovrapposizione spettrale (una delle condizioni perché avvenga un trasferimento energetico di tipo FRET) tra l'emissione del fluoroforo e l'assorbimento del fotosensibilizzatore o, viceversa, tra l'emissione del fotosensibilizzatore e l'assorbimento del fluoroforo. Nel primo caso il fotosensibilizzatore funge da accettore di energia, nel secondo da donatore.

Un altro criterio di scelta è l'assenza di interferenze dovute alla fluorescenza delle biomolecole presenti nel mezzo di coltura o nell'ambiente intracellulare. Questa condizione è particolarmente importante nella scelta di fluorofori che fungano da donatori, e che quindi debbano essere eccitati a lunghezze d'onda più basse del massimo di assorbimento dell'mTHPC (418 nm), in una regione spettrale nella quale assorbono anche molte biomolecole.

Vista la difficoltà di prevedere esattamente il comportamento di ogni coppia FRET nei complessi ambienti biologici degli esperimenti *in vitro*, e soprattutto la difficoltà di prevedere le proprietà dei fluorofori all'interno delle particelle (*loading*, distribuzione spaziale, coefficienti di estinzione, eventuale spegnimento per vie non radiative), si è deciso di condurre uno *screening* di quattro diverse specie, due donatori (un antracene e una cumarina) e due accettori (una fenossazina e una cianina). Sono stati quindi sintetizzati diversi tipi di nanoparticelle modificate contenenti il fotosensibilizzatore e uno dei fluorofori sonda. Per ancorare la sonda alla matrice del vettore è stata sfruttata la co-condensazione del precursore della silice con un trietossisilil derivato della specie da ancorare covalentemente oppure, nel caso della cumarina, lo stesso meccanismo di inclusione non covalente del fotosensibilizzatore (nel caso degli esperimenti preliminari in soluzione acquosa l'ancoraggio covalente dei fluorofori non è necessario poiché è già stata dimostrata l'assenza di rilascio).

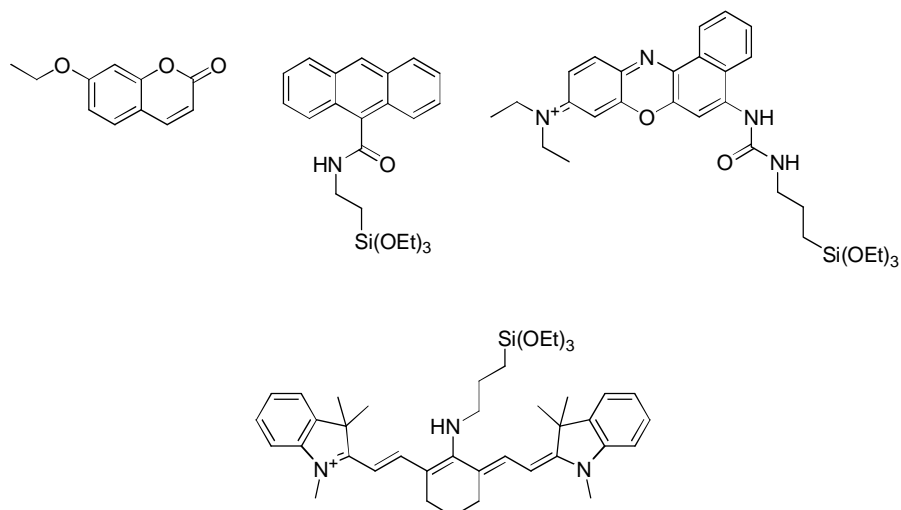


Figura 9. Fluorofori usati nello *screening*.

Il trietossisilil derivato del primo dei fluorofori sonda, l'antracene, è stato sintetizzato in due *step* a partire dall'acido 9-antracencarbossilico. Un trattamento con tionil cloruro in diclorometano ha fornito 9-antracenoil cloruro, che è stato fatto reagire, senza purificazione, con 3-amminopropil trietossisilano. Il prodotto di interesse è stato ottenuto in buona resa dopo purificazione cromatografica su gel di silice. Il prodotto ha diversi massimi di assorbimento a 328, 345, 364 e 377 nm, e diversi massimi di emissione a 392, 408 e 435 nm, ed è quindi un potenziale donatore.

Il trietossisilil derivato del terzo fluoroforo, il blu nilo A, è stato sintetizzato in uno *step* per addizione di 3-isocianatopropil trietossisilano al gruppo amminico della fenossazina commerciale. La reazione, condotta in acetonitrile a refluxo in presenza di una quantità catalitica di DMAP, ha fornito l'urea in buona resa dopo purificazione cromatografica su gel di silice. Il prodotto ha caratteristiche spettrali fortemente dipendenti dal solvente: in metanolo l'assorbimento ha un massimo a 536 nm (e torna a essere nullo a 650 nm), mentre in metanolo/acqua 1:1 a pH 7.5, accanto al primo massimo, spostato a 550 nm, ne compare un altro a 595 nm, e l'assorbimento a 650 nm è ancora significativo. Probabilmente il secondo picco, visibile solo in ambiente acquoso, è riconducibile alla specie protonata. Il fluoroforo sembrerebbe avere le potenzialità per essere un buon donatore, ma la fluorescenza della specie che assorbe a 650 nm appare spenta.

Il trietossisilil derivato del quarto fluoroforo, la cianina eptametinica IR775, è stato sintetizzato in un singolo *step* per sostituzione nucleofila viniloga del cloruro commerciale IR775-Cl con 3-amminopropil trietossisilano in dimetilformammide a 130 °C, che ha fornito il prodotto IR775-Sil in buona resa dopo purificazione cromatografica su gel di silice. Lo spettro di assorbimento di IR775-Sil esibisce una larga banda centrata intorno a 627 nm ($\epsilon_{627} = 63000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ in etanolo) che si sovrappone ampiamente con

l'emissione dell'mTHPC rendendo questa sonda un potenziale accettore. Lo spettro di emissione mostra una banda altrettanto larga, centrata a 738 nm.

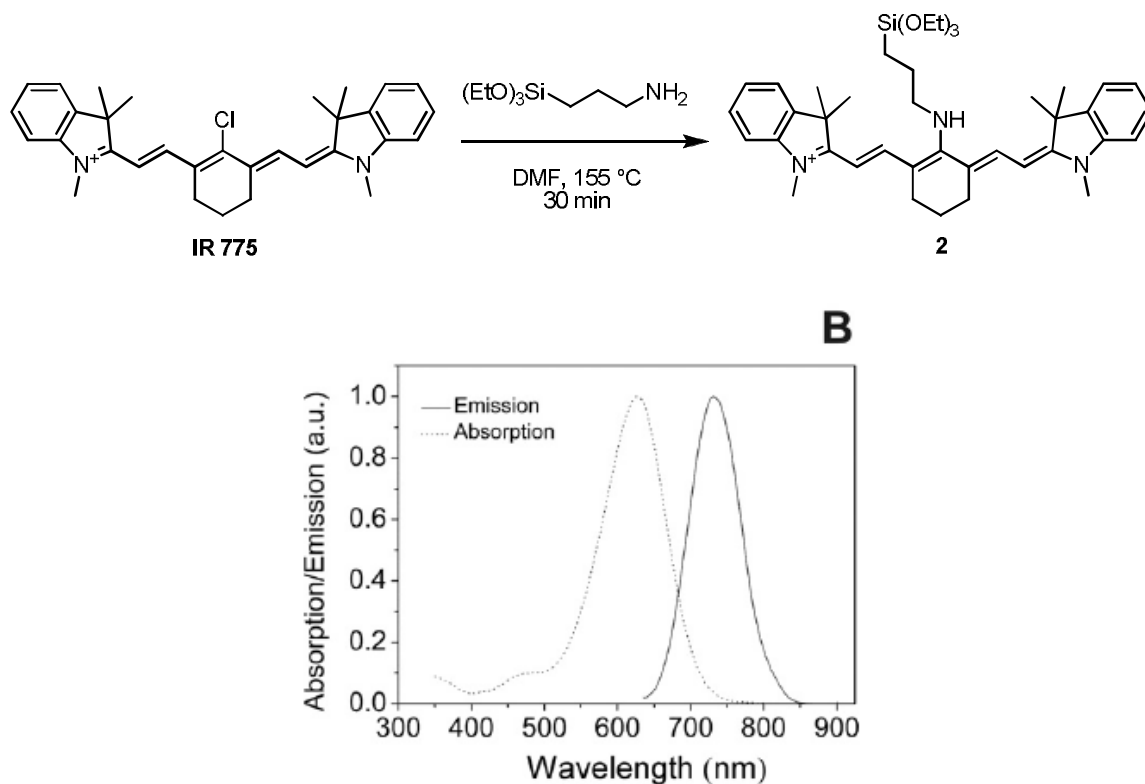


Figura 10. Spettri di assorbimento (puntato) e di emissione (continuo) di IR775-Sil.

La sintesi delle nanoparticelle modificate, contenenti fotosensibilizzatore e sonda FRET, è stata condotta secondo lo stesso protocollo usato per le particelle con il solo fotosensibilizzatore, aggiungendo alla miscela di reazione il trietossisilil derivato di interesse (o il fluoroforo non modificato, nel caso della cumarina) contemporaneamente all'mTHPC. Il trasferimento energetico in ognuna di queste particelle miste è stato studiato per via fluorimetrica, registrando spettri di eccitazione di fluorescenza alla lunghezza d'onda di emissione dell'accettore. L'intensità del segnale relativo all'assorbimento del donatore è direttamente riconducibile all'efficienza del processo FRET.

Dei quattro fluorofori provati, tre si sono rivelati inadatti allo scopo. Il sistema FRET realizzato con l'antracene, infatti, è penalizzato dalla grande differenza tra i coefficienti di estinzione dei due membri e soprattutto dall'interferenza dovuta alla fluorescenza delle proteine del siero. La 7-etossicumarina non è rimasta inclusa nelle particelle dopo l'ultrafiltrazione, mentre il blu nilo A si comporta da accettore solo se protonato, ma in queste condizioni la sua fluorescenza è spenta.

La cianina IR775-Sil, invece, si è dimostrata un'eccellente accettore, con uno spettro di assorbimento completamente sovrapposto all'emissione del fotosensibilizzatore, coefficienti di estinzione e rese quantiche paragonabili, e un ampio *Stokes shift* di 110 nm. Individuato il fluoroforo, la sintesi delle particelle miste è stata ottimizzata in modo da includere una quantità di IR775-Sil sufficiente a spegnere completamente la fluorescenza dell'mTHPC. Per raggiungere questo risultato è sufficiente usare, nella sintesi, una quantità di cianina doppia rispetto alla quantità di mTHPC.

Saggi di rilascio

Per studiare la cinetica di rilascio dell'mTHPC dalle particelle sono stati registrati spettri di eccitazione in diversi ambienti osservando l'emissione dell'accettore IR775-Sil a 760 nm. Nonostante il massimo di emissione dell'IR775-Sil sia a 738 nm (figura 10), in questi esperimenti l'emissione è stata monitorata a 760 nm per escludere ogni possibile contributo dalla fluorescenza dell'mTHPC. Se una molecola di fotosensibilizzatore è confinata all'interno della particella in prossimità di una molecola di fluoroforo sonda, l'energia di eccitazione della prima dovrebbe essere trasferita alla seconda, che la cede a sua volta sotto forma di emissione di fluorescenza. Un segnale a 418 nm nello spettro di eccitazione delle particelle sarebbe attribuibile al trasferimento di energia e confermerebbe l'inclusione dei fluorofori nelle particelle, mentre la sua diminuzione testimonierebbe del rilascio del fotosensibilizzatore e permetterebbe di misurare la frazione di mTHPC rilasciata.

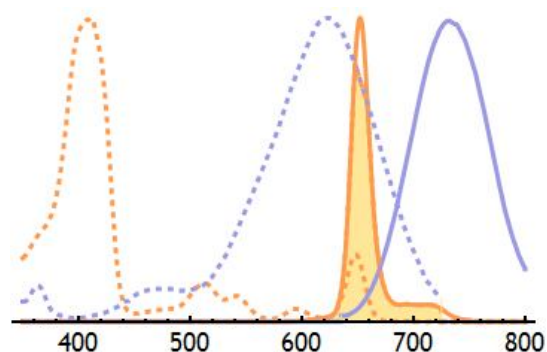


Figura 11. Sovrapposizione degli spettri di assorbimento (tratteggiati) e di emissione (continui) di mTHPC (arancione) e IR775-Sil (azzurro).

Il primo esperimento è stato condotto in acqua, per ottenere un'ulteriore conferma dell'inclusione del fotosensibilizzatore nelle particelle, peraltro già dimostrata dalla permanenza dell'mTHPC in soluzione anche dopo l'estesa ultrafiltrazione (5 mL di miscela di reazione sono stati dializzati con 1.5 L di acqua) e dalle proprietà fotofisiche

caratteristiche della forma monomerica. Lo spettro di eccitazione della soluzione acquosa di nanoparticelle presenta i segnali caratteristici dell'assorbimento dell'mTHPC (a 418 e 652 nm), oltre che del fluoroforo sonda (a 627 nm), a conferma dell'inclusione del fotosensibilizzatore nelle particelle. Uno spettro registrato dopo 24 ore, risultato perfettamente sovrapponibile al precedente, dimostra l'assenza di rilascio.

Esclusa definitivamente la possibilità che il rilascio dell'mTHPC abbia luogo in acqua, e confermata quindi l'integrità dei vettori nelle soluzioni madre, la prova successiva è stata volta a valutare la possibilità di un rilascio nelle condizioni degli esperimenti di produzione di ossigeno singoletto. Lo stesso spettro di eccitazione è stato quindi registrato in una miscela acqua/etanolo (50:50 v/v). La scansione, completata entro 20 secondi dalla preparazione della cuvetta per diluizione della soluzione madre, mostra la completa scomparsa del segnale dell'mTHPC (figura 12). Poiché la distanza efficace per i processi FRET è tipicamente inferiore a 10 nm e il fluoroforo sonda è ancorato alla matrice delle particelle, l'esperimento prova l'immediato e completo rilascio del fotosensibilizzatore. Questo risultato spiega la sorprendente somiglianza dei dati di produzione di ossigeno singoletto relativi al fotosensibilizzatore veicolato con il solvente standard con quelli relativi al fotosensibilizzatore veicolato con le nanoparticelle: in entrambi i casi l'mTHPC è libero in soluzione.

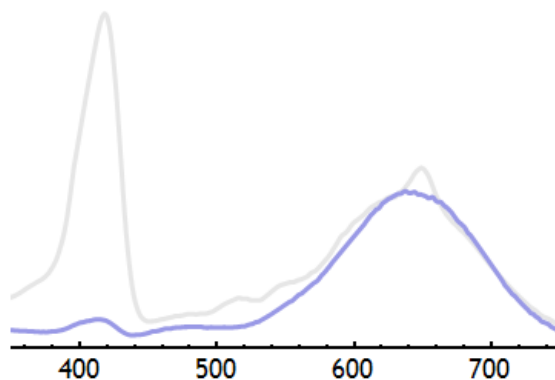


Figura 12. Rilascio in acqua/etanolo.

Il rilascio in acqua/etanolo dimostra anche che il fotosensibilizzatore non è intrappolato nelle particelle per costrizione sferica, ma attraverso interazioni idrofobiche. Quando la polarità del solvente diminuisce abbastanza da rendere la solvatazione energeticamente più favorevole dell'interazione con le superfici interne dei pori, il fotosensibilizzatore entra in soluzione e diffonde all'esterno della particella. Questo meccanismo di rilascio in solventi organici è analogo a quello già osservato in altre nanoparticelle ORMOSIL drogate con fotosensibilizzatori.⁸

Spiegati i risultati degli esperimenti di produzione di ossigeno singoletto, rimanevano da chiarire i risultati delle prove di tossicità. Una delle ipotesi formulate per spiegare le straordinarie coincidenze osservate dipinge uno scenario nel quale il vettore, entrato nella cellula per endocitosi, viene a trovarsi nell'ambiente acido degli endosomi dove il fotosensibilizzatore potrebbe subire protonazione. Le interazioni tra le particelle e la molecola protonata, divenuta più idrofila, potrebbero essere abbastanza indebolite da innescare il rilascio. Il meccanismo è analogo a quello appena descritto per il rilascio in solventi meno polari dell'acqua, tranne che in questo caso non sarebbe il solvente a cambiare la sua natura diventando più affine al fotosensibilizzatore ma, viceversa, il fotosensibilizzatore diventerebbe più affine al solvente. Per studiare la possibilità che il rilascio abbia luogo all'interno degli endosomi, lo stesso esperimento descritto prima è stato condotto in acqua tamponata a pH 5 e ha fornito un risultato identico a quello del primo esperimento condotto in acqua non tamponata. L'eventualità di un rilascio indotto dalla protonazione all'interno degli endosomi è stata perciò esclusa.

Un'altra possibile spiegazione dei risultati degli esperimenti *in vitro* è che il fotosensibilizzatore venga rilasciato nel mezzo di coltura, ed entri nelle cellule in forma libera, esattamente come quello veicolato con il solvente standard. Per esplorare questa possibilità sono stati registrati, a intervalli regolari di pochi minuti, spettri di eccitazione di soluzioni di nanoparticelle (0.85 μM in mTHPC) in RPMI contenente il 3% di FBS a 37 °C. L'esperimento ha permesso finalmente di individuare l'origine delle anomalie osservate nelle prove *in vitro*: la sequenza degli spettri ha evidenziato infatti una progressiva diminuzione del segnale relativo all'assorbimento del fotosensibilizzatore, che tuttavia non scompare mai del tutto, prova di un rilascio graduale e incompleto.

Le misure sono state ripetute a una diversa concentrazione di mTHPC (2.96 μM) nel tentativo di chiarire il meccanismo del processo. La velocità di rilascio non varia sensibilmente al variare della concentrazione di mTHPC: la frazione di farmaco rilasciata¹ raggiunge la metà del valore limite in 5 minuti in entrambi i casi. Varia, invece, la frazione trattenuta permanentemente (meno del 10% a 0.85 μM , curva rossa in figura 13, circa il 20% a 2.96 μM , curva nera in figura 13).

¹ La frazione rilasciata è stata calcolata come $[I(0) - I(t)] / I(0)$, dove $I(t)$ è l'intensità del segnale a 418 nm.

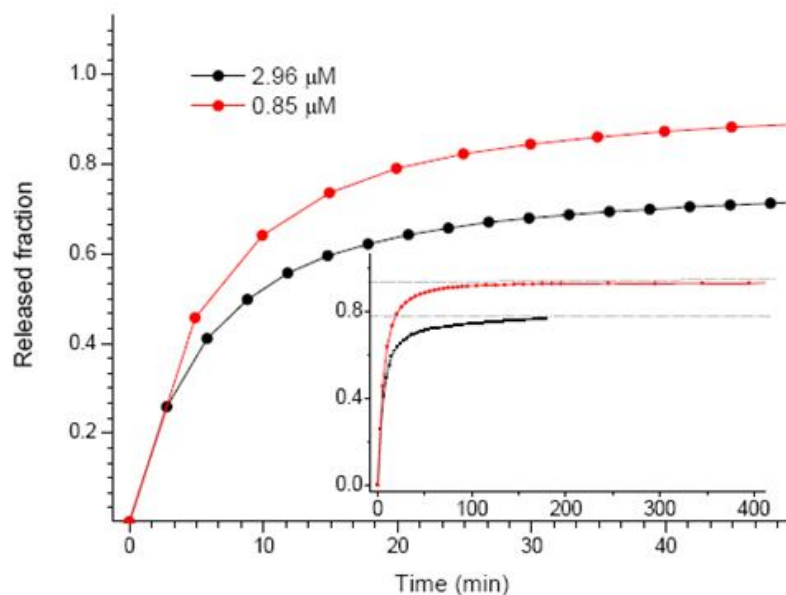


Figura 13. Cinetiche di rilascio nel mezzo di coltura.

La dipendenza della frazione trattenuta dalla concentrazione di nanoparticelle suggerisce il coinvolgimento delle proteine del siero nel processo di rilascio, che sembra dipendere dal rapporto tra la concentrazione di proteine (che non varia nei due esperimenti) e quella di fotosensibilizzatore. Quando ci sono meno proteine a disposizione per ogni molecola di fotosensibilizzatore, come nell'esperimento a concentrazione più alta, la quantità estratta è minore. Sembra cioè che siano proprio le proteine, adsorbite sulla superficie delle particelle, ad estrarre il fotosensibilizzatore per diffusione e, dissociatesi da queste, a trasportarlo all'interno delle cellule.

Rilascio nelle cellule

Lo scenario delineato dai risultati ottenuti fino a questo punto non esclude che, durante l'incubazione con le cellule, il vettore riesca a entrarvi prima che il rilascio di mTHPC raggiunga un valore significativo. In questo caso, i risultati degli esperimenti di tossicità e di localizzazione potrebbero essere spiegati da un eventuale rilascio intracellulare, sul quale gli esperimenti descritti finora non forniscono alcuna informazione.

Per investigare il fato del fotosensibilizzatore in presenza delle cellule, sono stati registrati nuovi spettri di eccitazione su lisati di cellule incubate per tempi diversi con le nanoparticelle miste nelle stesse condizioni degli esperimenti di tossicità. Questo esperimento equivale a registrare spettri di eccitazione del solo ambiente intracellulare.

Nessuno degli spettri di eccitazione presenta segnali relativi all'mTHPC. Per capire se questo comportamento fosse dovuto all'assenza del fotosensibilizzatore o alla sua

fuoriuscita dalle nanoparticelle, sono stati acquisiti spettri di emissione eccitando i campioni a 418 nm, in corrispondenza dell'assorbimento dell'mTHPC. La presenza della banda caratteristica a 652 nm dimostra la presenza del fotosensibilizzatore all'interno delle cellule, e permette di interpretare gli spettri di eccitazione come prove del completo rilascio del farmaco. L'osservazione più sconvolgente, tuttavia, è l'assenza, negli spettri di eccitazione, del segnale relativo all'assorbimento del fluoroforo sonda ancorato covalentemente alle particelle. L'unica spiegazione è l'assenza di nanoparticelle all'interno delle cellule. Questi due risultati, insieme, provano che solo l'mTHPC già rilasciato nel siero riesce a entrare nelle cellule, e che le nanoparticelle ne rimangono escluse.

PEGilazione del vettore

Per comprendere meglio il meccanismo del rilascio del fotosensibilizzatore, abbiamo preparato un campione di nanoparticelle caricate con mTHPC e IR775-Sil, la cui superficie è stata ricoperta con un derivato del PEG-2000. In questo caso, è stato osservato un rilascio più limitato (circa il 20%) e più lento di mTHPC dalle particelle dopo diluizione con mezzo di coltura cellulare contenente il 3% di FBS. Il ricoprimento di PEG ha ridotto fortemente il rilascio indotto dalle proteine del siero, mentre non ha limitato il rilascio indotto dall'aggiunta di etanolo.

E' noto che le proteine del siero vengono adsorbite sulla superficie delle nanoparticelle, e questo accade con ogni probabilità anche nelle nostre condizioni sperimentali, come suggerito dalla maggiore stabilità e ridotta aggregazione delle nanoparticelle in mezzi di coltura cellulare supplementati con FBS rispetto ai mezzi privi di FBS. Evidentemente le proteine del siero vengono adsorbite sulla superficie delle nanoparticelle, legano le molecole di mTHPC collocate in prossimità della superficie e quindi si dissociano dalle nanoparticelle come complessi proteina-mTHPC. Di conseguenza la velocità di rilascio dell'mTHPC dalle nanoparticelle è determinata dalla velocità di associazione e dissociazione di nanoparticelle e proteine.⁹ Questa ipotesi è confermata dal fatto che, quando le nanoparticelle sono ricoperte con PEG, che riduce l'adsorbimento delle proteine, la velocità e l'entità del rilascio del farmaco sono significativamente ridotte.

Saggi di rilascio sul vettore non modificato

I risultati ottenuti con il saggio FRET appena descritto possono essere interpretati senza ambiguità, e forniscono dati molto affidabili. Essi tuttavia si riferiscono a un vettore

modificato, che potrebbe non riflettere fedelmente il comportamento del vettore originale. La presenza del fluoroforo sonda, per esempio, potrebbe influenzare il rilascio del fotosensibilizzatore. Per verificare se gli esperimenti condotti sul vettore modificato siano veramente rappresentativi del comportamento del vettore originale, è stato concepito un saggio alternativo basato sulla separazione fisica e la quantificazione della frazione di farmaco rilasciata. Il confronto dei risultati di questo saggio con quelli del saggio FRET potrebbero confermare l'applicabilità generale di quest'ultimo.

Come nel saggio FRET, le soluzioni madre di nanoparticelle (in questo caso contenenti solo fotosensibilizzatore) sono state diluite in RPMI contenente il 3% di FBS fino a una concentrazione $1.75 \mu\text{M}$ in mTHPC. Dopo aver registrato un primo spettro di assorbimento UV-Vis, le soluzioni sono state incubate a 37°C per 0, 5 o 24 ore. Al termine dell'incubazione le soluzioni sono state ultracentrifugate a 100000 g per un'ora² e l'eventuale frazione di fotosensibilizzatore rilasciata, rimasta nel surnatante, determinata per via spettrofotometrica per confronto con lo spettro registrato prima dell'incubazione.

Il confronto degli spettri di assorbimento mostra che un processo di rilascio è attivo in tutti i campioni. L'assorbanza residua è il 53% di quella pre-centrifugazione dopo un'ora, e in non più di 6 ore si stabilizza intorno al 75% (tabella 3). In un esperimento di controllo condotto in acqua (mezzo nel quale è stata già accertata l'assenza di rilascio), una piccola frazione di mTHPC (~ 13%) è stata trovata nel surnatante. Un ulteriore controllo effettuato su nanoparticelle drogate con una porfirina modello legata covalentemente alla matrice ha dimostrato che questa assorbanza residua può essere interamente ricondotta alla sedimentazione incompleta delle nanoparticelle.

La sottrazione di questo contributo dall'assorbanza residua misurata negli esperimenti di rilascio ha fornito la frazione di mTHPC effettivamente rilasciata. I dati ottenuti in questo modo convalidano i risultati del saggio FRET. Il processo di rilascio sembra non essere influenzato dalla presenza del fluoroforo sonda, e il comportamento delle particelle modificate può essere considerato rappresentativo di quello del vettore originale.

Tabella 3. Rilascio di mTHPC da nanoparticelle ORMOSIL incubate per tempi diversi a 37°C in RPMI contenente il 3% di FBS. Ogni dato è rappresentativo di tre esperimenti che hanno fornito risultati molto simili.

² Velocità più elevate o tempi più lunghi causano la sedimentazione delle proteine del siero.

Ambiente	Tempo di incubazione 37° C (h)	Assorbanza dell'mTHPC a 420 nm		Assorbanza residua (%)
		Prima	Dopo	
Acqua	-	0.267	0.034	13
	0 + 1	0.252	0.133	53
RPMI + 3% FBS	5 + 1	0.225	0.173	77
	24 + 1	0.220	0.165	75

Il mistero della fototossicità e il ruolo dell'aggregazione

Il rilascio del fotosensibilizzatore e l'incapacità delle particelle di penetrare la membrana cellulare, accertati con il saggio FRET, spiegano i risultati di esperimenti come la localizzazione intracellulare e la produzione di ossigeno singoletto, identici per l'mTHPC veicolato con il solvente standard o incapsulato nelle nanoparticelle.

Questa spiegazione, però, apre un nuovo problema. Come si è detto in precedenza, al minore *uptake* dell'mTHPC veicolato dalle nanoparticelle non corrisponde un'uguale riduzione della fototossicità. Sembra cioè che, una volta entrato nelle cellule, l'mTHPC trasportato e rilasciato dalle nanoparticelle sia più tossico di quello veicolato con il solvente standard, in apparente contraddizione con lo scenario meccanicistico che è emerso dai risultati dei saggi di rilascio.

In un certo senso, è come se il fotosensibilizzatore avesse memoria dello stato precedente al rilascio. In effetti, quest'idea suggerisce una possibile spiegazione della differente efficienza di fotosensibilizzazione. L'"effetto memoria", assurdo se riferito alle singole molecole, potrebbe riguardare però lo stato di aggregazione. È noto che l'mTHPC, veicolato in forma parzialmente aggregata dal solvente standard, non disaggrega completamente in seguito all'associazione con le proteine del siero.¹⁰ Gli aggregati residui riescono a penetrare nelle cellule, insieme alle molecole di fotosensibilizzatore monomero, ma hanno un'efficienza di fotosensibilizzazione molto minore.⁶ Nelle particelle, invece, l'mTHPC si trova in forma monomero, e in questa forma potrebbe venire trasferito alle proteine del siero. Si spiegherebbe così la più alta tossicità intracellulare dell'mTHPC veicolato dalle nanoparticelle.

Per verificare questa ipotesi, il processo di disaggregazione nel mezzo di coltura è stato studiato per via fluorimetrica seguendo l'aumento di intensità dell'emissione di

fluorescenza. L'emissione, spenta negli aggregati, si dovrebbe riaccendere progressivamente con la dissociazione dei monomeri.

Gli spettri di emissione di fluorescenza (eccitando a 418 nm) e di assorbimento UV-Vis di due soluzioni di mTHPC (di concentrazione 1 μM) veicolato con nanoparticelle o solvente standard in RPMI contenente il 3% di FBS a 37 °C sono stati registrati a intervalli di dieci minuti. Al raggiungimento dell'equilibrio è stato aggiunto Triton X-100, un tensioattivo, per completare la disaggregazione. La registrazione degli spettri è proseguita fino al raggiungimento del nuovo equilibrio.

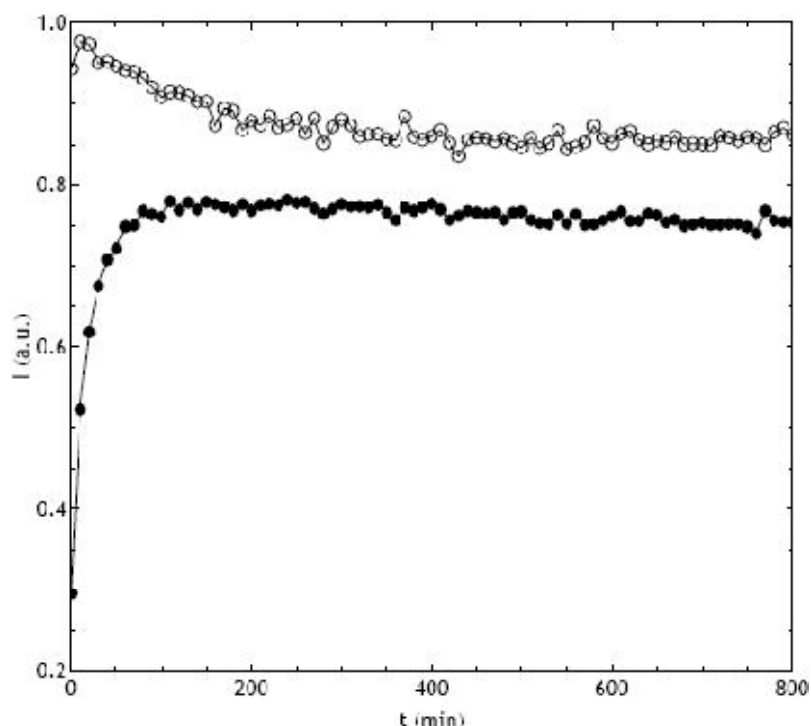


Figure 14. Emissione dell'mTHPC a 652 nm prima dell'aggiunta di Triton X-100 (cerchi vuoti per le nanoparticelle, cerchi pieni per il solvente standard). Le intensità sono normalizzate rispetto all'emissione all'equilibrio dopo l'aggiunta di Triton X-100.

I risultati dell'esperimento mostrano un drastico aumento della fluorescenza dell'mTHPC veicolato con il solvente standard, che si stabilizza in meno di due ore. L'aumento della fluorescenza, insieme all'analisi degli spettri di assorbimento, riflette un processo di disaggregazione del fotosensibilizzatore. Il confronto dell'emissione di equilibrio con l'emissione registrata dopo l'aggiunta di Triton X-100 indica che il 25% dell'mTHPC rimane aggregato.

La fluorescenza dell'mTHPC veicolato con le nanoparticelle, al contrario, diminuisce leggermente. Questa diminuzione è probabilmente dovuta al passaggio dall'ambiente

apolare delle nanoparticelle a un ambiente più polare all'interno delle proteine. In ogni caso, anche se la diminuzione della fluorescenza fosse riconducibile ad una parziale aggregazione, la frazione di mTHPC presente in forma aggregata sarebbe inferiore al 10%.

La più alta percentuale di fotosensibilizzatore presente in forma monomericamente nei complessi proteici responsabili del trasporto nelle cellule spiega la maggiore efficienza di fotosensibilizzazione intracellulare. Questo effetto di aumento selettivo della fototossicità mediato dal siero, che non interessa il farmaco veicolato con il solvente standard, è simile a quello descritto in letteratura per fotosensibilizzatori trasportati da particelle biodegradabili.^{11,12} La capacità delle proteine del siero di estrarre molecole lipofile incapsulate fisicamente nelle nanoparticelle appare quindi come una proprietà generale, e un utile criterio per la progettazione di vettori per il trasporto di farmaci.

Conclusioni

In questo capitolo è stato presentato uno studio dettagliato dell'inusuale comportamento *in vitro* di un vettore per la terapia fotodinamica già descritto in letteratura.¹ Questo lavoro pone le basi per lo sviluppo di un sistema di trasporto più versatile, alternativo al vettore descritto nel capitolo precedente, che era gravato da pesanti limitazioni.

Il fotosensibilizzatore è stato incapsulato con un *loading* dell'1% in nanoparticelle di silice modificata con gruppi organici dal diametro di circa 33 nm, sfruttando interazioni non covalenti. Le caratterizzazioni fotofisiche hanno provato che il fotosensibilizzatore è incapsulato in forma monomeric, in un microambiente di polarità simile al toluene, e mantiene una buona capacità di produrre ossigeno singoletto (anche se un confronto di diretto tra fotosensibilizzatore libero e incapsulato non è possibile, si noti che l'efficienza di produzione di ossigeno di singoletto per le particelle in acqua, sistema in cui l'mTHPC è sicuramente incapsulato, è di poco inferiore a quella misurata per il fotosensibilizzatore in presenza di siero). Le nanoparticelle sono risultate stabili in acqua, ma hanno mostrato una tendenza ad aggregare e precipitare in PBS, a causa dell'elevata forza ionica. Il siero fetale bovino contenuto nel terreno di coltura, invece, ne preserva la stabilità. Questi risultati forniscono una prima indicazione sull'interazione del nanosistema con l'ambiente biologico: la stabilizzazione colloidale è indice di una forte interazione tra le particelle e le proteine del siero, che probabilmente ne ricoprono la superficie.

Una volta investigate le proprietà fisiche del fotosensibilizzatore incapsulato nelle nanoparticelle, è stato studiato anche il suo comportamento in cellule di cancro esofageo umano, confrontandolo con quello del fotosensibilizzatore veicolato con il solvente standard. Il meccanismo di ingresso nelle cellule e la localizzazione intracellulare sono gli stessi indipendentemente dalla modalità di trasporto: entro 30 minuti il fotosensibilizzatore entra per endocitosi, si accumula nell'apparato di Golgi e nel reticolo endoplasmatico, e non sembra ridistribuirsi né effondere nemmeno dopo 24 ore. Anche le curve dose-risposta, in condizioni di irradiazione controllata, ricalcano quelle al fotosensibilizzatore incapsulato nelle nanoparticelle, con un EC_{50} di circa $0.5 \mu\text{M}$ (misurato dopo 24 ore di incubazione seguita da irradiazione con 0.12 J/cm^2). L'*uptake* sembra invece dipendere dalla modalità di trasporto: la formulazione in nanoparticelle lo riduce di circa il 50% rispetto alla formulazione in solvente standard.

L'inaspettata corrispondenza dei risultati di queste prove con quelli degli esperimenti di controllo condotti sul farmaco non incapsulato ha suggerito la possibilità che il fotosensibilizzatore fosse rilasciato nel terreno di coltura o nell'ambiente intracellulare. È

stato quindi messo a punto un saggio per valutare la validità di questa ipotesi e studiare la cinetica di un eventuale rilascio del fotosensibilizzatore dalle particelle. Il saggio richiede la sintesi di un vettore modificato, drogato covalentemente con un fluoroforo sonda in grado di formare una coppia FRET con il fotosensibilizzatore, anch'esso incluso nella particella. Poiché questo tipo di trasferimento energetico è efficace solo a distanze inferiori a pochi nanometri, l'eventuale rilascio del fotosensibilizzatore può essere direttamente ricondotto all'efficienza del processo misurata con un comune spettrofluorimetro.

Le misure di trasferimento energetico, convalidate da un saggio indipendente basato sulla separazione fisica della frazione rilasciata, hanno rivelato uno scenario molto diverso da quello previsto. Il vettore, incapace di entrare nelle cellule, rimane nel mezzo di coltura, dove viene ricoperto dalle proteine del siero. Le proteine estraggono il fotosensibilizzatore e, dissociatesi dalla superficie della particella, lo trasportano nelle cellule. Anche il fotosensibilizzatore veicolato con il solvente standard entra nelle cellule come complesso con proteine del siero, e questo spiega il comportamento simile. Esiste però un'importante differenza: mentre il fotosensibilizzatore veicolato con le nanoparticelle esiste in forma essenzialmente monomeric, e in questa forma viene trasferito alle proteine, quello veicolato con il solvente standard rimane parzialmente aggregato anche associato alle proteine. Il diverso stato di aggregazione spiega la maggiore l'efficienza intracellulare di fotosensibilizzazione.

Lo scenario che emerge dai risultati qua riportati è una testimonianza della complessità delle interazioni tra i nanosistemi e le entità biologiche, e un monito ad analizzarne attentamente l'evoluzione temporale. In particolare, il comportamento del vettore preso in esame potrebbe riflettere alcune proprietà generali dei vettori per farmaci idrofobici che sfruttano interazioni non covalenti, come la mediazione del rilascio da parte delle proteine del siero, e la memoria dello stato di aggregazione. Il saggio fluorimetrico proposto in questo capitolo può rappresentare inoltre uno strumento generale per lo studio del destino di vettori per farmaci fluorescenti, specialmente nell'ambiente intracellulare.

L'incapsulazione covalente del fotosensibilizzatore, suggerita recentemente da Ohulchanskyy e collaboratori,⁸ permetterebbe di superare i problemi legati al rilascio del farmaco. Questa strategia, tuttavia, non può essere applicata a farmaci la cui azione terapeutica richieda l'interazione con bersagli cellulari, che può essere inibita dall'associazione covalente alla matrice delle nanoparticelle. In questo capitolo è stata proposta una soluzione più generale, basata sul ricoprimento della superficie delle nanoparticelle con catene di polietilenglicole che rallentano il rilascio del farmaco

prevenendo l'adsorbimento delle proteine. Diversamente dall'approccio covalente, l'applicabilità di questa strategia non è limitata ai fotosensibilizzatori, ma riguarda potenzialmente qualsiasi farmaco idrofobico. Gli studi sul nuovo vettore sono ancora in corso.

Bibliografia

1. Roy, I. et al. Ceramic-based nanoparticles entrapping water-insoluble photosensitizing anticancer drugs: a novel drug-carrier system for photodynamic therapy. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 7860–7865 (2003).
2. Hadjur, C. et al. Spectroscopic studies of photobleaching and photoproduct formation of meta(tetrahydroxyphenyl)chlorin (m-THPC) used in photodynamic therapy. The production of singlet oxygen by m-THPC. *J. Photochem. Photobiol., B* **45**, 170–178 (1998).
3. Bertazza, L. et al. Cell penetrating silica nanoparticles doped with two-photon absorbing fluorophores. *Tetrahedron* **62**, 10434–10440 (2006).
4. Belitchenko, I. et al. Characterization of Photodegradation of Meta-tetra (Hydroxyphenyl)chlorin (<i>m</i>-THPC) in Solution: Biological Consequences in Human Tumor Cells. *Photochemistry and Photobiology* **67**, 584-590 (1998).
5. Hopkinson, H.J., Vernon, D.I. & Brown, S.B. Identification and partial characterization of an unusual distribution of the photosensitizer meta-tetrahydroxyphenyl chlorin (temoporfin) in human plasma. *Photochem. Photobiol.* **69**, 482–488 (1999).
6. Kiesslich, T., Berlanda, J., Plaetzer, K., Krammer, B. & Berr, F. Comparative characterization of the efficiency and cellular pharmacokinetics of Foscan- and Foslip-based photodynamic treatment in human biliary tract cancer cell lines. *Photochem. Photobiol. Sci.* **6**, 619–627 (2007).
7. Teiten, M., Bezdetnaya, L., Morlière, P., Santus, R. & Guillemin, F. Endoplasmic reticulum and Golgi apparatus are the preferential sites of Foscan® localisation in cultured tumour cells. *Br J Cancer* **88**, 146-152 (2003).
8. Kumar, R. et al. Covalently Dye-Linked, Surface-Controlled, and Bioconjugated Organically Modified Silica Nanoparticles as Targeted Probes for Optical Imaging. *ACS Nano* **2**, 449–456 (2008).
9. Cedervall, T. et al. Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 2050–2055 (2007).
10. Sasnouski, S. et al. Investigation of Foscan interactions with plasma proteins. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **1725**, 394–402 (2005).

11. Konan, Y.N., Chevallier, J., Gurny, R. & Allemann, E. Encapsulation of p-THPP into nanoparticles: Cellular uptake, subcellular localization and effect of serum on photodynamic activity. *Photochem. Photobiol.* **77**, 638–644 (2003).
12. Konan-Kouakou, Y.N., Boch, R., Gurny, R. & Allemann, E. In vitro and in vivo activities of verteporfin-loaded nanoparticles. *J. Controlled Release* **103**, 83–91 (2005).

Capitolo 5

Nanoparticelle mesoporose

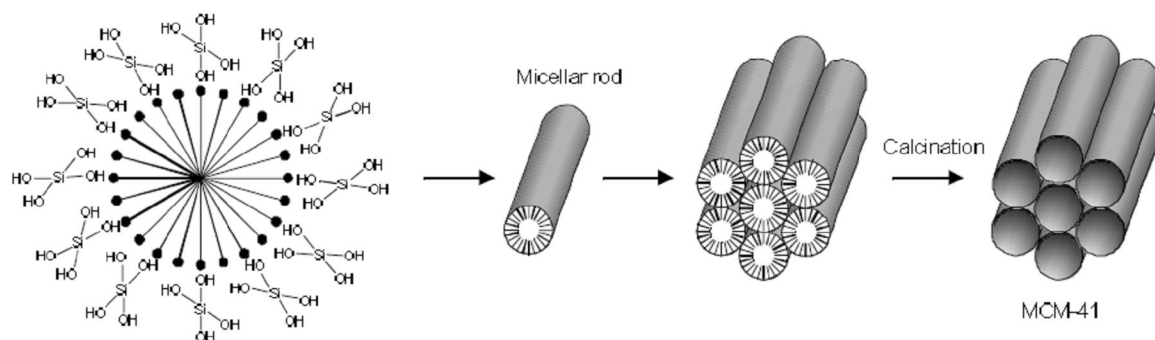
Materiali mesoporosi

I materiali porosi sono da lungo tempo oggetto di una particolare attenzione per la loro peculiare capacità di interagire con atomi, ioni e molecole non solo attraverso la superficie esterna, ma anche attraverso l'estesa superficie interna fornita dalle pareti dei pori. Le applicazioni tradizionali dei materiali porosi includono lo scambio ionico, l'adsorbimento (per scopi separativi) e la catalisi.

I pori sono classificati dalle norme IUPAC secondo il loro diametro: quelli più piccoli di 2 nm sono chiamati micropori, quelli più grandi di 50 nm macropori, mentre i pori con un diametro compreso tra 2 e 50 nm sono chiamati mesopori. La superficie interna dei materiali microporosi, come le zeoliti o i gel di silice, è generalmente inaccessibile a tutte le molecole organiche se non a quelle più piccole. Il più largo diametro dei mesopori, al contrario, consente l'interazione con qualsiasi tipo di specie organica, estendendone significativamente il campo di applicazione.

L'interesse nei confronti dei materiali mesoporosi è esploso nel 1992, quando alcuni ricercatori della Mobil Corporation proposero una nuova procedura per la sintesi di silice mesoporosa che sarebbe stata ben presto riconosciuta come rivoluzionaria.¹ La sintesi di Beck e collaboratori sfrutta l'auto-organizzazione di tensioattivi ionici, in presenza di un precursore dell'acido ortosilicico, in mesofasi liquido-cristalline a simmetria esagonale costituite da un sistema di micelle cilindriche. Le micelle dirigono la polimerizzazione *in situ* dell'acido ortosilicico e la confinano negli spazi intermicellari. Terminata la crescita della silice, i tensioattivi vengono rimossi per calcinazione o estrazione chimica. La sintesi originale può essere condotta in condizioni acide o basiche, usando sodio silicato o silice pirogenica come precursore. Negli anni successivi sono state introdotte varianti che hanno esteso la gamma dei precursori ai tetraalcoossilani e ai trietossisilil derivati di specie organiche, permettendo la sintesi di materiali ibridi organici-inorganici.²

I materiali prodotti in questo modo, designati dai ricercatori della Mobil come MCM-41, sono costituiti da particelle di dimensioni micrometriche, di morfologia irregolare, attraversate da mesopori cilindrici disposti sui nodi di un reticolo esagonale che riflette la simmetria delle micelle. La dimensione dei pori può essere variata tra 2 e 20 nm controllando la lunghezza della catena alchilica del tensioattivo e usando additivi organici per modificare il diametro delle micelle.



L'estesa area superficiale di questi materiali, dell'ordine di 10^3 m²/g, insieme all'elevata stabilità chimica e termica e alla facilità con cui si prestano alla funzionalizzazione, li rendono ideali per le applicazioni tradizionali, come l'adsorbimento e la catalisi,³ e hanno aperto la strada ad applicazioni nuove, come la sensoristica e il *drug delivery*.⁴

Negli anni successivi alla scoperta degli MCM-41 sono stati sintetizzati molti altri materiali mesoporosi, sfruttando la stessa strategia basata sull'uso di tensioattivi come templanti. Variando la natura e la concentrazione dei tensioattivi è possibile infatti ottenere mesofasi con simmetrie e topologie diverse, che si riflettono nella struttura del materiale prodotto.⁵ Un'altra importante svolta è arrivata nel 1998, quando Stucky e collaboratori sono riusciti a ottenere strutture con pori di diametro più largo, denominate SBA-15, usando copolimeri a blocchi come tensioattivi non ionici.⁶

Contemporaneamente, la ricerca si è concentrata sul controllo della morfologia, la funzionalizzazione con specie organiche, e l'estensione delle procedure sviluppate per la silice ad altri materiali inorganici.⁷ Oggi, la famiglia dei materiali mesoporosi è ormai vastissima.

Nanoparticelle mesoporose

Le procedure sintetiche più comuni per la preparazione di silice mesoporosa, descritte nel paragrafo precedente, conducono alla formazione di particelle con diametri tipicamente compresi tra 500 nm e diversi micron. In strutture così estese, il trasporto di massa attraverso i pori richiede tempi che in molti casi si rivelano troppo lunghi.

Applicazioni come la sensoristica e il *drug delivery* trarrebbero beneficio dai percorsi interni più brevi garantiti da particelle di dimensioni nanometriche.

Il trasporto di massa non è l'unico limite dei materiali mesoporosi *bulk*. Per le applicazioni biomediche, come l'*imaging* diagnostico e il *drug delivery*, in particolare, è fondamentale che le particelle rimangano stabilmente sospese in acqua. Le particelle di dimensioni micrometriche sedimentano rapidamente a causa della loro massa eccessiva. Perché una particella non risenta dell'effetto della gravità è cruciale che le sue dimensioni siano inferiori a poche centinaia di nanometri.

Diversi autori, negli ultimi 20 anni, hanno osservato la formazione di nanoparticelle come sottoprodotti della sintesi di materiali mesoporosi, ma nella maggior parte dei casi si tratta di agglomerati non ridispersibili. Sistemi di questo tipo sono stati studiati anche allo scopo di costruire strutture porose gerarchiche nelle quali i mesopori coesistono con pori più grandi creati dagli spazi tra le particelle primarie. La dimensione eccessiva, tuttavia, ne impedisce l'uso in soluzione.

Per esempio, la procedura descritta da Park e collaboratori per la sintesi di silice mesoporosa promossa da microonde fornisce, in assenza di additivi, strutture vermiformi di 1-2 μm .⁸ La stessa sintesi, condotta in presenza di etilen glicole, dà origine ad aggregati di particelle di forma sferoidale di circa 200 nm di diametro. Agglomerati di dimensioni comprese tra i 10 e i 100 μm , costituiti da particelle mesoporose primarie di 50-100 nm, sono stati osservati da Unger e collaboratori nella ricerca di nuovi materiali per cromatografia.⁹ Strutture simili sono state ottenute anche da Pinnavaia e collaboratori, sfruttando emulsioni eterogenee di tensioattivi non ionici in presenza di etanolo.¹⁰ Un'altra strategia, basata sull'uso di un copolimero a blocchi come inibitore (per incapsulazione) della crescita di silice MCM-41, fornisce un gel di particelle agglomerate di circa 20-50 nm.¹¹ Il metodo più semplice descritto da Amoros e collaboratori, invece, prevede che acqua, TEOS e cationi cetiltrimetilammonio vengano combinati con trietanolamina, che regola il processo di condensazione complessando i precursori della silice attraverso la formazione di silatrani.¹² Anche in questo caso il prodotto finale è un gel di particelle fuse che non possono essere ridisperse.

Sebbene tutte queste procedure forniscano particelle primarie di dimensioni nanometriche, la sintesi di nanoparticelle non aggregate ridispersibili in sospensioni colloidali stabili è stata dimostrata solo recentemente. La maggior parte delle nuove procedure sviluppate per ottenere nanoparticelle di silice mesoporosa sono varianti delle sintesi classiche condotte in condizioni di elevata diluizione, allo scopo di mantenere separate le particelle primarie.

Questa strategia è stata adottata, per esempio, da Rathousky e collaboratori, che hanno ottenuto particelle di circa 100 nm in una soluzione acquosa di sodio metasilicato 0.01 M usando isopropil acetato come additivo e operando a una temperatura di 80 °C.¹³ Analogamente, Ostafin e collaboratori hanno sintetizzato nanoparticelle di silice mesoporosa di 70 nm usando templanti ionici e una concentrazione di tetraetossisilano (TEOS) di 0.01 M.¹⁴ Una variante della stessa procedura fornisce nanoparticelle di 60 nm in presenza di templanti neutri e una concentrazione di tetraetossisilano di 0.04 M. Particelle ancora più piccole, fino a 30 nm, sono state ottenute da Lin e Tsai operando a pH 5.6 e a una concentrazione di TEOS di 0.02 M. Singole particelle di 60-140 nm, sono state ottenute da Cai e collaboratori in ambiente basico usando operando a una concentrazione di TEOS di 0.04 M.¹⁵ Un approccio più versatile per la preparazione di materiali mesoporosi colloidali di dimensioni nanometriche è stato introdotto da Mann e collaboratori.¹⁶ Secondo questa procedura, l'idrolisi e la condensazione del precursore della silice vengono condotte diluendo una miscela di reazione standard a una concentrazione di 0.05 M in condizioni fortemente basiche. La crescita viene fermata neutralizzando la miscela di reazione dopo un intervallo di tempo variabile dal quale dipende la dimensione finale delle particelle, che può essere variata tra 20 e 100 nm.

Le diluizioni relativamente alte richieste da tutte le procedure descritte sono di grande ostacolo alla trasposizione dei processi su scala industriale. In generale, l'uso di un volume elevato di solvente implica spesso difficili procedure di purificazione dei prodotti, che vengono ottenuti in basse rese. Un approccio promettente, proposto molto recentemente da Bein e collaboratori,^{17,18} consente di preparare particelle mesoporose di dimensioni nanometriche, ridispersibili in soluzioni colloidali stabili, in piccoli volumi di solvente. Nella procedura descritta da questi autori, il sodio idrossido usato come base nelle sintesi tradizionali è sostituito da trietanolamina. Come nella procedura di Amoros menzionata prima, la trietanolamina limita la dimensione delle particelle rallentando l'idrolisi e la condensazione dei precursori attraverso la formazione di silatrani. In questo caso, però, la formazione di aggregati viene evitata operando ad alta temperatura.

Applicazioni

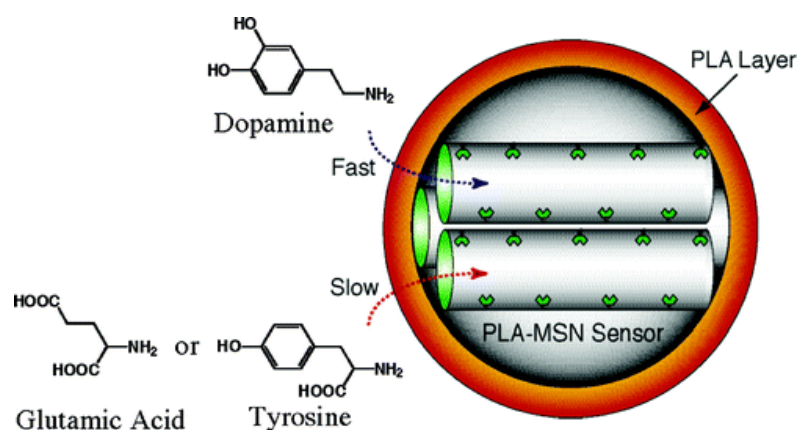
Negli ultimi anni le potenzialità delle soluzioni colloidali di nanoparticelle mesoporose sono state sfruttate per realizzare sistemi ingegnosi, nei quali i pori non servono semplicemente ad estendere l'area superficiale, ma svolgono funzioni complesse. Sebbene le proprietà peculiari delle nanoparticelle di silice mesoporose siano vantaggiose

anche per le applicazioni tradizionali, come l'adsorbimento e la catalisi, l'impatto maggiore ha interessato soprattutto le applicazioni biomediche, in particolare la sensoristica, l'*imaging* e il *drug delivery*.¹⁹

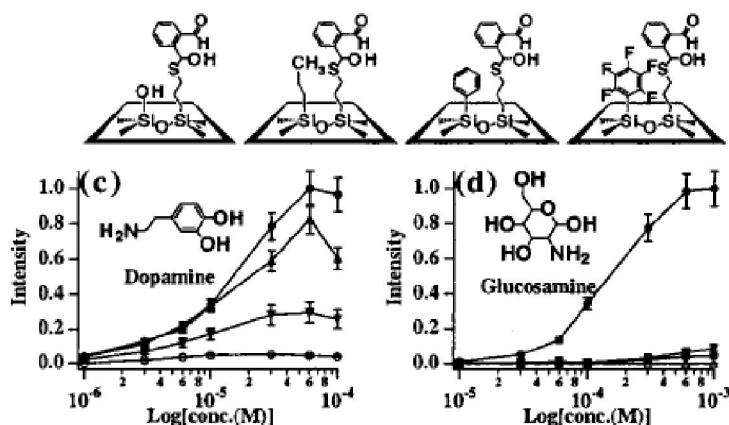
Sensori molecolari basati su nanoparticelle mesoporose

Come si è visto nel capitolo 1, le nanoparticelle di silice sono piattaforme ideali per la realizzazione di sensori ottici. La loro trasparenza nel visibile, l'inerzia rispetto ai processi fotofisici, e l'effetto protettivo nei confronti di cromofori e fluorofori trattenuti al loro interno le rendono molto vantaggiose rispetto alle sonde molecolari tradizionali. Nelle nanoparticelle di silice mesoporosa, questi vantaggi si accompagnano a quelli garantiti dalla vasta superficie interna, che consente di ancorare moltissime unità di riconoscimento in un volume ridotto, e dalla possibilità di sfruttare le differenze di mobilità nei pori per aumentare ulteriormente la selettività. Le dimensioni nanometriche delle nanoparticelle sono fondamentali per ottenere rapidi tempi di risposta agli analiti.

Un esempio particolarmente sofisticato di sensore basato su nanoparticelle mesoporose MCM-41 è il sistema descritto da Lin e collaboratori per la rivelazione selettiva di neurotrasmettitori contenenti gruppi amminici in acqua a pH fisiologico.²⁰ Il sensore sfrutta l'organizzazione di diverse componenti funzionali in comparti spazialmente distinti: una componente di riconoscimento molecolare basata su un emitioacetale fluorogenico ancorato alle pareti dei pori è responsabile della trasduzione del segnale, mentre uno strato esterno di acido polilattico conferisce ulteriore selettività al sensore regolando l'influsso degli analiti nei pori attraverso interazioni elettrostatiche e legami a idrogeno. Diversi neurotrasmettitori contenenti ammine primarie (dopamina, tirosina e acido glutammico) possono essere distinti in base alla velocità di diffusione attraverso lo strato polimerico esterno. Una volta penetrati nei pori, i gruppi amminici primari degli analiti reagiscono velocemente con l'emioacetale o-ftalico formando un indolo fluorescente.

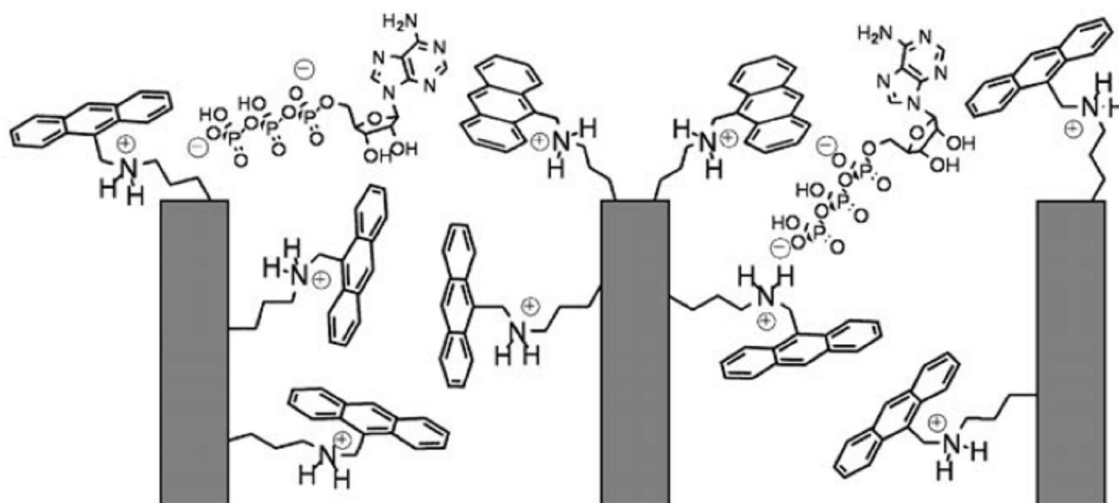


Un simile meccanismo di controllo della diffusione è stato sfruttato dagli stessi autori per realizzare un sensore in grado di discriminare tra dopamina e glucosammina.²¹ Anche in questo caso la selettività deriva dalla combinazione di interazioni covalenti, che controllano la trasduzione del segnale, e non covalenti, che controllano la diffusione nei pori. A differenza dell'esempio precedente, in questo sensore il controllo della diffusione avviene all'interno dei pori, le cui pareti sono ricoperte di gruppi pentafluorofenilici in grado di interagire preferenzialmente con la dopamina attraverso interazioni π - π .



Un approccio diverso, nel quale si sfrutta la forma del materiale per dirigere l'auto-organizzazione di unità di riconoscimento molecolare, è stato esplorato da Martinez e collaboratori.²² La superficie di una particella di silice mesoporosa è decorata con una specie contenente un ammonio, che funge da sito di coordinazione per gli anioni, e un antracene, che svolge la duplice funzione di unità di segnalazione fluorescente e di recettore per strutture aromatiche attraverso interazioni π - π . Il sensore riconosce selettivamente l'ATP, senza risentire di interferenze da parte di ADP, AMP o anioni inorganici. In questo caso è la forma stessa della struttura mesoporosa a conferire selettività al sensore: le stesse unità di riconoscimento, ancorate a una superficie di silice non mesoporosa, esibiscono una risposta più debole di due ordini di grandezza. Ogni molecola di ATP interagisce probabilmente con un ammonio e un antracene

(rispettivamente attraverso il fosfato e l'adenina) appartenenti a due unità di riconoscimento distinte situate alle estremità di pareti contigue. La cooperazione tra le due unità è possibile solo se le dimensioni dell'analita corrispondono alla periodicità dei pori.

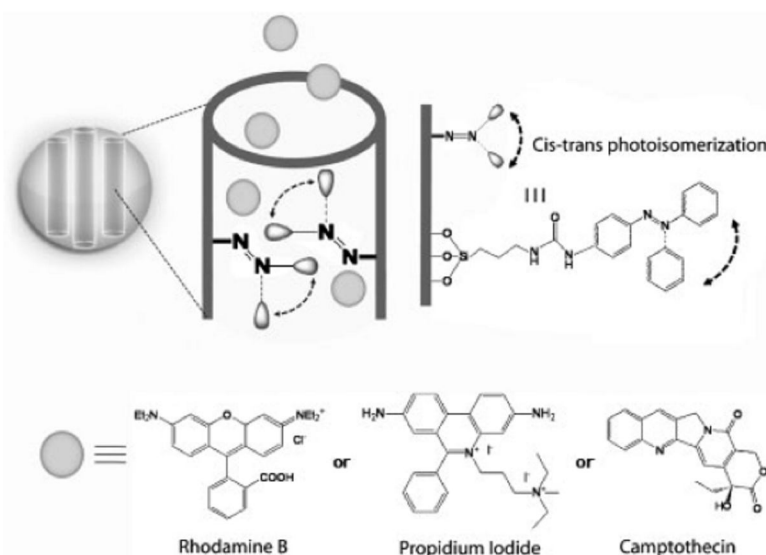


Vettori controllati a distanza: rilascio stimolato e *gatekeeping*

L'esteso volume interno delle particelle mesoporose si presta particolarmente bene ad ospitare molecole organiche. Nanoparticelle di silice mesoporosa opportunamente funzionalizzate possono penetrare in diversi tipi di cellule di mammifero per endocitosi, e fuoriuscire dagli endosomi senza indurre effetti citotossici. Per questo motivo, le nanoparticelle mesoporose sono particolarmente adatte a fungere da sistemi di trasporto per farmaci o altre molecole di interesse biologico. Il rilascio del carico, guidato dal gradiente di concentrazione, avviene per diffusione attraverso i pori. La possibilità di funzionalizzare facilmente le superfici interne ed esterne delle particelle ha portato, negli ultimi anni, alla concezione di meccanismi di rilascio più complessi, nei quali l'efflusso del carico può essere controllato da stimoli esterni.

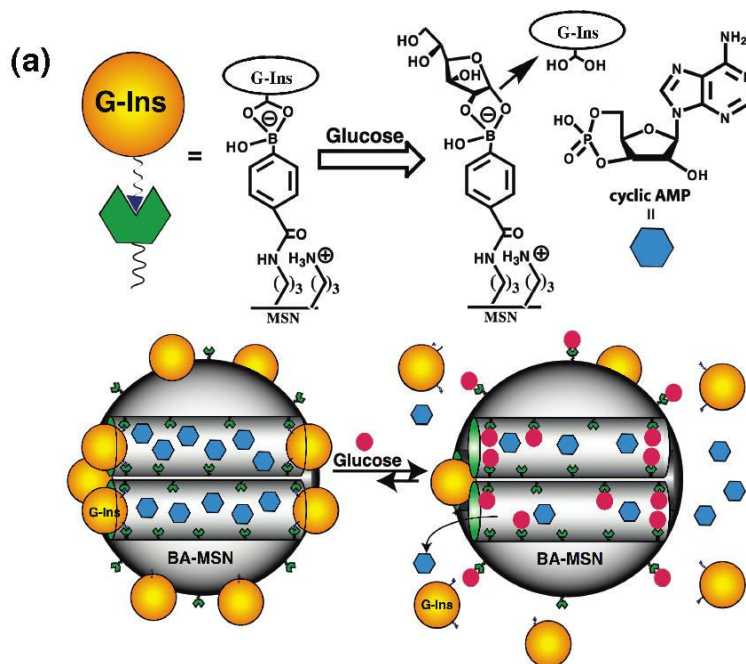
Un sistema molto ingegnoso di rilascio stimolato, descritto da Zink e collaboratori, sfrutta la funzionalizzazione delle pareti dei pori con molecole capaci di convertire un segnale luminoso in un movimento meccanico continuo.²³ Il meccanismo di trasduzione dello stimolo è la fotoisomerizzazione di azobenzene ancorati alla superficie dei pori. In assenza di stimoli l'isomero maggioritario è la più ingombrante forma *trans*, che trattiene all'interno delle nanoparticelle un carico composto da un marcatore fluorescente e un farmaco antitumorale. Dopo un periodo di incubazione con cellule tumorali, l'irradiazione delle nanoparticelle con luce di lunghezza d'onda tale da eccitare

entrambi gli isomeri induce una continua interconversione tra le forme *trans* e *cis*. Il carico viene letteralmente "spinto" nell'ambiente intracellulare dall'azione meccanica degli azobenzeni in rapido movimento, con un meccanismo di efflusso che non è più un semplice processo diffusivo. Il rilascio del marcatore rende il nucleo cellulare visibile in microscopia di fluorescenza, mentre il farmaco esercita la sua azione citotossica provocando la morte della cellula. Il preciso controllo spaziale e temporale del rilascio garantisce un'elevata efficacia terapeutica.

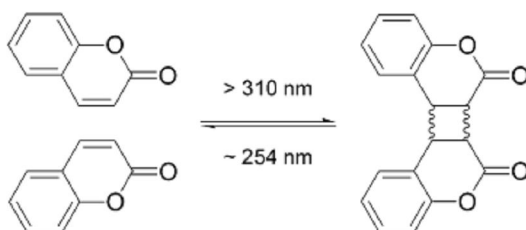


Un altro tipo di rilascio controllato (denominato *gatekeeping*) sfrutta l'apertura, innescata da stimoli esterni, di "porte" nanometriche situate all'ingresso dei pori. L'efflusso del carico è impedito fino alla rimozione delle ostruzioni. Sono state proposte numerose varianti di questo schema generale, che differiscono per la natura delle porte e per il meccanismo di apertura.

Nei sistemi ideati da Lin e collaboratori, per esempio, piccole nanoparticelle o macromolecole che ostruiscono l'ingresso dei pori vengono rilasciate in risposta a stimoli chimici. Un esempio molto recente è il sofisticato sistema di rilascio di cAMP e insulina rappresentato schematicamente in figura.²⁴ Le porte, in questo caso, sono insuline modificate con acido gluconico, ancorate alla superficie esterna di una nanoparticella mesoporosa attraverso la formazione di boronati. La nanoparticella, una volta entrata nelle cellule pancreatiche, risponde a un aumento di concentrazione del glucosio rilasciando l'insulina per transesterificazione dei boronati. Una volta rilasciata l'insulina, l'ingresso dei pori non è più ostruito, e un carico di cAMP trasportato all'interno è sua volta libero di diffondere nel citoplasma, dove contribuisce ad aumentare ulteriormente i livelli di insulina stimolandone la secrezione da parte della cellula ospite.



Un altro schema di rilascio stimolato basato sull'idea di *gatekeeping* è stato proposto da Mal e collaboratori.²⁵ In questo sistema le porte sono piccole molecole organiche, che possono aprire e chiudere l'ingresso dei pori in risposta a stimoli luminosi attraverso una reazione di fotodimerizzazione reversibile. Il funzionamento di questo meccanismo richiede che la dimensione dei dimeri corrisponda al diametro dei pori, che in questo caso è di 3 nm.



Bibliografia

1. Kresge, C.T., Leonowicz, M.E., Roth, W.J., Vartuli, J.C. & Beck, J.S. Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism. *Nature* **359**, 710-712 (1992).
2. Hoffmann, F., Cornelius, M., Morell, J. & Froeba, M. Silica-based mesoporous organic-inorganic hybrid materials. *Angew. Chem., Int. Ed.* **45**, 3216–3251 (2006).
3. Mihalcik, D.J. & Lin, W. Mesoporous silica nanosphere supported ruthenium catalysts for asymmetric hydrogenation. *Angew. Chem., Int. Ed.* **47**, 6229–6232 (2008).
4. Slowing, I.I., Trewyn, B.G., Giri, S. & Lin, V.S. Mesoporous silica nanoparticles for drug delivery and biosensing applications. *Adv. Funct. Mater.* **17**, 1225–1236 (2007).
5. Huo, Q., Margolese, D.I. & Stucky, G.D. Surfactant Control of Phases in the Synthesis of Mesoporous Silica-Based Materials. *Chemistry of Materials* **8**, 1147-1160 (1996).
6. Zhao, D. et al. Triblock Copolymer Syntheses of Mesoporous Silica with Periodic 50 to 300 Angstrom Pores. *Science* **279**, 548-552 (1998).
7. Davis, M.E. Ordered porous materials for emerging applications. *Nature* **417**, 813-821 (2002).
8. Park, S., Kim, D.S., Chang, J. & Kim, W.Y. Synthesis of MCM-41 using microwave heating with ethylene glycol. *Catalysis Today* **44**, 301-308 (1998).
9. Grün, M., Kurganov, A.A., Schacht, S., Schüth, F. & Unger, K.K. Comparison of an ordered mesoporous aluminosilicate, silica, alumina, titania and zirconia in normal-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **740**, 1-9 (1996).
10. Pauly, T.R., Liu, Y., Pinnavaia, T.J., Billinge, S.J.L. & Rieker, T.P. *Journal of the American Chemical Society* **121**, 8835 (1999).
11. Suzuki, K., Ikari, K. & Imai, H. Synthesis of Silica Nanoparticles Having a Well-Ordered Mesostructure Using a Double Surfactant System. *Journal of the American Chemical Society* **126**, 462-463 (2004).

12. Cabrera, S. et al. Generalised syntheses of ordered mesoporous oxides: the atrane route. *Solid State Sciences* **2**, 405-420 (2000).
13. Rathousky, J., Zupalova, M., Kooyman, P.J. & Zupal, A. Synthesis and characterization of colloidal MCM-41. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **241**, 81-86 (2004).
14. Nooney, R.I., Thirunavukkarasu, D., Chen, Y., Josephs, R. & Ostafin, A.E. Synthesis of Nanoscale Mesoporous Silica Spheres with Controlled Particle Size. *Chemistry of Materials* **14**, 4721-4728 (2002).
15. Cai, Q. et al. Dilute Solution Routes to Various Controllable Morphologies of MCM-41 Silica with a Basic Medium†. *Chemistry of Materials* **13**, 258-263 (2001).
16. Fowler, C.E., Khushalani, D., Lebeau, B. & Mann, S. Nanoscale Materials with Mesostructured Interiors. *Advanced Materials* **13**, 649-652 (2001).
17. Möller, K., Kobler, J. & Bein, T. Colloidal Suspensions of Nanometer-Sized Mesoporous Silica. *Adv. Funct. Mater.* **17**, 605-612 (2007).
18. Kobler, J., Möller, K. & Bein, T. Colloidal Suspensions of Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles. *ACS Nano* **2**, 791-799 (2008).
19. Slowing, I.I., Trewyn, B., Giri, S. & Lin, V. Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug Delivery and Biosensing Applications. *Advanced Functional Materials* **17**, 1225-1236 (2007).
20. Radu, D.R., Lai, C., Wiench, J.W., Pruski, M. & Lin, V.S. Gatekeeping layer effect: a poly(lactic acid)-coated mesoporous silica nanosphere-based fluorescence probe for detection of amino-containing neurotransmitters. *J. Am. Chem. Soc* **126**, 1640-1641 (2004).
21. Lin, V.S., Lai, C., Huang, J., Song, S. & Xu, S. Molecular Recognition Inside of Multifunctionalized Mesoporous Silicas: Toward Selective Fluorescence Detection of Dopamine and Glucosamine. *Journal of the American Chemical Society* **123**, 11510-11511 (2001).
22. Descalzo, A.B. et al. Anthrylmethylamine functionalised mesoporous silica-based materials as hybrid fluorescent chemosensors for ATP. *J. Mater. Chem.* **15**, 2721-2731 (2005).
23. Lu, J., Choi, E., Tamanoi, F. & Zink, J.I. Light-Activated Nanoimpeller-Controlled Drug Release in Cancer Cells. *Small* **4**, 421-426 (2008).

24. Zhao, Y., Trewyn, B.G., Slowing, I.I. & Lin, V.S. Mesoporous Silica Nanoparticle-Based Double Drug Delivery System for Glucose-Responsive Controlled Release of Insulin and Cyclic AMP. *Journal of the American Chemical Society* **131**, 8398-8400 (2009).
25. Mal, N.K., Fujiwara, M. & Tanaka, Y. Photocontrolled reversible release of guest molecules from coumarin-modified mesoporous silica. *Nature* **421**, 350-353 (2003).

Capitolo 6

In questo capitolo viene presentato un vettore alternativo, basato su nanoparticelle di silice mesoporose. È stata concepita una strategia sintetica innovativa, nella quale l'agente templante è una fase inorganica idroliticamente instabile, e il trattamento di rimozione del templante consiste nel semplice scambio di solvente con acqua a temperatura ambiente. La sintesi proposta è la trasposizione su scala nanometrica di un processo noto da decenni: la produzione di vetri di silice con pori di dimensioni nanometriche a partire da vetri borosilicati, ottenuta inducendo una separazione di fase e rimuovendo selettivamente la fase ricca di boro per idrolisi. Scegliendo opportunamente le fonti del silicio e del boro in una sintesi di Stoeber modificata è stato possibile ottenere una sospensione di nanoparticelle di borosilicati in etanolo con una distribuzione non omogenea del boro. Scambiando poi il solvente con acqua mediante ultrafiltrazione, la fase ricca di boro viene rimossa dalle particelle, lasciando al suo posto una rete di pori disordinati e interconnessi o addirittura dei gusci di silice.

Scopo

Due delle proprietà più importanti dei vettori per farmaci sono la capacità di *loading* e la versatilità sintetica, che può consentire la realizzazione di sistemi più complessi, per esempio attraverso la funzionalizzazione multipla. In questo senso, unire le proprietà delle particelle di silice (solubilità in acqua, biocompatibilità, trasparenza ottica e brevi percorsi di diffusione) all'elevata capacità di *loading* e alla ricchezza morfologica dei materiali mesoporosi rappresenta una prospettiva particolarmente interessante. Le nanoparticelle mesoporose possono inoltre fungere da piattaforma per la realizzazione di nanosistemi altamente sofisticati, dove il drogaggio di *bulk*, la funzionalizzazione differenziale della superficie e dei pori e il *loading* dei pori possono essere sfruttati simultaneamente per ottenere sistemi multifunzionali. L'analisi di queste potenzialità mi ha indotto a progettare la sintesi di un nuovo, più versatile, vettore basato su nanoparticelle di silice mesoporose, la cui realizzazione è stata perseguita parallelamente a quella dei sistemi descritti nei capitoli precedenti.

Le poche strategie per la sintesi di nanoparticelle di silice mesoporose riportate in letteratura non sono molto differenti da quelle, molto note, di materiali *bulk*. L'approccio generale richiede l'uso di un agente templante, di solito un tensioattivo, che guida la formazione dei pori e che viene rimosso, per calcinazione o estrazione chimica, dopo la formazione del reticolo di silice.¹ Tali procedure di rimozione sono però piuttosto drastiche e spesso incompatibili con la presenza di droganti delicati come farmaci o fluorofori. Il fotosensibilizzatore mTHPC studiato nel capitolo precedente, per esempio, non è stabile nemmeno rispetto a blandi trattamenti termici. I trattamenti ad alta temperatura, inoltre, possono provocare una seria diminuzione della reattività della superficie attraverso la disidratazione dei siti reattivi, rendendo così più difficile la funzionalizzazione della superficie e dei pori. In un'ottica industriale, evitare l'uso dei tensioattivi sarebbe vantaggioso anche in termini di costo, impatto ambientale e possibilità di *scale-up*.

Un'altra peculiarità che accomuna la maggior parte delle procedure sintetiche basate sull'uso di tensioattivi come templanti è la particolare topologia dei pori, organizzati in strutture ordinate di volumi cilindrici non interconnessi. Tale caratteristica, indubbiamente cruciale per molte applicazioni, non è sempre necessaria o addirittura desiderabile: infatti altre applicazioni, come l'adsorbimento o la catalisi, trarrebbero beneficio dalla maggiore accessibilità del volume interno di un reticolo di pori interconnessi.

La maggior parte delle poche procedure sintetiche per la preparazione di materiali a base di silice mesoporosa, che non richiedono l'uso di tensioattivi, si basano sull'utilizzo di templanti organici.² I trattamenti di rimozione, però, non sono significativamente diversi da quelli utilizzati per i tensioattivi. Un approccio completamente diverso è stato proposto invece da Asher e collaboratori, che sono riusciti a controllare la morfologia di nanoparticelle di silice in crescita usando nanoparticelle di cadmio solfuro come templanti.³ La rimozione del template richiede però un trattamento ad alta temperatura con acido nitrico. Anche in questo caso, comunque, la complessità della sintesi, la tossicità dei materiali e le drastiche condizioni di rimozione rappresentano altrettanti ostacoli all'uso delle nanoparticelle in *drug delivery*. L'utilizzo di templanti inorganici di facile rimozione sembrerebbe però essere una strategia promettente.

Nell'industria, l'uso di templanti inorganici per la preparazione di materiali porosi è una pratica consolidata. Un processo industriale di grande importanza, la produzione del vetro Vycor poroso (Corning, Inc.), sfrutta proprio questo principio. Sottoponendo un vetro borosilicato a trattamenti termici si può indurre la separazione di due fasi, una ricca di silice, l'altra (minoritaria) ricca di ossidi di boro.⁴ Poiché la separazione di fase

avviene per decomposizione spinodale, la morfologia della fase minoritaria risulta per lo più continua e disordinata. La rimozione selettiva di questa fase attraverso un trattamento di idrolisi acida fornisce un vetro di silice con un reticolo di pori vermiformi interconnessi.

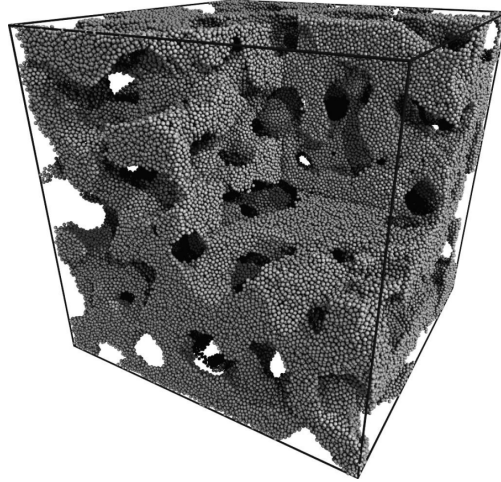


Figura 1: Modello molecolare di un vetro Vycor.⁵

Lo scopo del lavoro descritto in questo capitolo è la messa a punto di una strategia sintetica che permetta di trasporre questo processo dalla sintesi di materiali *bulk* a quella di nanoparticelle.

Risultati

Strategia sintetica

La strategia sintetica che proponiamo si articola in due stadi, analoghi solo formalmente ai due stadi del processo Vycor. Il primo prevede la preparazione di nanoparticelle interamente inorganiche, costituite da due fasi separate su scala nanometrica, una ricca di silice, l'altra ricca di boro. In queste particelle, non ancora mesoporose, la morfologia finale è già definita in forma mascherata. Nel secondo stadio, la fase minoritaria, che funge da template per i pori, viene rimossa con un trattamento idrolitico, per rivelare la struttura porosa.

Il primo *step* consiste dunque nella sintesi di nanoparticelle di borosilicati bifasiche. Dal punto di vista sintetico, le due fasi devono essere distinte già durante la crescita, vista l'impossibilità di indurre una separazione di fase in nanoparticelle colloidali omogenee di dimensioni così piccole. Occorre quindi operare in condizioni che garantiscano una distribuzione non omogenea del boro all'interno del reticolo di silice, favorendo la formazione di ponti a ossigeno tra atomi dello stesso tipo (B–O–B e Si–O–Si) a scapito della formazione di ponti tra atomi di tipo diverso (Si–O–B).

Le osservazioni di Irwin e collaboratori sulla sintesi *sol-gel* acquosa di vetri borosilicati forniscono utili indicazioni circa la strada da percorrere.⁶ Seguendo la crescita dei *gel* mediante spettroscopia infrarossa e NMR (¹¹B e ²⁹Si), questi autori hanno dimostrato che i legami borosilossanici (Si–O–B), dopo un periodo iniziale di lenta formazione, vengono progressivamente idrolizzati fino a scomparire del tutto. I legami si formano nuovamente solo in seguito alla disidratazione indotta da trattamenti termici ad alta temperatura. Il contenuto di legami borosilossanici e la loro reattività idrolitica sono importanti indici, rispettivamente, dell'omogeneità dei borosilicati e della facilità con la quale è possibile rimuovere selettivamente una delle due fasi. La loro sostanziale assenza suggerisce dunque l'esistenza di domini ricchi di boro di facile rimozione.

La sintesi *sol-gel* acquosa dei borosilicati rappresenta quindi un punto di partenza ideale per i nostri scopi. L'estensione di questa tecnica alla sintesi di nanoparticelle potrebbe quindi portare alla preparazione di nanoparticelle colloidali di borosilicati con le caratteristiche desiderate. Le evidenti analogie della sintesi *sol-gel* con il metodo di Stöber ci hanno spinti a concepire una variante di quest'ultimo che permettesse di ottenere il prodotto di interesse: nanoparticelle di borosilicati.

Il metodo di Stöber è basato sull'idrolisi e condensazione di alcossidi di silicio in una miscela di alcol, acqua e ammoniacca.⁷ Nella sintesi *sol-gel* degli ossidi misti, ogni

elemento diverso dall'ossigeno viene introdotto nel reticolo aggiungendo un precursore opportuno, generalmente un alcossido o un alogenuro, alla miscela di reazione.⁸ Questi subiscono quindi reazioni di idrolisi e condensazione che portano alla formazione delle particelle. Per analogia, l'introduzione di un precursore del boro nella sintesi di Stöber dovrebbe fornire nanoparticelle di borosilicati.

Nella sintesi *sol-gel*, l'omogeneità chimica del *gel* dipende criticamente dalla differenza tra le velocità di idrolisi dei precursori: poiché sono le loro forme idrolizzate che condensano per formare i ponti a ossigeno, se uno dei due precursori idrolizza molto più velocemente dell'altro, le reazioni di omocondensazione precedono quelle di eterocondensazione dando luogo alla formazione di domini distinti di diversa composizione chimica.⁸ La scelta del precursore del boro, guidata dalla necessità di massimizzare la differenza tra le velocità di idrolisi, è ricaduta sull'acido borico. Questo reagente, infatti, è la forma pre-idrolizzata degli alchilborati, i tipici precursori nella sintesi *sol-gel* dei borosilicati, e rispetto a questi appare molto vantaggioso anche in termini di costo e tossicità.

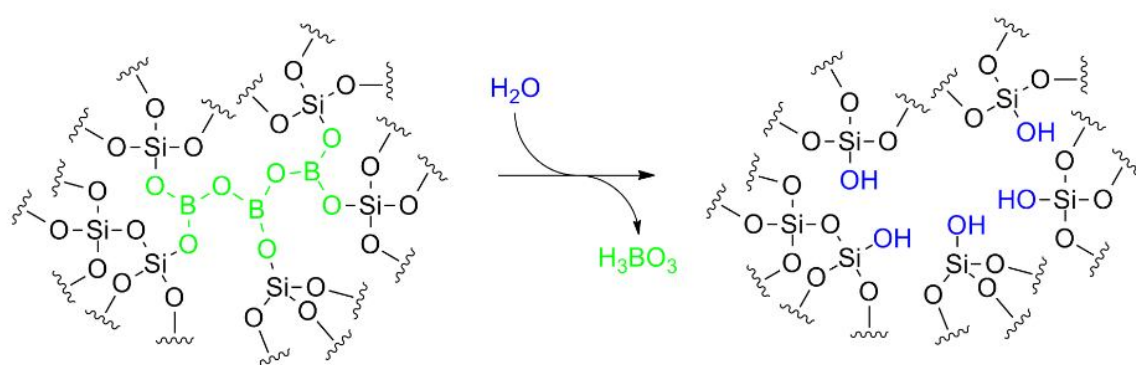


Figura 2. Schema per la sintesi di nanoparticelle mesoporose.

Sintesi delle nanoparticelle di borosilicati

Le nanoparticelle di borosilicati sono state sintetizzate secondo la variante del metodo di Stöber appena descritta, per idrolisi e co-condensazione di tetraetossisilano e acido borico in una miscela di etanolo, acqua e ammoniaca a temperatura ambiente. Il decorso della reazione è stato seguito mediante *dynamic light scattering* fino al termine della crescita. La miscela di reazione è stata quindi sottoposta a cicli di ultrafiltrazione su cellulosa rigenerata (cut-off 10 kDa) con etanolo, per rimuovere i monomeri non idrolizzati e le specie non reagite, e filtrata su filtri in PVDF con pori di 0.22 μm per

eliminare gli aggregati più grandi. La purificazione per ultrafiltrazione garantisce che le nanoparticelle rimangano sempre in soluzione, così da minimizzare la formazione di aggregati, spesso irreversibile nel caso della silice a causa della formazione di legami covalenti tra le particelle.

Caratterizzazioni morfologiche e controllo della dimensione

La morfologia delle nanoparticelle è stata studiata mediante microscopia elettronica in trasmissione. Le immagini TEM mostrano sfere dai contorni regolari, monodisperse e non aggregate. L'apparente omogeneità interna non riflette necessariamente un'omogeneità microstrutturale: la differenza di densità elettronica tra la silice e gli ossidi di boro potrebbe non essere sufficiente a distinguere le due fasi nelle immagini TEM.

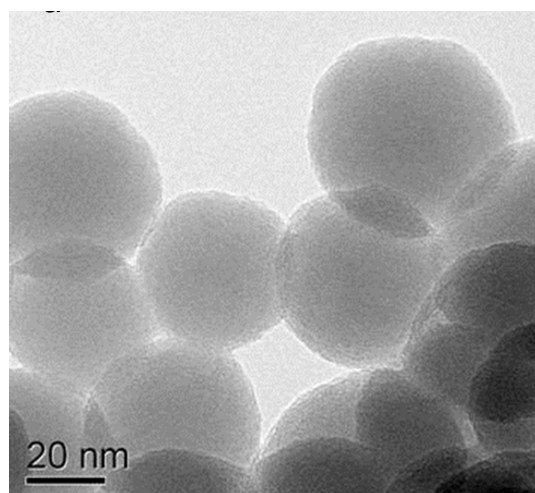


Figura 3. Immagini TEM delle nanoparticelle di borosilicati.

L'effetto delle condizioni di sintesi, in particolare della quantità di acqua e ammoniaca, è stato studiato in dettaglio nel tentativo di ottenere un controllo riproducibile della dimensione. I risultati, riportati in tabella 1, hanno permesso di ottimizzare la sintesi per fornire nanoparticelle di dimensione controllata, in un intervallo compreso tra 20 e 50 nm.

Tabella 1. Effetto della quantità di acqua e ammoniaca sulla dimensione.

Entry	[NH ₃] (M)	H ₂ O (%)	Size (nm)
1	0.30	6.8	50
2	0.30	4.5	30
3	0.30	2.3	-
4	0.37	4.5	20

Tra 30 e 50 nm il controllo dimensionale viene esercitato variando la concentrazione dell'acqua nella miscela di reazione. Concentrazioni più alte forniscono particelle più grandi (esempi **1** e **2**), ma sembra esistere una concentrazione minima necessaria alla buona riuscita della sintesi. Quando la miscela di reazione contiene meno del 4.5% d'acqua, infatti, la soluzione ottenuta dalle procedure di purificazione non sembra contenere nanoparticelle (esempio **3**). Per ottenere particelle più piccole di 30 nm occorre aumentare la concentrazione di ammoniaca (esempio **4**). Questo andamento è già noto nel caso della sintesi di Stöber ed è dovuto alla minore stabilità colloidale delle particelle in mezzi ad elevato forza ionica.

Caratterizzazioni chimiche e controllo del contenuto di boro

La sola caratterizzazione morfologica, come si è visto, non permette di distinguere le due fasi, e non fornisce informazioni sulla presenza del boro nelle nanoparticelle. La prima verifica della natura chimica delle nanoparticelle deve essere fornita, quindi, dall'analisi della loro composizione.

Il contenuto di boro è stato determinato con tre metodi diversi: spettroscopia di emissione atomica (ICP-OES, *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy*), spettroscopia ^{11}B -NMR e un metodo spettrofotometrico basato sulla variazione dell'assorbimento dell'azometino H (figura 4) in seguito alla condensazione con l'acido borico.

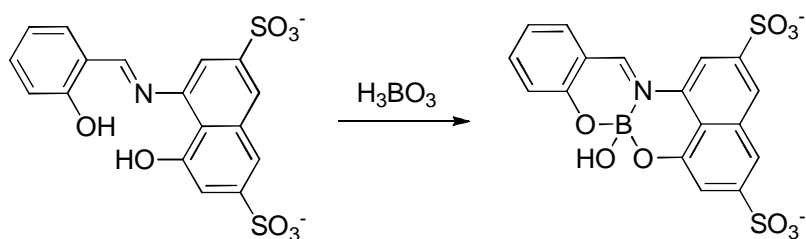


Figura 4. Condensazione dell'acido borico con azometino H.

Tutte le misure, effettuate su campioni di nanoparticelle mineralizzate in NaOH, hanno confermato la presenza di boro nelle particelle. Si è quindi investigato l'effetto del rapporto molare tra i precursori di silicio e boro sul contenuto di boro delle nanoparticelle, nel tentativo di ottenere strutture a porosità controllata. I risultati dell'analisi ICP-OES, confermati dalle determinazioni spettrofotometriche, sono riassunti in tabella 2.

Tabella 2. Effetto del rapporto molare B/Si sul contenuto di boro delle nanoparticelle.

Entry	(B/Si) _{react}	(B/Si) _{prod}	B % w/w
1	0.5	0.15	2.1
2	0.75	0.12	1.7
3	2	0.10	1.4

Un rapporto molare di 0.5 tra i precursori del boro e del silicio nella miscela di reazione fornisce nanoparticelle con un contenuto di boro del 2% in peso. L'uso di rapporti B/Si più alti non risulta in un contenuto di boro più elevato. Lo stesso valore limite del contenuto di boro si osserva anche nei borosilicati *bulk* preparati con il metodo sol-gel, ed è stato attribuito alla volatilità degli alchilborati.

Gli esperimenti di spettroscopia ¹¹B-NMR in soluzione hanno anche permesso dimostrare l'effettiva inclusione del boro nelle nanoparticelle. Infatti, lo spettro di un campione di nanoparticelle in soluzione etanolica non evidenzia alcun segnale ¹¹B, a causa dell'esteso allargamento di riga dovuto all'inclusione dei nuclei di boro nelle nanoparticelle, che diffondono molto più lentamente delle specie molecolari. Quando però le nanoparticelle sono vengono disciolte per aggiunta di NaOH concentrato, si ha il rilascio in soluzione di derivati del boro. Questo dà origine a uno stretto segnale a 1.62 ppm, che può essere assegnato alla specie B(OH)₄⁻.

Caratterizzazioni strutturali

Accertata la presenza del boro e la sua inclusione nelle particelle, rimane da verificare se la struttura delle particelle sia effettivamente costituita da due fasi separate. Per chiarire quest'ultimo dubbio sono state effettuate misure di spettroscopia infrarossa su campioni di nanoparticelle liofilizzati.

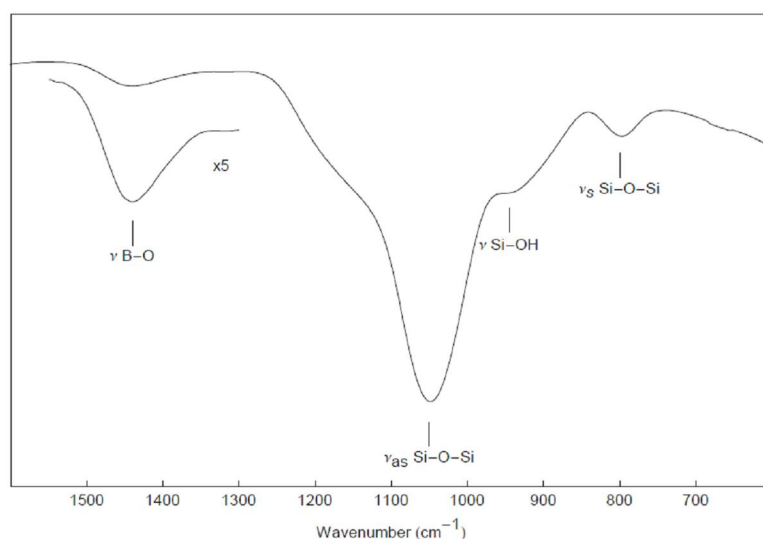


Figura 5. Spettro infrarosso delle nanoparticelle di borosilicati.

Nello spettro infrarosso si possono contare le bande caratteristiche della silice, originate dallo stretching simmetrico Si–O–Si a 800 cm^{-1} , dallo stretching Si–OH a 945 cm^{-1} e dallo stretching asimmetrico Si–O–Si a 1050 cm^{-1} . Lo stretching B–O, visibile a 1440 cm^{-1} , conferma la presenza del boro. Il dato più importante, però, è l'assenza di bande corrispondenti all'assorbimento dei borosilossani (attese a 930 e 670 cm^{-1}). Di fatto, si tratta di una forte indicazione della struttura bifasica delle particelle: l'assenza di borosilossani suggerisce che, come previsto, il boro non sia omogeneamente distribuito all'interno del reticolo di silice ma sia, al contrario, concentrato in domini distinti.

Rimozione del templante

Alla luce dei risultati appena esposti, le nanoparticelle di borosilicati possono essere considerate dei sistemi templati. La struttura mesoporosa, mascherata dalla fase ricca di boro, può a questo punto essere svelata con un trattamento idrolitico.

L'idrolisi del templante è stata condotta attraverso un semplice scambio del solvente mediante cicli di ultrafiltrazione con acqua a temperatura ambiente. Questo metodo consente di "lavare" le particelle senza dover mai rimuovere completamente il solvente, mantenendo così un elevato grado di disaggregazione. Un ulteriore vantaggio di questo approccio è che le nanoparticelle trattate si trovano già in soluzione acquosa, pronte per un eventuale uso biomedico.

Caratterizzazioni morfologiche

Le soluzioni acquose delle nanoparticelle trattate sono state nuovamente analizzate mediante microscopia elettronica in trasmissione, e confrontate con le immagini acquisite prima della rimozione del templante. Le immagini TEM mostrano la formazione di un reticolo di pori vermiformi, disordinati e interconnessi, che riflettono la distribuzione della fase ricca di boro nelle particelle di borosilicati. La dimensione media dei pori può essere stimata approssimativamente intorno ai 2-5 nm. Il contorno frastagliato suggerisce una leggera erosione superficiale, ma le dimensioni non sembrano significativamente diminuite.

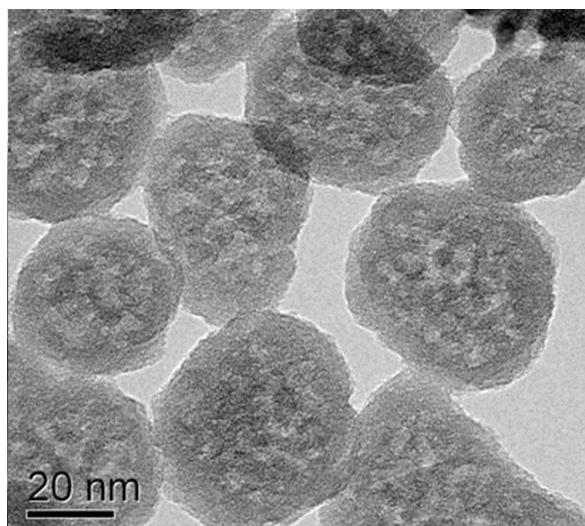


Figura 6. Immagini TEM di nanoparticelle ottenute per ultrafiltrazione con acqua di nanoparticelle di borosilicati.

In un esperimento di controllo, nanoparticelle di silice pura sono state sintetizzate in condizioni identiche tranne per l'assenza di acido borico, e sottoposte allo stesso trattamento idrolitico. Campioni prelevati prima e dopo l'ultrafiltrazione appaiono identici al TEM, e simili nell'aspetto alle particelle di borosilicati non porose prima del trattamento in acqua. Questo esperimento conferma il ruolo del boro come agente templante, ed esclude un possibile effetto del solo trattamento con acqua sulla formazione dei pori.

Caratterizzazione chimica e strutturale

La composizione chimica delle nanoparticelle trattate con acqua è stata analizzata con le stesse tecniche usate per le nanoparticelle di borosilicati, e confrontata con i risultati precedenti per verificare che la formazione dei pori fosse effettivamente dovuta alla rimozione della fase ricca di boro. Nessuna delle misure effettuate sui campioni di nanoparticelle mesoporose ha rivelato la presenza di boro, confermando questa ipotesi.

L'analisi spettroscopica ha fornito ulteriori informazioni circa la struttura del reticolo mesoporoso. Dopo il trattamento con acqua, l'assorbimento dei legami B–O scompare dallo spettro FT-IR, confermando i risultati già ottenuti dalle altre misure. Lo stretching Si–O–Si subisce uno spostamento a energie più alte, da 1050 cm^{-1} a 1070 cm^{-1} (figura 7). Questi spostamenti a energie più alte sono generalmente associati a una diminuzione della tensione del reticolo di silice, che sarebbe compatibile, in questo caso, con la rimozione di una fase templante.

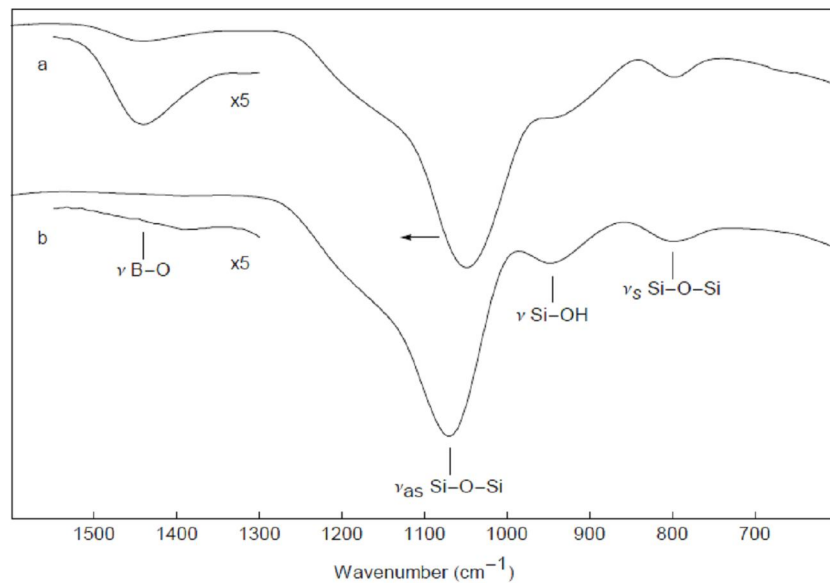


Figura 7. Spettro infrarosso di nanoparticelle ottenute per ultrafiltrazione con acqua di nanoparticelle di borosilicati.

Nanocapsule di silice

La rimozione del template dalle nanoparticelle sintetizzate con un elevato contenuto d'acqua nella miscela di reazione ha rivelato strutture inaspettate. Le sintesi condotte con una concentrazione d'acqua del 6% hanno fornito, insieme alle nanoparticelle mesoporose, una popolazione di nanocapsule delle stesse dimensioni. Intrigati dalla possibilità di ottenere strutture complesse così facilmente, abbiamo investigato più a fondo questo fenomeno, aumentando ulteriormente il contenuto di acqua nella sintesi. L'analisi delle immagini TEM ha rivelato una forte correlazione tra la percentuale di acqua e la frazione di nanocapsule. Quando la concentrazione dell'acqua raggiunge il 10% la maggior parte delle nanoparticelle è cava (figura 8).

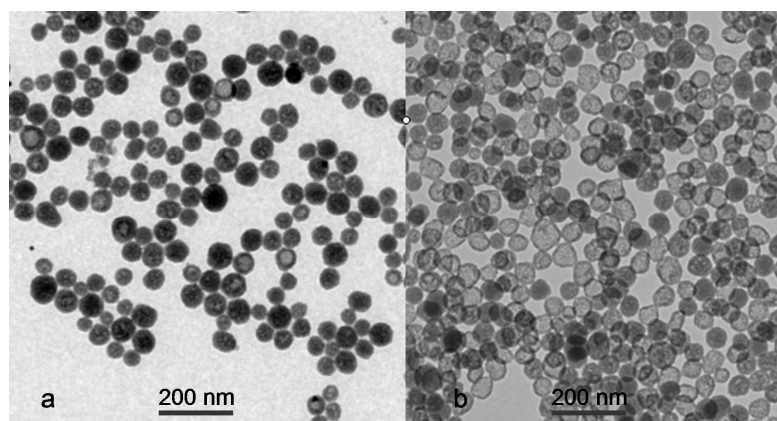


Figura 8. Immagini TEM di campioni sintetizzati con contenuti di acqua crescenti nella miscela di reazione: (a) 6.8%, (b) 10%.

Conclusioni

In questo capitolo è stata descritta una nuova via di sintesi di nanoparticelle di silice mesoporose, nella quale i tensioattivi usati comunemente come templanti per i pori sono stati sostituiti da una fase inorganica. La rimozione del templante inorganico, effettuata in condizioni blande, è compatibile con la presenza all'interno delle nanoparticelle di carichi delicati come i farmaci.

Nanoparticelle di borosilicati di dimensioni comprese tra 20 e 50 nm sono state sintetizzate in una soluzione etanolica attraverso una variante del metodo di Stöber che prevede la co-condensazione di tetraetossisilano e acido borico. La sintesi è stata ottimizzata in modo da fornire nanoparticelle di dimensione controllata attraverso la variazione delle concentrazioni di acqua e ammoniaca nella miscela di reazione. Lo studio della loro struttura e composizione chimica mediante spettroscopia infrarossa, ICP-OES, e spettroscopia ^{11}B -NMR ha rivelato una struttura bifasica costituita da due fasi distinte, una ricca di silice, l'altra ricca di boro. Il contenuto di boro è stato stimato intorno al 2% in peso, indipendentemente dal rapporto molare tra i precursori di silicio e boro. La fase ricca di boro è stata rimossa attraverso un semplice scambio del solvente con acqua per ultrafiltrazione a temperatura ambiente, rivelando un reticolo di pori vermiformi interconnessi di diametro compreso tra 2 e 5 nm. Lo stesso metodo di sintesi, in presenza di concentrazioni elevate di acqua nella miscela di reazione, ha condotto alla formazione di nanocapsule di silice di circa 50 nm di diametro.

Questa procedura sintetica altamente versatile rappresenta una valida alternativa per la sintesi di vettori complessi, nei quali diversi carichi terapeutici e altre unità funzionali possano essere introdotti simultaneamente con precisione nanometrica in comparti ben definiti e spazialmente separati, in condizioni compatibili anche con le specie più delicate. La funzionalizzazione differenziale dei pori e della superficie esterna della silice mesoporosa viene condotta generalmente attraverso trattamenti successivi con trialcossilil derivati diversi prima e dopo la rimozione del templante.⁹ Questa procedura, tuttavia, può dare luogo a una funzionalizzazione promiscua a causa della tendenza dei trialcossilil derivati a sostituire i tensioattivi all'interno dei pori. Recentemente è stato proposto un approccio basato su un processo di diffusione controllata successivo alla rimozione del templante,¹⁰ che tuttavia è limitato per sua natura a nanoparticelle abbastanza grandi (centinaia di nanometri) da permettere un controllo preciso dei tempi di diffusione. Le piccole nanoparticelle di borosilicati presentate in questo capitolo potrebbero invece essere immuni agli equilibri di scambio templante-silano, e quindi particolarmente adatte alla funzionalizzazione selettiva.

Ulteriori studi sono in corso per caratterizzare meglio il sistema ed esplorarne le possibili applicazioni.

Bibliografia

1. Kresge, C.T., Leonowicz, M.E., Roth, W.J., Vartuli, J.C. & Beck, J.S. Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism. *Nature* **359**, 710-712 (1992).
2. Wei, Y. et al. A non-surfactant templating route to mesoporous silica materials. *Adv. Mater. (Weinheim, Ger.)* **10**, 313–316 (1998).
3. Chang, S., Liu, L. & Asher, S.A. Preparation and Properties of Tailored Morphology, Monodisperse Colloidal Silica-Cadmium Sulfide Nanocomposites. *Journal of the American Chemical Society* **116**, 6739-6744 (1994).
4. Hood, H.P. & Nordberg, M.E. (1934).
5. Gelb, L.D. & Gubbins, K.E. Characterization of Porous Glasses: Simulation Models, Adsorption Isotherms, and the Brunauer–Emmett–Teller Analysis Method. *Langmuir* **14**, 2097-2111 (1998).
6. Irwin, A., Holmgren, J. & Jonas, J. Solid state ²⁹Si and ¹¹B NMR studies of sol-gel derived borosilicates. *Journal of Non-Crystalline Solids* **101**, 249-254 (1988).
7. Stöber, W., Fink, A. & Bohn, E. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *Journal of Colloid and Interface Science* **26**, 62-69 (1968).
8. Brinker, C.J. & Scherer, G.W. *Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*. (Academic Press: 1990).
9. De Juan, F. & Ruiz-Hitzky, E. Selective functionalization of mesoporous silica. *Adv. Mater. (Weinheim, Ger.)* **12**, 430–432 (2000).
10. Cheng, K. & Landry, C.C. Diffusion-Based Deprotection in Mesoporous Materials: A Strategy for Differential Functionalization of Porous Silica Particles. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 9674–9685 (2007).

Capitolo 7

Strumentazione

Spettrometria di risonanza magnetica nucleare: lo spettrometro utilizzato è un Bruker AC 250F operante a 250 MHz per spettri protonici e a 69.9 MHz per spettri al ^{13}C . I chemical shift sono riferiti al tetrametilsilano utilizzato come standard interno. La simbologia usata per descrivere i segnali spettrali è la seguente: s = singoletto; d = doppietto, t = tripletto, q = quartetto, qn = quintetto, st = sestetto, m = multipletto, broad = allargato.

Spettroscopia di fluorescenza: il fluorimetro utilizzato per la registrazione degli spettri di fluorescenza è un Perkin Elmer LS-55, dotato di lampada allo xenon impulsata, filtri di polarizzazione, fotomoltiplicatore Hamamatsu R928 e portacelle termostatato a circolazione d'acqua. Per le analisi sono state usate cuvette di quarzo con cammino ottico di un centimetro.

Le misurazioni delle rese quantiche di fluorescenza sono state effettuate in soluzioni ed a 25°C seguendo il metodo descritto da Demas e Crosby. La resa quantica è data dalla relazione:

$$\Phi_S = \Phi_R \left(\frac{A_S}{A_R} \right) \left(\frac{n_S}{n_R} \right)^2$$

dove Φ è la resa quantica, A l'area sottesa alla banda di missione ed n l'indice di rifrazione del solvente utilizzato per preparare i campioni di misura. I suffissi S e R indicano il campione di misura ed il riferimento utilizzato.

Spettroscopia UV-VIS: gli spettrofotometri utilizzati per la registrazione di spettri UV-VIS sono strumenti a doppio raggio dotati di portacelle multiplo e termostatato a circolazione d'acqua (Perkin-Elmer Lambda 5, 16 e 45), sono state utilizzate cuvette di quarzo con cammino ottico di un centimetro.

Spettroscopia UV-Vis (per valutare la produzione di $^1\text{O}_2$): lo spettrofotometro impiegato per la registrazione degli spettri UV-Vis è un Perkin Elmer Lambda 2 a doppio raggio. Per le analisi sono state utilizzate cuvette di quarzo con cammino ottico di un centimetro.

Spettrometria di Massa: Le analisi ESI-MS sono effettuate con lo strumento Navigator LC/MS della Thermo Quest Finningan, gestito con software Xalibur.

Dynamic Light Scattering (DLS): le misure DLS sono state effettuate con uno strumento costituito da un autocorrelatore Pacific Scientific NICOMP C370, collegato ad un laser ad argon Spectraphysics 2016 operante a 488 nm. Per le analisi sono stati utilizzati tubi per coltura cellulare in vetro con 0.6 mm di diametro in un portacelle termostatato con un sistema Peltier.

Analisi 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 keV e con ingrandimento 40.000 x.

Esperimenti di Ultrafiltrazione: per gli esperimenti di ultrafiltrazione sono stati utilizzati apparati di filtrazione *Millipore*[®] da 75 mL, 50 mL e 10 mL con membrane *Amicon*[®] in cellulosa rigenerata rispettivamente di 47 mm, 44 mm e 27 mm. Tutte le membrane hanno un cut off di 10000 Dalton ed un diametro medio dei pori circa 3 nm.

Microscopia di fluorescenza: gli esperimenti di microscopia di fluorescenza sono stati effettuati al Dipartimento di Biologia "Vallisneri" dell'Università di Padova. Le immagini sono state ottenute con un microscopio Leika DM 5000B, telecamera Leika DFC 300, con filtri di eccitazione a 515-560 nm e di emissione a 580 m.

Irraggiamento: la sorgente luminosa utilizzata è costituita da una lampada ad alogeno/quarzo PTL Penta, munita di fibra ottica, di filtri che permettono di isolare la banda di luce desiderata e termostata a circolo d'acqua. La fluenza della luce è stata misurata con un radiometro IL 1700 (International Light).

Materiali

Le soluzioni per le misure spettrofotometriche e le procedure di ultrafiltrazione vengono preparate utilizzando acqua deionizzata ($R > 18 \text{ M}\Omega$) filtrata con sistema MILLI-Q della Millipore ($\text{H}_2\text{O MQ}$).

Il gel di silice utilizzato per le colonne cromatografiche flash è *Machery-Nagel* ed ha granulometria 230-400 mesh e *Kieselgel 60*, 0.063mm *Merck*. Per la cromatografia su strato sottile 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:¹

mTHPC (*meta*-tetra(idrossifenil)clorina, Foscan[®]): fornita dalla Biolitec AG (Jena, Germania).

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

PBS con Ca^{2+} e Mg^{2+} : PBS con aggiunta di CaCl_2 e MgCl_2 .

Versene: soluzione costituita da PBS contenente lo 0.2% di EDTA (acido etilendiammonio-tetracetico).

FBS (Foetal Bovine Serum): prodotto commerciale fornito dalla Gibco (Invitrogen, Milano, Italia).

RPMI 1640 1X (Roswell Park Memorial Institute 1640): terreno di coltura cellulare in forma liquida, fornito dalla Gibco. È costituito da sali inorganici, vitamine, aminoacidi ed altre sostanze, quali D-glucosio, glutatione ridotto e rosso fenolo, ed è addizionato con GlutaMAX[®] 0.2 M, che è il dipeptide L-Alanil-L-Glutammina precursore della L-Glutammina.

F-12K 1X (Nutrient Mixture Kaighn's modification): terreno di coltura cellulare in forma liquida contenente L-Glutammina, fornito dalla Gibco.

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium): terreno di coltura liquido contenente GlutaMAX[®] e 4.5 g/l di glucosio, fornito dalla Gibco.

¹ I prodotti commerciali non elecanti sono stati usati senza ulteriore purificazione; quando necessaria, la purificazione e l'anidrificazione dei solventi è effettuata con tecniche standard.

Trypsine: tripsina liquida allo 0.25% con EDTA 1 mM, tripsina liquida allo 0.05% con EDTA 0.53 mM, tripsina allo 0.25%; fornite dalla Gibco.

CellTiter 96[®] AQueous One Solution Proliferation Assay: Kit per test MTS, prodotto commerciale fornito dalla ditta Promega.

ADPA (acido disodico 9,10-antracenedipropionico): sonda utilizzata per valutare la produzione di ossigeno singoletto, fornita dalla Molecular Probes (Invitrogen).

Image-iT[™] LIVE Green Reactive Oxygen Species Detection Kit: Kit fornito dalla Molecular Probes, utilizzato per valutare la produzione cellulare di ROS.

R123 (Rodamina 123), NBD C₆-ceramide (6-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)amino esanoil]sfringosina), LysoTracker Green DND-26 e ER-Tracker Green (glibenclamide BODIPY[®] FL): sonde per microscopia di fluorescenza prodotte dalla Molecular Probes.

Trypan blue: colorante ad esclusione vitale in soluzione allo 0.4%, fornito dalla Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Penicillina G, Streptomicina, AOT (dioctil-sodiosulfosuccinato), n-butano, VTES (viniltrietossisilano), APTES (3-aminopropiltrirossisilano), IR775 cloride (2-[2-[2-cloro-3-[2-(1,3-diidro-1,3,3-trimetil-2H-indol-2-ilidene)-etilidene]-1-cicloesene-1-il]-etenil]-1,3,3-trimetil-3H-indolio cloride), HEPES (acido 4-(2-idrossietil-1-piperazinil)etansolfonico), Triton X-100: forniti dalla ditta Sigma-Aldrich.

SDS (sodio dodecil solfato): soluzione acquosa al 2% utilizzata per la lisi cellulare.

Kit per il saggio BCA: kit fornito dalla ditta Pierce (Rockford, IL) e costituito da un reagente A (acido bicinconinico, carbonato di sodio, bicarbonato di sodio, tartrato di sodio in NaOH 0.2 M) e da un reagente B (solfato di rame al 4%).

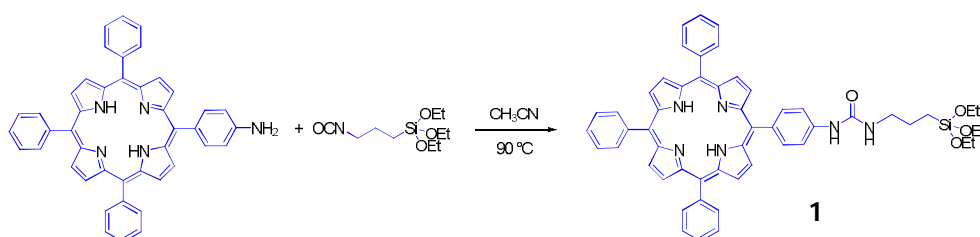
Tioridazina Cloridrato: farmaco appartenente alla famiglia delle fenotiazine, fornito dalla Sandoz Pharma Ltd (Basilea, Svizzera); lo stock è sciolto in etanolo assoluto.

Acqua milliQ: preparata a partire da acqua deionizzata (R > 18 M Ω) filtrata con sistema di purificazione Milli-Q della Millipore.

Materiale plastico: le plastiche utilizzate per le colture cellulari sono prodotti Falcon[®].

Vettore modulare

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

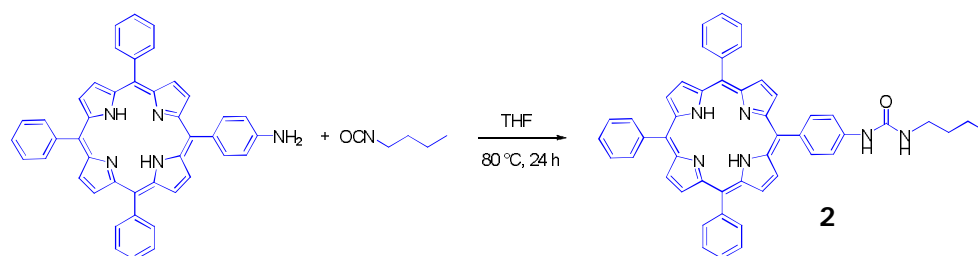


	PM	mg	mL	Mmol	eq	d (g/mL)
5-(4-amminofenil)-10,15,20-trifenilporfirina	629.75	50		0.08	1	
3-trietossisililpropilisocianato	247.37	198	0.198	0.8	10	1.002
CH ₃ CN			6+2			

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 μ L (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).

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



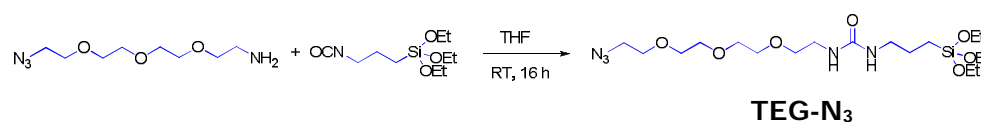
	PM	mg	mL	mmol	eq	d (g/mL)
5-(4-amminofenil)-10,15,20-trifenilporfirina	629.75	25		0.04	1	
1-butilisocianato	99.13	80	0.090	0.8	20	0.890
THF			3+1			

In una fiala da 10 mL, oscurata alle pareti e munita di ancoretta 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.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ -2.43 (s, 2H, NH); 1.00 (t, 3H, J = 7.25 Hz, (CH₂)₃CH₃); 1.25 (m, 4H, CH₂(CH₂)₂CH₃); 3.37 (m, 2H, J = 6 Hz, NH(CO)NHCH₂); 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⁺)

Sintesi di N-(3-trietossisililpropil)-N'-(11-azido-3,6,9-triossaundecil)urea



	PM	mg	mL	Mmol	eq	d (g/mL)
--	----	----	----	------	----	-------------

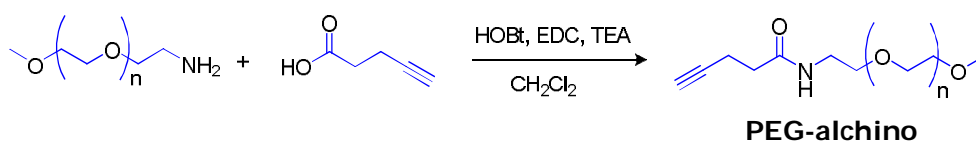
11-azido-3,6,9-triossaundecan-1-ammina	218.26	109	0.100	0.5	1	1.100
3-trietossisililpropilisocianato	247.37	136	0.135	0.55	1.1	1.002
THF			20+10			

In un pallone da 50 mL, munito di ancoretta magnetica e in atmosfera di azoto, si introducono 100 mL (0.5 mmol) di 11-azido-3,6,9-triossaundecan-1-ammina disciolti in 20 mL di THF anidro. Alla soluzione raffreddata a 0 °C si aggiungono goccia a goccia, mediante un imbuto gocciolatore, 135 mL (0.55 mmol) di 3-trietossisililpropilisocianato disciolti in 10 mL di THF anidro. Si lascia riscaldare fino a temperatura ambiente e si segue il decorso della reazione mediante TLC (eluente DCM/MeOH 10:1). Dopo 16 h si rimuove il solvente a pressione ridotta, ottenendo 256 mg (resa 100%) di **TEG-N₃** sotto forma di olio incolore.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ 0.63 (t, 2H, SiCH₂, J = 8.5 Hz); 1.21 (t, 9H, J = 7.25 Hz, CH₃CH₂O); 1.57 (m, 2H, SiCH₂CH₂); 3.36 (m, 4H, CH₂NH(CO)NH); 3.55 (t, 2H, CH₂N₃, J = 4.75 Hz); 3.66 (m, 12H, OCH₂CH₂O); 3.79 (q, 6H, CH₃CH₂O, J = 7 Hz), 4.84 (t, 1H, Si(CH₂)₃NH, J = 5.75 Hz), 4.96 (t, 1H, NH(CH₂)₂, J = 5.25 Hz).

¹³C-NMR (69.9 MHz, CDCl₃): δ 7.57 (SiC); 18.25 (CH₃CH₂O); 30.25 (SiCH₂CH₂); 40.22 (SiCH₂CH₂CH₂); 42.89 (NHCH₂CH₂O); 50.60 (CH₂N₃); 58.36 (CH₃CH₂O); 69.89 (OCH₂CH₂O); 69.99 (OCH₂CH₂O); 70.10 (OCH₂CH₂O); 70.35 (OCH₂CH₂O); 70.46 (OCH₂CH₂O); 70.62 (OCH₂CH₂O); 70.68 (OCH₂CH₂O); 158.40 (NH(CO)NH).

Sintesi di O-(2-(4-pentinammido)etil)-O'-metilpolietilenglicole 2000



	PM	mg	mL	mmol	Eq	d (g/mL)
O-(2-amminoetil)-O'-metilpolietilenglicole 2000	2000	800		0.4	1	
HOBt	135.12	325		2.4	6	
EDC·HCl	191.7	460		2.4	6	
Acido 4-pentinoico	98.10	200		2	5	
Trietilammina	101.19	200	0.280	2	5	0.726
CH ₂ Cl ₂			8 + 4			

In un pallone da 25 mL, munito di ancoretta magnetica si introducono 200 mg (2 mmoli) di acido 4-pentinoico, 325 mg di HOBt, 8 mL di CH₂Cl₂ anidro e 280 µL di trietilammina. Alla soluzione raffreddata a 0°C si aggiungono 460 mg di EDC·HCl. Si lascia riscaldare fino a temperatura ambiente e dopo circa 15 minuti si aggiungono 800 mg di O-(2-amminoetil)-O'-metilpolietilenglicole 2000 precedentemente sciolti in 4 mL di CH₂Cl₂ anidro. Si lascia decorrere la reazione in atmosfera di azoto. Dopo 16 h si rimuove il solvente a pressione ridotta e si scioglie il residuo in circa 20 mL di EtOH. Si raffredda fino a 0°C e si mantiene tale temperatura per 30 minuti. Si introducono quindi circa 5 mL di MTBE e si raffredda fino a -20°C. Tale temperatura viene mantenuta per un'ora. Il solido precipitato viene recuperato tramite filtrazione a pressione ridotta. La procedura viene ripetuta per due volte e il solvente residuo viene rimosso a pressione ridotta. Si ottengono 758 mg (resa 90.2%) di prodotto sotto forma di solido bianco opaco.

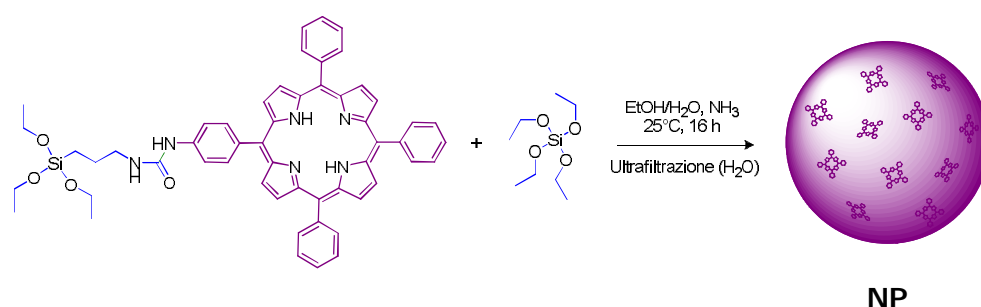
¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ 2.02 (t, 1H, C≡CH, J = 2.5 Hz); 2.42 (m, 2H, CH₂CH₂(CO)); 2.50 (m, 2H, (CO)CH₂); 3.38 (s, 1H, CH₃O); 3.48 (t, 135H, PEG); 3.92 (t, 1H, CH₂NH, J = 4.5 Hz); 6.51 (s, 1H, NH)

¹³C-NMR (69.9 MHz, CDCl₃): δ 35.17 (CH₂CH₂(CO)); 59.03 ((CO)CH₂); 70.22 (PEG); 71.90 (C≡CH); 83.08 (C≡CH).

IR (KBr): 3446, 2885, 2262, 2102, 1967, 1734, 1717, 1700, 1696, 1506, 1467, 1456, 1413, 1360, 1343, 1280, 1242, 1150, 114, 1060, 964, 842, 668, 529, 509 cm⁻¹.

Analisi elementare: Calcolata per C₉₈H₁₉₃O₄₇N: C, 55.05%; H, 9.11%; N, 0.66%.
Trovata: C, 54.95%; H, 9.41%; N, 0.65%.

Sintesi di nanoparticelle di silice drogate con N-(3-trietossisililpropil)-N'-[4-(10,15,20-trifenilporfirin-5-il)-fenil]urea

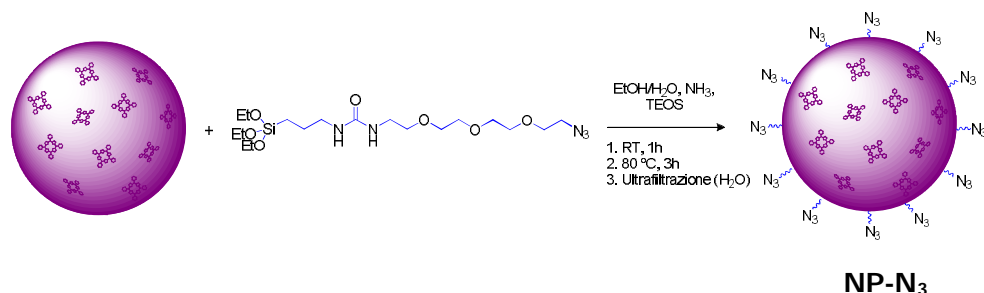


	PM	mg	mL	Mmol	eq	D (g/mL)
TEOS	208.33	93	0.100	0.45	100	0.933
1	877.12	4		0.005	1	
NH ₃ (7.4 M in H ₂ O)			1	7.4	1600	
EtOH			20			

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: 78.4 ± 33.8 nm

Funzionalizzazione superficiale di NP con N-(3-trietossisililpropil)-N'-(11-azido-3,6,9-triossaundecil)urea



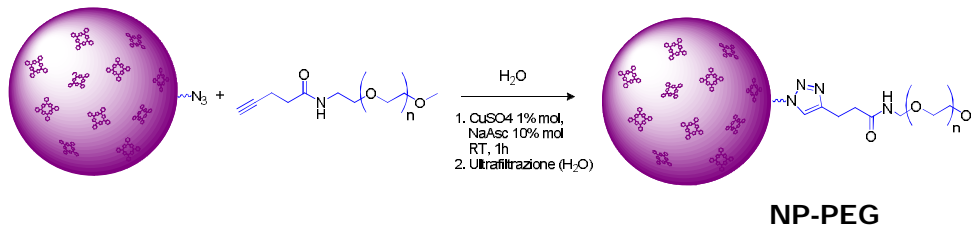
	PM	mg	mL	mmol	Eq	D (g/mL)
TEOS	208.33	6.25	0.0067	0.03	1	0.933
N-(3-trietossisililpropil)- N'-(11-azido-3,6,9-triossaundecil)urea	465.53	37		0.08	2.7	
NP			20			

In un pallone da 50 mL, oscurato alle pareti e munito di ancoretta magnetica, si introducono 37 mg (0.08 mmol) di N-(3-trietossisililpropil)-N'-(11-azido-3,6,9-triossaundecil)urea, 20 mL di una soluzione di NP e 6.7 μ L di TEOS (0.03 mmoli). Si lascia decorrere la reazione a temperatura ambiente per un'ora. La miscela di reazione viene poi portata ad 80°C, a riflusso ed in atmosfera di azoto. Trascorse tre ore, si toglie il riscaldamento e si aggiungono circa 20 mL di EtOH a temperatura ambiente. La soluzione viene quindi filtrata a pressione ridotta su filtro Millipore® con membrana 0.45 μ m. La soluzione ottenuta viene concentrata e diluita a 80 mL per 7 volte su membrana Amicon® in cellulosa rigenerata (cut-off 10 kDa) sotto pressione di N₂ (4 bar) con 7 \times 60 mL di acqua milliQ. Il volume totale della soluzione viene ricondotto a 20 mL.

Dynamic light scattering: 68.9 \pm 30.3 nm

IR (KBr): 3420, 2114, 1635, 1576, 1087, 965, 801, 668, 458 cm⁻¹.

Funzionalizzazione superficiale di NP-N₃ con O-(2-(4-pentinammido)etil)-O'-metilpolietilenglicole 2000 per via catalitica



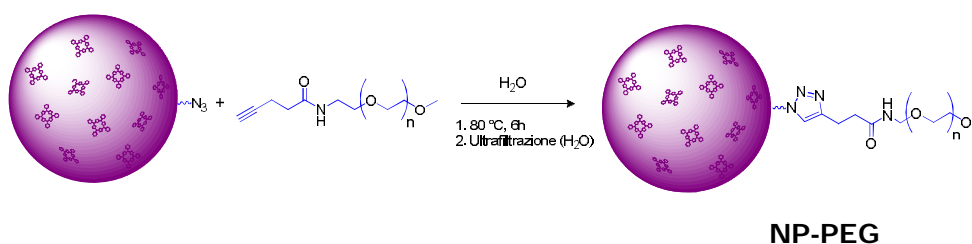
	PM	Mg	mL	Mmol	Eq
O-(2-(4-pentylamido)etil)-O'-metilpolietilenglicole 2000	2100	168		0.08	100
NP-N ₃			20	0.08	100
H ₂ O			2 + 2		
CuSO ₄	159.60	0.13		0.0008	1
NaAsc	198.11	1.6		0.008	10

In un pallone da 25 mL, oscurato alle pareti e munito di ancoretta magnetica, si introducono 168 mg (0.08 mmol) di O-(2-(4-pentylamido)etil)-O'-metilpolietilenglicole 2000, 20 mL di una soluzione acquosa di NP-N₃, 2 mL di soluzione 0.4 mM di CuSO₄ in acqua e 2 mL di soluzione 4 mM in acqua. Si lascia decorrere la reazione per un'ora. La miscela di reazione viene poi concentrata e diluita a 80 mL per 7 volte su membrana Amicon® in cellulosa rigenerata (cut-off 10 kDa) sotto pressione di N₂ (4 bar) con 7 × 60 mL di acqua milliQ.

Dynamic light scattering: 64.3 ± 24.1 nm

IR (KBr): 3430, 2887, 2742, 2694, 1968, 1734, 1700, 1468, 1456, 1413, 1360, 1343, 1280, 1242, 1150, 1114, 1060, 964, 947, 842, 668, 530, 509, 463 cm⁻¹.

Funzionalizzazione di NP-N₃ con O-(2-(4-pentylamido)etil)-O'-metilpolietilenglicole 2000 per via termica



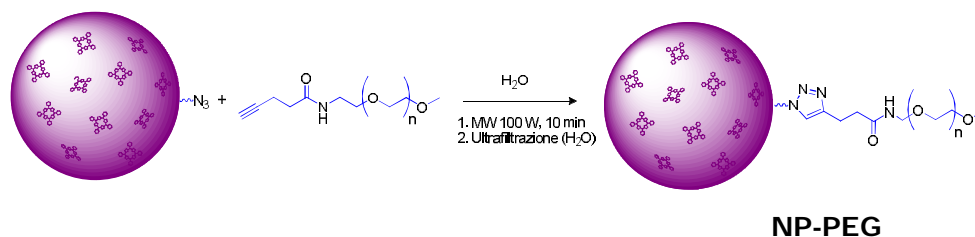
	PM	Mg	mL	mmol	Eq
O-(2-(4-pentinammido)etil)-O'-metilpolietilenglicole 2000	2100	168		0.08	1
NP-N ₃			20	0.08	1

In un pallone da 50 mL, oscurato alle pareti e munito di ancoretta magnetica, si introducono 168 mg (0.08 mmol) di O-(2-(4-pentinammido)etil)-O'-metilpolietilenglicole 2000 e 20 mL di una soluzione acquosa di NP-N₃ (0.08 mmol di azidi). Il pallone viene munito di refrigerante a bolle e la miscela viene portata ad una temperatura di 80°C. Si lascia decorrere la reazione per 6 ore. La miscela di reazione viene poi concentrata e diluita a 80 mL per 7 volte su membrana Amicon® in cellulosa rigenerata (cut-off 10 kDa) sotto pressione di N₂ (4 bar) con 7 × 60 mL di acqua milliQ.

Dynamic light scattering: 66.4 ± 30.4 nm

IR (KBr): 3255, 2886, 2741, 2694, 1968, 1734, 1700, 1467, 1456, 1413, 1360, 1343, 1280, 1242, 1150, 1114, 1060, 963, 946, 842, 668, 529, 509, 462 cm⁻¹.

Funzionalizzazione superficiale di NP-N₃ con O-(2-(4-pentinammido)etil)-O'-metilpolietilenglicole 2000 assistita da microonde



	PM	mg	mL	Mmol	Eq
O-(2-(4-pentinammido)etil)-O'-metilpolietilenglicole 2000	2100	42		0.08	1
NP-N ₃			4	0.08	1

In un reattore da 5 mL si introducono 42 mg (0.08 mmol) di O-(2-(4-pentinammido)etil)-O'-metilpolietilenglicole 2000 e 4 mL di una soluzione acquosa di NP-N₃. La reazione viene condotta a potenza costante di 100 W per 10 minuti. La miscela

di reazione viene poi concentrata e diluita a 80 mL per 7 volte su membrana Amicon® in cellulosa rigenerata (cut-off 10 kDa) sotto pressione di N₂ (4 bar) con 7 x 20 mL di acqua milliQ.

Dynamic light scattering: 70 ± 44.6 nm

IR (KBr): 3302, 2886, 2742, 2694, 1968, 1734, 1701, 1468, 1456, 1414, 1360, 1343, 1280, 1242, 1150, 1113, 1060, 963, 947, 842, 668, 529, 509, 461 cm⁻¹.

Studi in vitro

Linea cellulare

La linea cellulare impiegata in questo lavoro è la KYSE-510, fornita dalla DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH/Braunschweig, Germania). Tale linea deriva da un carcinoma squamocellulare esofageo di una donna giapponese di 67 anni, sottoposta a radioterapia e trattamento chemioterapico con cisplatino. La linea, pertanto, presenta una mutazione nel gene p53 e amplificazione dei geni myc, hst1 e ciclina-D1.

Le cellule KYSE vengono mantenute in incubatore a 37°C con 5% di CO₂ e 90% di umidità, all'interno di fiasche da 75 cm², con un mezzo composto per il 10% da FCS e per il 90% da terreno RPMI 1640 1X, addizionato con Glutamax™ e con i seguenti antibiotici: 30 mg/ml di streptomina (38 U/ml) e 25 mg/ml di penicillina G (100 U/ml). Le cellule, che hanno un tempo di replicazione di circa 24 ore, crescono adese alla superficie della fiasca, formando un monostrato cellulare: prima del raggiungimento della confluenza, vengono tripsinizzate, risospese ed aliquotate in modo da avere una diluizione 1:5 o 1:10 in terreno completo (con antibiotici e 10% FCS). Il protocollo seguito è il seguente:

1. lavaggio con PBS 1X + antibiotici dopo aver eliminato il terreno ;
2. aggiunta di una soluzione allo 0.25% di tripsina per staccare le cellule;
3. neutralizzazione della tripsina con terreno RPMI 10X completo;
4. risospensione delle cellule e prelievo dell'aliquota corrispondente.

Prove di stabilità

In previsione di effettuare gli studi *in vitro*, si effettuano delle prove preliminari di stabilità delle nanoparticelle nei possibili mezzi di coltura cellulare. Le misure utili a determinare questo tipo di informazioni sono misure di *Dynamic Light Scattering* (DLS), che vengono effettuate prima e dopo la filtrazione dei campioni su filtro sterile in cellulosa Minisart® con diametro dei pori pari a 0.2 μm .

I campioni vengono preparati diluendo la soluzione di nanoparticelle rispettivamente in PBS, in terreno senza siero ed in terreno in presenza di siero al 3%, ciascuno per un volume complessivo di 1 mL, alla concentrazione che si intende impiegare, poi, nell'incubazione con le cellule (1 μM e 5 μM).

Misura della produzione di ossigeno singoletto

L'ossigeno singoletto è la principale specie reattiva che si forma in seguito alle reazioni di fotosensibilizzazione. Per valutarne la produzione da parte del fotosensibilizzatore in forma libera ed incluso nelle nanoparticelle di silice, si impiega l'ADPA (acido 9,10-antracenedipropionico). Il composto è un derivato dell'antracene solubile in acqua ed è un potente sensore per l'ossigeno singoletto. Esso viene convertito in endoperossido mediante ossidazione da parte dell'ossigeno singoletto, che si sviluppa durante la reazione di fotoeccitazione (Figura 14).

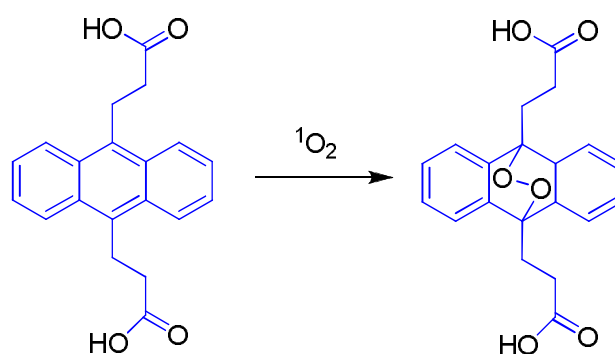


Figura 14: Ossidazione dell'ADPA ad endoperossido ad opera dell'ossigeno singoletto.

La reazione causa una diminuzione dell'assorbanza dell'ADPA a 379 nm (la λ_{max} di una delle bande di assorbimento dell'ADPA), che viene impiegata come test per verificare la produzione dell'ossigeno singoletto: misure spettrofotometriche della diminuzione dell'assorbanza vengono ripetute ad intervalli di 5 minuti durante

l'irradiazione, per monitorare nel tempo la produzione della specie reattiva dell'ossigeno.

Per condurre l'esperimento si preparano 3 mL di una soluzione di acqua/etanolo (1:1 v/v), contenente ADPA 20 μM e nanoparticelle contenenti una concentrazione pari a 1 μM di fotosensibilizzatore, e 3 mL di una soluzione costituita da ADPA e fotosensibilizzatore libero alle stesse concentrazioni. La soluzione al 50% di etanolo permette di raggiungere un compromesso tra l'ambiente di solubilizzazione dell'ADPA e quello delle nanoparticelle: l'etanolo evita l'aggregazione del derivato libero del fotosensibilizzatore mantenendo la sua stabilità, mentre l'acqua solubilizza il derivato dell'antracene. Le soluzioni contenenti i campioni vengono irradiate con luce rossa all'interno di una cuvetta in quarzo con cammino ottico di 1 cm, utilizzando come sorgente luminosa una lampada alogeno/quarzo termostata a 20°C con circolo d'acqua, con una velocità di fluensa della luce misurata con un radiometro e pari a 50 mW/cm². Contemporaneamente come controllo negativo si utilizza una soluzione di ADPA 20 μM irradiata alle stesse condizioni, ma senza la presenza del fotosensibilizzatore. Al termine di ogni ciclo di irraggiamento, per ognuna delle soluzioni si effettua una lettura allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 379nm (utilizzando come bianco il solo solvente ed una soluzione equimolare di sole nanoparticelle) ed una lettura a 556 nm, riferita al solo solvente, per verificare l'assenza di degradazione del fotosensibilizzatore in seguito all'irraggiamento.

Microscopia di fluorescenza

Per la preparazione dei vetrini vengono seminate circa 50000 cellule in 2 mL di terreno (RPMI completo) in dischetti di plastica con diametro 35 mm, all'interno dei quali è stato depositato un vetrino copri oggetto. Il protocollo è riportato di seguito:

1. Le capsule vengono mantenute a 37°C, in atmosfera contenente il 5% di CO₂ e 90% di umidità per 24 ore; in questo intervallo di tempo le cellule crescono formando un monostrato adeso al vetrino.

2. Trascorse le 24 ore, si rimuove il terreno e si aggiungono in ciascuna capsula 2 mL di trattamento, lasciando incubare per 24 ore a 37°C, 5% CO₂ e 90% di umidità.
3. I diversi campioni vengono preparati diluendo la soluzione acquosa di nanoparticelle con terreno RPMI 10x e H₂O (entrambi sterili), in modo che nella soluzione finale il terreno risulti dieci volte più diluito e quindi utilizzabile nelle cellule.
4. Oltre ai dischetti con le differenti concentrazioni di trattamento, si preparano dei vetrini di controllo costituiti da RPMI 10X, FCS al 3% ed H₂O milliQ.
5. Al termine si elimina il terreno contenente le nanoparticelle, i vetrini vengono lavati con PBS e osservati al microscopio a fluorescenza.

Vettore ORMOSIL

mTHPC

La soluzione di mTHPC utilizzata in questo lavoro sperimentale è stata preparata sciogliendo tale fotosensibilizzatore nel solvente standard, ossia in una soluzione costituita al 20% da etanolo assoluto, al 30% da polietilenglicole (PEG 400) e al 50% da acqua milliQ. La concentrazione della mTHPC è stata controllata effettuando uno spettro di assorbimento in etanolo assoluto, utilizzando i valori dei coefficienti di estinzione molare a 420 e 650 nm ($\epsilon_{420 \text{ nm}} = 199700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; $\epsilon_{650 \text{ nm}} = 43252 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Nanoparticelle ORMOSIL

Le nanoparticelle ORMOSIL (ORganically MODified SILica) utilizzate in questo progetto di Dottorato di Ricerca sono state sintetizzate e caratterizzate presso il Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università di Padova.

In generale, sono state sintetizzate per polimerizzazione di un precursore VTES (viniltrietossisilano) all'interno di micelle di tensioattivo, utilizzando come co-tensioattivo l'n-butanolo e come catalizzatore basico l' NH_3 , seguendo il metodo proposto da Roy et al. (2003).

Per quanto riguarda la preparazione di nanoparticelle ORMOSIL nude, ossia non PEGilate superficialmente, è stato seguito il seguente protocollo sperimentale (Fig. 14). All'interno di un reattore incamiciato termostato (20°C), contenente una soluzione di AOT (sodio diottilsulfosuccinato, 0.44 g, 1.0 mmol) ed n-butanolo (0.8 mL, 7.6 mmol) in acqua (20 mL), sono stati aggiunti 100 μL di una soluzione 8.8 mM di mTHPC in DMSO (dimetilsolfossido) per sintetizzare nanoparticelle con la mTHPC incorporata, oppure 200 μL di una soluzione 8.8 mM di IR775-Sil in DMSO per sintetizzare nanoparticelle contenenti una cianina legata covalentemente alla matrice silanica, oppure entrambe queste quantità in modo da ottenere nanoparticelle con incorporate sia la mTHPC che la cianina. Successivamente sono stati addizionati anche 200 μL di VTES (0.96 mmol) e la

miscela di reazione è stata mantenuta sotto vigorosa agitazione per circa 30 minuti fino a limpidezza. La polimerizzazione è stata innescata per aggiunta di una soluzione acquosa di ammoniaca (28%, 10 μL , 0.12 mmol), che funge da catalizzatore. La miscela di reazione è stata mantenuta sotto agitazione per 16 ore a 20°C; è stata poi filtrata attraverso una membrana PVDF avente pori di 0.45 μm , trasferita in una cella da ultrafiltrazione Amicon da 75 mL (Millipore) munita di una membrana di cellulosa rigenerata di 10 kDa (cut-off di circa 3 nm) e ultrafiltrata con acqua milliQ sotto azoto ad una pressione di 4 bar per eliminare dalla soluzione l'AOT, l'n-butanol, i monomeri che non hanno reagito e le molecole di sostanza non incorporate nelle nanoparticelle. La cella utilizzata per l'ultrafiltrazione è munita di un serbatoio da 1 litro per mantenere costante il volume all'interno della cella ed impedire un'eventuale andata a secco del campione. L'ultrafiltrazione è stata fatta proseguire fino al raggiungimento della concentrazione di AOT non tossica per le colture cellulari da utilizzarsi negli esperimenti *in vitro*, calcolata mediante esperimenti di vitalità cellulare. La soluzione finale di nanoparticelle è stata filtrata attraverso una membrana PVDF con pori di 0.22 μm . Infine la sospensione di nanoparticelle è stata portata ad un pH compreso tra 7.2 e 7.3, per permetterne il successivo utilizzo negli esperimenti *in vitro* nelle colture cellulari, conservata a temperatura ambiente ed utilizzata entro breve tempo in quanto è stata riscontrata la tendenza delle nanoparticelle ad aggregare.

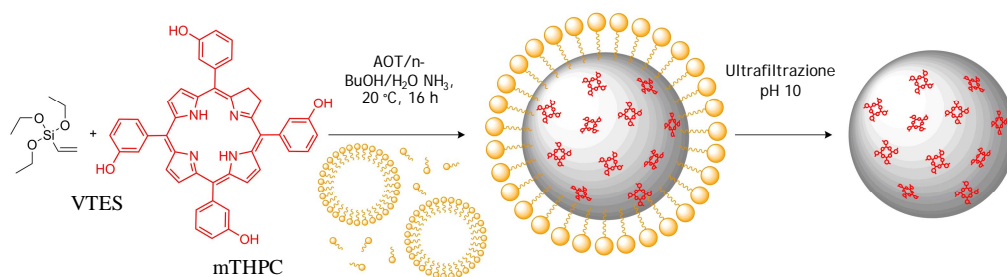


Fig. 14 Schema semplificato di sintesi di nanoparticelle ORMOSIL nude caricate non covalentemente con la mTHPC.

Le nanoparticelle ORMOSIL PEGilate, cioè rivestite con uno strato di polietilenglicole (PEG 2000), sono state preparate secondo la procedura appena descritta per le nanoparticelle nude, aggiungendo però un trimetossisililderivato anfifilico del PEG 2000 alla miscela di reazione.

Le nanoparticelle ORMOSIL vuote, ossia non caricate, sono state sintetizzate secondo la procedura sopra descritta per quelle caricate col fotosensibilizzatore e/o con la cianina, utilizzando 200 μL di DMSO puro al posto del volume della soluzione di mTHPC e/o IR775-Sil in DMSO.

Una volta sintetizzate, le soluzioni di nanoparticelle sono state accuratamente caratterizzate. La concentrazione di AOT o Brij35 residui nei campioni di nanoparticelle ultrafiltrate è stata calcolata misurando la tensione superficiale della soluzione di nanoparticelle con tensiometro Kruss K6 ed utilizzando una retta di calibrazione precedentemente allestita col medesimo strumento. Un'aliquota della soluzione di nanoparticelle risultante dalla sintesi è stata tirata a secco e pesata per determinarne la concentrazione in peso (mg di nanoparticelle/mL di soluzione), mentre la quantità di sostanza incorporata nelle nanoparticelle è stata determinata registrandone gli spettri di assorbimento UV-Vis con spettrofotometro Perkin Elmer Lambda 45, fornito di cella termostata, ed utilizzando i coefficienti di estinzione molare di $165000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 420 nm e $45800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 627 nm, rispettivamente per la mTHPC e la cianina IR775-Sil. Sono stati registrati gli spettri di fluorescenza della sostanza incorporata nelle nanoparticelle con spettrofluorimetro Perkin Elmer LS-55 munito di cella termostata. È stata effettuata un'analisi dimensionale delle nanoparticelle tramite microscopia elettronica a trasmissione (TEM) con microscopio Fei Tecnai 12 (100 KeV) e programma *Image J*, e mediante determinazione del diametro idrodinamico medio con misurazioni di Dynamic Light Scattering (DLS) con strumento Particle Sizing Systems Nicomp Model 370 equipaggiato con cella termostata e laser a 488 nm (Spectra Physics Series 2016 Ar).

La stabilità della preparazione di nanoparticelle è stata misurata tramite la registrazione di uno spettro di assorbimento prima della somministrazione *in vitro*. La concentrazione di mTHPC incorporata nelle nanoparticelle è stata calcolata utilizzando i valori dei coefficienti di estinzione molare (ϵ) calcolati sciogliendo la mTHPC in toluene ($\epsilon_{420 \text{ nm}} = 166000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$; $\epsilon_{650 \text{ nm}} = 38300 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$). Un'eventuale aggregazione delle nanoparticelle risulta in una diminuzione

della concentrazione apparente del fotosensibilizzatore e in un allargamento della banda a 420 nm.

Linee cellulari

La linea cellulare KYSE 510, derivante da un carcinoma squamocellulare esofageo umano di una donna giapponese di 67 anni, è stata fornita dalla Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH/Braunschweig (DSMZ, Germania) e presenta una mutazione nel gene p53 ed amplificazione dei geni c-myc, hst-1 e ciclina D1. Le cellule KYSE 510 sono state coltivate in monostrato in fiasche da 75 cm² utilizzando il mezzo RPMI 1640 1X contenente il 10% di siero fetale bovino (FBS) inattivato con il calore, 38 unità/ml (30 mg/ml) di streptomycina e 100 unità/ml (25 mg/ml) di penicillina G.

Per la subcoltura le cellule sono state sciacquate con PBS ed incubate per 4 minuti a 37°C con una soluzione 0.25% di tripsina e 1 mM di EDTA, per permetterne il distacco dal substrato plastico. L'azione della tripsina è stata quindi neutralizzata tramite l'aggiunta di mezzo completo (10% FBS) e, dopo un'accurata risospensione, sono state prelevate delle aliquote di sospensione cellulare che sono state seminate in nuove fiasche contenenti terreno completo fresco diluendole 1:5 oppure 1:20, rispettivamente ogni 3 o 4 giorni. Le cellule KYSE 510 hanno un tempo di replicazione di 23-24 ore.

Le varie colture cellulari sono state mantenute in incubatore a 37°C, in atmosfera contenente il 5% di CO₂ e 90% di umidità e sono state testate periodicamente per assicurare l'assenza di contaminazione da micoplasmi.

Saggio di vitalità cellulare MTS

Il CellTiter 96[®] AQueous One Solution Proliferation Assay è un saggio colorimetrico che consente di determinare il numero di cellule vitali in saggi di proliferazione o di citotossicità, basandosi sulla determinazione spettrofotometrica del numero di cellule vitali in funzione della loro attività enzimatica mitocondriale. È costituito dal sale di tetrazolio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carbossimetossifenil)-2-(4-sulfufenil)-2H-tetrazolio (MTS o reagente di Owen) e dal reagente accoppiante di

elettroni fenazina etosolfato (PES). L'MTS, dopo essere stato endocitato dalle cellule, viene bioridotto e trasformato in formazano, composto solubile nel mezzo di coltura cellulare e con assorbimento alla lunghezza d'onda di 490 nm. Questa conversione dell'MTS è presumibilmente accompagnata dalla formazione di NADPH o dal NADH prodotti dalle deidrogenasi, enzimi presenti nelle cellule metabolicamente attive. La quantità di formazano prodotta è pertanto direttamente proporzionale al numero di cellule vitali presenti (Fig. 17).

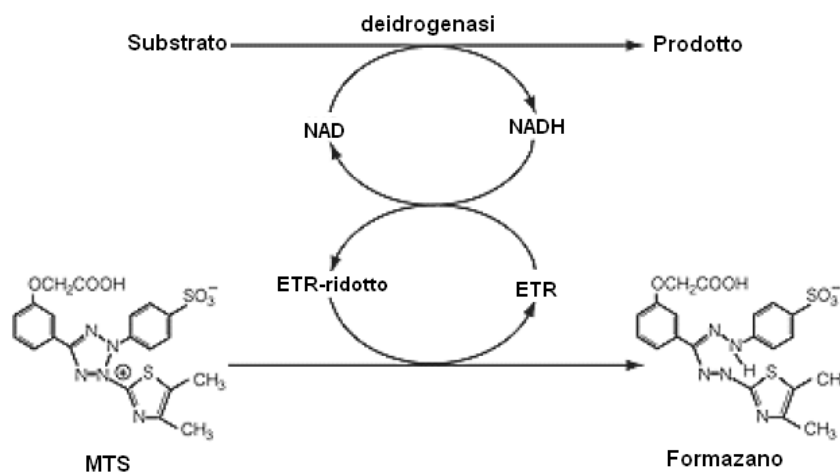


Fig. 17 Trasformazione dell'MTS a formazano (ETR: electron transfer reagent, ossia il reagente accoppiante di elettroni PES).

Per effettuare tale test le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti con fondo piatto (1 x 10³ cellule KYSE 510/pozzetto) in 200 µL di terreno completo e lasciate crescere a 37°C per 24 ore. Allo scadere di tale tempo il terreno è stato sostituito con 150 µL di terreno fresco contenente il 3% di FBS e concentrazioni crescenti del trattamento da effettuare (3 pozzetti per ogni diversa dose di trattamento). Le cellule sono state incubate al buio a 37°C per 24 ore, al termine delle quali è stata valutata la vitalità cellulare col test MTS (24 h) oppure è stato eliminato il terreno contenente l'agente trattante, sostituito con 150 µL di terreno completo, dopo aver effettuato 2 sciacqui con 150 µL di PBS 1 X con Ca²⁺ e Mg²⁺ e la vitalità cellulare è stata valutata con saggio MTS dopo ulteriori 24 ore di incubazione (24 + 24 h). Allo scadere delle 24 h e 24 + 24 h, da ciascun pozzetto è stato rimosso il terreno e sono stati aggiunti 100 µL di terreno privo di FBS e 20 µL di soluzione MTS. La reazione è stata fatta procedere a 37°C al riparo dalla luce per circa 60-90 minuti, al termine dei quali è stata misurata l'assorbanza a

490 nm con lettore di piastra spettrofotometrico Spectramax 190 (Molecular Devices). Al valore di assorbanza dei campioni è stato sottratto il valore medio dei bianchi, ossia pozzetti privi di cellule il cui segnale rappresenta il background di assorbanza a 490 nm, ricavando così il valore di assorbanza del formazano prodotto dagli enzimi cellulari. La vitalità cellulare dei diversi campioni è stata quindi espressa come percentuale di assorbanza rispetto al valore medio di assorbanza delle cellule di controllo, ossia rispetto a cellule che non sono state esposte al trattamento, ma che hanno subito gli stessi cambiamenti di terreno delle cellule trattate. Per calcolare la deviazione del controllo è stata fatta la media delle deviazioni delle assorbanze dei singoli determinanti, media che viene poi convertita in valore percentuale.

Con questo saggio è stata valutata la tossicità al buio in cellule KYSE 510 indotta dalla mTHPC veicolata nel solvente standard o incorporata non covalentemente in nanoparticelle ORMOSIL nude, dalle nanoparticelle ORMOSIL nude vuote e dal solo solvente standard a concentrazione equivalente a quella utilizzata per somministrare la più alta dose di mTHPC. È stata valutata anche la citotossicità del tensioattivo AOT, contenuto come residuo di sintesi nella soluzione di nanoparticelle, per determinarne la concentrazione massima non tossica *in vitro* nelle cellule KYSE 510. È stata stimata la tossicità al buio in cellule A549 e CCD-34Lu indotta dalla mTHPC veicolata nel solvente standard o incorporata non covalentemente o covalentemente in nanoparticelle ORMOSIL PEGilate superficialmente, dalle nanoparticelle ORMOSIL PEGilate vuote, dal tensioattivo Brij35 e dalle varie formulazioni liposomiale veicolanti la mTHPC (Fospeg).

Il test MTS è stato inoltre applicato per valutare la vitalità di cellule sottoposte a irradiazione dopo trattamento con concentrazioni crescenti di mTHPC nel solvente standard, caricata in nanoparticelle o in liposomi (esperimenti di PDT *in vitro*).

Per questi esperimenti di PDT *in vitro* le cellule sono state seminate in pozzetti e sottoposte a trattamento, seguendo il medesimo protocollo sperimentale sopra descritto per gli esperimenti di citotossicità al buio. Al termine dei trattamenti le cellule di ogni pozzetto sono state sciacquate due volte con 150 μ l di PBS con ioni Ca^{2+} e Mg^{2+} ed irradiate in PBS con una determinata dose di luce rossa (600-700 nm). Nel caso delle cellule KYSE 510 sono stati seminati e trattati solo i 4 pozzetti

centrali della piastra, ed irradiati con 0.12 J/cm^2 (30 secondi; 4 mW/cm^2) di luce rossa, ponendo la piastra sopra un supporto in plexiglass al di sotto del quale è stata fissata la fibra della lampada a quarzo/alogeno PTL Penta (modello STL-B-049, Desys SA, S. Antonino, Svizzera), munita di fibre ottiche e di filtri che permettono di selezionare le lunghezze d'onda di luce appropriata per l'attivazione del PS. La lampada è stata tarata utilizzando un radiometro IL 1700 (International Light, Newburyport, MA). Al termine dell'irradiazione, il PBS di ogni pozzetto è stato sostituito con $150 \mu\text{L}$ di terreno completo fresco. Dopo 24 ore di incubazione a 37°C , la vitalità cellulare è stata valutata con saggio MTS ed espressa come percentuale di assorbanza rispetto a cellule di controllo (100%) che non hanno subito né il trattamento né l'irradiazione.

Test di vitalità cellulare con Trypan Blue

La vitalità di cellule KYSE 510 dopo PDT con la mTHPC sciolta nel solvente standard o incorporata in nanoparticelle nude è stata valutata anche mediante il saggio del trypan blue. Quest'ultimo è un colorante ad esclusione vitale, avente carica negativa, in grado di penetrare solamente nelle cellule con membrana danneggiata. Questa proprietà consente di discriminare le cellule vive dalle morte tramite osservazione al microscopio ottico in quanto le prime risulteranno in grado di non fare penetrare il colorante, mentre le seconde assumeranno una tipica colorazione blu.

Per quest'esperimento, sono state seminate 5×10^4 cellule KYSE 510 in 2 mL di terreno completo in capsule di plastica del diametro di 35 mm, e lasciate attaccare e crescere in incubatore per 24 ore. Dopo tale tempo, il terreno è stato sostituito con 2 mL di terreno fresco contenente il 3% di FBS e la concentrazione desiderata di mTHPC libera o incorporata in nanoparticelle. Dopo 24 ore di trattamento a 37°C , i monostrati cellulari sono stati sciacquati due volte con 2 mL di PBS con ioni Ca^{2+} e Mg^{2+} , ed irradiati in PBS con 0.12 J/cm^2 (2 mW/cm^2 ; 1 minuto) di luce rossa (600-700 nm) emessa da una lampada a quarzo/alogeno PTL Penta. Al termine dell'irradiazione, in ogni capsula il PBS è stato sostituito con terreno completo e le capsule sono state mantenute in incubatore a 37°C per altre 24 ore prima di procedere con il test del trypan blue, che permette di determinare la

vitalità cellulare esprimendola come percentuale di cellule negative al trypan blue rispetto a cellule di controllo che non sono state né trattate né irradiate, ma che sono state sottoposte agli stessi cambiamenti di terreno dei campioni trattati. Una volta eliminato il terreno, il monostrato cellulare è stato sciacquato 2 volte con 1 mL di PBS; le cellule sono state staccate dal substrato plastico aggiungendo 500 μ l di tripsina/capsula (37°C; 4 minuti) e neutralizzando l'azione di quest'ultima con 200 μ l di FBS. Le cellule sono state raccolte in provette e risospese accuratamente. Da ogni campione sono stati prelevati 30 μ l di sospensione cellulare ai quali sono stati addizionati 30 μ l di soluzione di trypan blue per effettuare la conta cellulare utilizzando una camera di Bürker. La vitalità cellulare è stata quindi calcolata come percentuale, confrontando il numero di cellule vitali contate nei campioni trattati con il numero di cellule vitali nel controllo, considerate come 100% di vitalità.

Produzione di ossigeno singoletto

Per valutare la produzione di ossigeno singoletto da parte della mTHPC, libera o incorporata non covalentemente in nanoparticelle ORMOSIL nude, in diversi tipi di microambienti, è stato misurato il photobleaching nel tempo dell'ADPA (acido 9,10-antracenedipropionico), un derivato dell'antracene solubile in acqua che viene convertito in endoperossido dall'ossigeno singoletto prodotto dall'irradiamento del fotosensibilizzatore. Questa reazione determina una diminuzione dell'assorbanza dell'ADPA a 378 nm (λ_{\max} di una delle bande di assorbimento dell'ADPA) per cui è possibile monitorare la produzione di ossigeno singoletto durante l'irradiamento attraverso misurazioni spettrofotometriche dell'assorbanza a questa lunghezza d'onda. Tali misurazioni devono essere eseguite nello stesso tipo di soluzione sia per la mTHPC libera che in nanoparticelle, poiché l'ossigeno singoletto decade in maniera diversa a seconda dell'ambiente in cui si trova.

In un tipico esperimento, 2.5 mL di una soluzione di acqua o acqua/etanolo (1:1 v/v) o PBS col 3% di siero, contenente ADPA 20 μ M e mTHPC 1 μ M (libera o in nanoparticelle) sono stati mantenuti in agitazione a 20°C ed irradiati con luce rossa in una cuvetta in quarzo con cammino ottico di 1 cm (50 mW/cm² su una

parete della cuvetta), utilizzando come sorgente luminosa una lampada PTL Penta. In esperimenti di controllo, una soluzione di ADPA 20 μM è stata irradiata con le stesse condizioni, ma in assenza della mTHPC. La fotodegradazione tempo-dipendente dell'ADPA durante l'irradiazione è stata monitorata effettuando una lettura dell'assorbanza a 378 nm per ogni soluzione ad intervalli successivi di 5 minuti per un totale di 30 minuti. La costante cinetica della fotodegradazione dell'ADPA nei diversi mezzi è stata calcolata dalla pendenza della porzione lineare dei grafici del $\ln(A_0/A_t)$ vs tempo di irradiazione.

Photobleaching

Il *photobleaching*, ossia la degradazione del fotosensibilizzatore una volta esposto ad irradiazione, è indice della fotostabilità della molecola fotosensibilizzatore utilizzata. Se quest'ultima infatti si degradasse troppo velocemente la distruzione del tessuto tumorale non potrebbe completarsi. La fotostabilità della mTHPC, veicolata nel solvente standard e intrappolata fisicamente in nanoparticelle ORMOSIL nude, è stata determinata monitorandone l'emissione di fluorescenza in una sospensione cellulare sottoposta a 24 ore di trattamento. A questo scopo sono state seminate 5×10^4 cellule KYSE 510 in capsule di plastica del diametro di 35 mm. Dopo 24 ore a 37°C, le cellule sono state incubate con 2 mL di terreno RPMI contenente il 3% di FBS e 0.5 o 1 μM di mTHPC, sciolta nel solvente standard o incorporata in nanoparticelle. È stata anche allestita una capsula con cellule di controllo. Tutti i campioni sono stati quindi mantenuti al buio a 37°C per 24 ore, al termine delle quali le cellule di ogni capsula sono state lavate due volte con 1 mL di PBS senza ioni Ca^{2+} e Mg^{2+} , sono state staccate con 500 μl di tripsina, la cui azione è stata poi bloccata aggiungendo 200 μl di FBS. La sospensione cellulare di ogni capsula è stata raccolta in una provetta e centrifugata per 8 minuti a 1100 rpm. Il pellet è stato risospeso con 3 mL di PBS con ioni Ca^{2+} e Mg^{2+} per mimare le condizioni sperimentali applicate durante l'irradiazione negli esperimenti di valutazione della vitalità cellulare. Tale sospensione in PBS è stata trasferita infine in cuvette da 3 mL, aventi cammino ottico di 1 cm, ed irradiata con luce rossa ad una potenza di 6 mW/cm^2 per intervalli costanti di tempo, mantenendola sotto agitazione magnetica all'interno di un apposito supporto termostato a 22-23°C, per evitare che incrementi della

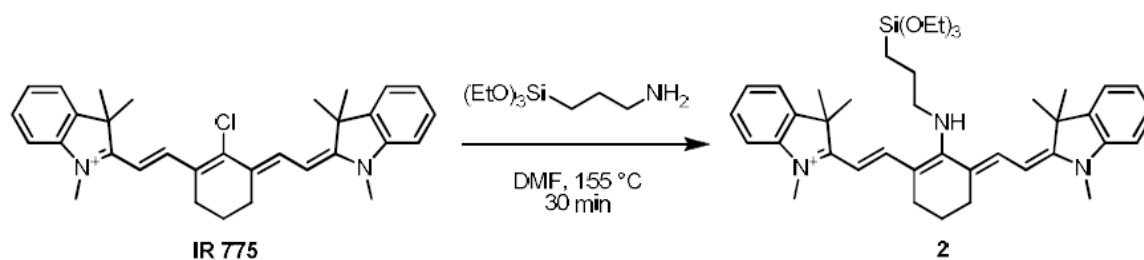
temperatura durante l'irradiazione potessero provocare delle alterazioni delle proprietà del fotosensibilizzatore. Al termine di ogni intervallo di irradiazione, per ogni campione è stata letta l'emissione di fluorescenza eccitandolo a 420 nm, dopo aver azzerato lo strumento con la sospensione delle cellule di controllo. Ciò è stato effettuato per analizzare l'eventuale diminuzione del segnale di fluorescenza emesso dalla mTHPC durante l'esposizione a luce rossa e per individuare eventuali differenze di comportamento tra la clorina veicolata in nanoparticelle nude rispetto a quella nella forma libera.

Studi di rilascio dell'mTHPC dalle nanoparticelle

Fluorescence energy transfer

Le cinetiche di rilascio sono state analizzate in diversi mezzi: acqua, etanolo/acqua (50:50, v/v) e terreno di coltura cellulare RPMI contenente 3% di FBS. Gli esperimenti sono stati condotti aggiungendo 200 μL di soluzione di nanoparticelle caricate con mTHPC (3.4 μM) e cianina (6.8 μM) a 600 μL del mezzo desiderato in una cuvetta per fluorescenza da 1.2 mL. Ogni cuvetta è stata termostata a 37°C e gli spettri di eccitazione di fluorescenza (200-750 nm) sono stati acquisiti immediatamente dopo la miscelazione e ad intervalli successivi di 20 minuti, ponendosi alla lunghezza d'onda di emissione alla quale emette solo la cianina, ossia 760 nm. Una correzione lineare basale è stata applicata alla banda di eccitazione della mTHPC a 420 nm, e la sua intensità dipendente dal tempo $I(t)$ è stata utilizzata per calcolare la frazione rilasciata come $[I(0)-I(t)]/I(0)$, dove $I(0)$ e $I(t)$ indicano rispettivamente l'intensità al tempo 0 ed al tempo t . In maniera analoga, le cinetiche di rilascio della mTHPC sono state studiate anche per nanoparticelle ORMOSIL PEGilate in terreno di coltura cellulare contenente concentrazioni crescenti di FBS (3%, 10% e 50%).

Sintesi di IR775-Sil



	PM	mg	mL	mmol	eq
IR775-Cl	519.55	104		0.2	1
APTES (d = 0.946 g/mL)	221.37	177	0.187	0.8	4
DMF			50		

Una soluzione di IR775 (104 mg, 0.2 mmol) e APTES (187 μL , 0.8 mmol) in DMF anidra (50 mL) è stata mantenuta sotto agitazione a 120°C per 30 minuti in atmosfera di azoto. Col progredire della conversione si osserva un cambiamento di colore dal verde al blu. Dopo 30 minuti si rimuove il solvente a pressione ridotta e si purifica il prodotto grezzo tramite cromatografia flash su gel di silice (eluente DCM/MeOH 10:1), ottenendo 30 mg (resa 21%) di IR775-Sil sotto forma di polvere blu.

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

ESI-MS: m/z 669.2 (attesa 669.42)

UV (MeOH): λ_{max} (nm) 624

UV (EtOH): λ_{max} (nm) 628, $\epsilon_{628} = 63106 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

UV (toluene): λ_{max} (nm) 580, $\epsilon_{580} = 45823 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Fluorescenza (MeOH, λ_{exc} 627 nm): λ_{em} (nm) 733.

Ultracentrifugazione

Per confermare il rilascio della mTHPC dalle nanoparticelle ORMOSIL nude in seguito a diluizione nel terreno di coltura cellulare contenente proteine del siero, sono stati effettuati degli esperimenti di ultracentrifugazione.

A tale scopo, la mTHPC incorporata non covalentemente in nanoparticelle, è stata diluita alla concentrazione $1.75 \mu\text{M}$ in RPMI contenente il 3% di FBS. Sono stati registrati gli spettri di assorbimento dei campioni nella regione UV-visibile per misurare le concentrazioni delle proteine sieriche e della mTHPC, utilizzando come bianchi appropriate soluzioni. Subito dopo aver registrato gli spettri di assorbimento oppure dopo incubazione a 37°C (per mimare le condizioni delle colture cellulari) per 5 o 24 ore, i vari campioni sono stati ultracentrifugati per 1 ora a $100000 \times g$ con un'ultracentrifuga Beckman XL-70 munita di un rotore 50-Ti. Tali condizioni di centrifugazione sono state selezionate sulla base di esperimenti preliminari, condotti con nanoparticelle nude caricate con una porfirina legata covalentemente alla matrice silanica, che avevano mostrato che in queste condizioni circa l'85% delle nanoparticelle venivano sedimentate mentre le proteine del siero rimanevano nel surnatante.

Al termine dell'ultracentrifugazione sono stati registrati gli spettri di assorbimento UV-visibili dei surnatanti recuperati e confrontati con i corrispondenti spettri ottenuti prima della centrifugazione per valutare la percentuale di mTHPC rilasciata dalle nanoparticelle.

Cinetiche di disaggregazione dell'mTHPC

Le cinetiche di disaggregazione della mTHPC nel terreno di coltura cellulare contenente il 3% di FBS sono state studiate fluorometricamente monitorando l'aumento dell'intensità dell'emissione di fluorescenza. Gli esperimenti sono stati condotti aggiungendo un'aliquota di mTHPC, sciolta nel solvente standard o incorporata non covalentemente in nanoparticelle ORMOSIL nude, a 1.8 mL di RPMI contenente il 3% di FBS in una cuvetta di quarzo per fluorescenza. In tutti i casi la concentrazione finale della mTHPC era pari a $1 \mu\text{M}$, e la cuvetta veniva termostata a 37°C . La lunghezza d'onda di eccitazione è stata impostata a 420 nm e gli spettri di emissione di fluorescenza della clorina sono stati acquisiti immediatamente dopo aver preparato la miscela e ad intervalli successivi di 10

minuti. Una volta raggiunte le condizioni di equilibrio, come indicato dalla costante di intensità di emissione, sono stati addizionati ad ogni cuvetta 3.6 μL di Triton X-100 (corrispondente ad un 0.2% v/v della concentrazione nella cuvetta) e sono stati acquisiti gli spettri ad intervalli di 10 minuti. È stata quindi costruita una curva relativa all'intensità di fluorescenza emessa dalla mTHPC a 652 nm in funzione del tempo, dopo diluizione nel terreno RPMI in presenza di siero.

Accumulo cellulare dell'mTHPC mediante quantificazione fluorimetrica e dosaggio proteico con saggio BCA

La concentrazione di mTHPC internalizzata dalle cellule KYSE 510, dopo veicolazione nel solvente standard o incorporata non covalentemente in nanoparticelle nude, è stata misurata sfruttando il suo segnale di emissione di fluorescenza e normalizzandolo sulla base della quantità di proteine presenti nel campione di cellule.

Per questo esperimento sono state seminate 5×10^4 cellule KYSE 510 in 2 mL di terreno completo in capsule di plastica del diametro di 35 mm e, dopo 24 ore a 37°C , sono state trattate con 2 mL di terreno contenente il 3% di FBS e 0.5 o 1 μM di mTHPC, libera o incorporata in nanoparticelle (3 capsule per ciascuna concentrazione di trattamento). Contemporaneamente sono stati preparati anche 3 capsule di controllo. L'accumulo del fotosensibilizzatore è stato valutato dopo 24 ore di trattamento, allo scadere delle quali i monostrati cellulari sono stati sciacquati 2 volte con 2 mL di PBS con ioni Ca^{2+} e Mg^{2+} e lisati sotto agitazione magnetica per 1 ora a temperatura ambiente con 0.8 mL di SDS al 2%. Per stimare, invece, il rilascio della mTHPC dalle cellule, al termine delle 24 ore di trattamento il terreno è stato sostituito con terreno completo privo della mTHPC e, dopo ulteriori 24 ore, le cellule sono state lavate due volte con PBS e lisate.

Per ogni campione lisato è stato registrato lo spettro di emissione di fluorescenza della mTHPC tra 600 e 800 nm ($\lambda_{\text{em max}} = 652 \text{ nm}$) con uno spettrofluorimetro (Cary Eclipse, Varian), dopo eccitazione alla lunghezza d'onda di 420 nm. La concentrazione della clorina nei lisati cellulari è stata ricavata per estrapolazione utilizzando una retta di taratura costruita con soluzioni a concentrazione nota di mTHPC, preparate aggiungendo quantità note di quest'ultima sciolta nel solvente

standard ad aliquote di lisato ottenuto da cellule che non sono state esposte a trattamento con la clorina ed aventi lo stesso contenuto di proteine cellulari dei campioni analizzati.

Il contenuto proteico dei lisati cellulari è stato misurato col saggio dell'acido bicinconinico (BCA) ed è stato usato per esprimere l'accumulo intracellulare della mTHPC come picomoli di mTHPC/ μg di proteine cellulari. Il saggio viene condotto in condizioni alcaline in quanto viene sfruttata la riduzione dello ione Cu^{2+} a ione Cu^{+} da parte delle proteine e la sua interazione con l'acido bicinconinico. La reazione porta alla formazione di un complesso colorato tra due molecole di BCA e una molecola di rame; tale prodotto è solubile in acqua ed è in grado di assorbire la luce alla lunghezza d'onda di 562 nm. Per effettuare tale saggio BCA, dai lisati cellulari, diluiti 1:2 in acqua milliQ, sono state prelevate in doppio aliquote da 50 μl a ciascuna delle quali è stato addizionato 1 mL di miscela di reazione. Quest'ultima è costituita da 50 parti di reagente A ed 1 parte di reagente B. Per permettere l'inizio della reazione e pertanto l'interazione dell'acido bicinconinico con lo ione rameoso, i campioni sono stati mantenuti in incubatore a 37°C per 30 minuti, quindi la reazione è stata bloccata raffreddando i campioni immergendoli in acqua fredda per circa 5 minuti. A questo punto è stata effettuata la lettura dell'assorbanza dei vari campioni a 562 nm, azzerando lo spettrofotometro con acqua milliQ.

Per poter risalire alla concentrazione proteica (μg di proteine/ml di lisato cellulare) a partire dal valore di assorbanza letto, è stata costruita una retta di taratura con soluzioni a concentrazione nota di albumina in SDS 1%. Tutti i valori di assorbanza dei campioni e quelli della retta di taratura sono stati sottratti del valore medio delle due letture di assorbanza del bianco, ottenuto incubando 50 μl di SDS 1% con 1 mL di miscela di reazione.

Microscopia di fluorescenza

L'internalizzazione e la localizzazione intracellulare della mTHPC veicolata nel solvente standard o in nanoparticelle è stata analizzata mediante microscopia di fluorescenza, sfruttando la naturale fluorescenza rossa di questo fotosensibilizzatore.

Per questo esperimento sono state seminate 5×10^4 cellule KYSE 510 in 2 mL di terreno completo in capsule di plastica del diametro di 35 mm contenenti un vetrino coprioggetti. Dopo 24 ore a 37°C , il terreno è stato sostituito con terreno fresco contenente il 3% di FBS e 0.75 o 1.5 μM di mTHPC sciolta nel solvente standard o incorporata in nanoparticelle. I vetrini sono stati incubati a 37°C per tempi diversi (KYSE: 0.5, 2 o 24 ore; A549 e CCD-34Lu: 5 o 24 ore) e, dopo due lavaggi con 2 mL di PBS, sono stati posti su vetrini portaoggetti ed osservati al microscopio a fluorescenza Olympus IMT-2 equipaggiato con CCD camera (Micromax, Princeton Instruments) e lampada allo Xenon da 75 W. Le immagini sono state acquisite utilizzando obiettivi a immersione in olio 40X o 60X 1.4 NA (Olympus) ed analizzate col software per immagini Metamorph (Universal Imaging). Per studiare la ridistribuzione della mTHPC intracellulare dopo la sua rimozione dal terreno di trattamento, le osservazioni sono state fatte anche 24 ore dopo la rimozione della soluzione di trattamento ed il ripristino del terreno completo. Per evidenziare la distribuzione subcellulare della mTHPC sono state utilizzate delle sonde fluorescenti specifiche per organelli e/o compartimenti cellulari, in modo da verificare l'eventuale co-localizzazione per sovrapposizione della fluorescenza della clorina con quella delle sonde. R123 (0.2 μM), LysoTrackerGreen DND-26 (75 nM), NBD C_6 -ceramide (15 μM) e ER-Tracker Green (1 μM), utilizzati rispettivamente per marcare i mitocondri, i lisosomi, l'apparato del Golgi ed il reticolo endoplasmatico, sono stati aggiunti ai monostrati cellulari quindici minuti prima del termine del trattamento con la clorina. La R123 è una sonda cationica che viene sequestrata selettivamente all'interno dei mitocondri metabolicamente attivi. La sonda NBD- C_6 ceramide è in grado di legarsi agli sfingolipidi cellulari, particolarmente abbondanti nell'apparato del Golgi. La glibenclamide coniugata all'ER-Tracker™ Green è in grado di legarsi a recettori della sulfonilurea presenti su canali del potassio ATP-dipendenti, che sono molto diffusi proprio nel reticolo endoplasmatico. Il LysoTracker Green è un fluoroforo legato ad una base debole solo parzialmente protonata a pH neutro, è di tipo acidotropico altamente permeabile nelle membrane biologiche in grado di colorare selettivamente solo gli organelli caratterizzati da un interno acido, tra cui i lisosomi.

È stato usato un set di filtri con eccitazione a 400 nm ed emissione a 620 nm per visualizzare la fluorescenza della mTHPC, e con eccitazione a 475 nm ed emissione a 520 nm per visualizzare la fluorescenza verde delle sonde.

Studio del meccanismo di accumulo cellulare dell'mTHPC

Per determinare se il meccanismo di internalizzazione nelle cellule KYSE 510 della mTHPC, libera o incorporata non covalentemente in nanoparticelle nude, fosse endocitotico, è stato studiato l'effetto della temperatura di incubazione. Alla temperatura di 4°C si ha infatti una diminuzione della fluidità delle membrane cellulari ed un blocco della produzione energetica intracellulare, che determinano un'inibizione dell'endocitosi cellulare. Le cellule sono state seminate secondo il protocollo seguito negli studi di microscopia di fluorescenza ed accumulo, sono state incubate per 2 ore a 4°C e a 37°C con le soluzioni di trattamento contenenti la mTHPC, veicolata nel solvente standard o incorporata non covalentemente in nanoparticelle nude, ed HEPES 5 mM, che serve a mantenere un pH fisiologico anche in seguito a cambiamenti di temperatura. Allo scadere di tale tempo, le cellule sono state osservate al microscopio a fluorescenza per verificare se sia avvenuta o meno l'internalizzazione cellulare della mTHPC in seguito ad incubazione a 4°C, oppure sono state lisate per determinare la quantità di clorina accumulata nelle cellule incubate a 4°C come percentuale rispetto a cellule incubate a 37°C.

Vettore multifunzionale

Le immagini di microscopia elettronica in trasmissione (TEM) sono state acquisite usando uno strumento Philips/FEI CM300 operante a 300 kV (CIME, EPFL) e uno strumento Philips EM208 operante a 100 keV (CSPA, University of Trieste). I campioni sono stati sonicati e alcune gocce depositate su reticelle rame ricoperte di carbonio forato o su reticelle di rame standard ricoperte di carbonio (200 mesh). Le misure di Dynamic Light Scattering (DLS) sono state effettuate con uno strumento Malvern Zetasizer Nano S. Gli spettri infrarossi sono stati ottenuti in riflettanza totale attenuata (ATR) su uno strumento FT-IR Nicolet 5700. Gli spettri ^{11}B -NMR sono stati ottenuti su uno spettrometro Bruker Avance DRX 300. Le analisi ICP-OES sono state condotte con uno strumento Varian Liberty Series II. I campioni per le misure ICP-OES sono stati mineralizzati in NaOH 6 M a 70 °C per un'ora prima dell'analisi.

Sintesi tipica di nanoparticelle di borosilicati

Ad un reattore termostato caricato con una soluzione di acido boricco (13 mg, 0.21 mmol) in etanolo (20 mL), sono stati aggiunti 100 μL (0.45 mmol) di TEOS sotto agitazione a 25 °C. 0.6 mL di acqua milliQ e 0.4 mL di una soluzione acquosa 14.8 M di ammoniaca sono stati quindi aggiunti per innescare la polimerizzazione. Dopo 16 ore, la soluzione è stata filtrata attraverso un filtro in PVDF con pori di 0.22 μm . La soluzione è stata quindi diluita a 80 mL con etanolo e concentrata al volume originale per ultrafiltrazione attraverso una membrana di cellulosa rigenerata (cut-off 10 kDa) sotto pressione di azoto (4 bar). La procedura è stata ripetuta cinque volte. La soluzione risultante è stata filtrata attraverso un filtro in PVDF con pori di 0.22 μm .

Sintesi di nanoparticelle di silice mesoporose

La soluzione di nanoparticelle di borosilicati è stata diluita a 80 mL con acqua e concentrata al volume originale per ultrafiltrazione attraverso una membrana di cellulosa rigenerata (cut-off 10 kDa) sotto pressione di azoto (4 bar). La

procedura è stata ripetuta cinque volte. La soluzione acquosa risultante è stata filtrata attraverso un filtro in PVDF con pori di 0.22 μm .

Appendice

The cellular uptake of meta-tetra (hydroxyphenyl)chlorin entrapped in organically modified silica nanoparticles is mediated by serum proteins

Chiara Compagnin¹, Luca Baù², Maddalena Mognato¹,
Lucia Celotti¹, Giovanni Miotto³, Maria Arduini²,
Francesca Moret¹, Caterina Fedè¹, Francesco Selvestrel^{1,2},
Iria M Rio Echevarria^{1,2}, Fabrizio Mancin² and Elena Reddi^{1,4}

¹ Department of Biology, University of Padova, via Ugo Bassi 58/B, I-35131 Padova, Italy

² Department of Chemical Sciences, University of Padova, via Marzolo 1, I-35131 Padova, Italy

³ Department of Biological Chemistry, University of Padova, via Ugo Bassi 58/B, I-35131 Padova, Italy

E-mail: elena.reddi@unipd.it


Received 25 May 2009, in final form 26 May 2009

Published 4 August 2009

Online at stacks.iop.org/Nano/20/345101

Abstract

Nanosized objects made of various materials are gaining increasing attention as promising vehicles for the delivery of therapeutic and diagnostic agents for cancer. Photodynamic therapy (PDT) appears to offer a very attractive opportunity to implement drug delivery systems since no release of the sensitizer is needed to obtain the therapeutic effect and the design of the nanovehicle should be much easier. The aim of our study was to investigate the use of organic-modified silica nanoparticles (NPs) for the delivery of the second-generation photosensitizer meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (mTHPC) to cancer cells *in vitro*. mTHPC was entrapped in NPs (~33 nm diameter) in a monomeric form which produced singlet oxygen with a high efficiency. In aqueous media with high salt concentrations, the NPs underwent aggregation and precipitation but their stability could be preserved in the presence of foetal bovine serum. The cellular uptake, localization and phototoxic activity of mTHPC was determined comparatively in human oesophageal cancer cells after its delivery by the NPs and the standard solvent ethanol/poly(ethylene glycol) 400/water (20:30:50, by vol). The NP formulation reduced the cellular uptake of mTHPC by about 50% in comparison to standard solvent while it did not affect the concentration-dependent photokilling activity of mTHPC and its intracellular localization. Fluorescence resonance energy transfer measurements, using NPs with mTHPC physically entrapped and a cyanine covalently linked, and ultracentrifugation experiments indicated that mTHPC is transferred from NPs to serum proteins when present in the medium. However, the coating of the NP surface with poly(ethylene glycol) largely prevented the transfer to proteins. In conclusion, mTHPC is rapidly transferred from the uncoated nanoparticles to the serum proteins and then internalized by the cells as a protein complex, irrespective of its modality of delivery.

 Supplementary data are available from stacks.iop.org/Nano/20/345101

⁴ Author to whom any correspondence should be addressed.

1. Introduction

In the last few years, nanoparticles and other nanosystems have gained much attention in the field of biology and medicine [1–3]. In fact, they appear to be very promising vehicles for the delivery of drugs since they offer, at least in theory, the possibility to engineer and realize multifunctional agents capable of performing sophisticated functions including, beside delivery itself, targeting, imaging and diagnosis [3, 4]. From this point of view, a nanoparticle for biomedical applications can be regarded as a scaffold that allows the realization of an organized assembly of different molecules, such as drugs, dyes, passivating species and ligands, whose cooperative action leads to the execution of the desired tasks. However, the mechanisms of interaction of the nanosystems with living cells and organisms and the consequent biological effects are largely unknown, therefore unpredicted outcomes can often be observed [5, 6]. This should not be surprising since both nanocarrier assemblies and biological systems are very complex entities and a number of different processes can occur as consequence of their interaction. Furthermore, the conventional techniques and methodologies usually employed to study the fate of molecular entities in biological systems may not be appropriate for nanoparticles, due to their different nature, and the development of new strategies may be required for tracing them and/or the entrapped molecules.

Photodynamic therapy (PDT) [7] and other binary therapeutic modalities, such as photothermal therapy (PTT) [8] or boron neutron capture therapy (BNCT) [9], stimulate the realization of nanomedicine agents for cancer, because in these therapies the killing of cancer cells is not due to the drug administered to the patient but to the cytotoxic species generated after its activation by an external stimulus (light, heat or neutron beam). In the case of PDT, the external stimulus is irradiation with visible light, which activates light absorbing molecules, called photosensitizers, to generate cytotoxic-reactive oxygen species (ROS), particularly singlet molecular oxygen ($^1\text{O}_2$) [10]. As a consequence, there is no need to release the sensitizer from the nanoparticles to obtain the therapeutic effect, provided that the nanoparticle is porous and transparent enough to allow light and molecular oxygen to reach the photosensitizer entrapped in its matrix and ROS to diffuse out. This point may render the design of the nanocarrier much easier, since no controlled release mechanism needs to be engineered [11]. Moreover, the photosensitizer biodistribution may be modified and the phototoxic effects in the skin and eye caused by the accumulation of the free photosensitizer may be reduced significantly. Several examples of nanosystems loaded with photosensitizers for PDT, including liposomes [12, 13], biodegradable nanocapsules [14, 15], polymer [16], gold [17] and silica nanoparticles [18–21], have been described in the last few years. In particular, silica-based nanoparticles represent a promising system for carrying the photosensitizers into tumour cells [11, 22, 23], because they are transparent to light and photochemically inert. In addition the porosity of their matrix allows the diffusion of small molecules in their interior: they are compatible with biological systems, easy

and inexpensive to prepare with a desired and homogeneous size. They can be loaded with organic molecules, which can be covalently linked to the silica matrix or simply entrapped.

In this paper we describe the preparation of organically modified silica (ORMOSIL) nanoparticles (NPs) loaded with the photosensitizer meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (mTHPC) [24–26]. The fate of such nanocarriers and the entrapped molecule, when exposed to biological fluids and living cells, has been studied and unexpected results have been obtained which suggest that the delivery of nanosystem-entrapped drugs to tumour cells may not be straightforward. A fluorescence energy transfer approach is presented which can be useful for determining unambiguously whether a physically entrapped drug is delivered to cells still associated with the nanosystem or through a separate route.

2. Materials and methods

2.1. Materials

mTHPC was kindly provided by Biolitec AG (Jena, Germany). Rhodamine 123 (R123), 6-[*N*-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino hexanoyl] sphingosine (NBD C₆-ceramide), LysoTracker Green DND-26 and ER-Tracker™ Green (glibenclamide BODIPY® FL) were purchased from Invitrogen Molecular Probes (Milan, Italy). Dioctyl sodium sulfosuccinate (AOT), *n*-butanol, vinyltriethoxysilane (VTES), 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) and 2-[2-[2-chloro-3-[2-(1,3-dihydro-1,3,3-trimethyl-2H-indol-2-ylidene)-ethylidene]-1-cyclohexen-1-yl]-ethenyl]-1,3,3-trimethyl-3H-indolium chloride (IR775 chloride) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). The CellTiter 96® aqueous one-solution cell proliferation assay (MTS) was from Promega Co. Solvents and commercially available reagents were used as received. The solutions used for the synthesis and purification procedures were prepared using deionized water ($R > 18 \text{ M}\Omega$), obtained with a Milli-Q (Millipore) purification system.

The ultrafiltration procedures were performed using a 75 ml Amicon Ultrafiltration Cell (Millipore), equipped with a 10 kDa regenerated cellulose membrane, under a pressure of 4 bar. The cell was provided with a 1 l reservoir tank.

2.2. Synthesis of the fluorescence energy transfer acceptor IR775-Sil

A solution of IR-775 (104 mg, 0.2 mmol) and APTES (187 μl , 0.8 mmol) in anhydrous DMF (50 ml) was stirred at 120 °C for 30 min under a dry nitrogen atmosphere (figure 6(A)). The solvent was evaporated and the crude product was purified by flash chromatography on silica gel (DCM/MeOH 10:1), affording 30 mg (21%) of IR775-Sil as a blue powder.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 0.64 (t, 2H, SiCH_2 , $J = 8.25 \text{ Hz}$), 1.20 (t, 9H, OCH_2CH_3 , $J = 7 \text{ Hz}$), 1.39 (m, 2H, SiCH_2CH_2), 1.71 (br.s, 12H, indole-(CH_3)₂), 1.79 (qn, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ cyclohexene), 2.08 (m, 2H, $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.48 (t, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ cyclohexene, $J = 6 \text{ Hz}$), 3.29 (s, 6H, NCH_3), 3.80 (q, 6H, OCH_2CH_3 , $J = 7 \text{ Hz}$), 5.46 (d, 2H, indole-CHCH, $J = 12.75 \text{ Hz}$), 6.80 (d, 2H, indole-CHCH, $J = 8 \text{ Hz}$), 7.09 (t, 2H, ArH, $J = 6.75 \text{ Hz}$), 7.23 (m, 6H,

ArH), 10.44 (br.s, 1H, NH). ESI-MS m/z : 669 [M]⁺. UV-vis (EtOH): λ_{\max} (nm) 627, $\epsilon = 4.58 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Fluorescence (EtOH): λ_{exc} (nm) 627, λ_{em} (nm) 738.

2.3. Synthesis of the nanoparticles

A thermostated vessel (20 °C) was charged with a solution of AOT (0.44 g, 1.0 mmol) and *n*-butanol (0.8 ml, 7.6 mmol) in water (20 ml) and a small aliquot of the desired dopant solution in DMSO was added under stirring. VTES (200 μl , 0.96 mmol) was subsequently added and the reaction mixture was vigorously stirred (for about 30 min) until it turned clear. Polymerization was started by the addition of APTES (40 μl , 0.17 mmol) or aqueous ammonia solution (28%, 10 μl , 0.12 mmol). The reaction mixture was vigorously stirred for 16 h at 20 °C. The solution was then filtered through a PVDF membrane (pore size 0.45 μm), transferred into a 75 ml Amicon ultrafiltration cell and ultrafiltered under a pressure of 4 bar until the residual AOT concentration was lower than 30 μM , as determined by surface tension measurements. The resulting NPs were then filtered through a PVDF membrane (pore size 0.22 μm). A 5 ml aliquot of the resulting solution was evaporated and dried under heating to determine the weight concentration of the NP samples, while the amount of dopant present was determined by measuring its absorbance and using molar extinction coefficients of 1.65×10^5 at 420 nm and $4.58 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 627 nm for, respectively, mTHPC and IR775-Sil. The undoped nanoparticles were synthesized according to the general procedure outlined above, using 200 μl of pure DMSO instead of the dopant solution. The mTHPC-doped nanoparticles were synthesized using 100 μl of an 8.8 mM solution of mTHPC in DMSO as the dopant solution. The cyanine-doped nanoparticles were synthesized using 200 μl of an 8.8 mM solution of IR775-Sil in DMSO as the dopant solution. The mTHPC–cyanine nanoparticles were synthesized according to the general procedure and using 100 μl of an 8.8 mM solution of mTHPC in DMSO plus 200 μl of an 8.8 mM solution of IR775-Sil in DMSO as the dopant solutions.

Different volumes of the dopant solutions were used for optimizing the concentrations of the entrapped dyes, which depended on the type of experiment. In any case, the amount of DMSO added to the reaction mixtures had no influence on the final size of the nanoparticles. Nanoparticles coated with a layer of poly(ethylene glycol) (PEG-2000) were prepared in a similar way by the addition of a trimethoxysilane-PEG derivative to the reaction mixture (details will be described elsewhere) [27].

2.4. Characterization of the nanoparticles

Dynamic light scattering (DLS) measurements were performed with a particle sizing system Nicomp Model 370 correlator equipped with a thermostated cell holder and a Spectra Physics Series 2016 Ar laser operating at 488 nm. Hydrodynamic particle diameters were obtained from cumulated fits of the autocorrelation functions at 90° scattering angle.

Transmission electron microscopy (TEM) images of the particles were obtained with an Fei Tecnai 12 transmission

electron microscope operating at 100 keV. Samples for TEM were prepared by spreading a droplet of the nanoparticle solution in water ($\sim 1 \text{ mg ml}^{-1}$) onto standard carbon-coated copper grids (200 mesh). Dimensional analysis of nanoparticles from TEM images was performed by using the *Image J* software.

UV-vis absorption measurements were performed on a Perkin Elmer Lambda 45 spectrophotometer equipped with a thermostated cell holder (1 cm quartz cell). Fluorescence spectra were recorded on a Perkin Elmer LS-55 spectrometer equipped with a thermostated cell holder (1 cm quartz cell).

Surface tension measurements were performed by a Kruss K6 tensiometer equipped with a thermostated sample vessel. The AOT concentration in the ultrafiltered NP samples was determined with a calibration curve. Reliability of surface tension measurement was confirmed by NMR measurements, using CH₃CN (25 μM) as internal standard.

2.5. Cell line

The cell line KYSE 510, derived from human oesophageal squamous carcinoma, was obtained from Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH/Braunschweig (DSMZ, Germany). KYSE 510 cells were cultured in monolayer in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated foetal bovine serum (FBS) (Gibco, Invitrogen, Milan, Italy), 1 mM L-glutamine, 38 units ml⁻¹ streptomycin and 100 units ml⁻¹ penicillin G (Sigma). The cell culture was kept at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Every 3 days, before reaching the confluence, the cells were detached with 0.25% trypsin-1 mM EDTA (Gibco) and reseeded into fresh medium. The KYSE 510 cells have a doubling time of 23–24 h.

2.6. Dark and phototoxicity of mTHPC delivered by standard solvent or NPs

The cytotoxicity of mTHPC delivered by the standard solvent or entrapped in the NPs was evaluated in the dark (see supporting information available at stacks.iop.org/Nano/20/345101) and after exposure to red light. For these experiments, the cells were seeded in 35 mm diameter plastic tissue culture dishes (5×10^4 cells/dish) with 2 ml of RPMI 1640 containing 10% FBS and allowed to attach for 24 h. After this time the medium was replaced with fresh RPMI containing 3% FBS and various concentrations of mTHPC (0.1–1.75 μM). mTHPC was diluted in the culture medium from a stock in the standard solvent or NP suspensions. The mTHPC concentrations in the stock solutions were determined by absorption spectroscopy using molar extinction coefficients of 2.00×10^5 at 416 nm and $1.65 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 420 nm, respectively, for the standard solvent diluted in an excess of ethanol and the NP suspension in water. After 24 h of incubation with mTHPC at 37 °C the cell monolayers were washed twice with 2 ml of PBS with Ca²⁺ and Mg²⁺, and irradiated in PBS with 0.12 J cm⁻² of red light (600–700 nm) emitted from a PTL Penta quartz halogen lamp (model STL-B-049, Desys SA, S. Antonino, Switzerland). The fluence rate at the level of the cell monolayer was

2 mW cm⁻² as measured with a radiometer IL 1700 (International Light, Newburyport, MA). Immediately after irradiation the cells were brought back to the incubator after replacement of the PBS with complete medium containing 10% FBS. Cell viability was determined 24 h later with the trypan blue exclusion test and expressed as a percentage of trypan blue negative cells with respect to cell samples that were neither incubated with mTHPC or NPs nor irradiated. In additional experiments, the cells were seeded in 96-well plates (1000 cells/well) in 0.2 ml of culture medium, treated as above but the cell viability was determined with the MTS assay. 24 h after irradiation the cell medium was replaced with 100 μ l of serum-free medium plus 20 μ l of CellTiter 96[®] Reagent, the samples were incubated for 1.5 h at 37 °C and after this time the absorbance at 490 nm was measured with a Spectramax 190 (Molecular Devices) plate reader. The cell viability was expressed as a percentage of the absorbance of the control cells.

2.7. Cellular uptake of mTHPC delivered by standard solvent or NPs

KYSE 510 cells (5×10^4) were seeded in 35 mm diameter tissue culture dishes with 2 ml of RPMI containing 10% FBS and after 24 h were incubated with RPMI containing 3% FBS and 0.5 or 1 μ M mTHPC delivered by standard solvent or NPs. The mTHPC uptake was measured after 24 h of incubation. For this experiment, the cell monolayers were washed twice with 2 ml of PBS with Ca²⁺ and Mg²⁺ and lysed with 0.8 ml of 2% sodium-dodecyl sulfate (SDS). For measuring the release of mTHPC, after 24 h incubation the medium was replaced with mTHPC-free complete medium (10% FBS) and 24 h later the cells were washed twice with PBS and lysed. The cell lysates were kept under magnetic stirring for 1 h before measuring the mTHPC fluorescence with a Cary Eclipse fluorescence spectrophotometer. To determine the mTHPC concentration in the samples, the intensity of the fluorescence emission spectrum in the 600–800 nm range ($\lambda_{em\ max} = 652$ nm) was measured after excitation with a light wavelength of 420 nm. The mTHPC concentration in the cell lysates was calculated from calibration plots built up with known mTHPC concentrations. The solutions for the calibration plots were prepared by adding known amounts of mTHPC from stocks in standard solvent to aliquots of lysate obtained from cells not exposed to the chlorin and containing the same amount of cellular proteins as the samples.

The protein content of the cell lysates was measured by the bicinchoninic acid (BCA) assay (Pierce, Rockford, IL) and was used to express the mTHPC uptake in the cells as pmoles of mTHPC μ g⁻¹ of proteins.

2.8. Fluorescence microscopy

The intracellular localization of mTHPC delivered to KYSE 510 cells with standard solvent or NPs was assessed by fluorescence microscopy taking advantage of the mTHPC red fluorescence. For these experiments, 5×10^4 cells were seeded in 35 mm diameter tissue culture dishes containing a glass coverslip. After 24 h, the medium was replaced with fresh

RPMI containing 3% FBS and 0.75 μ M mTHPC from standard solvent or NPs. The cells were incubated at 37 °C for 0.5, 2 or 24 h, washed twice with 2 ml of PBS and viewed using an Olympus IMT-2 microscope equipped with a refrigerated CCD camera (Micromax, Princeton Instruments) and a 75 W xenon lamp. Fluorescence images obtained with a 40 \times or 60 \times 1.4 NA oil immersion objective (Olympus) were acquired and analysed with the imaging software Metamorph (Universal Imaging). For assessing redistribution of intracellular mTHPC after its removal from the incubation medium, the analyses were also performed 24 h after replacement of mTHPC-free culture medium supplemented with 10% FBS. For determining the mechanism of mTHPC internalization, cells incubated for 2 h at 4 °C were also analysed (see supporting information available at stacks.iop.org/Nano/20/345101).

The cellular distribution of the mTHPC fluorescence was compared with that of R123, LysoTracker Green DND-26, NBD-C₆ ceramide and ER-Tracker[™] Green, used as markers for mitochondria, lysosomes, Golgi apparatus and endoplasmic reticulum, respectively. R123 (0.2 μ M), LysoTracker Green (75 nM), NBD-C₆ ceramide (15 μ M) and ER-Tracker[™] Green (1 μ M) were added to the cell monolayers 15 min before completing the incubation with mTHPC. For the mTHPC fluorescence detection a set of filters with 400 nm excitation and 620 nm emission was used, whereas 475 nm excitation and 520 nm emission were used for R123, LysoTracker Green, NBD-C₆ ceramide and ER-Tracker[™] Green.

2.9. Fluorescence energy transfer studies on the release of mTHPC from the nanoparticles

The kinetics of mTHPC release from NPs was studied fluorometrically by measuring the FRET efficiency of the mTHPC–cyanine couple. Toward this aim, we used NPs doped with simply entrapped mTHPC and cyanine, in the form of IR775-Sil, covalently linked to the NP matrix. Different media were investigated: water, ethanol/water 50:50 v/v and cell culture medium (RPMI with 3% FBS). The experiments were started by adding 200 μ l solution of mTHPC/cyanine-doped NPs (3.4 μ M in THPC and 6.8 μ M in IR775-Sil) to 600 μ l of the desired medium in a 1.2 ml fluorescence cuvette. Each cuvette was thermostated at 37 °C and fluorescence excitation spectra were acquired immediately after mixing and at 20 min intervals. The emission wavelength was set at 760 nm, where only the cyanine emits and the spectrum was recorded in the 200–750 nm range. A linear baseline correction was applied to the mTHPC excitation band at 420 nm, and its time-dependent intensity $I(t)$ was used to calculate the released fraction as $[I(0) - I(t)]/I(0)$, where $I(0)$ and $I(t)$ indicated respectively the intensity at time 0 and time t .

3. Results

3.1. Preparation and characterization of mTHPC-loaded nanoparticles

Organically modified silica NPs containing mTHPC were prepared following the method proposed by Roy *et al* [20],

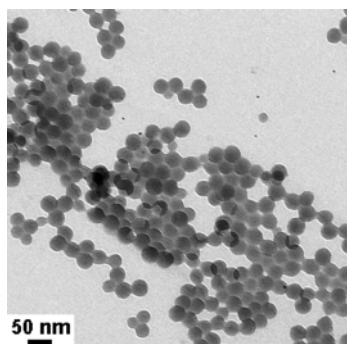


Figure 1. Transmission electron microscopy image of mTHPC-loaded ORMOSIL nanoparticles.

which allows the incorporation of lipophilic dyes in the particles without the need for their chemical modification.

Accordingly, VTES was polymerized by basic catalysis in the hydrophobic core of AOT/n-butanol micelles loaded with mTHPC (or with the cyanine–silane derivative IR775-Sil). The resulting particle solutions underwent extensive ultrafiltration over a 10 000 Da (~ 3 nm) cutoff membrane, until unreacted and unincorporated species were removed and the AOT concentration in the purified batches was reduced to non-toxic values. The cytotoxicity limit was determined with experiments performed on KYSE 510 cells, which showed a reduced viability when the AOT concentration in the cell medium was greater than $30 \mu\text{M}$ (data not shown). TEM analyses revealed particles with a spherical shape (figure 1) and average diameter of 33 ± 9 nm. Dynamic light scattering (DLS) analyses were in good agreement, indicating a hydrodynamic diameter of 41 ± 6 nm.

Entrapment of mTHPC in the NPs was demonstrated by UV–vis absorption and fluorescence emission spectra of the so-obtained nanoparticles in water (figure 2). The absorption spectrum of mTHPC in NPs exhibited a strong band around 420 nm and four Q bands at higher wavelengths, the last one centred around 650 nm, while the fluorescence emission was centred at 652 nm. It is well known that in water mTHPC forms aggregates that exhibit broad absorption bands and quenched fluorescence emission [28]. In contrast, the spectral features of NP solutions were similar to those of the free mTHPC in organic solvents. This is in agreement with previous observations from our lab, indicating that dyes entrapped in ORMOSIL NPs experience an environment of polarity similar to toluene [29]. Moreover, absorption and fluorescence excitation spectra of mTHPC-loaded NPs in water (figure 2) were very similar, indicating furthermore that the photosensitizer molecules were included inside the nanoparticles in a monomeric form. A typical NP sample contained about 0.5 mg ml^{-1} of NPs and $7 \mu\text{M}$ mTHPC. These values correspond to a drug loading of 1% of the nanoparticles.

The nanoparticles were stable in water, but underwent aggregation and precipitation in PBS or RPMI cell culture medium, because of the high salt concentration. However, the presence of 3% FBS prevented nanoparticle aggregation and precipitation.

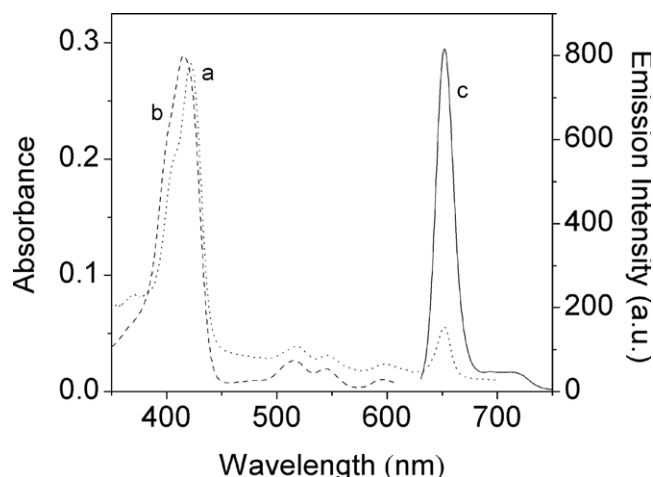


Figure 2. Absorption ((a), dotted line), fluorescence excitation ((b), dashed line, $\lambda_{\text{em}} = 652$ nm) and fluorescence emission ((c), solid line, $\lambda_{\text{exc}} = 420$ nm) spectra of $1 \mu\text{M}$ mTHPC entrapped in ORMOSIL NPs suspended in water.

3.2. Photocytotoxicity of mTHPC delivered by standard solvent or NPs

The phototoxicity of increasing concentrations of mTHPC delivered by NPs was determined in KYSE 510 cells after 24 h of dark incubation followed by irradiation with a light dose of 0.12 J cm^{-2} . As shown in figure 3, a significant reduction of the cell viability was found with $0.2 \mu\text{M}$ mTHPC and complete loss of viability was achieved in cells irradiated after incubation with $1.25 \mu\text{M}$. Surprisingly, the dose–response curve obtained by incubating the cells with increasing concentrations of mTHPC delivered by the standard solvent was perfectly superimposed on that of mTHPC delivered by NPs. This result was obtained by measuring the cell viability with the trypan blue exclusion test and the MTS assay (figure 3).

In the absence of light, the incubation with the two formulations of mTHPC affected the viability of the cells starting with an mTHPC concentration of $1.75 \mu\text{M}$ (figure 1(S) in the supporting information available at stacks.iop.org/Nano/20/345101). The incubation with increasing concentrations of empty NPs (corresponding to the range used for the delivery of mTHPC) in the dark or after exposure to light caused no significant decrease of cell viability (supporting information available at stacks.iop.org/Nano/20/345101).

3.3. Uptake and intracellular localization of mTHPC delivered by standard solvent or NPs

KYSE 510 cells incubated at 37°C with mTHPC ($0.75 \mu\text{M}$) delivered by the two formulations exhibited a red fluorescence distributed throughout the cytoplasm but particularly intense in a region close to the cell nucleus (figure 4). The fluorescence distribution of the intracellular mTHPC did not show any appreciable difference whether the photosensitizer was delivered to the cells by the standard solvent or NPs. In mTHPC-loaded cells stained with NBD- C_6 ceramide or ER-TrackerTM Green, co-localization of the red and green

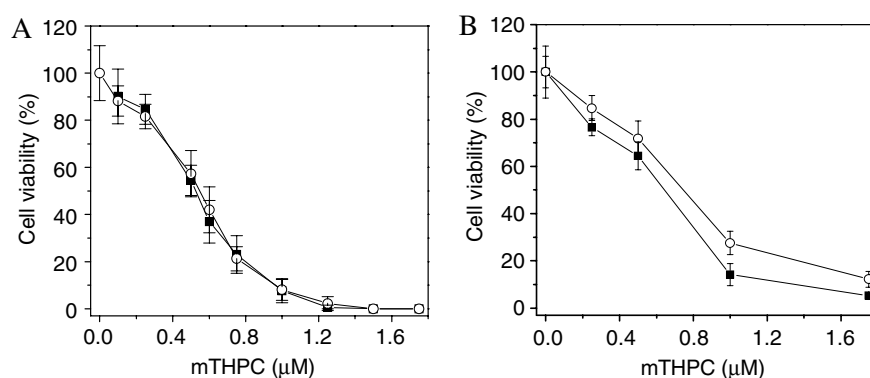


Figure 3. Viability of KYSE 510 cells irradiated with 0.12 J cm^{-2} of 600–700 nm light after 24 h incubation with increasing concentration of mTHPC delivered by the standard solvent (■) or entrapped in NPs (○). Cell viability was determined 24 h post-irradiation by the trypan blue exclusion test (A) and the MTS assay (B). The data represent means \pm s.d. ($n = 6$).

Table 1. Uptake in and retention by KYSE 510 cells of 0.5 and $1 \mu\text{M}$ mTHPC delivered in the free form (standard solvent) or entrapped in NPs. (Note: The uptake was determined after 24 h of incubation at 37°C in medium with 3% FBS (24 h) and expressed as total pmoles of mTHPC recovered from the samples as well as pmoles of mTHPC μg^{-1} of cell proteins. mTHPC retention was determined after a further 24 h (24 + 24 h) by keeping the cells in mTHPC-free medium supplemented with 10% FBS. The data represent means \pm s.d. ($n = 6$.)

		24 h			24 + 24 h		
mTHPC		pmol mTHPC	μg cell proteins	$\text{pmol } \mu\text{g}^{-1}$ proteins	pmol mTHPC	μg cell proteins	$\text{pmol } \mu\text{g}^{-1}$ proteins
Free	$0.5 \mu\text{M}$	37 ± 1	130 ± 13	0.29 ± 0.03	38 ± 3	354 ± 22	0.11 ± 0.01
	$1 \mu\text{M}$	110 ± 12	138 ± 11	0.80 ± 0.09	105 ± 4	364 ± 24	0.29 ± 0.01
NPs	$0.5 \mu\text{M}$	21 ± 1^a	137 ± 19	0.15 ± 0.01^a	21 ± 3^a	385 ± 12	0.05 ± 0.01^a
	$1 \mu\text{M}$	49 ± 3^a	134 ± 17	0.37 ± 0.03^a	49 ± 3^a	380 ± 28	0.13 ± 0.01^a

^a $p < 0.001$ when compared to the free form at the same concentration.

fluorescence was observed, suggesting that mTHPC was largely localized in the Golgi apparatus and the endoplasmic reticulum (figure 4, images (D)–(I)). In contrast, the mTHPC fluorescence did not co-localize appreciably with the dotted fluorescence of R123 or LysoTracker Green (figure 4, images (A)–(C) and (J)–(L)) used as probes, respectively, for mitochondria and lysosomes. The localization of mTHPC in the Golgi apparatus and in the endoplasmic reticulum was very rapid since a very similar fluorescence distribution was observed already after 0.5 and 2 h of incubation at 37°C (figure 5). The incubation for 2 h at 4°C reduced the internalization of mTHPC delivered by the two formulations by about 80% and intracellular dye was no longer detectable by fluorescence microscopy (figure 4(S) in the supporting information available at stacks.iop.org/Nano/20/345101). In cells incubated with mTHPC for 24 h and cultured for additional 24 h in mTHPC-free medium supplemented with 10% FBS, the localization did not change substantially (figure 5, image (D)).

The amount of mTHPC taken up by KYSE 510 cells was determined following 24 h of incubation at concentrations of 0.5 and $1 \mu\text{M}$ mTHPC and using the two modes of delivery. mTHPC from standard solvent was taken up by the cells more efficiently than mTHPC in NPs (table 1) as shown by the two times higher amount of photosensitizer recovered at the end of the incubation. In both cases, the mTHPC taken up during the 24 h incubation was not released by the cells kept for an additional 24 h in fresh complete medium with 10% FBS but

without mTHPC. At 24 plus 24 h the pmoles of mTHPC μg^{-1} cell proteins were reduced by more than 50% when compared to that found at 24 h. However, this difference was not indicative of mTHPC efflux but of an increased number of cells, as expected based on the cell doubling time (~ 24 h) and confirmed by the increased protein content/sample (table 1). In fact, the amounts of mTHPC recovered from the cell samples at 24 h and 24 plus 24 h were very similar.

3.4. Release of mTHPC from the nanoparticles

The same intracellular localization and concentration-dependent cell photokilling activity of mTHPC, irrespective of the formulation used, raised the question whether mTHPC was internalized by the cells still entrapped in NPs or after its transfer to other biological entities, e.g. serum proteins, present in the cell medium. In fact, mTHPC is only physically entrapped inside the NPs, therefore its release could be possible if the particle pores are large enough to allow the photosensitizer to escape. To investigate this point, ORMOSIL nanoparticles loaded with both mTHPC and the derivative IR775-Sil were prepared. IR775-Sil contained a triethoxysilane moiety, which ensured covalent grafting to the nanoparticle silica network (figure 6(A)) and prevented its release. The absorption spectrum of IR775-Sil exhibited a broad band centred at 627 nm (figure 6(B)) which largely overlapped with the emission of mTHPC. As a consequence, when the two dyes are confined in the small nanoparticle volume, fluorescence resonance energy

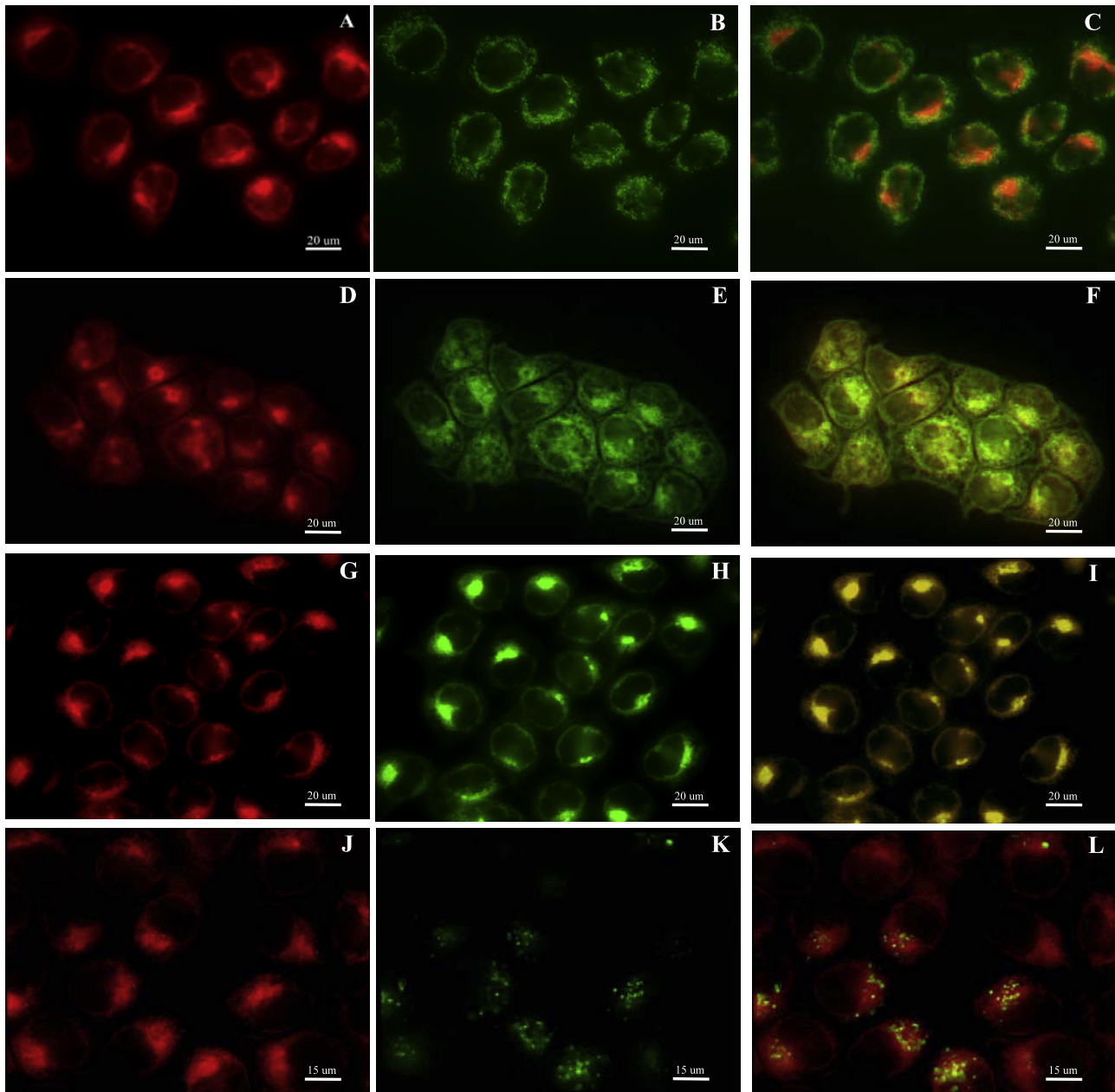


Figure 4. Localization of NP-delivered mTHPC ($0.75 \mu\text{M}$) in KYSE 510 cells after 24 h incubation at 37°C . The red fluorescence of mTHPC ((A), (D), (G) and (J)) largely co-localized with the green fluorescence of ER-Tracker™ Green (E) and NBD C_6 -ceramide (H), used respectively as probes of the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus while co-localization with LysoTracker Green (K) or rhodamine 123 (B) was not very evident. The merged images for each probe are shown in (C), (F), (I) and (L).

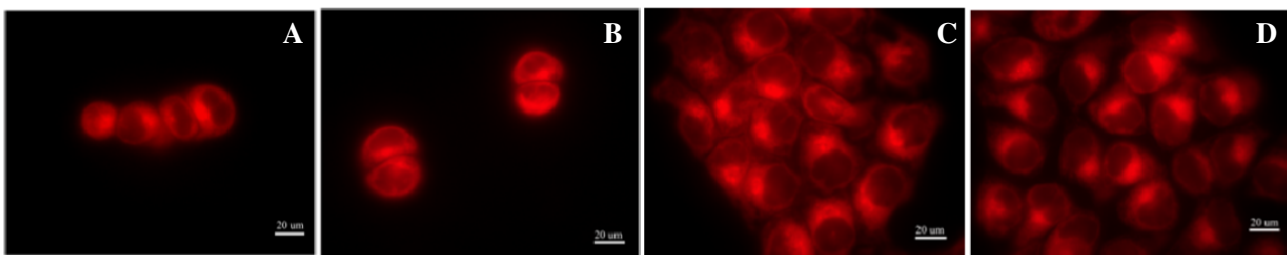


Figure 5. Localization of mTHPC in KYSE 510 cells as a function of the incubation time at 37°C . The distribution of the intracellular mTHPC fluorescence was analysed at 0.5 (A), 2 (B) and 24 h (C) of incubation and at 24 h followed by an additional 24 h in mTHPC-free culture medium (D).

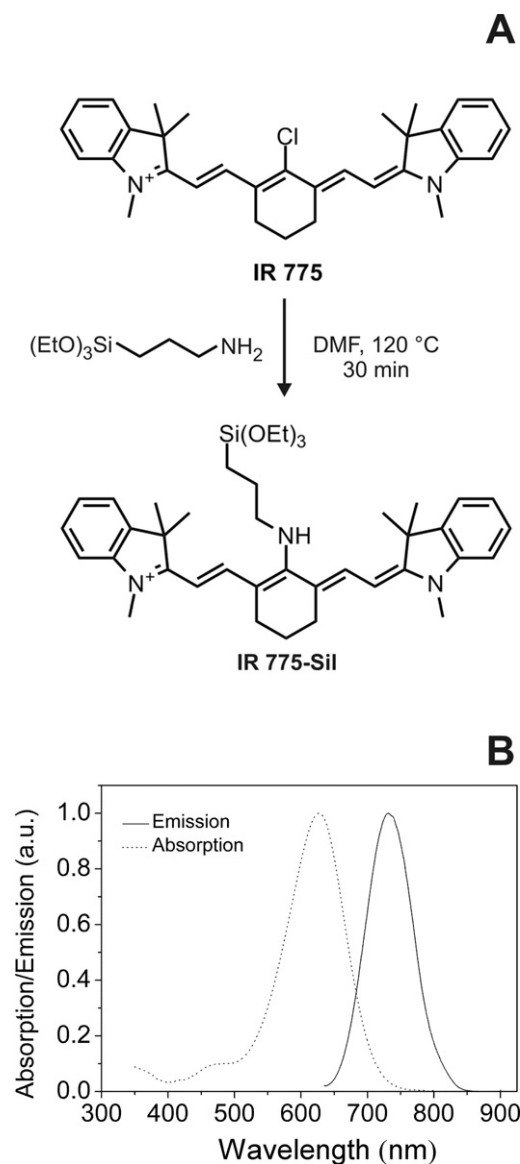


Figure 6. Reaction scheme for the synthesis of the IR775-Sil derivative (A). Absorption and fluorescence emission ($\lambda_{\text{exc}} = 627$ nm) spectra of IR775-Sil in ethanol (B).

transfer (FRET) may occur from mTHPC to IR775-Sil. This was confirmed by the fluorescence excitation spectra recorded at 760 nm of nanoparticles loaded with IR775-Sil and mTHPC in water solution. The maximum fluorescence emission of IR775-Sil is at 738 nm (figure 6), but in our FRET experiments, its emission was monitored at 760 nm to exclude any possible contribution from mTHPC fluorescence. The presence of the absorption bands of mTHPC in the excitation spectrum indicated that a FRET process was occurring as expected when the two species are in close proximity (figure 7). The excitation spectrum remained unchanged by keeping this water solution for up to several days, but the addition of ethanol to water (50:50, by vol) caused the rapid disappearance of the mTHPC bands (figure 7). Since the Forster distance for the energy transfer process is typically in the range 2–6 nm and the IR775-Sil derivative cannot escape from the nanoparticles, such an observation demonstrated the immediate release

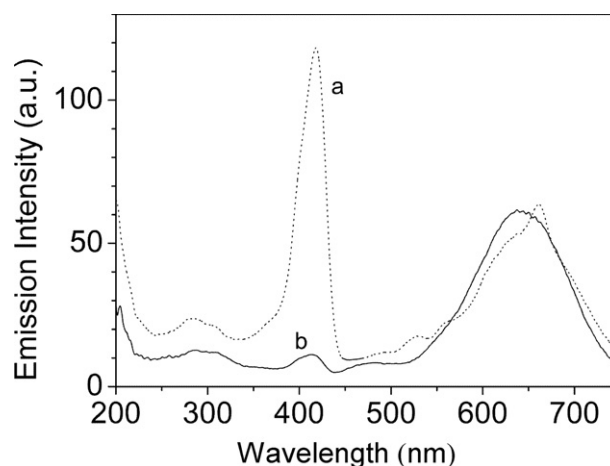


Figure 7. Excitation spectra of ORMOsil nanoparticles loaded with physically entrapped mTHPC and covalently bound IR775-Sil. The spectra were recorded in water ((a), dotted line) and in water/ethanol 1:1 ((b), solid line). Conditions: [mTHPC] = 0.8 μM , [IR775-Sil] = 1.6 μM , $\lambda_{\text{em}} = 760$ nm, 37 °C.

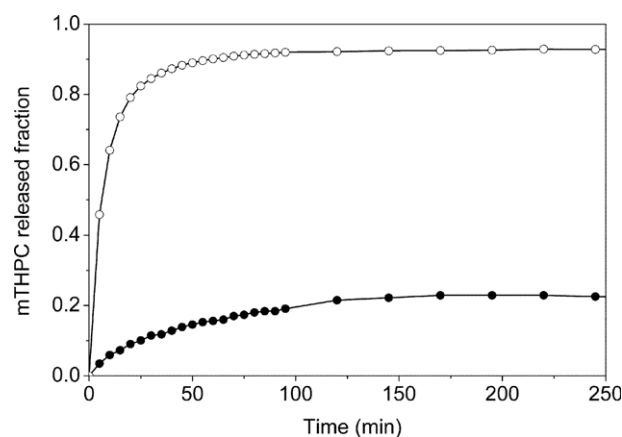


Figure 8. Time-dependent release of mTHPC from ORMOsil nanoparticles uncoated (open circles) and coated with a PEG layer (solid circles) after suspension in the cell culture medium (RPMI) with 3% FBS. The release was determined by FRET experiments using nanoparticles loaded with mTHPC and IR775-Sil. Conditions: [mTHPC] = 0.8 μM , [IR775-Sil] = 1.6 μM , $\lambda_{\text{em}} = 760$ nm, 37 °C.

of mTHPC after the addition of ethanol. Interestingly, similar results were obtained when the nanoparticles were diluted with cell culture medium containing 3% FBS: a progressive decrease of the mTHPC band in the excitation spectra, indicating the gradual release of mTHPC, was observed and after 30 min the release was complete (figure 8). In cells incubated with NPs loaded with mTHPC and IR775-Sil, only the mTHPC fluorescence emission at 652 nm could be observed but not that at 738 nm typical of IR775-Sil (data not shown).

Also ultracentrifugation experiments carried out with NPs doped with mTHPC and incubated with the cell culture medium containing 3% FBS showed that, while the NPs were mostly recovered in the sediment, the mTHPC was largely recovered in the supernatant which contained the serum proteins (table 2S in the supporting information available at

stacks.iop.org/Nano/20/345101), therefore confirming the data obtained with the FRET experiments.

To gain more insight into the mechanism of dye release, we prepared a sample of nanoparticles, loaded with mTHPC and IR775-Sil, whose surface was coated with a PEG-2000 derivative. In this case, a much smaller (about 20%) and slower release of mTHPC from the nanoparticles was observed after dilution with cell culture medium containing 3% FBS (figure 8). The PEG coating strongly reduced the release induced by serum proteins while it did not limit the release induced by the addition of ethanol.

Furthermore, the dynamic of mTHPC transfer from the nanoparticles to serum proteins was investigated by steady state fluorescence experiments. It has been reported that the binding of mTHPC to serum proteins results in the partial conversion of aggregates to monomers [30]. Since it is well established that only monomers are fluorescent, the disaggregation processes can be monitored by measuring the sample fluorescence emission (supporting information available at stacks.iop.org/Nano/20/345101). In fact, when mTHPC in the standard solvent was diluted (to 1 μ M concentration) with cell culture medium containing 3% FBS at 37 °C, a fast increase of the fluorescence intensity was observed, but at equilibrium the fluorescence intensity was lower than that measured after the addition of Triton X100 (which produces complete disaggregation of mTHPC) indicating the presence of 20–25% of residual aggregates (figure 4S). In turn, when the NP-entrapped mTHPC was diluted in the medium at the same concentration, an immediate slight decrease of the emission was observed (which could indicate a less polar environment for mTHPC in the nanoparticles than in serum proteins) and less than 10% of the mTHPC was present as aggregates at equilibrium.

4. Discussion

In the last few years, the use of photosensitizer-loaded nanoparticles for PDT has gained increasing interest. As a matter of fact, it appears an ideal strategy to take full advantage of the potentialities of nanocarriers while avoiding some of the possible drawbacks associated with the conventional modes of drug delivery. The inclusion of the photosensitizer in the nanoparticle may lead to completely different pharmacokinetics and biodistribution, and selective accumulation in the tumour tissues can be improved either by passive (EPR effect) or active targeting [3, 31]. In PDT, the photosensitizing drug can perform its task while remaining within the nanoparticle, therefore there is no need to design release mechanisms. In theory, even photosensitizers that were discarded for clinical application due to their toxicity or unfavourable biodistribution could be revisited, since inclusion in the nanoparticles could result in the masking of their intrinsic properties and no direct interaction with the cellular targets.

The picture emerging from the results reported here suggests, however, that many precautions need to be taken when such systems are studied and unforeseen effects may arise from the interaction of nanosystem assemblies with

biological entities. At first, inclusion of mTHPC in the nanoparticles appeared to be ensured: the molecule was still present in the nanoparticle solutions after extensive ultrafiltration (1.5 l of water was used to purify 5 ml of nanoparticle preparation) and its photophysical characteristics demonstrated that it was inside the nanoparticles as a monomer. The possibility to deliver the photosensitizer in aqueous medium in the monomeric form is quite valuable since the photosensitizer aggregates, which usually form in aqueous media, exhibit low fluorescence yield and low photodynamic activity. The entrapped mTHPC was still capable of producing singlet oxygen upon light activation (supporting information available at stacks.iop.org/Nano/20/345101), demonstrating that both oxygen can permeate in the nanoparticle and ROS escape from it. In fact, the efficiency of singlet oxygen production of mTHPC inside the particles was slightly but not significantly lower than that of mTHPC associated with serum proteins in the aqueous medium.

Inclusion of mTHPC in the nanoparticles was also confirmed by the fluorescence energy transfer experiments carried out in water (figure 7). However, the same experiments revealed that the addition of ethanol in a 1:1 ratio to water led to the immediate release of the photosensitizer from the nanoparticles. This indicated that entrapment of mTHPC is not due to steric constriction but to hydrophobic interaction with the low-polarity interior of the nanoparticles, which have pores large enough to allow the chlorin to escape when the external solvent is capable to solubilize it. The same behaviour has been already reported for other photosensitizer-loaded ORMOSIL nanoparticles when exposed to organic solvents [32].

More surprisingly, serum proteins also appear to promote the release of the photosensitizer from the nanoparticles, as demonstrated by both the energy transfer and ultracentrifugation experiments. Serum proteins are known to adsorb on the surface of nanoparticles, and this very likely occurs also in our experimental conditions, as suggested by the higher stability and reduced aggregation of NPs in cell culture medium supplemented with FBS compared to FBS-free medium. Apparently, serum proteins adsorb on the nanoparticle surface, bind the mTHPC molecules located near the surface and then dissociate from the nanoparticle as a protein–mTHPC complex. Therefore the rate of release of mTHPC from the NPs is determined by the rates of continuous association and dissociation between NPs and proteins [33]. Such a picture is confirmed by the fact that, when the nanoparticles are coated with PEG, which is known to reduce the absorption of serum proteins, the rate and extent of drug release are significantly reduced [34].

Interestingly, the presence of serum has been shown to improve the phototoxicity of biodegradable nanoparticles loaded with photosensitizers for PDT (but not of the free drug) and in one case such an effect has been correlated with a rapid transfer of the photosensitizer to the serum proteins as proved by the rapid increase of fluorescence emission [35, 36]. The ability of the serum proteins to extract lipophilic molecules physically entrapped in nanoparticles may hence be a general property that should be taken into account when studying these systems as drug delivery agents.

The release of mTHPC, or other photosensitizers, from the nanoparticles could not be a serious drawback if this

occurs after the nanovehicle has been internalized by the cells. Unfortunately, fluorescence measurements performed with nanoparticles loaded both with mTHPC and IR775-Sil demonstrated that very little internalization of the NPs occurred. In fact, in the cells incubated for 24 h with the NPs carrying the two dyes, only the mTHPC fluorescence was clearly detected while the fluorescence from IR775-Sil, which was covalently bound to the NP matrix, was barely detected. This observation demonstrated that NP-entrapped mTHPC is efficiently taken up by the cells but NPs are not involved in the process of internalization.

Taken together, these observations explain why NP-entrapped or free mTHPC showed no differences on the localization in and retention by KYSE 510 cells: NP-entrapped mTHPC is rapidly transferred to serum proteins once diluted with the cell medium and then follows the same internalization mechanism of the free drug. In all cases, mTHPC was largely localized in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus (figure 4) as reported also for other cell lines [37]. Noticeably, association of mTHPC with various serum protein fractions was demonstrated by several studies [38, 39] and, very likely, mTHPC is internalized by the cells as a protein complex. The incubation at low (4 °C) temperature exerted an inhibitory effect on the uptake of mTHPC (supporting information available at stacks.iop.org/Nano/20/345101). Therefore the internalization could be due to the energy-dependent endocytic process. An almost identical behaviour with respect to intracellular localization and photocytotoxicity has been described for mTHPC delivered to human biliary tract cancer cells in standard solvent or in a liposomal formulation [39].

It is worth underlining that, notwithstanding the relatively fast transfer of mTHPC from the NPs to serum proteins, the mode of delivery affected somehow the uptake of mTHPC in the cells (table 1), which was about 50% with the nanoparticles compared to standard solvent. Surprisingly, the lower uptake of mTHPC did not cause any reduction of the photokilling effect (figure 3) and this could imply a higher photosensitizing efficiency of the chlorin delivered with nanoparticles in comparison to that in the standard solvent. The reason for this different photosensitizing efficiency may be, at least partially, related to the mTHPC aggregates taken up by the cells. It is known [30], and the experiments reported here confirm the picture, that when mTHPC is diluted from the standard solvent into the culture medium, it associates with the serum proteins at least in part as aggregates. Ma *et al* reported that such aggregates are taken up by the cells, together with the monomeric photosensitizer molecules, but they are characterized by a much lower photosensitization efficiency [40]. In contrast, mTHPC embedded in the nanoparticles is monomeric and it is transferred to serum proteins essentially in a monomeric form. The absence, or very low level, of mTHPC aggregates in cells incubated with the nanoparticles may explain the higher photokilling efficiency of this formulation when compared with the uptake. However, more detailed photophysical studies need to be performed in order to confirm this hypothesis.

5. Conclusions

The results reported in this paper highlight once more the complexity of the behaviour of the nanosystems in comparison to 'normal free molecules' when they interact with a biological environment and the need to analyse carefully the fate of physically entrapped drugs. For instance, one should bear in mind that if fluorescence microscopy, in the case of fluorescent molecules, indicates where the molecules are, it may not provide information on the location of the dye-doped nanoparticles, unless the dye is covalently attached to the nanoparticle.

Of course, the behaviour of the ORMOSIL NPs reported here does not necessarily apply to any other nanocarrier, since different chemical composition, surface properties and size [41] or more rapid cellular internalization of the nanoparticles may slow down the release in the extracellular medium while favouring a more efficient delivery of the drug inside the cells.

Indeed, the covalent incorporation of the photosensitizer, as recently suggested by Ohulchanskyy *et al* [19], may offer the possibility to follow the fate of the NPs after exposure to the biological environment and living cells. However, the covalent association of drugs to the NP matrix may affect negatively their therapeutic effect so that the release from NPs after cell entry may be required. This may not be necessary in the case of photosensitizing drugs such as those used in PDT but it is necessary for all those drugs whose therapeutic effect is based on the interaction of the drug with a cellular target. The coating of the NP surface with a PEG layer appears a valuable strategy for limiting serum protein adsorption and drug release. While it is rather easy to follow the release of physically entrapped molecules in solution it is much more complicated to do the same within the cells. Here we report on a FRET approach in which the far-red absorbing molecule functioning as acceptor is covalently linked to the matrix of NPs while the photosensitizer of interest is simply entrapped. This method could constitute a general tool to investigate the fate of the NP-included photosensitizers when delivered to the cells.

Acknowledgments

We thank Biolitec (Jena, Germany) for supplying us with mTHPC and Mr Giuseppe Tognon (CNR Institute of Biomedical Technologies, Padova Unit) for TEM imaging. The research leading to these results has received funding from the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement no. 201031 NANOPHOTO.

References

- [1] Duncan R 2006 Polymer conjugates as anticancer nanomedicines *Nat. Rev. Cancer* **6** 688–701
- [2] Ferrari M 2005 Cancer nanotechnology: opportunities and challenges *Nat. Rev. Cancer* **5** 161–71

- [3] Peer D, Karp J M, Hong S, Farokhzad O C, Margalit R and Langer R 2007 Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy *Nat. Nanotechnol.* **2** 751–9
- [4] Joshi A, Vance D, Rai P, Thiagarajan A and Kane R S 2008 The design of polyvalent therapeutics *Chemistry* **14** 7738–47
- [5] Ferrari M 2008 Nanogeometry: beyond drug delivery *Nat. Nanotechnol.* **3** 131–2
- [6] Juliano R 2007 Challenges to macromolecular drug delivery *Biochem. Soc. Trans.* **35** 41–3
- [7] Sharman W M, Allen C M and van Lier J E 1999 Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications *Drug Discov. Today* **4** 507–17
- [8] Camerin M, Rello S, Villanueva A, Ping X, Kenney M E, Rodgers M A J and Jori G 2005 Photothermal sensitisation as a novel therapeutic approach for tumours: studies at the cellular and animal level *Eur. J. Cancer* **41** 1203–12
- [9] Barth R F 2003 A critical assessment of boron neutron cancer therapy: an overview *J. Neurocol.* **62** 1–5
- [10] Oleinick N L and Evans H H 1998 The photobiology of photodynamic therapy: cellular targets and mechanisms *Radiat. Res.* **150** S146–56
- [11] Prasad P N 2004 Polymer science and technology for new generation photonics and biophotonics *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **8** 11–9
- [12] Buchholz J, Kaser-Hotz B, Khan T, Rohrer Bley C, Melzer K, Schwendener R A, Roos M and Walt H 2005 Optimizing photodynamic therapy: *in vivo* pharmacokinetics of liposomal meta-(tetrahydroxyphenyl)chlorin in feline squamous cell carcinoma *Clin. Cancer Res.* **11** 7538–44
- [13] Pegaz B, Debeve E, Ballini J P, Wagnières G, Spaniol S, Albrecht V, Scheglmann D V, Nifantiev N E, van den Bergh H and Konan-Kouakou Y N 2006 Photodynamic activity of mTHPC-loaded liposomal formulations: pre-clinical assessment on chick chorioallantoic membrane model *Eur. J. Pharm. Sci.* **28** 134–40
- [14] Bourdon O, Laville I, Carrez D, Croisy A, Fedel P, Kasselouri A, Prognon P, Legrand P and Blais J 2002 Biodistribution of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin incorporated into surface-modified nanocapsules in tumour-bearing mice *Photochem. Photobiol. Sci.* **1** 709–14
- [15] Quintanar-Guerrero D, Allemann E, Fessi H and Doelker E 1998 Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers *Drug Dev. Indust. Pharm.* **24** 1113–28
- [16] Gao D, Xu H, Philbert M A and Kopelman R 2007 Ultrafine hydrogel nanoparticles: synthetic approach and therapeutic application in living cells *Angew. Chem. Int. Edn Engl.* **46** 2224–7
- [17] Cheng Y, Samia A C, Meyers J D, Panagopoulos I, Fei B and Burda C 2008 Highly efficient drug delivery with gold nanoparticle vectors for *in vivo* photodynamic therapy *J. Am. Chem. Soc.* **130** 10643–7
- [18] Kim S, Ohulchanskyy T Y, Pudavar H E, Pandey R K and Prasad P N 2007 Organically modified silica nanoparticles co-encapsulating photosensitizing drug and aggregation-enhanced two-photon absorbing fluorescent dye aggregates for two-photon photodynamic therapy *J. Am. Chem. Soc.* **129** 2669–75
- [19] Ohulchanskyy T Y, Roy I, Goswami L N, Chen Y, Bergey E J, Pandey R K, Oseroff A R and Prasad P N 2007 Organically modified silica nanoparticles with covalently incorporated photosensitizer for photodynamic therapy of cancer *Nano Lett.* **7** 2835–42
- [20] Roy I, Ohulchanskyy T Y, Pudavar H E, Bergey E J, Oseroff A R, Morgan J, Dougherty T J and Prasad P N 2003 Ceramic-based nanoparticles entrapping water-insoluble photosensitizing anticancer drugs: a novel drug-carrier system for photodynamic therapy *J. Am. Chem. Soc.* **125** 7860–5
- [21] Roy I, Ohulchanskyy T Y, Bharali D J, Pudavar H E, Mistretta R A, Kaur N and Prasad P N 2005 Optical tracking of organically modified silica nanoparticles as DNA carriers: a nonviral, nanomedicine approach for gene delivery *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102** 279–84
- [22] Burns A, Ow H and Wiesner U 2006 Fluorescent core-shell silica nanoparticles: towards ‘Lab on a Particle’ architectures for nanobiotechnology *Chem. Soc. Rev.* **35** 1028–42
- [23] Santra S, Xu J, Wang K and Tan W 2004 Luminescent nanoparticles probes for bioimaging *J. Nanosci. Nanotechnol.* **4** 590–9
- [24] Ball D J, Vernon D I and Brown S B 1999 The high photoactivity of mTHPC in photodynamic therapy. Unusually strong retention of mTHPC by RIF-1 cells in culture *Photochem. Photobiol.* **69** 360–3
- [25] Reuther T, Kubler A C, Zillmann U, Flechtenmacher C and Sinn H 2001 Comparison of the *in vivo* efficiency of photofrin II-, mTHPC-, mTHPC-PEG- and mTHPCnPEG-mediated PDT in a human xenografted head and neck carcinoma *Laser Surg. Med.* **29** 314–22
- [26] van Geel I P, Oppelaar H, Oussoren Y G, van der Valk M A and Stewart F A 1995 Photosensitizing efficacy of mTHPC-PDT compared to photofrin-PDT in the RIF1 mouse tumour and normal skin *Int. J. Cancer* **60** 388–94
- [27] Rio Echevarria I M, Selvestrel F and Mancin F 2009 in preparation
- [28] Hadjur C, Lange N, Rebstein J, Monnier P, van den Bergh H and Wagnières G 1998 Spectroscopic studies of photobleaching and photoproduct formation of meta(tetrahydroxyphenyl)chlorin (mTHPC) used in photodynamic therapy. The production of singlet oxygen by mTHPC *J. Photochem. Photobiol. B* **45** 170–8
- [29] Bertazza L, Celotti L, Fabbri G, Loi M A, Maggini M, Mancin F, Marcuz S, Menna E, Muccini M and Tonellato U 2006 Cell penetrating silica nanoparticles doped with two-photon absorbing fluorophores *Tetrahedron* **62** 10434–40
- [30] Sasnouski S, Zorin V, Khludeyev I, D’Hallewin M A, Guillemin F and Bezdetnaya L 2005 Investigation of Foscan[®] interactions with plasma proteins *Biochim. Biophys. Acta* **1725** 394–402
- [31] Cho K, Wang X, Nie S, Chen Z and Shin D 2008 Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer *Clin. Cancer Res.* **14** 1301–16
- [32] Kumar R, Roy I, Ohulchanskyy T Y, Goswami L N, Bonoiu A C, Bergey E J, Tramosch K M, Maitra A and Prasad P N 2008 Covalently dye-linked, surface-controlled, and bioconjugated organically modified silica nanoparticles as targeted probes for optical imaging *ACS Nano* **2** 449–56
- [33] Cedervall T, Lynch I, Lindman S, Berggård T, Thulin E, Nilsson H, Dawson K A and Linse S 2007 Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **104** 2050–5
- [34] Satomi T, Nagasaki Y, Kobayashi H, Kataoka K and Otsuka H 2007 Physicochemical characterization of densely packed poly(ethylene glycol) layer for minimizing non specific protein adsorption *J. Nanosci. Nanotechnol.* **7** 2394–9
- [35] Konan Y N, Chevallier J, Gurny R and Allemann E 2003 Encapsulation of p-THPP into nanoparticles: cellular uptake, subcellular localization and effect of serum on photodynamic activity *Photochem. Photobiol.* **77** 638–44
- [36] Konan-Kouakou Y N, Boch R, Gurny R and Allemann E 2005 *In vitro* and *in vivo* activity of verteporfin-loaded nanoparticles *J. Control. Release* **103** 83–91

- [37] Teiten M H, Bezdetnaya L, Morlière P, Santus R and Guillemain F 2003 Endoplasmic reticulum and Golgi apparatus are the preferential sites of Foscan[®] localisation in cultured tumour cells *Br. J. Cancer* **88** 146–52
- [38] Hopkinson H J, Vernon D I and Brown S B 1999 Identification and partial characterization of an unusual distribution of the photosensitizer meta-tetrahydroxyphenyl chlorin (temoporfin) in human plasma *Photochem. Photobiol.* **69** 482–8
- [39] Kiesslich T, Berlanda J, Plaetzer K, Krammer B and Berr F 2007 Comparative characterization of the efficiency and cellular pharmacokinetics of Foscan[®] - and Foslip[®]-based photodynamic treatment in human biliary tract cancer cell lines *Photochem. Photobiol. Sci.* **6** 619–27
- [40] Ma L, Moan J and Berg K 1994 Evaluation of a new photosensitizer, meso-tetra-hydroxyphenyl-chlorin, for use in photodynamic therapy: a comparison of its photobiological properties with those of two other photosensitizers *Int. J. Cancer* **57** 883–8
- [41] Villanueva A, Cañete M, Roca A G, Calero M, Veintemillas-Verdaguer S, Serna C J, del Puerto Morales M and Miranda R 2009 The influence of surface functionalisation on the enhanced internalisation of magnetic nanoparticles in cancer cells *Nanotechnology* **20** 115103

Surfactant-free synthesis of mesoporous and hollow silica nanoparticles with an inorganic template†

Luca Bau^a,*^a Barbora Bártoová,^b Maria Arduini^a and Fabrizio Mancin^a*

Received (in Cambridge, UK) 27th August 2009, Accepted 16th October 2009

First published as an Advance Article on the web 4th November 2009

DOI: 10.1039/b917561j

A surfactant-free synthesis of mesoporous and hollow silica nanoparticles is reported in which boron acts as the templating agent. Using such a simple and mild procedure as a treatment with water, the boron-rich phase is selectively removed, affording mesoporous pure silica nanoparticles with wormhole-like pores or, depending on the synthetic conditions, silica nanoshells.

Mesoporous silica has been attracting increasing attention since the synthetic procedure based on surfactant templating was devised in 1992 by Beck and co-workers.¹ By virtue of its high surface area and ease of functionalization,² mesoporous silica is a unique material that holds promise for a host of applications, ranging from catalysis³ to sensing⁴ and, more recently, drug delivery.⁵ In recent years, considerable efforts have been devoted to the synthesis of mesoporous silica nanoparticles, combining the peculiar properties of silica nanoparticles, such as water solubility, biocompatibility, optical transparency and shorter diffusion paths, with the high loading capacity of mesoporous materials.⁶

The general approach involves, as in the case of mesoporous silica, the use of a templating agent, usually a surfactant, which is removed by calcination or chemical extraction after the silica network is formed.⁷ However, high temperature treatments may affect the properties of the silica particles, reducing the amount of surface silanol groups,⁸ and, in general, surfactant removal procedures are often incompatible with the presence of delicate payloads (drugs or other active species) inside the particles. Avoiding the use of surfactants is hence highly desirable and would be beneficial in terms of cost, environmental impact and scale-up potential. Furthermore, most synthetic procedures based on surfactant templating lead to ordered structures with non-interconnected cylindrical pores. Though undoubtedly crucial to many applications, these features are not always needed or even desirable. Other applications, like adsorption or catalysis, would benefit from the more accessible internal volume afforded by interconnected pores.

Surfactant-free synthesis of mesoporous silica can be performed using organic templates,⁹ but the removal procedures are similar to those used for surfactants. A different approach may involve the use of inorganic templates, as demonstrated by Asher and co-workers,¹⁰ who were able to tailor the morphology of growing silica nanoparticles using cadmium sulfide nanoparticles as templates. However, also in this case

harsh removal conditions, namely concentrated nitric acid treatment, were required.

We report here a novel surfactant-free approach to the synthesis of mesoporous nanoparticles in which the templating agent is a hydrolytically unstable inorganic phase, and the template removal treatment is a simple solvent exchange with water at room temperature. Such procedure results in the preparation of silica nanoparticles with interconnected disordered pores or, depending on the reaction conditions, silica nanoshells.

It has been known for several decades that silica glasses with nanometre-sized pores can be obtained by inducing phase separation in borosilicate glasses and selectively leaching the boron oxide phase.¹¹ We reasoned that if a similar phase separation could be achieved in silica nanoparticles, a novel route to mesoporous nanoparticles could be envisaged.

In principle, such a separation should indeed occur. Silica nanoparticles may be easily prepared, according to the Stöber method,¹² by condensation of alkoxy silane derivatives in ethanol–water–ammonia solutions at room temperature. The aqueous sol–gel synthesis of borosilicates, a similar procedure, has been extensively studied by Irwin and co-workers,¹³ who found the formation of borosiloxane (Si–O–B) bonds to take place only upon dehydration at high temperatures. The absence of borosiloxane bonds points to the existence of boron-rich domains that should be easily removed by hydrolysis, leaving a network of pores in their place.

We set out to test this hypothesis by synthesizing borosilicate nanoparticles through a modified Stöber reaction,¹⁴ involving the co-condensation of silicon and boron oxide precursors. Tetraethoxysilane (TEOS) was used as a silicon source, while boric acid was chosen as the boron precursor in order to maximize the difference in the hydrolysis rates of the two precursors, which is known to correlate with oxide network inhomogeneity in sol–gel processes.¹⁵ The reaction was

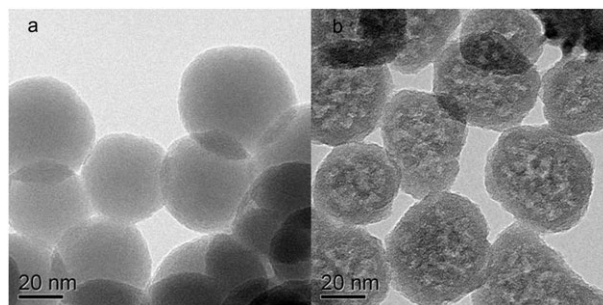


Fig. 1 TEM bright field images of borosilicate nanoparticles (a) and the same sample after water treatment (b).

^a Dip. di Scienze Chimiche, Università di Padova, via Marzolo 1, 35131 Padova, Italy. E-mail: luca.bau@unipd.it, fabrizio.mancin@unipd.it

^b CIME & LSME, EPFL, Station 12, 1015 Lausanne, Switzerland

† This paper is dedicated to Professor Umberto Tonellato of University of Padova on the occasion of his retirement.

Table 1 Effect of water and ammonia on size^a

Entry	[NH ₃]/M	H ₂ O (%)	Size/nm
1	0.30	6.8	50
2	0.30	4.5	30
3	0.30	2.3	— ^a
4	0.37	4.5	20

^a No particles were isolated under these conditions after filtration over a 0.22 μm PVDF filter.

Table 2 Effect of the B/Si molar ratio in the reaction mixture on the boron content of the nanoparticles

Entry	(B/Si) _{react}	(B/Si) _{prod}	B % (w/w)
1	0.5	0.15	2.1
2	0.75	0.12	1.7
3	2	0.10	1.4

monitored by dynamic light scattering[‡] until particle growth was complete. Unreacted species and hydrolyzed monomers were then removed by ultrafiltration with ethanol.

Size and morphology of the resulting borosilicate nanoparticles were investigated by TEM[‡]. Spherical monodisperse particles, with a homogeneous interior and a smooth surface, are visible in the TEM images (Fig. 1a).

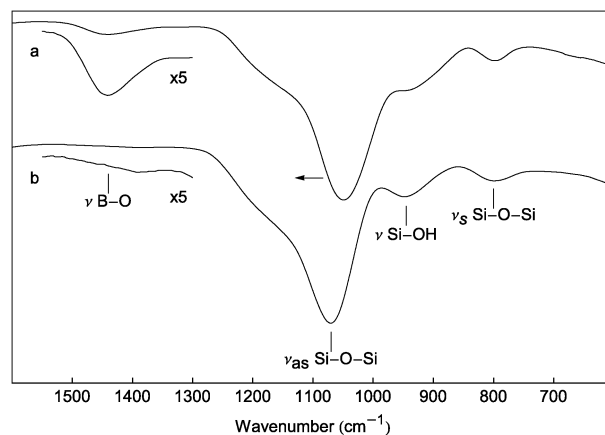
Monodisperse nanoparticles as small as 20 nm can be easily obtained by this method (see Table 1). Larger nanoparticles are obtained when a higher water concentration is used (entries 1 and 2). However, no nanoparticles can be isolated when the reaction mixture contains less than 4.5% water (entry 3). In order to obtain smaller particles, the ammonia concentration must be increased (entry 4).

The boron content was determined by spectrophotometric analysis using the azomethine H method¹⁶ and confirmed with ICP-OES analysis[‡] (see Table 2). A 0.5 molar ratio of the boron and silicon precursors in the reaction mixture affords borosilicate nanoparticles with a boron content of 2% by weight. As observed also in the case of borosilicate glasses prepared by sol-gel synthesis,¹³ the use of higher B/Si ratios in the preparation of the particles does not result in an increased boron loading.

The actual inclusion of boron into the nanoparticles was demonstrated by solution ¹¹B-NMR experiments[‡]. No ¹¹B signal was detected when a nanoparticles sample was analyzed, because of the massive line broadening due to inclusion of the boron nuclei into the slowly diffusing nanoparticles. However, when the nanoparticles were dissolved by addition of concentrated NaOH, boron derivatives were liberated in the solution and a sharp signal at 1.62 ppm, which can be assigned to the B(OH)₄⁻ species, appeared.

The presence of boron is also confirmed by the B–O absorption band at 1440 cm⁻¹ in the FT-IR spectrum[‡] (Fig. 2). The lack of borosiloxane absorption bands (expected at 930 and 670 cm⁻¹) suggests that, as expected, boron is not homogeneously distributed in the silica network but segregates into boron-rich domains.¹⁷

Encouraged by this finding, we tried to selectively leach the boron-rich phase. Nanoparticle solutions in ethanol were

**Fig. 2** FT-IR spectra images of borosilicate nanoparticles (a) and the same sample after water treatment (b).

extensively ultrafiltered with water. After this treatment the B–O absorption disappears from the FT-IR spectrum and the complete leaching of boron is confirmed by ICP-OES analysis. The Si–O–Si stretching is blue-shifted from 1050 cm⁻¹ to 1070 cm⁻¹ (Fig. 2). Such shifts to higher frequencies are known to be associated with a decreased strain in the silica network¹⁸ that would be consistent, in this case, with the removal of a templating phase. Remarkably enough, TEM micrographs of the nanoparticles after water treatment (Fig. 1b) show the formation of a pore network with a wormhole-like morphology, reflecting the distribution of the boron-rich phase in the parent borosilicate particles. The average size of the pores can be roughly estimated to lie in the 2–5 nm range. The rugged contour suggests slight surface erosion, but the particle size is not significantly decreased.

In a control experiment, pure silica nanoparticles were synthesized in identical conditions but in the absence of boric acid and subjected to the same water treatment. Samples taken before and after ultrafiltration look identical in TEM, and quite similar to the non-porous borosilicate particles as they appear before water treatment. This experiment confirms the role of boron as a templating agent, and excludes a possible effect of the water treatment alone on the formation of pores.

Interestingly, we also noticed that when the water content of the reaction mixture was increased to 6%, a small fraction of hollow nanoparticles was present, along with the mesoporous particles, in the water-treated samples (Fig. 3). We decided to further investigate this phenomenon and found out that the fraction of nanoshells increases rapidly with the water content of the reaction mixture: when it reaches 10%, most of the nanoparticles are hollow (Fig. 3).

This procedure paves the way to the realization of highly sophisticated silica nanosystems, where bulk doping, surface functionalization, pore wall functionalization and pore loading can be simultaneously exploited. The differential functionalization of pores and external surface of templated mesoporous silica is usually achieved by sequential treatment with different silane coupling agents before and after template removal.¹⁹ However, this procedure can result in promiscuous functionalization because of surfactant displacement. A diffusion-based approach that takes place after surfactant

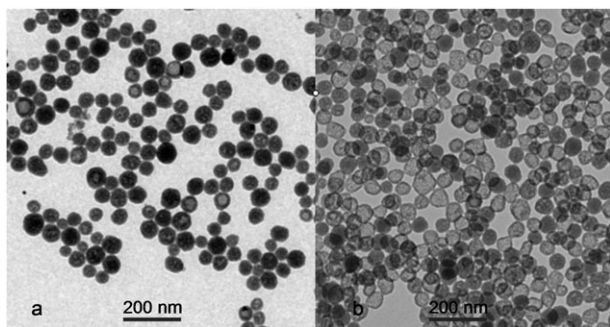


Fig. 3 TEM images of samples synthesized with increasing water content in the reaction mixture: (a) 6.8%, (b) 10%.

removal has been reported,²⁰ but is inherently limited to large nanoparticles where a precise control of the diffusion time is possible. Small borosilicate nanoparticles may be largely immune to template–silane exchange, and thus more suitable for selective functionalization.

In summary, we present a mild, surfactant-free method for the synthesis of hollow or mesoporous colloidal silica using boric acid as a templating agent. In contrast with the currently used methods for the preparation of similar system, the use of boric acid allows for an easy, cheap and mild removal of the template through a simple exposure to water. Moreover, tuning the water content in the reaction mixture allows the outcome of the reaction to be directed towards either mesoporous particles or nanoshells. Further investigations are under way to better characterize the system and explore the possible applications.

The authors would like to express their appreciation to Dr A. Sturaro and Dr R. Rella (Istituto per la Dinamica dei Processi Ambientali, CNR, Corso Stati Uniti 4, 35127 Padova) for skillful support in ICP-OES measurements, and to Mr Claudio Gamboz and Prof. Maria Rosa Soranzo (University of Trieste) for some TEM measurements.

Notes and references

† Transmission electron microscopy (TEM) images were acquired using a Philips/FEI CM300 machine operated at 300 kV (CIME, EPFL) and a Philips EM208 machine operated at 100 keV (CSPA, University of Trieste). Samples were sonicated and a few drops were deposited on holey carbon copper grids or standard carbon-coated copper grids (200 mesh). Dynamic light scattering (DLS) measurements were obtained with a Malvern Zetasizer Nano S instrument. Infrared spectra were obtained in attenuated total reflectance mode on a Nicolet 5700 FT-IR instrument. ¹¹B NMR spectra were obtained on a Bruker Avance DRX 300 spectrometer. ICP-OES analyses were performed with a Varian Liberty Series II instrument. Samples for ICP-OES were mineralized in 6 M NaOH at 70 °C for one hour prior to analysis.

Typical synthesis of borosilicate nanoparticles. To a thermostated vessel charged with a solution of boric acid (13 mg, 0.21 mmol) in ethanol (20 mL), 100 μL (0.45 mmol) of TEOS were added under stirring at 25 °C. 0.6 mL of milliQ water and 0.4 mL of a 14.8 M aqueous solution of ammonia were then added to initiate the polymerization. After 16 hours, the solution was filtered through a 0.22 μm PVDF filter. The solution was then diluted to 80 mL with ethanol and concentrated to the original volume by ultrafiltration through a regenerate cellulose membrane (cut-off 10 kDa) under nitrogen pressure (4 bar). The procedure was repeated five times. The resulting solution was filtered through a 0.22 μm PVDF filter.

Synthesis of mesoporous silica nanoparticles. The borosilicate nanoparticles solution was diluted to 80 mL with water and concentrated to the original volume by ultrafiltration through a regenerate cellulose membrane (cut-off 10 kDa) under nitrogen pressure (4 bar). The procedure was repeated five times. The resulting aqueous nanoparticles solution was then filtered through a 0.22 μm PVDF filter.

- 1 C. T. Kresge, M. E. Leonowicz, W. J. Roth, J. C. Vartuli and J. S. Beck, *Nature*, 1992, **359**, 710.
- 2 F. Hoffmann, M. Cornelius, J. Morell and M. Fröba, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2006, **45**, 3216.
- 3 C. Crudden, M. Sateesh and R. Lewis, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 10045; D. J. Mihalcik and W. Lin, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2008, **47**, 6229.
- 4 A. Descalzo, D. Jimenez, M. Marcos, R. Martínez-Mañez, J. Soto, J. E. Haskouri, C. Guillém, D. Beltrán, P. Amorós and M. Borrachero, *Adv. Mater.*, 2002, **14**, 966.
- 5 N. K. Mal, M. Fujiwara and Y. Tanaka, *Nature*, 2003, **421**, 350; S. Giri, B. G. Trewyn, M. P. Stellmaker and V. S.-Y. Lin, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2005, **44**, 5038.
- 6 Selected reviews: (a) I. I. Slowing, B. G. Trewyn, S. Giri and V. S. Y. Lin, *Adv. Funct. Mater.*, 2007, **17**, 1225; (b) C. Barbe, J. Bartlett, L. G. Kong, K. Finnie, H. Q. Lin, M. Larkin, S. Calleja, A. Bush and G. Calleja, *Adv. Mater.*, 2004, **16**, 1959.
- 7 J. Kobler, K. Möller and T. Bein, *ACS Nano*, 2008, **2**, 791.
- 8 C. Yague, M. Moros, V. Grazu, M. Arruebo and J. Santamaria, *Chem. Eng. J.*, 2008, **137**, 45.
- 9 Y. Wei, D. Jin, T. Ding, W. Shih, X. Liu, S. Z. D. Cheng and Q. Fu, *Adv. Mater.*, 1998, **10**, 313.
- 10 S.-Y. Chang, L. Liu and S. A. Asher, *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, **116**, 6739.
- 11 H. P. Hood and M. E. Nordberg, *US Pat.*, 2 106 744, 1934.
- 12 W. Stöber, A. Fink and E. Bohn, *J. Colloid Interface Sci.*, 1968, **26**, 62.
- 13 A. Irwin, J. Holmgren, T. Zerda and J. Jonas, *J. Non-Cryst. Solids*, 1987, **89**, 191.
- 14 An alternative procedure for the synthesis of larger borosilicate nanoparticles was recently reported in V. K. Parashar, J.-B. Orhan, A. Sayah, M. Cantoni and M. A. M. Gijs, *Nat. Nanotechnol.*, 2008, **3**, 589.
- 15 C. J. Brinker and G. Scherrer, *Sol-Gel Science, The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*, Academic, Boston, 1990.
- 16 D. L. Harp, *Anal. Chim. Acta*, 1997, **346**, 373.
- 17 The degree of condensation of boron-rich domains (boron oxide, borates or other condensed forms) is unclear at this level of investigation.
- 18 (a) R. A. B. Devine, *J. Non-Cryst. Solids*, 1993, **152**, 50; (b) A. Agarwal and M. Tomozawa, *J. Non-Cryst. Solids*, 1997, **209**, 166.
- 19 F. de Juan and E. Ruiz-Hitzky, *Adv. Mater.*, 2000, **12**, 430.
- 20 K. Cheng and C. C. Landry, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 9674.