



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

*Dipartimento di Biomedicina Sperimentale e Neuroscienze Cliniche (BioNeC)*  
*Dottorato di ricerca in Oncobiologia Sperimentale*

*Coordinatore Prof.ssa Renza Vento*

**Sviluppo di nanocarriers per il “*drug release*”  
controllato di biomolecole nella terapia antitumorale**  
**SSD BIO/10 - Biochimica**

Tutor

Prof. Giulio Gherzi

Candidata

Dott.ssa Giorgia Adamo

Il Coordinatore del Dottorato

Prof.ssa Renza Vento

**Triennio 2011-2013-Ciclo XXIV**

## **Indice**

<b>Introduzione</b>	4
1. Nanoscienze e Nanotecnologie	5
2. I Nanomateriali	6
2.1 Nanomateriali di carbonio	8
2.2 Le nanoparticelle	9
2.2.1 Le nanoparticelle inorganiche	10
2.2.2 Le nanoparticelle organiche	12
3. I nanogels	15
3.1 Nanogels in Poly(N-vinyl pyrrolidone) prodotti tramite $\beta$ -irraggiamento	18
4. Nanocarriers nel " <i>drug delivery system</i> "	20
4.1 Il <i>Targeting</i>	22
4.1.1 Anticorpi e frammenti anticorpali	24
4.1.2 Aptameri	26
4.1.3 Peptidi	26
4.1.4 Zuccheri	26
4.1.5 <i>Small molecule</i> : l'acido folico	27
4.2 La <i>clearance</i> delle nanoparticelle	28
<b>Scopo della tesi</b>	31
<b>Materiali e Metodi</b>	34
Generazione di nanogels funzionalizzati con gruppi amminici e carbossilici	35
Culture cellulari utilizzate	36
Coltura, mantenimento e manipolazione delle colture cellulari	36
Valutazione della biocompatibilità dei nanogels in PVP	39
-Test MTT	39
-Saggio di attivazione delle Caspasi 3/7/8	40
-Colorazione con Arancio di Acridina	42

Coniugazione dei nanogels con sonde fluorescenti	43
Studio di internalizzazione dei nanogels fluorescenti	43
-Microscopia confocale	43
-Analisi spettrofluorimetrica	45
Coniugazione dei nanogels con la proteina BSA	45
Coniugazione dei nanogels con Anticorpi Monoclonali Fluorescenti	46
Studi di localizzazione degli immunonanogels in colture cellulari	46
-Studio di colocalizzazione del sistema P*-g-A(100) <sup>FITC</sup> coniugato all'antiCD44 <sup>TRITC</sup> su cellule ECV304	47
Studio sul meccanismo di internalizzazione dei nanogels	47
-Inibizione dei pathways di endocitosi	47
-Analisi citofluorimetrica	47
-Analisi di microscopia confocale	48
Esperimenti di <i>targeting attivo</i> mediante Wound Healing assay	48
Protocollo di coniugazione dei nanogels con la Doxorubicina	48
-Alamar blue test	49
Sviluppo dei nanogels P*(o.50)AA-AEDP-Dox	49
-Cinetica di rilascio <i>in vitro</i> in condizioni riducenti	50
Studio sul rilascio controllato del farmaco in cellule, mediante stimolazione da parte del glutatione	50
-Analisi di microscopia a epifluorescenza	51
-Analisi citofluorimetrica	51
Coniugazione dei nanogels ad oligonucleotidi	52
-Funzionalizzazione dei nanogels con oligonucleotidi modificati fluorescenti	52
-Test di annealing e di digestione enzimatica	52
<b>Risultati</b>	54
Caratterizzazione delle nanoparticelle utilizzate	55
Valutazione della biocompatibilità	56
-Studi di citotossicità	56
-Valutazione di fenomeni apoptotici	57

-Valutazione dei danni al DNA	57
Coniugazione delle nanoparticelle con sonde fluorescenti e studi di <i>up-take</i> cellulare	59
-Sviluppo di nanogels fluorescenti	59
-Studi di up-take e di localizzazione dei nanogels in colture cellulari	59
Coniugazione dei nanogels P*-g-A(100) a molecole biologiche	62
-Coniugazione con la proteina BSA	62
Coniugazione dei nanogels con anticorpi monoclonali	63
-Studi di localizzazione degli immunonanogels su cellule ECV304	63
- Analisi di colocalizzazione degli immunonanogels	67
P*-g-A(100) <sup>FITC</sup> coniugati all' antiCD44 <sup>TRITC</sup> su cellule ECV304	
Mecanismo di internalizzazione cellulare dei nanogels	68
Capacità di " <i>Targeting attivo</i> " da parte dell'immunonanogels P*-g-A(100)antiβ3 <sup>TRITC</sup> mediante <i>Wound Healing assay</i>	71
Sviluppo di nanocarriers per il trasporto di un farmaco chemioterapico, la Doxorubicina	74
Generazione di un sistema di rilascio controllato di farmaci, mediante stimolazione da parte del glutatione	77
-Creazione di P*(0.50)AA-AEDP-Dox e meccanismo d'azione proposto	78
-Studi di rilascio <i>in vitro</i> su P*(0.50)AA-AEDP-Dox	79
-Studi sul rilascio di Doxorubicina dal <i>nanodrug</i> , mediante stimolo del GSH intracellulare	80
Coniugazione dei nanogels con oligonucleotidi modificati	84
<b>Conclusioni</b>	87
<b>Bibliografia</b>	92

## ***Introduzione***

## 1. Nanoscienze e Nanotecnologie

Le nanoscienze costituiscono il punto di incontro di discipline differenti che vanno dalla fisica quantistica alla chimica sopramolecolare, dalla scienza dei materiali alla biologia molecolare e rappresentano una realtà ormai affermata nel mondo della ricerca.

Il concetto di nanoscienza fu formulato per la prima volta dal fisico Richard Feynman nel 1959 nel discorso intitolato *"There's plenty of room at the bottom. An invitation to enter a new field of physics"*, durante il quale ipotizzò che nel futuro si sarebbero potuti costruire dispositivi di varia natura agendo direttamente sulla posizione degli atomi nella materia<sup>[1]</sup>.

Anni dopo, nel 1975, a coniare il termine nanotecnologie fu Eric Drexler, definendola: *"una tecnologia a livello molecolare che ci potrà permettere di porre ogni atomo dove vogliamo che esso stia. Chiamiamo questa capacità nanotecnologia, perché funziona su scala del nanometro, 1 milionesimo di metro"*<sup>[2]</sup>.

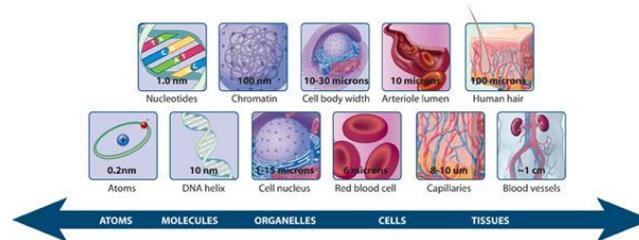
Prende inizio così l'epoca d'oro della nanotecnologia del progettare, sintetizzare e caratterizzare nanoparticelle. Le nanotecnologie, quindi, sono un insieme di tecnologie, tecniche e processi che richiedono un approccio multidisciplinare e consentono la creazione e utilizzazione di materiali, dispositivi e sistemi con dimensioni nanometriche. Le prospettive associate alle nanotecnologie derivano dal fatto che, a questi livelli dimensionali, comportamenti e caratteristiche della materia cambiano drasticamente<sup>[3]</sup>.

Le nanotecnologie trovano applicazione praticamente in tutti i settori produttivi. Numerosi prodotti riconducibili all'utilizzo delle nanotecnologie sono già disponibili sul mercato ed il loro numero cresce costantemente. Tra essi si possono citare, ad esempio, nanoparticelle per cosmetici, *coatings* e vernici, nanocompositi, *"hard disks"* con superfici nanostrutturate per registrazione dati ad altissima densità, *"chips"* di memoria con dimensioni inferiori a 100 nm, dispositivi fotonici e superfici autopulenti.

Ma è il settore biomedico quello che trova maggiori applicazioni, che vanno dall'uso medico dei nanomateriali (ad esempio, attraverso i nanofili), alla formulazione di nuovi sistemi per la somministrazione dei farmaci (attraverso nanoparticelle nei *drug delivery systems*), ai biosensori nanotecnologici nella diagnostica o ancora, al possibile utilizzo futuro della nanotecnologia molecolare.

Infatti, un importantissimo fattore trainante dello sviluppo delle nanotecnologie è la comprensione dei processi biologici che avvengono su nanoscala<sup>[4]</sup>. Gli organismi viventi

sono costituiti da cellule, mediate dal diametro di 10 micron; tuttavia, i vari componenti cellulari hanno dimensioni dei sub-micron e dei nanometri (fig.1). Questo confronto fornisce un'idea delle potenzialità che si hanno nell'utilizzo delle nanoparticelle, intese come piccolissimi strumenti all'interno del macchinario cellulare: ogni cellula può accogliere al suo interno o sulla sua superficie decine se non centinaia di strutture nanometriche che possono essere utilizzate come sonde per peptidi, anticorpi, acidi nucleici e per interagire con prodotti in processi cellulari<sup>[5]</sup>.



**Figura 1:** Scala relativa alla dimensione di molecole e strutture biologiche. Le cellule possono variare tra 1 micrometro (micron) e centinaia di micrometri di diametro. All'interno di una cellula, una doppia elica di DNA è di circa 10 nanometri (nm) di larghezza, mentre il nucleo che racchiude il DNA può essere di circa 1000 volte più grande (circa 10 micron). 2010 Nature Education.

Infine, alcune proprietà delle nanoparticelle, come un'aumentata attività chimica, una migliore selettività e l'abilità di attraversare le barriere tissutali, stanno portando allo sviluppo di nuove tecniche in ambito farmacologico, per lo sviluppo di terapie innovative. In futuro, una nanoparticella o un gruppo di nanoparticelle potranno essere progettate per cercare, individuare e distruggere una singola cellula patologica. Attraverso le nanotecnologie si potranno stimolare meccanismi di riparazione di tessuti malati o danneggiati, senza ricorrere a trapianti o ad organi artificiali.

## 2. I nanomateriali

I nanomateriali (NMs) sono comunemente definiti come materiali aventi una dimensione inferiore ai 100 nm. I NMs esibiscono peculiari proprietà chimiche, fisiche e ottiche che dipendono dalle loro dimensioni e che sono differenti da quelle presenti nei materiali di dimensioni convenzionali (cosiddetti *bulk materials*)<sup>[6]</sup>. I NMs possono avere origine naturale, quali ad esempio quelli prodotti da processi di combustione naturali (vulcani, incendi spontanei) oppure avere origine antropogenica. In questo caso, si distinguono quelli prodotti involontariamente (che originano da motori diesel, inceneritori, industrie)

e quelli prodotti volontariamente. A quest'ultima categoria appartengono i NMs artificiali, o ingegnerizzati, ossia appositamente prodotti dalle nanotecnologie per scopi tecnologici di diverso livello, da quello scientifico a quello industriale.

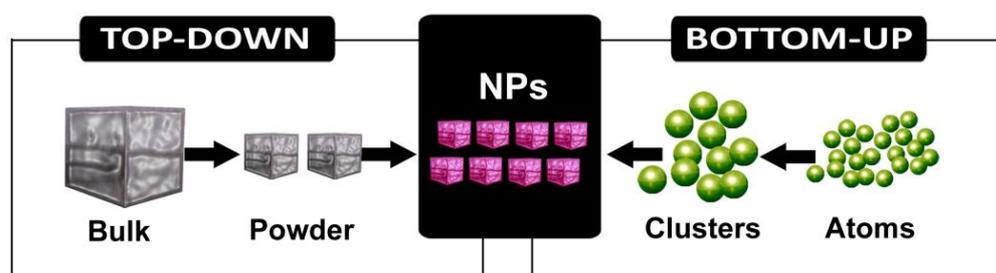
Le proprietà particolari dei nanomateriali sono dovute al fatto che, per le loro dimensioni, seguono leggi fisiche che si trovano a metà tra la fisica classica e la fisica quantistica. Infatti, il rapporto superficie/volume è molto elevato, in una via di mezzo tra quello degli atomi e quello di materiali di dimensioni oltre il micron<sup>[7]</sup>.

Le caratteristiche che consentono di variare le proprietà dei nanomateriali sono essenzialmente la composizione, la dimensione e la superficie:

- **Composizione:** composizioni chimiche differenti portano a comportamenti fisici e chimici diversi.
- **Dimensione:** in base al materiale utilizzato per produrre i NMs, se si variano le dimensioni, si possono modificare proprietà quali solubilità, trasparenza, colore, lunghezza d'onda di assorbimento o emissione, conduttività, punto di fusione e comportamento catalitico.
- **Superficie:** caratteristiche differenti di superficie portano a una diversa capacità di dispersione, conduttività, comportamento catalitico e a una modifica delle proprietà ottiche. Il legame di peptidi o altre molecole alla superficie di nanomateriali (la cosiddetta "funzionalizzazione"), consente di diminuire l'aggregazione, oppure può rendere selettivo il legame con altri materiali.

Tutti questi parametri devono essere controllati quando si pensa all'applicazione finale del NMs.

I NMTs ingegnerizzati possono essere creati attraverso due approcci fondamentali: *bottom up* (dal basso verso l'alto) e *top down* (dall'alto verso il basso) (fig.2).



**Figura 2:** Rappresentazione delle procedure di Top-Down e Bottom-Up.

L'approccio *bottom up* si riferisce alla capacità di assemblare il materiale nanostrutturato partendo dalle nanoparticelle che lo costituiranno. In biologia, chimica e fisica, si utilizza per lo più questo tipo di approccio. Il metodo *top down* consiste, invece, nella costruzione di micro e nanostrutture a partire dal blocco massivo di materiale (*bulk*) con tecniche che riducono le dimensioni delle strutture iniziali attraverso metodi fisici, portandole a livello micro/nanometrico <sup>[6]</sup>.

Le procedure di fabbricazione dei sistemi nanostrutturati dipendono dalla natura degli oggetti elementari che li compongono e, pertanto, le nanostrutture possono essere classificate sulla base dei rispettivi componenti di base quali atomi, molecole inorganiche, composti metallorganici, oppure molecole organiche e punti quantici.

Generalmente è possibile classificare i nanomateriali in relazione al numero di dimensioni nanometriche che presentano; esistono infatti:

- strutture zerodimensionali (*quantum dot*), in cui tutte le dimensioni sono in scala nanometrica (nanoparticelle, ossidi, metalli, semiconduttori, fullereni, ecc.);
- strutture monodimensionali (*quantum wire*), con una sola dimensione finita come i nanofili (*nanowire*), i *nanorod* o i nanotubi di carbonio;
- strutture bidimensionali (*quantum well*), con sole due dimensioni finite, come i film sottili (*monolayer, multilayer, Self-Assembled Monolayer, ecc.*);
- strutture tridimensionali come i nanocompositi (ibridi organici-inorganici, micro e mesoporosi, ecc.), che presentano le tre dimensioni finite.

## 2.1 Nanomateriali di carbonio

I nanomateriali di carbonio sono composti principalmente da carbonio, solitamente nella forma di sfere vuote, ellissoidi o tubi. Nel 1985, il chimico americano Richard E. Smalley ha scoperto che, in particolari situazioni, gli atomi di carbonio compongono delle strutture ordinate di forma sferica, con dimensioni dell'ordine del nanometro: le molecole di fullerene. Studi rivolti ai nanomateriali di carbonio hanno portato alla scoperta e allo sviluppo dei nanotubi di carbonio. I nanotubi di carbonio sono costituiti da fogli di grafite (atomi di carbonio disposti in piani paralleli) arrotolati in modo da assumere una struttura cilindrica. Il diametro di un nanotubo è compreso tra 0,7 e 30 nm (oggetti più grandi vengono chiamati nanofibre di carbonio). L'elevatissimo rapporto tra lunghezza e diametro (nell'ordine di  $10^4$ ) consente di considerarli come delle nanostrutture virtualmente monodimensionali.

I nanotubi di carbonio riscuotono un notevole interesse grazie alla loro resistenza meccanica e delle loro proprietà elettriche<sup>[8]</sup>. Negli ultimi dieci anni, le proprietà fisiche e chimiche dei fullereni sono state un argomento di punta nel campo della ricerca e dello sviluppo, e probabilmente occuperanno questo posto ancora per molto tempo. Queste particelle hanno diverse applicazioni potenziali nel campo dell'elettronica. Inoltre, la possibilità di riempire i nanotubi e i fullereni di farmaci, e di funzionalizzarli esternamente con peptidi antigenici, può portare allo sviluppo di sistemi innovativi di trasporto selettivo e controllato, applicabili nelle terapie basate sul *drug delivery*. Nell'aprile del 2003, infatti, i fullereni cominciarono ad essere studiati anche dal punto di vista medico: sono stati creati legami tra specifici antibiotici e le strutture particolarmente resistenti presenti sulla parete dei batteri; e si è riusciti, perfino, ad avere attività di *targeting* per specifiche cellule tumorali come i melanomi<sup>[9]</sup>.

## 2.2 Le nanoparticelle

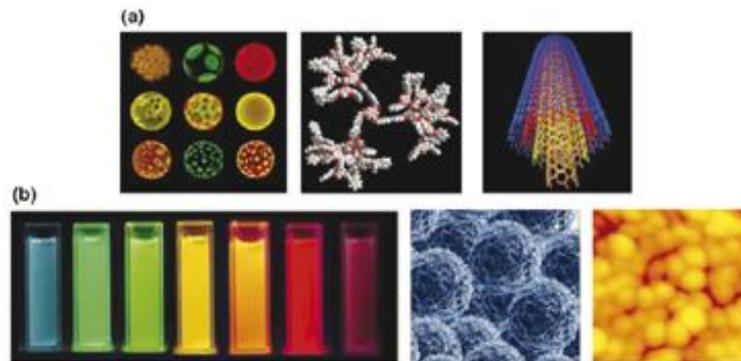
Le nanoparticelle (NPs) sono definite come dispersioni particolate o particelle solide, il cui "range" di dimensioni varia da 1-300 nm. Le NPs possono essere formate da vari materiali e assumere forme regolari (tubulari, sferiche o filamentose) o irregolari. Inoltre, possono esistere allo stato disperso o in forma fusa, aggregata o agglomerata<sup>[10-11]</sup>. Caratteristica comune delle NPs è di possedere proprietà e caratteristiche differenti da quelle della specie chimica parentale<sup>[11]</sup>. Tali proprietà sono attribuibili sia all'effetto quantico che all'aumento della superficie per unità di massa, e ciò implica una maggiore reattività chimica, una maggiore resistenza e conducibilità elettrica e, potenzialmente, una più accentuata attività biologica. L'aumento della superficie nanoparticellare è responsabile del cambiamento della reattività, la quale cresce considerevolmente al diminuire delle dimensioni. Mentre l'effetto quantico si osserva per particelle nell'ordine di pochi nm (al massimo 10 nm) ed induce un cambiamento nelle proprietà fotoniche, elettriche, meccaniche, magnetiche, chimiche, biologiche e strutturali<sup>[12]</sup>.

Grazie alla possibilità di ingegnerizzare la superficie o il core di questi sistemi, le proprietà delle NPs possono essere modulate per applicazioni multifunzionali. In medicina, per esempio, trovano crescente applicazione in ambiti quali la chemioterapia, la radioterapia, la termoterapia, *il bioimaging*, la terapia fotodinamica e antiangiogenica.

Esistono varie tipologie di nanoparticelle, ognuna delle quali presenta determinate caratteristiche in base alla loro diversa natura<sup>[13]</sup>. Le NPs possono essere preparate con

polimeri o materiali organici (nanoparticelle organiche) e/o con elementi inorganici (nanoparticelle inorganiche) (Fig.3).

Tra le nanoparticelle inorganiche vi sono: quantum dots, nanoparticelle magnetiche, ceramiche e metalliche; queste possiedono un core centrale costituito di materiale inorganico che definisce le proprietà fluorescenti, magnetiche, elettroniche e ottiche. Mentre, tra le nanoparticelle organiche troviamo liposomi e micelle, dendrimeri, nanoparticelle polimeriche e nanogels<sup>[14]</sup>.



**FIGURA 3:** Esempi di nanoparticelle (a) Nanoparticelle organiche. Da sinistra verso destra: liposomi, dendrimeri e nanotubi di carbonio. (b) Nanoparticelle inorganiche. Da sinistra verso destra: quantum dots, nanoparticelle magnetiche e nanoparticelle d'oro.

### 2.2.1 Le nanoparticelle inorganiche

Negli anni 2000 la ricerca applicata ai materiali nano strutturati ha portato allo sviluppo di diverse tipologie di nanocompositi, con matrice inorganica (cementizia o vetrosa) alla quale, attraverso processi chimici, vengono legate nanopolveri o nanoparticelle anch'esse a base inorganica (ossidi metallici o ceramica) o organica (carbonio). Le nanoparticelle inorganiche includono i quantum dots, nanogold, nanosilver e ossidi di metalli come il diossido di titanio.

Un quantum dot è un cristallo semiconduttore altamente impaccato da centinaia o migliaia di atomi, e le cui dimensioni sono nell'ordine di alcuni nanometri (da 1 a 100nm). Al variare delle dimensioni dei quantum dots, variano le loro proprietà ottiche, e in genere vengono utilizzati per la loro capacità di emettere fluorescenze diverse<sup>[15]</sup>.

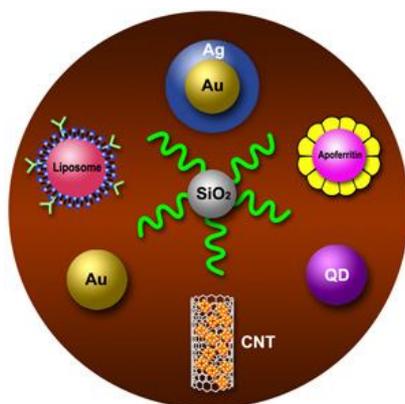
#### - Nanoparticelle metalliche

Le proprietà fisiche di una nanoparticella metallica, come la risposta ottica, differiscono significativamente da quelle che si possono osservare su scala macroscopica, in quanto si trovano a metà tra quelle di un solido e quelle di una singola molecola. Gli effetti della

riduzione delle dimensioni sulle proprietà elettroniche, compaiono quando le dimensioni della nanoparticella diventano comparabili o inferiori rispetto al cammino libero medio degli elettroni quasi liberi all'interno del metallo. Infatti, alle dimensioni "nano", le collisioni elettrone-superficie non possono più essere trascurate rispetto ad altri processi di interazione (collisioni elettrone-elettrone e collisioni elettrone-fonone)<sup>[16]</sup>. La risposta degli elettroni quasi liberi è perciò modificata dall'interazione con la superficie e variano in base alla forma, dimensioni, proprietà ottiche e proprietà elettromagnetiche. Il loro utilizzo si basa sul fatto che quando una nanoparticella metallica viene colpita dalla luce, il campo elettrico oscillante induce il movimento degli elettroni di conduzione; per cui quando si verifica l'assorbimento fotonico, si hanno fenomeni ottici particolari.

I metalli più utilizzati per la creazione di nanoparticelle sono i metalli nobili come oro, argento o rame e hanno solitamente un diametro prossimo ai 100 nm<sup>[17]</sup>.

Tra le MNPs, le nanoparticelle d'oro sono particolarmente studiate, poiché mostrano uno spettro ottico di risonanza nel range del visibile, che dipende dalla dimensione, dalla forma e dal mezzo in cui si trovano. Nanoparticelle d'oro rivestite con acidi nucleici sono state utilizzate per la tecnica biolistica, ossia un metodo di trasformazione genica applicato nel campo della biologia vegetale<sup>[17]</sup>.



**Figura 4.** Alcuni esempi di nanoparticelle metalliche (oro, argento, silicio), quantum dots, nanoparticelle coniugate all'apoferritina, altre che fungono da semiconduttori e nanotubi di carbonio caricati con enzimi (CNT) che possono essere utilizzati per amplificare i segnali di biomarcatore.

Altri tipi di MNPs sono:

- nanoparticelle d'argento la cui applicazione è legata alle loro proprietà antimicrobiche e antifunginee, nella produzione di nanofluidi antibatterici
- nanoparticelle di platino, palladio e rodio usate come catalizzatori<sup>[16]</sup>
- nanoparticelle magnetiche che grazie alle loro proprietà sono usate come agenti di contrasto nell'MRI e per la funzionalizzazione di superficie per il *targeting in vivo* e la diagnosi<sup>[16]</sup>.

## 2.2.2 Le nanoparticelle organiche

Passando dal campo inorganico al campo organico, un tipo di nanoparticelle su cui la ricerca si è concentrata solo negli ultimi anni, ma che risultano fortemente promettenti in diversi ambiti, come il medicale, sono le nanostrutture totalmente organiche. Esse hanno le peculiarità di essere costituite essenzialmente da materiali “*soft*” come polimeri o piccole molecole e, quindi, di avere potenzialmente tossicità minore rispetto alle nanoparticelle costituite da metalli o semiconduttori. Esistono numerosi tipi di nanoparticelle organiche, tra cui si possono annoverare ad esempio le nanoparticelle polimeriche, le nanoemulsioni (sistemi micellari), i nanodots organici, i nano aggregati (fig. 5). I nanodot sono nanostrutture in cui i cromofori, di uno o più tipi, sono legati covalentemente ad una struttura dendrimerica. Il loro vantaggio è quello di poter avere struttura, numero di cromofori e grandezza controllati ma, di contro, la sintesi può risultare molto lunga e dispendiosa<sup>[18]</sup>.

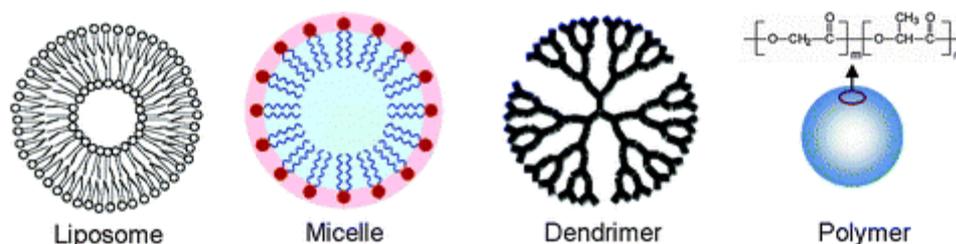
### **-Liposomi e micelle**

I liposomi sono vescicole fosfolipidiche (50–100 nm) che si generano attraverso il *self-assembly* di lipidi anfifilici ed eccipienti. I lipidi formano un *bilayer* basato su interazioni idrofobiche che avvengono in parallelo lungo una superficie continua, con le teste idrofiliche disposte sul versante acquoso. In genere vengono utilizzati come *carriers* in cui le molecole idrofiliche possono essere incapsulate nella fase acquosa interna, mentre le molecole idrofobiche trasportate nel *bilayer* lipidico. I liposomi sono classificati in base alle loro dimensioni e numero di layer in multi, oligo o uni-lamellari. Le proprietà chimico-fisiche dei liposomi possono essere accuratamente modificate semplicemente mescolando molecole lipidiche diverse, variando la carica superficiale, la funzionalità e la dimensione. Questo offre un vantaggio rispetto agli altri *nanocarriers* che richiedono un controllo maggiore negli steps di sintesi e successive modifiche chimiche addizionali. Generalmente, i liposomi approvati dalla FDA sono costituiti da lipidi di origine naturale; alcuni esempi sono il lipide 1,2-distearoil-glicerolo-3-fosfoetanolamina, la fosfatidil-colina idrogenata, il fosfatidil-glicerolo dal tuorlo d'uovo e la 1,2-distearoil-glicerolo-3-fosfocolina. Ognuno di questi lipidi può essere coniugato con il PEG (Poli etilen-glicole), che in genere viene usato per funzionalizzare la superficie dei liposomi. I liposomi sono ideali per accogliere al loro interno molecole idrofiliche, come proteine e acidi nucleici e subire modificazioni a livello superficiale al variare del pH della soluzione in cui si trovano

(variazione del potenziale  $\zeta$ ). Questa capacità viene sfruttata dai sistemi di *drug delivery* in quanto, in seguito alla fusione con la membrana plasmatica cellulare, i liposomi che si vanno a localizzare all'interno degli endosomi, rilasciano l'agente terapeutico in risposta ad una variazione del pH.

I liposomi possiedono il vantaggio di essere soggetti a una buona biodistribuzione all'interno dell'organismo, ma una scarsa capacità d'incapsulamento di farmaci (*drug loading*). Un altro svantaggio è l'interazione con le HDL e LDL plasmatiche, con conseguente scambio di componenti lipidici e variazioni dimensionali significative e non facilmente prevedibili. Inoltre, i liposomi sono associati a numerosi effetti negativi dovuti al loro accumulo nei tessuti<sup>[19]</sup>.

Per migliorare l'applicazione dei liposomi nel campo del *drug delivery*, recentemente, sono state inserite molecole con gruppi amminici che destabilizzano il *bilayer*, per massimizzare il rilascio del farmaco. Oltre ai liposomi, come strutture lipidiche, troviamo le micelle che sono composte da lipidi o molecole anfifiliche, che si auto-assemblano formando delle vescicole con un core idrofobico. Le micelle sono utilizzate per trasportare numerose tipologie di farmaci lipofili. Entrambe le classi di nanoparticelle risultano essere biocompatibili e biodegradabili<sup>[20-22]</sup>.



**Figura 5.** Struttura di nanoparticelle di tipo organico : Liposomi, micelle, dendrimeri e nanoparticelle polimeriche polimeriche.

### **-Dendrimeri**

I dendrimeri sono polimeri sintetici altamente ramificati con un'architettura a strati costituita da tre parti: un nucleo (core) polifunzionale, delle unità ramificanti e i gruppi funzionali superficiali, che ne determinano le caratteristiche. I dendrimeri sono prodotti attraverso condensazioni ripetitive della stessa unità ramificata, il che li rende strutture altamente regolari. Per la loro sintesi, vengono fatti reagire una diammina (comunemente etilendiammina) con acrilato di metile. La formazione dei dendrimeri parte da un core centrale che funge da centro di nucleazione. Le ramificazioni che partono da un unico ramo ancestrale formano una struttura definita dendrone, ogni ramificazione successiva è

detta generazione (GN). Il dendrimero è l'associazione di più dendroni. Il core centrale presenta una porosità maggiore rispetto alla porzione periferica. Infatti, le macromolecole o i farmaci da veicolare vengono caricati a livello della porzione centrale. La cinetica di rilascio dei farmaci è controllata attraverso le specifiche proprietà delle catene polimeriche. Per decenni sono stati considerati come sottoprodotti insolubili della formazione dei polimeri, mentre negli anni '70 sono diventati oggetto di numerose linee di ricerca. Tali strutture, infatti, possono essere funzionalizzate con *linkers* specifici e vengono stabilizzate con PEG per non subire l'attacco dai macrofagi. Grazie alla loro architettura tridimensionale, i dendrimeri possono essere usati come *scaffolds* per la rigenerazione tissutale<sup>[21]</sup>.

### **-Nanoparticelle polimeriche**

Le nanoparticelle polimeriche (PNPs) sono definite come particelle solide con una dimensione che varia dai 10 ai 300 nm. Le PNPs, grazie alle loro proprietà chimico-fisiche, alle loro dimensioni e alla loro biocompatibilità, risultano essere degli ottimi candidati come *carriers* in campo biomedico e farmacologico (nella terapia del cancro, nel campo dei vaccini, dei contraccettivi e degli antibiotici). I polimeri usati nella preparazione delle nanoparticelle devono essere compatibili con il corpo umano in termini di non-tossicità e non-antigenicità, e devono essere biodegradabili<sup>[22]</sup>.

I polimeri naturali più usati nella preparazione delle nanoparticelle sono il chitosano, la gelatina, il sodio alginato e l'albumina. Mentre, i polimeri sintetici più utilizzati sono l'acido polilattico (PLA), l'acido polilattico-co-glicolico (PLGA), il poly(N-vinyl pyrrolidone) (PVP), il PEG, il Poli-caprolattone, il Poli (metil-metacrilato), l'Acido poli-acrilico e la Poliacrilamide. L'acido polilattico (PLA) e il polilattico-co-glicolico (PLGA) sono i candidati molto promettenti, infatti sono largamente usati in drug delivery, grazie alla loro biocompatibilità e alla loro capacità di dissolversi lentamente in soluzione acquosa, motivo per cui sono stati approvati dalla FDA per l'iniezione parenterale<sup>[23]</sup>.

In base al metodo di preparazione si possono ottenere nanosfere o nanocapsule. Le nanocapsule sono sistemi in cui il farmaco è confinato in una cavità circondata da un'unica membrana polimerica, mentre le nanosfere sono sistemi la cui matrice racchiude il farmaco, uniformemente disperso.

Le PNPs, intese come veicoli per il *drug delivery*, sono facilmente manipolabili per ottenere *carriers* con capacità di rilascio del farmaco *sito-specifico*, comportando un miglioramento nella sicurezza relativa all'uso di farmaci specifici, come i chemioterapici.

Numerosi sono i vantaggi che si riscontrano nell'uso delle PNPs:

- Aumento della stabilità degli agenti farmaceutici.
- Miglioramento rispetto alle tradizionali vie di somministrazione (orale e intravenosa) in termini di efficienza ed efficacia.
- Rilascio di concentrazioni maggiori del farmaco nel sito specifico desiderato.

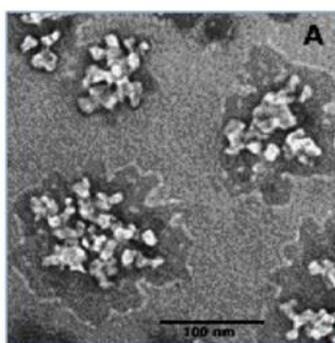
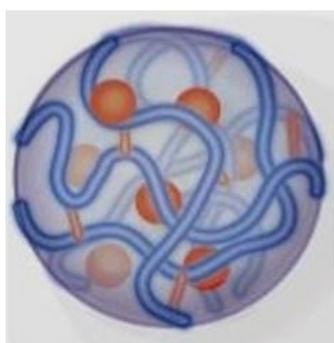
### 3. I nanogels

I nanogels sono degli idrogels di dimensioni nanometriche, composti da catene polimeriche che si dispongono a dare un network, in grado di assorbire e ritenere al loro interno quantità elevate di soluzione acquosa (capacità di rigonfiarsi o "*swelling*") (Fig. 6). La capacità di idratarsi è data dalla presenza di gruppi basici o acidi a livello delle catene polimeriche, che favoriscono la ritenzione delle molecole d'acqua nelle regioni interne<sup>[24]</sup>. Le dimensioni dei nanogels variano da pochi nanometri fino a 300 nm. È dimostrato che la forma del nanogel è determinata dall'equilibrio tra la pressione osmotica, esercitata dalla soluzione in cui il nanogel è immerso, e la forza elastica del polimero stesso<sup>[25]</sup>. I nanogels permangono nel loro stato rigonfio grazie al *cross-link* tra i polimeri. Questo processo di reticolazione del polimero in soluzione (*cross-linking*), che porta alla formazione di compartimenti permanenti rigonfi di acqua (pori), non è spontaneo ma può essere innescato da agenti esterni. Generalmente i nanogels sono preparati attraverso una sintesi chimica, chiamata micro-emulsione inversa. Tale tecnica si serve di due diversi approcci: la polimerizzazione *in situ* e la dispersione di un polimero preformato. Nella prima tecnica, il monomero è emulsionato con molecole di tensioattivo che stabilizzano, in soluzione acquosa, le microgocce di monomero che si formano. Introducendo un iniziatore radicalico viene fatta iniziare la reazione di polimerizzazione che è molto rapida, ma al contempo comporta alcuni svantaggi come la bassa resa quantitativa e una sintesi laboriosa e poco sicura. Durante la sintesi chimica, infatti, il controllo dimensionale è reso possibile grazie all'uso di surfattanti, solventi organici, catalizzatori e iniziatori radicalici che difficilmente vengono allontanati dalla miscela finale<sup>[26]</sup>. Una possibile soluzione a questo problema è l'uso di dispersioni di polimeri preformati che comportano una

maggior semplicità operativa, che però prevede sempre l'utilizzo di solventi organici e ricorre ad alte temperature. Ciò rende la tecnica non idonea alla sperimentazione con farmaci termosensibili.

La rete polimerica può essere costituita da omopolimeri o copolimeri.

I nanogels possono essere classificati in base alla composizione chimica, in sintetici, naturali e ibridi (ossia che contengono sia componenti naturali che sintetiche)<sup>[27]</sup> e in base alla carica superficiale in neutri, anionici o cationici.



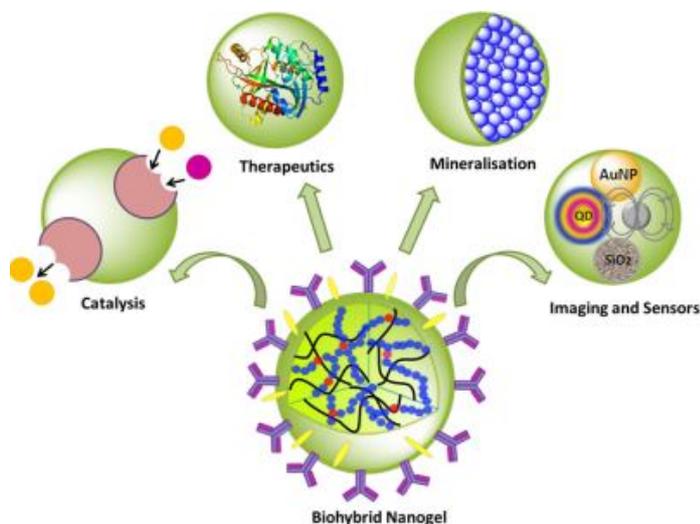
**Figura 6:** Rappresentazione di un nanogel. Nell'immagine a sinistra le strutture in arancio rappresentano i cross-link esistenti tra la rete polimerica (in blu). A destra immagine al TEM di nanogels. Scale bar 100 nm.

Per oltre cinquant'anni, gli idrogels sono stati usati in applicazioni biomediche, in oftalmologia come lenti a contatto, in chirurgia come suture riassorbibili così come in altre aree della pratica clinica per curare malattie come il diabete mellito, l'osteoporosi, l'asma, malattie cardiache e neoplastiche. Il primo idrogel con applicazione biomedica è stato sintetizzato nel 1955 dal Professor Lim e dal Professor Wichterle (Praga). Questo idrogel era composto da Poli-2-idrossietil metacrilato, usato subito dopo la sua scoperta nella produzione di lenti a contatto. Il vantaggio principale di questo materiale rivoluzionario consiste nella sua straordinaria stabilità in condizioni variabili di pH, temperatura e tonicità del fluido<sup>[27]</sup>.

Il caricamento delle molecole biologiche, nella rete polimerica interna, può avvenire spontaneamente, attraverso interazioni di tipo idrofobico, elettrostatico e di Van-der-Waals, che s'instaurano tra la molecola e la matrice polimerica stessa. Inoltre i gruppi funzionali sulla superficie dei nanogels (generalmente gruppi -OH, -CONH-, -CONH<sub>2</sub>) possono essere modificati per la coniugazione con varie molecole, quali proteine, acidi nucleici e farmaci<sup>[28]</sup>.

Inoltre, l'estrema flessibilità strutturale dei nanogels, li rende capaci di penetrare attraverso piccoli pori o canali e di generare, quindi, una bassissima frizione sulle superfici biologiche. Infatti, i nanogels trovano applicazione come *nanocarriers* nel campo del *drug*

*delivery*. Ciò è dovuto anche ad un'alta stabilità, alla responsività a fattori ambientali quali forza ionica, pH e temperatura, all'elevata capacità di *loading* e protezione delle biomolecole trasportate dalla degradazione metabolica cellulare. Inoltre, nel caso della somministrazione per via orale, i nanogels potenziano la biodisponibilità dei farmaci a basso peso molecolare [26-28].



**Figura 7.** Lo schema mostra i recenti sviluppi nel campo dei nanogels che hanno portato allo sviluppo di sistemi bioibridi che trovano diverse applicazioni, che vanno dalle terapie innovative alla catalisi.

Il successo nell'utilizzo dei nanogels, come *nanocarriers* in campo biomedico, è dovuto ai vantaggi unici offerti da questi sistemi, rispetto ad altre tipologie di nanoparticelle. Alcuni di questi sono: l'ampia superficie flessibile disponibile a una bioconiugazione multivalente, un ambiente interno acquoso per incorporare e proteggere le biomolecole, la possibilità di intrappolare un core metallico o minerale per il *bioimaging*, o ancora la capacità di risposta agli stimoli esterni per avere un controllo temporale e spaziale del rilascio del carico trasportato (fig. 7). Infatti, i nanogels possono essere progettati in modo da renderli "intelligenti", ossia capaci di rispondere a cambiamenti dell'ambiente esterno<sup>[27]</sup>. Possiamo avere:

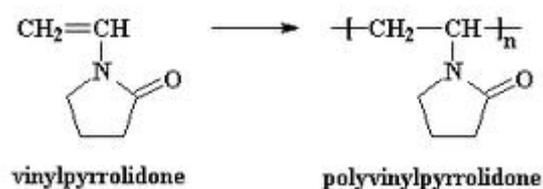
- Nanogels sensibili alla temperatura
- Nanogels complessanti
- Nanogels sensibili a reazioni chimiche o enzimatiche
- Sistemi che rispondono a campi magnetici

I materiali che possono essere usati per formare idrogel sono molto vari, alcuni di questi sono i polimeri sintetici come l'acido poliacrilico (PAA), il poly(N-vinyl pyrrolidone) (PVP),

il polivinyl-alcol (PVA) e i polipeptidi. Tra i polimeri naturali da cui si possono ricavare idrogels ci sono l'alginato, il chitosano, il collagene, la fibrina e l'acido ialuronico (HA). Gli idrogels sintetici sono molto utilizzati in quanto le loro proprietà chimiche sono facilmente controllabili e riproducibili. I polimeri sintetici possono essere prodotti con pesi molecolari specifici, strutture a blocchi, legami degradabili e, proprio queste proprietà, determinano le dinamiche di formazione del gel, la densità dei legami crociati e le proprietà meccaniche e di degradabilità del materiale. Gli idrogels derivati da polimeri naturali sono spesso utilizzati in applicazioni di ingegneria tissutale in quanto possiedono componenti o proprietà macromolecolari simili all'ECM naturale<sup>[29]</sup>.

### 3.1 Nanogels in Poly(N-vinyl pyrrolidone) prodotti tramite $\beta$ -irraggiamento

Il poly(N-vinyl pyrrolidone) (PVP) è un polimero sintetizzato dalla polimerizzazione di radicali liberi dell' N-vinylpyrrolidone (fig. 8) in acqua o in alcoli con l'aggiunta di opportuni catalizzatori. Le catene del polimero contengono gruppi idrofilici che conferiscono al PVP una solubilità quasi totale sia in solventi idrofili che idrofobici, rendendolo particolarmente versatile ed indicato per la formazione di idrogels ad elevato grado di biocompatibilità<sup>[30]</sup>.



**Figura 8.** Struttura chimica dell'N-vinyl pyrrolidone e del Poly(N-vinyl pyrrolidone).

Il processo che porta alla formazione dell' idrogel non è spontaneo ma può essere innescato da agenti esterni.

Recentemente è stato sviluppato un sistema di sintesi alternativo che prevede l'utilizzo di mezzi fisici, come le radiazioni ionizzanti che permettono la formazione di specie radicaliche in soluzione, che favoriscono il cross-link tra le catene polimeriche. Questi sistemi prevedono l'utilizzo di acceleratori di particelle lineari affinché si abbia l'irraggiamento  $\gamma$ , l'irraggiamento UV e il  $\beta$ -irraggiamento.

Mediante  $\beta$ -irraggiamento si ha la polimerizzazione fisica, regolando diversi parametri come temperatura, pressione, volume, forza ionica della soluzione, in modo tale che si abbiano processi che portano alla formazione di interazioni ioniche e idrofobiche. Queste

procedure sono molto convenienti poiché permettono la reticolazione senza aggiunta di agenti chimici <sup>[31]</sup>. Le “radiazioni  $\beta$ ” consistenti in fasci di elettroni ad elevata energia. Tali radiazioni ionizzanti sono più energetiche delle radiazioni  $\alpha$ , ma meno energetiche delle radiazioni  $\gamma$ . Sono quindi radiazioni di lieve/moderata energia, sufficiente per la formazione dei radicali necessari alla polimerizzazione. Per l'applicazione di tale tecnica, le molecole reagenti vengono preventivamente saturate con ossido nitroso per incrementare la concentrazione di radicali idrossilici che si formano durante la radiolisi dell'acqua che genera durante l'irraggiamento. Nello specifico, i parametri dell'irraggiamento per la creazione di nanoparticelle permettono la formazione di radicali  $\text{OH}\cdot$  e  $\text{H}\cdot$  che destabilizzano il monomero e le altre molecole presenti in soluzione causando il cross-linking. La tecnica del  $\beta$ -irraggiamento è la sola in grado di dare sterilità ai materiali ottenuti, questa è una condizione essenziale per l'utilizzo dei nanomateriali in ambito biomedico. Ciò è dovuto alla capacità delle radiazioni di diminuire quindi la carica microbica, danneggiando le strutture e molecole cellulari.

Un altro aspetto innovativo di questa tecnica sta nella possibilità di ottenere nanogels che presentano una funzionalizzazione superficiale data dalla presenza di gruppi chimici reattivi, in quanto le molecole funzionalizzanti vengono aggiunte alla soluzione contenente il monomero, prima dell'irraggiamento<sup>[31]</sup>. Inoltre, modificando le condizioni d'irraggiamento è possibile ottenere particelle con il  $D_h$  (diametro idrodinamico) desiderato<sup>[32]</sup>.

In ambito farmaceutico, il PVP trova numerose applicazioni; infatti viene utilizzato come eccipiente, come stabilizzante, come agente di rivestimento (in alternativa al PEG) e come materiale d'idrofilizzazione. In soluzione risulta stabile per lungo tempo, senza subire fenomeni di degradazione e tale stabilità lo rende adatto alla veicolazione dei farmaci nell'organismo.

Mentre, in ambito biomedico, il PVP è considerato il migliore sostituto del plasma sanguigno e viene usato in casi di shock ipovolemico<sup>[30]</sup>. È stato dimostrato che il PVP non è assorbito lungo il tratto gastrointestinale o nelle mucose, se non in piccolissime quantità per pinocitosi. Inoltre, possiede una serie di peculiarità che gli permettono di non essere metabolizzato e di non causare alcuna sensibilizzazione né tossicità; inoltre non è mutageno e teratogeno.

Il PVP è, infatti, presente nella lista delle sostanze approvate dal FDA, per uso biomedico. Il PVP è un materiale igroscopico, ovvero ha la proprietà di assorbire il vapore acqueo

(umidità) dell'atmosfera<sup>[30]</sup>. Tale caratteristica, influenza la capacità di adesione del PVP nei confronti dei materiali farmaceutici idrofobici o idrofilici.

#### **4.Nanocarriers nel “drug delivery system”**

In ambito medico-farmaceutico, i “drug delivery systems” sono quei sistemi in grado di rilasciare farmaci in maniera controllata, ossia con velocità di rilascio programmate, con dosi ben precise, per periodi di tempo predefiniti e in luoghi specifici.

Le motivazioni che sono alla base del crescente interesse per questi sistemi sono legate alla necessità di trovare soluzioni alternative rispetto alle convenzionali terapie impiegate nel trattamento di diverse patologie.

Nonostante i notevoli passi avanti fatti in questo campo nell'ultimo decennio, l'adeguato trattamento di patologie, quali il tumore, rimane legato all'individuazione di materiali ad elevato grado di biocompatibilità e in grado riconoscere e rilasciare il farmaco nel nostro organismo, in modo da minimizzare gli effetti collaterali. In molti casi, infatti, il sistema di rilascio deve svolgere la sua funzione in risposta alle condizioni fisiologiche del sito specifico (*site specifying-targeting*), modulando i tempi di rilascio (*temporal modulation*), in dipendenza delle variabili fisiche dell'ambiente che lo circonda<sup>[33]</sup>.

I sistemi convenzionali di somministrazione (parenterale, orale, cutanea o topica) soffrono di limitazioni farmaco-cinetiche, ovvero non vi è sincronia tra il tempo richiesto affinché la concentrazione del principio attivo raggiunga il valore soglia utile ai fini terapeutici, ed il profilo di rilascio del farmaco che segue meccanismi diffusionali.

In tal modo, il farmaco si distribuisce più o meno estesamente a livello sistemico e pertanto, affinché venga raggiunta una concentrazione di farmaco efficace nel sito d'azione per il periodo di trattamento terapeutico, è necessaria la somministrazione in dosi elevate e ripetute con il conseguente instaurarsi di effetti tossici secondari<sup>[34]</sup>.

Il “*drug targeting*”, definito come la capacità di trasportare in modo selettivo e quantitativo un farmaco nel sito d'azione indipendentemente dal compartimento e dal metodo di somministrazione, rappresenta una soluzione a queste problematiche.

Questo approccio ha trovato uno sviluppo di particolare interesse nell'ambito delle biotecnologie che hanno permesso di produrre farmaci ad elevata selettività funzionale quali anticorpi, citochine, enzimi.

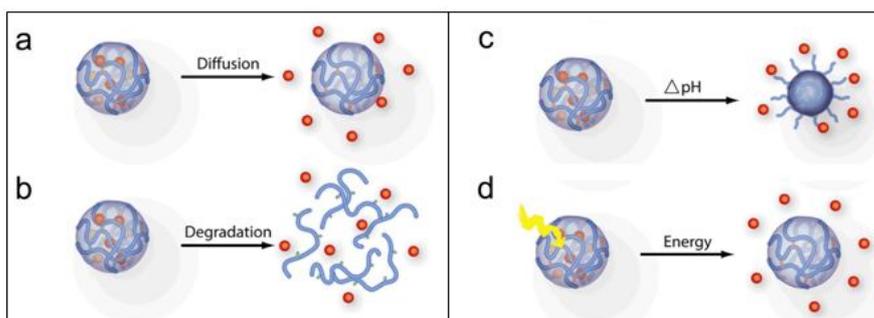
Il *drug delivery system* può avvenire attraverso il coordinamento di tre componenti essenziali:

1. farmaco;
2. molecola *targeting*;
3. nanocarrier;

riuniti in un unico prodotto in grado di trasportare e rilasciare in modo selettivo i farmaci nel sito d'azione ed allo stesso tempo, amplificare il numero di molecole di farmaco associate ad ogni singola molecola *targeting*, aumentando l'efficacia terapeutica. Da questo concetto di base sono stati sviluppati numerosi sistemi di *drug delivery* molto più sofisticati e complessi. Tali sistemi sono formati da strutture colloidali, multifunzionali quali: liposomi, micelle, dendrimeri, nanoparticelle polimeriche e metalliche, nanotubi, bioconiugati polimerici, nanogels.

I nanogels polimerici sono stati riconosciuti, fin dagli anni '50, come i sistemi più adatti a svolgere la funzione di rilascio "intelligente"; infatti, il loro elevato grado di biocompatibilità, unito ad una particolare sensibilità alle variazioni quali temperatura, pH e forza ionica, li rende dei candidati ideali per la soluzione di diverse problematiche in ambito medico. La sperimentazione di sistemi basati sui nanogels ha come primo obiettivo quello di individuare quali matrici polimeriche sono in grado di preservare la funzionalità delle molecole proteiche utilizzate nelle terapie mediche.

Per quanto riguarda le caratteristiche superficiali, i nanosistemi possono essere modificati in superficie, ricoperti (*coated*) o decorati (*decorated*) in modo da conferire loro caratteristiche di biocompatibilità o di elusione dei sistemi biologici di riconoscimento (come dal sistema reticolo-endoteliale, RES), oppure derivatizzati con ligandi biologici per il direccionamento attivo.



**Figura 9:** Metodi di rilascio di biomolecole da nanogel: (a) per diffusione passiva, (b) per biodegradazione, (c) per variazione di pH, (d) per somministrazione di energia esterna.

I meccanismi di rilascio controllato possono essere ottenuti in specifici microambienti, sfruttando variazioni di pH, temperatura, enzimi, forza ionica, potenziale redox oppure tramite manipolazione esterna mediata da campi elettrici, campi elettromagnetici o

ultrasuoni <sup>[35]</sup>(fig.9). Nel caso di nanoparticelle polimeriche, la struttura stessa del reticolo può variare sotto specifici stimoli, determinando il rilascio del farmaco <sup>[22]</sup>.

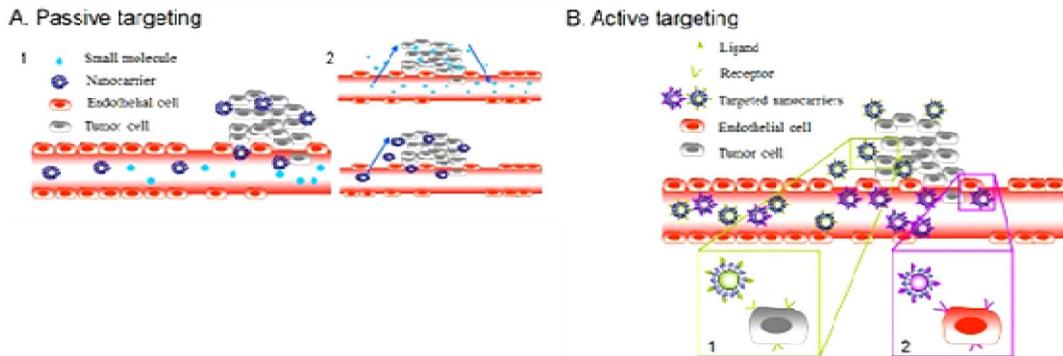
In particolare, i tessuti tumorali solidi presentano alcune peculiari caratteristiche fisiopatologiche che possono essere opportunamente sfruttate per la veicolazione e il rilascio selettivo di farmaci. Le cellule tumorali spesso sovraesprimono specifici recettori di membrana ed hanno un potenziale redox e un corredo enzimatico alterati. Nelle neoplasie si riscontrano in genere elevati livelli di molecole danneggiate dai componenti ossidanti prodotti dal metabolismo del tumore come basi azotate ossidate e lipidi perossidati <sup>[36]</sup>. Inoltre, a causa dell'elevato metabolismo, i tumori solidi presentano le tipiche caratteristiche di un tessuto infiammato con una temperatura superiore e un pH inferiore rispetto ai tessuti sani. I sistemi scavenger e la glutazione perossidasi non sono adeguati a tenere sotto controllo tali eventi. Sebbene le vie biochimiche che regolano lo stress ossidativo delle cellule tumorali non siano ancora state chiarite, in letteratura è stato dimostrato un aumento della concentrazione citosolica del glutathione(10mM), nella sua forma ridotta, rispetto sia quella di cellule sane che a quella dell'ambiente extracellulare e dei fluidi corporei ( in cui è presente in concentrazioni micro molar).

Nanoparticelle funzionalizzate dalla presenza di gruppi tiolici hanno suscitato particolare interesse e sono state utilizzate per il rilascio controllato, in ambiente riducente, sfruttando la differenza di potenziale redox tra il mezzo extracellulare ossidante e i fluidi intracellulari riducenti <sup>[37-38]</sup>.

#### **4.1 Il Targeting**

Il concetto di *targeting* nei sistemi di *drug delivery* è basato sull'uso di *nanocarrier* che trasportano il farmaco selettivamente al sito d'azione. La scelta del *bersaglio* da usare nella strategia del *drug targeting* dipende, innanzitutto, dal tipo di cellule che devono essere raggiunte e bersagliate, ma anche dal tipo di farmaco che deve essere veicolato e, se necessario, rilasciato. La strategie di direzionamento verso un sito bersaglio per le patologie, come quelle tumorali che creano masse solide, può essere attiva oppure passiva (fig. 10). Il targeting attivo è basato sul riconoscimento tra nanosistemi funzionalizzati con ligandi specifici (anticorpi, piccole molecole, citochine) che possiedono elevata affinità per un recettore espresso esclusivamente o in prevalenza nel sito patologico. Il targeting attivo può essere di tipo chimico-fisico, nel caso di sistemi

intelligenti che rispondono ad anormali valori di pH e/o temperatura del tessuto tumorale.



**Figura 10.** Rappresentazione schematica dei meccanismi di targeting passivo (A) e attivo (B).

Nel *targeting* passivo, la localizzazione della particella è affidata alle sole caratteristiche morfologiche, chimiche e fisiche del *carrier* e alle caratteristiche anatomiche e fisiologiche del sito bersaglio. Il *targeting* passivo sfrutta l'accumulo di un *carrier* per effetto EPR (Enhanced Permeability and Retention), senza l'aggiunta di altre componenti che aumentino la specificità verso le cellule bersaglio. Affinchè il direzionamento passivo possa raggiungere la massima concentrazione del farmaco, deve essere progettato un vettore di dimensioni opportune, in modo tale che possa oltrepassare le fenestrature anomale presenti tra le cellule tumorali<sup>[39-40]</sup>.

L'effetto EPR (Enhanced Permeability and Retention) è un fenomeno di direzionamento passivo verso i tumori che è stato descritto per la prima volta in letteratura circa 25 anni fa e descrive l'abilità intrinseca di macromolecole e particelle con uno specifico diametro di accumularsi nei tessuti di tumori solidi<sup>[41]</sup>. Il primo studio a dimostrare questo concetto ha rilevato come una proteina marcata, superiore ai 15 kDa, si accumula maggiormente nel tumore rispetto a molecole con dimensioni minori, e che questa è trattenuta *in situ* per periodi di tempo più lunghi. Questo fenomeno è stato attribuito alle caratteristiche uniche presenti a livello di un tessuto malato, come un più alto numero di vasi sanguigni, il maggiore trasferimento di sostanze ai tessuti e ad un basso sistema di recupero linfatico, che comporta una diminuzione significativa del recupero di macromolecole da parte del flusso sanguigno. L'importanza e il potenziale dell'effetto EPR nel *targeting* dei tumori ha aumentato l'interesse verso i fattori che lo mediano. Le caratteristiche che sono state maggiormente attenzionate includono l'aumento della permeabilità vascolare e i fattori di vasodilatazione, che in prossimità del sito tumorale sono presenti in grandi quantità rispetto ad un tessuto sano. Anche le differenze anatomiche nella vascolatura

tumorale, come la mancanza dello strato di muscolatura liscia intorno ai vasi sanguigni, comportano un aumento del flusso di sangue al tumore, ma anche una maggiore penetrazione delle macromolecole nei tessuti circostanti nei vasi. Per aumentare l'accumulo del un sistema in un tessuto tumorale si può agire, quindi, aumentando la pressione del sangue, perché la vasocostrizione periferica che ne consegue fa diminuire la quantità di farmaco che giunge agli organi sani, limitando quindi l'extravasazione delle particelle in siti non target<sup>[54]</sup>. Diversamente, si può agire aumentando la vasodilatazione, utilizzando dell'ossido di azoto (NO), per allargare le porosità tra le cellule endoteliali. Infatti, alcuni farmaci chemioterapici proinfiammatori, possono generare radicali superossidi e NO, e indurre un aumento della permeabilità vascolare (farmaci pro-EPR)<sup>[42]</sup>. Resta da sottolineare che un efficace *targeting* passivo di una molecola o di un vettore verso un tessuto malato non si traduce in una omogenea distribuzione spaziale del farmaco nella massa tumorale, che al contrario è non omogenea e imprevedibile. La creazione di sistemi basati sul *targeting* attivo permette al dispositivo di essere riconosciuto e intercettato solo dalle cellule bersaglio. In questo caso il direccionamento è dovuto all'interazione del ligando specifico con antigeni e recettori sovraespressi nelle cellule di un particolare tessuto. I due metodi di direccionamento, sebbene indipendenti tra loro, possono venir combinati opportunamente per aumentare le capacità di discriminazione del sistema tra tessuti normali e patologici. Generalmente i ligandi per il *targeting* possono essere raggruppati in cinque categorie: anticorpi e frammenti anticorpali, aptameri, peptidi, zuccheri e *small molecules*.

#### **4.1.1 Anticorpi e frammenti anticorpali**

Gli anticorpi e i frammenti anticorpali rappresentano una classe importante tra i ligandi per il *targeting*, in quanto possiedono un alto livello di specificità per i recettori cellulari e un'elevata affinità di legame. Gli anticorpi monoclonali (MAbs) sono sempre più utilizzati e studiati per la diagnosi e la terapia di patologie tumorali, grazie al riconoscimento specifico per antigeni associati a tumori. L'avvento della tecnologia degli ibridomi, introdotta nel 1975 da Kohler e Milstein, ha permesso la sintesi di una grande quantità di anticorpi monoclonali con elevata specificità. Ciò ha consentito di sviluppare MAbs nei confronti di numerose linee cellulari tumorali, capaci di guidare il direccionamento attivo anche *in vivo*. Infatti, la FDA ha già approvato l'utilizzo di numerosi MAbs o MAbs-coniugati a nanocarriers in terapie antitumorali e nella diagnosi, mentre molti altri sono in

sperimentazione clinica avanzata. Gli antigeni sfruttati finora comprendono il recettore HER2, il recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR) e il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF), l'antigene carcinoembrionario (CEA), ma anche antigeni associati alle classi linfocitiche, chiamati *cluster designation molecule*<sup>[43-45]</sup>. Sono state proposte diverse strategie per aumentare l'efficacia dei MAb verso i tumori. La costruzione di anticorpi umani dell'isotipo IgG1 o IgG3 potrebbe fornire ai MAb la capacità di mediare meccanismi di citotossicità cellulare dipendente dall'anticorpo (ADCC) e citotossicità dipendente dal complemento (CDC)<sup>[46]</sup>. Tuttavia la citotossicità può essere efficace per l'eradicazione di singole cellule tumorali o di piccoli aggregati nei pazienti, ma non è sufficientemente aggressiva verso i tumori più estesi, soprattutto quando il paziente è immunocompromesso. Un'altra strategia arma direttamente il MAb con un agente citotossico come tossine, chemioterapici convenzionali o radionuclidi<sup>[45]</sup>.

I MAb sono stati usati per dirigere i nanocarriers in modo sito-specifico. Per esempio, nanoparticelle di PLA coniugate con MAb mostrano un aumento di sei volte nel tasso di uptake rispetto a particelle dello stesso tipo non funzionalizzate per il *targeting*<sup>[46]</sup>.

Comparati ai MAb, i frammenti anticorpali dimostrano un potenziale maggiore per l'applicazione dei nanocarriers. Possiedono dimensioni minori e mancano della capacità di attivare il complemento mantenendo allo stesso tempo la specificità di legame all'antigene. Recenti progressi nel campo delle tecnologie ricombinanti hanno portato allo sviluppo di frammenti anticorpali quali scFv (single-chain variable fragments), Fab (fragments of antigen binding), i loro dimeri (F(ab<sub>2</sub>)).

Un esempio di nanocarriers funzionalizzati con frammenti anticorpali sono gli immunoliposomi, alcuni dei quali in trials clinici tra cui MCC-465 che usa F(ab<sub>2</sub>) per il rilascio mirato del farmaco Doxorubicina e il SGT-53 che usa scFv per il rilascio di p53 (tumor suppressor gene)<sup>[45-48]</sup>.

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

#### 4.1.2 Aptameri

Gli aptameri sono rappresentati da molecole di DNA a singolo filamento oppure da oligonucleotidi a RNA con una struttura tridimensionale ben definita. Gli aptameri possono riconoscere e legare un'ampia varietà di molecole (proteine, fosfolipidi, zuccheri e acidi nucleici) con alta affinità e specificità.

Comparati agli anticorpi, gli aptameri presentano un'immunogenicità e una dimensione inferiore che permettono una penetrazione tissutale migliore.

Per migliorarne la stabilità a livello ematico, possono essere modificati incorporando nucleotidi modificati nel loro scheletro.

Ad oggi più di 200 aptameri funzionali sono stati isolati, e si è vista la loro reattività contro una serie di targets biologici quali antigeni di superficie e fattori di crescita. Infatti, sono stati coniugati a differenti tipologie di nanoparticelle per l'identificazione di cellule tumorali <sup>[49-50]</sup>.

### **4.1.3 Peptidi**

I peptidi hanno dimostrato un alto potenziale nel campo delle nanotecnologie, grazie alle loro piccole dimensioni, all'alta stabilità e alla capacità di essere prodotti con eccellente controllo qualitativo. Le nanoparticelle coniugate con peptidi sono ampiamente usate per il *targeting* delle cellule tumorali e per la distinzione tra neo-vascolatura tumorale e tessuto vascolare sano. Un esempio è la sequenza peptidica RGD (Arginina-Glicina-Acido aspartico) propria delle fibronectine e di altre proteine. Questa sequenza ha un'alta affinità per le integrine, molecole di adesione che rivestono un ruolo chiave nel processo dell'angiogenesi. Recentemente sono stati sottoposti a screening dei peptidi *targeting* specifici per il collagene di tipo IV della membrana basale e coniugati con nanoparticelle polimeriche ricoperte da lipidi <sup>[51]</sup>.

### **4.1.4 Zuccheri**

Specifiche molecole di zucchero (lattosio, galattosio e mannosio) possono riconoscere le lectine che sono overesprese sulla superficie di numerose cellule tumorali. Queste molecole rappresentano un altro approccio interessante per il *targeting* specifico delle nanoparticelle al livello del tessuto tumorale.

Varie strategie sono state proposte per realizzare un sistema di *targeting* attivo, come la derivatizzazione con la galattosamina, che si è dimostrata utile per direzionare coniugati verso forme diverse di tumore al fegato, grazie alla presenza di asialoproteine

epatocitarie, che hanno alta affinità per il galattosio. Altri studi vedono l'uso di polimeri coniugati con zuccheri coinvolti nell'endocitosi mediata da lectine, in tre differenti linee cellulari tumorali del colon umano, suggerendo una potenziale applicazione per il rilascio mirato di chemioterapici al livello dell'adenocarcinoma del colon<sup>[52]</sup>.

Nonostante queste potenzialità, gli zuccheri hanno lo svantaggio di mostrare una debole affinità di legame e si devono coniugare numerose molecole sulla superficie delle nanoparticelle, per ottenere un maggior numero d'interazioni. Per esempio nel caso dei carriers liposomali galattosilati, l'efficacia di targeting dipende dalla densità dei ligandi esposti sulla superficie<sup>[53]</sup>.

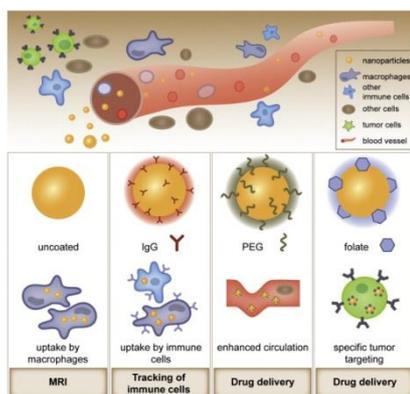
#### **4.1.5 *Small molecule*: l'acido folico**

Le "small molecule" hanno attirato un'attenzione crescente come potenziali ligandi per il *targeting* grazie alle loro dimensioni, basso costo di produzione e facilità nella coniugazione alle nanoparticelle.

Particolarmente importanti sono le dimensioni di questi ligandi che permettono una funzionalizzazione con molecole multiple sulla stessa nanoparticella, minimizzando l'ingombro sterico.

L'acido folico, noto anche come vitamina B9 o folacina, è un agente di *targeting* di significativo interesse nel campo della terapia antitumorale. Il suo recettore FR (*Folate Receptor*), noto come la proteina di membrana ad alta affinità per il folato, è notoriamente sovraespresso nei tessuti tumorali<sup>[55]</sup>. Il recettore FR ha un'elevata espressione in vari tipi di cancro umano, mentre è assente nella maggior parte dei tessuti normali, tranne che per i plessi corioidei e per la placenta oltre al polmone, tiroide e reni, anche se con livelli di espressione molto bassi<sup>[56]</sup>. FR è frequentemente sovraespresso in cellule tumorali *in vitro* e in tumori epiteliali, in particolare nel carcinoma ovarico (90% dei casi), di cui costituisce anche un utile marker<sup>[58]</sup>. Il recettore è sovraespresso anche nelle patologie oncologiche dell'endometrio, del cervello, del polmone, del seno e del rene<sup>[57]</sup>. Data la diffusione di questo recettore sono stati proposti numerosi sistemi per il targeting attivo di patologie oncologiche.

Vi sono vari tipi di nanoparticelle coniugate con acido folico quali liposomi, nanoparticelle polimeriche e dendrimeri, utilizzate nel trattamento sperimentale di cancro al seno, ai polmoni, ai reni e al colon<sup>[57]</sup>.

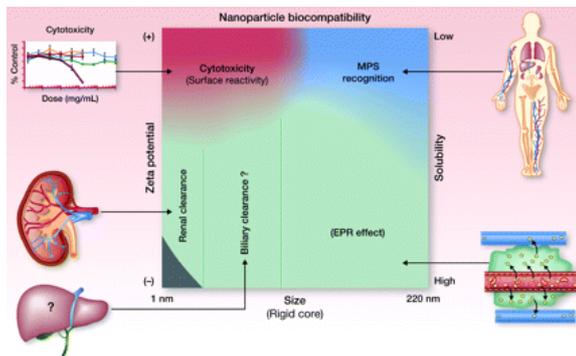


**Figura 11.** Diverse tipologie di nanoparticelle funzionalizzate o meno con molecole quali anticorpi, acido folico, PEG e il loro diverso destino nel torrente circolatorio.

## 4.2 La clearance delle nanoparticelle

Un altro obiettivo fondamentale per lo sviluppo di un sistema di rilascio efficace è una *clearance* della nanoparticella, dopo il rilascio. Quando le nanoparticelle entrano nel circolo ematico, possono essere riconosciute come corpi estranei (*"non-self"*) e la loro superficie può subire un adsorbimento proteico non specifico (opsonizzazione) rendendo le nanoparticelle più visibili alle cellule fagocitiche <sup>[58]</sup>. Dopo l'opsonizzazione, le nanoparticelle possono essere rapidamente sottoposte a *clearance* dal circolo sanguigno attraverso la fagocitosi attuata dal sistema MPS (*mononuclear phagocyte system o reticuloendothelial system RES*) nel fegato e grazie alla filtrazione nella milza<sup>[59]</sup>. Questa barriera biologica è una componente essenziale delle funzioni di difesa dell'organismo e include anche i monociti del sangue, i macrofagi del tessuto connettivo, degli organi linfatici e del midollo osseo, i macrofagi del polmone, le cellule di Kupffer del fegato e gli osteoclasti dell'osso. I macrofagi rimuovono, fagocitando, frammenti di tessuto, ma anche microparticolato come liposomi e microsfele. L'azione fagocitaria nei confronti di particelle estranee varia a seconda delle loro dimensioni e delle caratteristiche superficiali, pertanto questi due parametri sono d'importanza centrale nella progettazione dei nanocarriers <sup>[60]</sup> (fig.12). Sulla base di parametri fisiologici quali la filtrazione epatica, l'extravasazione/diffusione tissutale e la secrezione renale, è chiaro che la dimensione del nanocarrier gioca un ruolo fondamentale nella biodistribuzione e nella circolazione a livello sistemico. Le nanoparticelle più piccole di 10 nm sono rapidamente secrete dai reni, mentre particelle troppo grandi tendono ad essere processate dal sistema MSP. Numerosi studi dimostrano che le nanoparticelle con dimensioni di circa 100 nm hanno una potenzialità più alta di permanenza nel circolo sanguigno, riducendo la filtrazione epatica<sup>[61]</sup>. Molti studi sono stati condotti per determinare la grandezza dei *gap* presenti nelle pareti vascolari neoplastiche e il range di

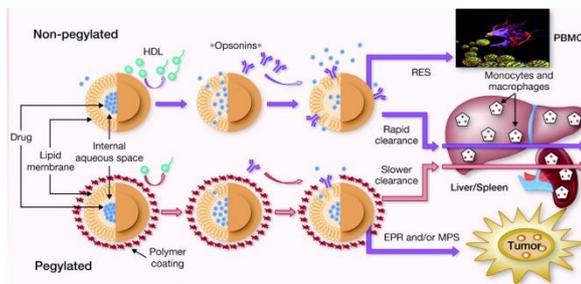
grandezza ottimale per una nanoparticella è approssimativamente 10-250nm<sup>[11]</sup>. Il loro destino dei nanocarrier varia anche a seconda della via di somministrazione scelta. Nel caso di iniezione diretta nel sistema circolatorio, le particelle vengono eliminate dal circolo principalmente dai macrofagi presenti nel fegato (cellule di Kupffer) e nella milza (zona marginale e polpa rossa). Si tratta di una clearance sito-specifica che avviene attraverso meccanismi di tipo passivo<sup>[62]</sup>.



**Figura 12.** I fattori che influenzano il destino delle nanoparticelle sono il potenziale zeta, le dimensioni e la solubilità, da cui dipendono la reattività di superficie, il processo di clearance (renale o biliare), il riconoscimento MPS / RES e l'effetto EPR.

Di fatto, questo processo di eliminazione è uno dei componenti del sistema di difesa primario sviluppato contro l'invasione di sostanze particolate "non-self". Questa eliminazione di tipo passivo può essere resa più efficace dal concomitante fenomeno di opsonizzazione, cioè il deposito sulla superficie delle particelle di fattori proteici quali fibronectina, immunoglobuline e proteine del complemento, i quali, a loro volta, facilitano il riconoscimento da parte dei macrofagi. Le dimensioni delle particelle possono giocare un ruolo importante nell'attivazione del complemento che si verifica solo per particelle di dimensioni pari o superiori ai 200 nm, le quali vengono eliminate rapidamente dalle cellule di Kupffer. L'interazione delle nanoparticelle con le opsonine varia considerevolmente a seconda delle caratteristiche superficiali delle particelle stesse e, in particolare, dalla presenza su di esse di determinati gruppi funzionali e dalla loro densità di carica superficiale. Ad esempio, è noto che nanoparticelle quali i quantum dots e i dendrimeri polimerici sono estremamente suscettibili all'aggregazione in ambiente fisiologico, mentre si è osservato che nanoparticelle di natura lipidica possono interagire considerevolmente con le lipoproteine plasmatiche. L'iniezione interstiziale può risultare una via di somministrazione vantaggiosa quando il bersaglio è uno specifico linfonodo o un gruppo di linfonodi localizzati in una delimitata regione. Nei capillari linfatici, le cellule endoteliali si trovano aderenti una all'altra, ma sono carenti di strutture che determinano una adesione serrata<sup>[63-65]</sup>.

Subito dopo una iniezione interstiziale, quindi, le cellule si allontanano tra loro creando dei passaggi attraverso i quali le particelle possono diffondere fino a raggiungere il nodo linfatico. A livello dei linfonodi il destino delle particelle sarà diverso a seconda delle loro dimensioni: nanocarriers tra 30 e 100 nm sono sufficientemente grandi da prevenire un rapido drenaggio nei capillari sanguigni. Particelle con dimensioni maggiori di 100 nm sono invece molto suscettibili alla clearance da parte dei macrofagi interstiziali. Particelle molto piccole (1-20 nm) possono invece raggiungere i linfonodi dal circolo sanguigno tramite extravasazione. Le caratteristiche superficiali influenzano notevolmente la ritenzione nel linfonodo. In generale particelle idrofiliche interagiscono poco con le sostanze presenti nello spazio interstiziale e vengono rapidamente drenate verso i vasi linfatici.



**Figura 13.** Rappresentazione del processo di clearance che segue una nanoparticella pegilata rispetto a una che non presenta il rivestimento in PEG.

Mascherandolo il carrier con opportuni polimeri, come il PEG, si ha un aumento del peso molecolare, un aumento di emivita del farmaco ma anche un carattere *stealth*, sopprimendo l'antigenicità e diminuendo l'uptake da parte del RES (fig. 13)<sup>[63-67]</sup>. Per questa serie di motivi la scelta di una nanoparticella varia a seconda della patologia, della localizzazione anatomica e dei possibili fattori che influenzano il riconoscimento e il rilascio specifico.

## ***Scopo della tesi***

Da quanto detto fino ad ora risulta evidente come il mondo delle nanotecnologie è estremamente vasto, in continua evoluzione e di fondamentale importanza per lo sviluppo di nuove metodiche che permettano di progettare sistemi innovativi finalizzati ad un miglioramento delle terapie attuali.

Lo scopo del presente lavoro è quello di studiare e caratterizzare nanocarriers, costituiti da nanogels in Poly(N-vinyl pyrrolidone)(PVP), e di funzionalizzarli in modo da riconoscere dei siti target e rilasciare molecole biologicamente attive, sotto controllo di specifici stimoli.

Nello specifico, la sperimentazione è stata rivolta a dei sistemi basati su nanogels prodotti mediante  $\beta$ -irraggiamento, utilizzando acceleratori lineari di particelle, prodotti dal gruppo di ricerca cui fa capo l'ing. Dispenza, del Dipartimento di Ingegneria Chimica, dell'Università degli Studi di Palermo. Questo metodo di sintesi permette di ottenere, in un unico step, nanogels sterili, di dimensioni controllabili, colloidalmente stabili, funzionalizzati e facilmente coniugabili a molecole biologiche. Inizialmente, è stata provata la loro biocompatibilità e non genotossicità in sistemi biologici, caratteristiche fondamentali per la loro applicazione in campo biomedico. Successivamente, sono stati messi a punto dei protocolli per la bioconiugazione delle nanoparticelle con diverse molecole, grazie alla presenza dei gruppi amminici e carbossilici reattivi presenti sulla loro superficie.

Dopo aver coniugato i nanogels con delle sonde fluorescenti (isotiocianato di fluoresceina e ammino-fluoresceina), è stata valutata l'affinità dei nanogels per i sistemi biologici *in vitro*, verificando la loro capacità di oltrepassare le membrane biologiche. Infatti, è stato seguito l'*uptake* dei nanogels in colture cellulari, monitorando nel tempo la localizzazione intra/extra-cellulare tramite microscopia confocale e saggi di spettrofluorimetria. Il picco d'internalizzazione è stato osservato dopo 6 ore d'incubazione e l'accumulo avviene preferenzialmente nella regione perinucleare; mentre per tempi di incubazione più lunghi, i nanogels vengono rilasciati lentamente dalle cellule e riversati nell'ambiente extracellulare<sup>[31-32]</sup>.

Per quanto riguarda la famiglia di nanogels funzionalizzati con gruppi amminici, questi sono stati bioconiugati con l'anticorpo monoclonale fluorescente, in grado di riconoscere e legare la glicoproteina di membrana CD44. L'avvenuta bioconiugazione è stata verificata attraverso analisi spettrofluorimetrica, mentre per verificare il riconoscimento antigene-

anticorpo, e la successiva internalizzazione del complesso nanogel-anticorpo, sono state effettuate osservazioni al microscopio confocale, a diversi tempi di incubazione. A differenza delle nanoparticelle coniugate con la sola sonda fluorescente, in questo caso si ha un'internalizzazione più veloce grazie al riconoscimento antigene-anticorpo. Infatti, per tempi di incubazione più brevi (15', 30') una buona quota di nanoparticelle si trova già sulla superficie e all'interno di cellule endoteliali ECV304, che over-esprimono sulla loro superficie la molecola CD44. Per riuscire ad avere un'attività di "addressing" sito-specifico, tali nanoparticelle amminiche sono state coniugate con l'anticorpo fluorescente anti- $\beta_3$  che riconosce l'integrina  $\alpha_v\beta_3$ . Tramite il *wound-healing assay* su cellule ECV304, è stato dimostrato il targeting attivo mediato da tali nanoparticelle. Da immagini di microscopia a epifluorescenza risulta evidente la capacità del complesso nanogel-anticorpo di riconoscere e legare l'antigene specifico all'interno di un sistema eterogeneo. L'integrina  $\alpha_v\beta_3$  risulta presente solo sulle cellule limitrofe al *wound*, in quanto, in seguito alla transizione epitelio-mesenchima, queste hanno assunto un fenotipo migratorio. Tale risultato rende i nanogels dei candidati ideali per le terapie antitumorali che sfruttano il *targeting* attivo.

Per chiarire quale fosse il meccanismo specifico che media l'internalizzazione dei nanogels, sono stati fatti dei saggi di inibizione, utilizzando delle sostanze che bloccano selettivamente diversi tipi di endocitosi. In particolare è stata inibita l'endocitosi mediata da clatrina, l'endocitosi mediata da caveolina e la macropinocitosi. Mediante analisi effettuate al citofluorimetro e al microscopio confocale, è stato dimostrato che il meccanismo di internalizzazione dei nanogels preferenziale sfrutta la macropinocitosi.

Per quanto riguarda la famiglia di nanogels funzionalizzati con gruppi carbossilici, questi sono stati ingegnerizzati per il rilascio controllato di un farmaco chemioterapico, ossia la Doxorubicina.

La Doxorubicina è un antineoplastico della famiglia delle antracicline, dotato di un ampio spettro antitumorale. Il farmaco si intercala nel DNA cellulare, inibendo la sintesi degli acidi nucleici, la mitosi e conseguentemente la proliferazione cellulare.

La Doxorubicina, è stata coniugata ai gruppi carbossilici presenti sui nanogels attraverso uno spacer (AEDP: aminoethyldithiopropionic acid), contenente un ponte disolfuro (S=S). Studi di rilascio *in vitro* hanno dimostrato che in presenza di alte concentrazioni di agenti riducenti, quali il ditiotreitolo (DTT), si ha la rottura del ponte S=S, che innesca il rilascio della Doxorubicina. Il meccanismo d'azione pensato, sfrutta l'aumento dei livelli di

glutathione presente nel citoplasma delle cellule tumorali, che risulta essere superiore rispetto a quello presente nelle cellule normali <sup>[71]</sup>. Per studiare l'efficienza del sistema proposto nei sistemi biologici, sono stati fatti diversi saggi su cellule MC3T3-E1 non tumorali e su cellule Hela tumorali. Inoltre, queste cellule sono state trattate (o meno) con GSH-OET (fattore in grado di incrementare i livelli di GSH citoplasmatico), ed è stato valutato il meccanismo di rilascio controllato da nanogels mediante saggi di vitalità cellulare (Alamar Blue Test), microscopia ad epifluorescenza e analisi citofluorimetrica. I risultati evidenziano un rilascio di Doxorubicina più efficiente e rapido nelle cellule tumorali e in quelle pretrattate con GSH-OEt. Infatti, in queste cellule, la concentrazione di GSH a livello citoplasmatico è più elevata e ciò comporta una più rapida rottura del ponte disolfuro a livello dello *spacer* e un rilascio più efficiente del farmaco dai nanogels. Le molecole di Doxorubicina rilasciate, infatti, penetrano nel nucleo e si intercalano tra le molecole di DNA, favorendo la morte cellulare. Infine, sono stati fatti esperimenti preliminari di coniugazione dei nanogels con acidi nucleici, seguiti da studi di riconoscimento enzimatico, per una futura applicazione dei nanogels in terapie basate sul silenziamento genico<sup>[32]</sup>.

## ***Materiali e Metodi***

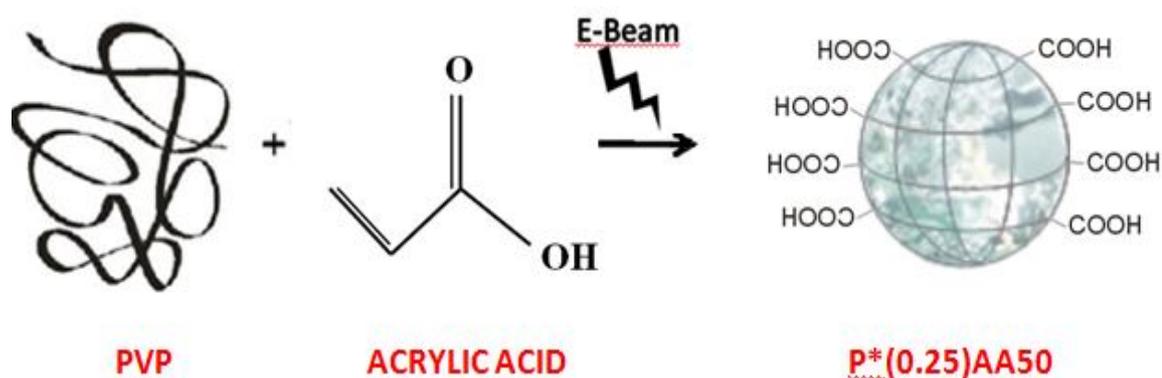
## Generazione di nanogels funzionalizzati con gruppi amminici e carbossilici

Il gruppo di lavoro dell'Ing. C. Dispenza, del dipartimento DICGIM dell'Università degli Studi di Palermo, ha sviluppato nanogels in Poly (N-vinyl pyrrolidone) (PVP), funzionalizzati superficialmente con gruppi amminici (indicati con la sigla P\*-g-A (100)) e carbossilici (P\*(0.50-0.25)AA50)<sup>[31-32]</sup>.

I nanogels si formano attraverso il  $\beta$ -irraggiamento di una soluzione acquosa di Poly(N-vinyl pyrrolidone) (PVP K60, Aldrich) e delle molecole funzionalizzanti (*aminopropyl-methacrylamide*, acido acrilico (AA, Aldrich)), ad una determinata dose di radiazioni e per un certo periodo di tempo che permette la reticolazione del polimero, direttamente in soluzione.

La soluzione prima di essere sottoposta a  $\beta$ -irraggiamento è filtrata con filtri da 0.22  $\mu\text{m}$ , viene sottoposta a deossigenazione con azoto gassoso, chiusa ermeticamente in fiale di vetro e saturata di  $\text{NO}_2$  (99,99%). Dopo l'irraggiamento, la soluzione è dializzata per 48 ore con membrana da 100 KDa in acqua distillata. Il PVP formerà la rete polimerica del nanogel, attraverso formazione di specie radicali che, mentre la molecola funzionalizzante servirà per la decorazione di superficie con gruppi chimici reattivi (Fig.1).

Il  $\beta$ -irraggiamento è eseguito usando l'acceleratore di particelle lineare (10 MeV) all'ICHTJ di Varsavia (Polonia).



**FIGURA 1:** Schematizzazione del meccanismo di sintesi tramite  $\beta$ -irraggiamento di nanogels. La sintesi tramite  $\beta$ -irraggiamento offre, tra i tanti vantaggi, la possibilità di inserire nel volume di reazione sia le molecole di monomero, sia le eventuali molecole di funzionalizzazione.

## Colture cellulari utilizzate

Le linee cellulari utilizzate sono: **MC3T3-E1**, **ECV304** e **HeLa**.

- La linea cellulare **MC3T3-E1** (*Mouse Calvaria Cell*) è costituita da osteoblasti murini. Tali cellule hanno la capacità di differenziare in osteoblasti e osteociti e inoltre hanno mostrato la capacità di formare tessuto osseo calcificato *in vitro*.
- La linea cellulare **ECV304** (*Endothelial Cell Vein*) è costituita da cellule endoteliali immortalizzate.
- Le cellule **HeLa** sono cellule tumorali immortalizzate altamente stabilizzate, molto utilizzate nella ricerca scientifica. Questa linea cellulare è stata isolata da un cancro della cervice uterina umana.

## Coltura, mantenimento e manipolazione delle colture cellulari

### -Materiali

- DMEM (*Dulbecco's modified Eagle medium*)(EuroClone), terreno usato per le MC3T3 e le HeLa
- M199 (*medium 199*)(EuroClone), terreno usato per le ECV304
- Siero (*Fetal Bovin Serum*)(EuroClone)
- Antibiotici
- Glutamina

### -Coltura cellulare

Per la crescita ottimale dei due tipi cellulari, ai rispettivi terreni, si aggiungono siero fetale bovino ad una concentrazione pari al 10% del totale, antibiotici all'1% (penicillina e streptomina) e glutamina all'1% (EuroClone). Tutti i materiali utilizzati devono essere sterili e riscaldati a una temperatura di 37 °C; inoltre tutte le operazioni devono essere condotte sotto cappa rispettando le condizioni di sterilità. Il terreno così addizionato viene definito terreno completo. Le cellule vengono piastrate a bassa densità nelle fiasche di coltura, alle quali si aggiunge terreno completo. La quantità di cellule da piastare e la quantità di terreno variano in base alle dimensioni della piastra. In particolare il terreno deve essere sufficiente in modo da fornire tutti i nutrienti essenziali alle cellule, ma allo stesso tempo deve lasciare un adeguato spazio d'aria nella piastra in modo da permettere

gli scambi gassosi fisiologici delle cellule. In queste condizioni le cellule possono rimanere nello stesso terreno per un tempo variabile in base al tipo cellulare. Le colture sono mantenute a 37°C in incubatore con atmosfera umidificata al 5% di CO<sub>2</sub>.

Il terreno deve essere cambiato quando i nutrienti scarseggiano o quando in qualche modo viene alterato. La principale alterazione possibile è la variazione di pH, causata dal metabolismo cellulare che rilascia diversi prodotti acidi. Il terreno contiene un indicatore di pH (di solito rosso fenolo) che farà virare il colore in funzione del pH. In particolare il colore di partenza (solitamente un rosso violaceo o arancio) virerà a un giallo intenso. In questo caso sarà necessario cambiare il terreno.

La proliferazione cellulare raggiungerà un punto in cui ogni cellula avrà contatti con le altre cellule e la piastra non offrirà più alcuno spazio per la crescita di nuove cellule. In questa condizione (definita di confluenza), le cellule smetteranno di dividersi e sarà necessario distribuirle in piastre diverse, in modo da far riprendere i normali processi di divisione cellulare.

Per operare tale procedura sarà necessario staccare le cellule in modo enzimatico dalla piastra di coltura. La coltura cellulare viene innanzi tutto incubata per qualche minuto (in genere 5 minuti) con PBS (*Phosphate buffered saline, EuroClone*) sterile e privo di Ca<sup>++</sup> e Mg<sup>++</sup> in modo da allentare i contatti calcio-dipendenti tra le cellule e tra queste e la piastra. Quindi si elimina il PBS e le cellule vengono incubate a 37 °C con un piccolo volume (necessario solo a coprire il fondo della piastra) di Tripsina-EDTA 1X (EuroClone) (diluita in PBS) per qualche minuto in dipendenza dal tipo cellulare (solitamente da 1 a non più di 5 minuti). Un lungo periodo in presenza dell'enzima potrebbe danneggiare le strutture cellulari; per questo motivo, immediatamente dopo il tempo di incubazione stabilito si aggiungono alla piastra due volumi e mezzo (rispetto il volume di tripsina) di terreno completo.

Le proteine presenti nel siero in questo modo saturano e inibiscono l'azione della tripsina. Quindi si recupera tutto e si trasferisce in un falcon. Le cellule vengono imbellettate per allontanare il terreno contenente la tripsina, e risospese in terreno fresco. Adesso le cellule sono pronte per essere ripiastrate in piastre nuove con terreno fresco.

### **-Conta cellulare**

Diversi esperimenti necessitano la conoscenza del numero iniziale di cellule presenti nella piastra. Per questo motivo è stata introdotta la conta cellulare. A tal fine vengono utilizzati dei particolari supporti, come la camera di *Bürker* o la camera di *Thoma-Zeiss*.

La camera di *Thoma-Zeiss* consta di una robusta lastra di vetro rettangolare, che presenta al centro un rilievo, delimitato da ambo i lati da due scanalature parallele e un corto solco trasversale che divide questo rilievo centrale in due metà, ciascuno delle quali porta inciso un reticolo di conta. Ogni reticolo è quadrato ed ha il lato di 1 mm; tale quadrato grande al suo interno presenta 16 altri quadrati più piccoli (Fig. 10). I due reticoli vengono coperti da un unico vetrino coprioggetto tenuto aderente da due morsetti laterali metallici. In questo modo, ogni quadrato grande con il coprioggetto viene ad avere un volume di  $0,1 \text{ mm}^3$  (=  $0,1 \text{ }\mu\text{l}$ ). Si mettono quindi  $10\mu\text{l}$  di soluzione con le cellule per reticolo, iniettandola direttamente sotto il coprioggetto. Quindi si contano le cellule nei due quadrati grandi e si fa la media aritmetica (X). Adesso moltiplicando il valore per 10 si ottiene il numero di cellule per  $\mu\text{l}$ , e moltiplicando questo valore per 1000 si ottiene il numero di cellule per ml. Quindi in totale la media di cellule viene moltiplicata per un fattore  $10^4$ .

Inoltre per evitare di contare numeri troppo elevati di cellule, viene generalmente fatta una diluizione 1:10 delle cellule risospese dopo la centrifugazione. Quindi alla fine per avere la giusta quantità di cellule deve essere tenuto in considerazione tale fattore di diluizione. Essendo un fattore di diluizione pari a 10, il valore viene anche moltiplicato per 10. Quindi alla fine per avere il giusto numero di cellule totali:

$$\text{Nr. cells} = X \cdot 10^4 \cdot 10 \cdot V_r$$

In questo modo otteniamo il numero di cellule presenti in tutto il nostro volume di risospensione ( $V_r$ ). Adesso con una semplice proporzione possiamo trovare il volume da prelevare per piastrare la quantità di cellule desiderata.

### **-Congelamento delle cellule**

Le cellule, qualora non siano più immediatamente utili, offrono la possibilità di essere congelate in azoto liquido. Alla temperatura estrema di  $-195,82 \text{ }^\circ\text{C}$ , infatti, le cellule possono essere mantenute per un tempo indefinito senza subire danni. In questo modo ogni laboratorio può fornire di una "scorta" di cellule utilizzabili in caso di bisogno. Anche le operazioni di congelamento devono essere eseguite in sterilità. Dopo aver staccato e centrifugato le cellule in modo da ottenere un *pellet*, si risospende in un volume di siero

adeguato al *pellet* in questione. Dopo aver contato le cellule, si deve operare aggiungendo siero in modo da avere 1 milione di cellule per ml. Ogni criotubo, infatti, può contenere un volume pari ad 1 ml. La soluzione congelante è costituita da 90% di siero e 10% di DMSO. In ogni criotubo quindi mettiamo una quantità di cellule risospese in siero pari a 900  $\mu$ l, alla quale aggiungiamo 100  $\mu$ l di DMSO. Il DMSO è un agente crioprotettore, che ha la funzione di scalzare le molecole di acqua presenti tra i fosfolipidi delle membrane cellulari, evitando in tal modo la morte delle cellule durante il congelamento. Tutti i procedimenti vanno eseguiti con le soluzioni fredde (4 °C) in modo da avere un abbassamento della temperatura graduale e non stressare esageratamente le cellule. Messe quindi le cellule con le soluzioni nei criotubi, queste vengono conservate a -80 °C per circa 24 ore. Successivamente possono essere trasferite nelle apposite stecche da immergere nell'azoto liquido.

#### **-Scongelo delle cellule**

Per essere riutilizzate le cellule crioconservate devono essere prima scongelate. I criotubi vengono prelevati dal contenitore con l'azoto e lasciati scongelare a temperatura ambiente. Prima che la sospensione cellulare si scongeli completamente, bisogna prelevarla e trasferirla in un tubo contenente 10 ml di terreno completo freddo. Quindi si centrifuga il tutto a 1000 rpm per 5 minuti e si aspira il surnatante. Il pellet quindi viene risospeso in terreno completo scaldato a 37 °C. Adesso le cellule sono pronte per essere nuovamente piastrate negli appositi contenitori e venire incubate in modo da poter riprendere il loro normale ciclo vitale che il congelamento aveva temporaneamente interrotto.

### **Valutazione della biocompatibilità dei nanogels in PVP**

#### **-Test MTT**

Il saggio con MTT (bromuro di dimetil-tiazolil-difenil-tetrazolio) (MTT Cell Proliferation Assay Kit, Invitrogen) è un test colorimetrico quantitativo. Il saggio si basa sulla capacità degli enzimi succinato deidrogenasi mitocondriale, presenti nelle cellule vitali, di trasformare il sale MTT tetrazolium 3-(4,5-dimethylthiazolo-2-yl)-2,5-diphenyltetrasolium bromide, di color giallo, in cristalli di formazano, mediante rottura dell'anello tetrazolico. I cristalli hanno una colorazione porpora e sono insolubili in soluzioni acquose. Solubilizzati tali sali dalle cellule, solitamente con DMSO, l'intensità della colorazione viene misurata attraverso le misurazioni in assorbanza in un range di lunghezza d'onda di 490-570nm. La

densità ottica ottenuta è direttamente proporzionale al numero di cellule vitali. La percentuale di vitalità è espressa come:

$$\% = [\text{media campione}/\text{media controllo negativo}] \times 100.$$

Le linee cellulari MC3T3-E1 ed ECV304 sono state piastrate in una multiwell da 96 alla densità di  $10^4$  cellule per pozzetto. Il giorno successivo le cellule vengono incubate con la sintesi a diverse concentrazioni:

- Le MC3T3-E1 sono state trattate con P\*-g-A(100) alle concentrazioni di 100 $\mu$ g, 50 $\mu$ g, 25 $\mu$ g, 12,5 $\mu$ g, per 24ore.
- Le ECV304 sono state trattate con P\*(0.25)AA50 alle concentrazioni di 30 $\mu$ g, 60 $\mu$ g, 120 $\mu$ g per 24 ore.

In contemporanea sono stati portati avanti un controllo negativo (con cellule non trattate) e un controllo positivo (con cellule trattate un farmaco che induce morte cellulare, Doxorubicina, 5 $\mu$ M). Dopo 24h di incubazione, le cellule vengono lavate con PBS e incubate con terreno di coltura contenente l'MTT (*MTT solution*) ad una concentrazione di 0,5mg/ml. Dopo un'incubazione di 2h a 37 °C, si osserva la formazione dei granuli violacei di formazano all'interno delle cellule. A questo punto si elimina il mezzo di coltura e si trattano le cellule con 100 $\mu$ l di DMSO, in modo da solubilizzare i sali di formazano. Si ottiene una soluzione di colore viola, la cui assorbanza a 490 nm di lunghezza d'onda è stata letta allo spettrofotometro DU-730 Life Science (Beckman Coulter). L'intensità di colorazione è proporzionale alla quantità di formazano in essa disciolto, quindi al grado di vitalità cellulare. I risultati sono stati espressi come rapporto percentuale dell'assorbanza fra il campione trattato e il controllo non trattato.

### **-Saggio di attivazione delle Caspasi 3/7/8**

Le caspasi sono proteasi acisteina che tagliano i peptidi dopo un residuo di acido aspartico. Le caspasi sono implicate in diversi ruoli dal punto di vista cellulare; prima fra tutti l'apoptosi, ossia la morte cellulare programmata. Qualora una cellula subisca un danno irreversibile, quale potrebbe un danno al DNA, questa attiva il meccanismo dell'apoptosi per eliminare in modo definitivo la cellula portante l'anomalia; in questo modo viene evitata l'estensione del danno alle altre cellule. Nella regolazione del meccanismo apoptotico, le caspasi hanno un ruolo fondamentale. Queste proteasi hanno come substrato diverse componenti essenziali per il ciclo cellulare; tra queste ricordiamo: proteine del citoscheletro (da cui il cambiamento di forma della cellula apoptotica),

proteine del nuclear envelope, fattori di trascrizione, proteine della regolazione del ciclo cellulare, proteine della trasduzione del segnale e della replicazione del DNA.

La famiglia umana delle caspasi è costituita da 10 membri. Abbiamo caspasi implicate nella maturazione delle citochine (caspasi 1, 4, 5) non implicate quindi nell'apoptosi, caspasi iniziatrici (caspasi 2, 8, 9, 10) e caspasi effettrici (caspasi 3, 6, 7).

Il saggio effettuato prevede la verifica dell'attivazione delle specifiche caspasi 3, 7, 8. In particolare la caspasi 8 è la caspasi iniziatrice, che attiva in seguito le caspasi 3 e 7. Queste ultime hanno una struttura molecolare simile e riconoscono come sito di taglio il tetrapeptide Asp-x-x-Asp, dove x rappresenta un qualunque aminoacido.

Poiché quindi l'attivazione delle caspasi risulta essere la risposta ad un danno cellulare, la verifica di tale attivazione permette di evidenziare eventuali danni subiti dalla cellula in seguito all'esposizione a diversi composti, come i nanogela. L'attivazione delle caspasi risulta essere un marker biochimico dell'apoptosi. La presenza di tale marker prova l'esistenza di una qualche forma di citotossicità che i composti in questione hanno sulle cellule.

Il test di attivazione delle caspasi 3/7/8 si articola in diverse fasi:

- Lisi meccanica delle cellule per procedere con l'estratto proteico
- Quantificazione delle proteine estratte tramite saggio di Bradford
- Incubazione dell'estratto proteico con il substrato caspasi-specifico
- Monitoraggio della cinetica di reazione tramite spettrofluorimetria

Le cellule vengono piastrate ad alta densità per 24h con terreno completo in una multiwell da sei pozzetti. Il giorno seguente le cellule sono state incubate con i nanogels:

- Le MC3T3-E1 sono state trattate con P\*-g-A(100) alle concentrazioni di 20µg per 24ore
- Le ECV304 sono state trattate con P\*(0.25)AA50 alle concentrazioni di 250µg/ml per 24 ore.

Successivamente, le cellule vengono incubate con PBS e staccate meccanicamente dalle piastre con lo *scraper*. Recuperate, vengono centrifugate per 5 minuti a 1000rpm.

Eliminato il surnatante, il pellet viene risospeso in 70µl di Triton 1% in PBS e incubate per 10 minuti a temperatura ambiente. Il Triton è un tensioattivo che ha la funzione di rompere le membrane cellulari e solubilizzare le proteine. Dopodichè i campioni vengono centrifugati a 10.000rpm per 10 minuti, in modo da eliminare col pellet i residui cellulari.

Per quantificare le proteine estratte, è stata utilizzata l'analisi Bradford. Questo metodo prevede la costruzione di una curva standard di campioni contenenti quantità note e

crescenti di una proteina purificata, l'albumina del siero bovino (BSA). Quindi la quantità di proteine nei campioni viene determinata confrontando i valori della curva standard, leggendo la densità ottica (OD) a 595nm. Il reattivo di Bradford contiene, come cromogeno, il Coomassie Brilliant Blue R-250, che quando lega le proteine ha uno spostamento del massimo di assorbimento da 465 nm (rosso) a 595 nm (blu) in soluzioni acide.

Per interpolazione alla curva viene determinata la concentrazione, incognita, delle proteine totali estratte dal lisato cellulare.

L'estratto proteico di ciascun campione (20µg) è stato addizionato con il substrato Ac-Asp-Glu-Val-Asp-MCA 8µM (PeptaNova, Peptide Institute). Tale peptide è substrato delle caspasi, ed emette fluorescenza in seguito al taglio operato da queste. La fluorescenza emessa è indice dell'attivazione delle caspasi nelle cellule. Monitorando la fluorescenza, quindi, si verifica l'eventuale instaurarsi del meccanismo apoptotico mediato dalle caspasi.

Viene quindi effettuata una cinetica di reazione, rilevando la fluorescenza ad intervalli di tempo di 15 minuti a partire dal tempo zero fino a 2h, a 37 °C, mediante Spectra MaxiGemini EM-500 (Molecular Devices) e i dati sono stati elaborati mediante SoftMax Pro 5.2 software.

Sono portati avanti anche i controlli negativo (estratto proteico di cellule non trattate) e positivo (estratto proteico di cellule trattate per 24h con Doxorubicina 5µM, potente induttore apoptotico).

#### **-Colorazione con Arancio di acridina**

Le cellule ECV304 sono state piastrate su vetrino sterile e coltivate in MEM199 completo per 24 h. Successivamente, le cellule sono state incubate rispettivamente, con 60 e 250 µg /mL di P\*(0.25)AA50 per 24 h. Dopo il periodo di incubazione, il mezzo è stato rimosso e le cellule sono state lavate con PBS, successivamente, le cellule sono state colorate con la soluzione arancio di acridina PBS (Sigma) a 100µg/mL per 10 min a temperatura ambiente e rapidamente esaminati al microscopio a fluorescenza (Leica, DFC450C). L'arancio di acridina è un colorante metacromatico che penetra all'interno della cellula e lega l'acido nucleico legando ed emette fluorescenza verde quando si lega a doppio filamento di DNA e fluorescenza rossa quando si lega al DNA a singolo filamento o all'RNA. Questa colorazione discrimina tra cellule vive (nuclei verdi) da quelle danneggiate

(nuclei rossi) cellule. Come controllo positivo, le cellule sono state trattate con Doxorubicina (Dox, Ebewe Pharma) a 5  $\mu$ M per 24 h.

## **Coniugazione nanogels con sonde fluorescenti**

I nanogels P\*-g-A(100) sono stati trattati una soluzione di Borax 0,05 M (pH 9.3), 0.4 M NaCl (1,4 mL) e con 14  $\mu$ g/ml di una soluzione di metanolo/acqua (0,1 vol% MeOH) di isotiocianato di fluoresceina o FITC (2 mL). La soluzione è stata mantenuta a 37 ° C sotto agitazione per 2 h. I NGs coniugati sono stati poi accuratamente dializzati in tubi da dialisi contro PBS pH 7,4, usando tubi da dialisi (MWCO 12-14 kDa). I campioni coniugati sono stati analizzati mediante letture spettrofotometriche usando DU-730 Life Science (Beckman Coulter).

I nanogels P\*(0.25)AA50 sono stati coniugati con una sonda fluorescente l'amminofluoresceina (AF, Aldrich) tramite protocollo standard<sup>[77]</sup> basato sull' 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimide - N-idrossisulfosuccinimide (EDC/Sulfo-NHS, Aldrich). La reazione è condotta a 37°C in acido 2- (N-morfolino) etanesulfonico (MES, Aldrich) a pH 5, in eccesso di AF (rapporto molare tra AF nella soluzione irradiata e gruppi COOH è pari a 10). La reazione è avvenuta in agitazione. Il sistema di nanogel coniugato con il probe è stato poi purificato attraverso dialisi in acqua. I nanogels così coniugati sono denominati P\*(0.25)AA50-AF. Il grado di coniugazione è stato stimato attraverso lettura allo spettrofluorimetro (Shimadzu 2401-PC spectrofluorimeter). Lo spettro di emissione è stato ottenuto eccitando l'AF a  $\lambda_{ex}$ = 490 nm ( $\lambda_{em}$ = 520 nm).

## **Studio di internalizzazione dei nanogels fluorescenti**

### **-Microscopia confocale**

La microscopia confocale è una tecnica ottica principalmente utilizzata per lo studio tridimensionale di strutture biologiche isolate o *in situ*.

Il sezionamento ottico di un sistema biologico consiste nella raccolta di una serie d'immagini di piani paralleli, spostando il fuoco dell'obiettivo, lungo un asse, che generalmente coincide con l'asse di propagazione della luce.

La microscopia confocale usa, per eccitare le molecole, una sorgente luminosa molto intensa, il laser. La luce emessa dai fluorocromi del campione, eccitati dal laser, è

catturata dalle lenti dell'obiettivo, attraversa lo specchio dicroico e raggiunge il fotomoltiplicatore, che trasforma l'intensità luminosa in un segnale elettrico d'intensità proporzionale. Tra lo specchio dicroico ed il fotomoltiplicatore, il fascio luminoso attraversa un diaframma (*pinhole*) che impedisce alla luce proveniente dalle zone fuori fuoco di raggiungere il fotomoltiplicatore stesso. In questo modo solo il segnale luminoso relativo al piano di fuoco viene registrato e utilizzato nella formazione dell'immagine finale.

Per ottenere la rappresentazione non di una porzione microscopica del campione ma dell'intero piano, si muove il fascio di luce lungo il campione di punto in punto, in modo che tutto il piano situato alla profondità voluta venga illuminato dal fascio di luce secondo una precisa sequenza. Questo processo viene definito scansione. Spostando lungo l'asse verticale, il campione dopo ogni scansione, è possibile eseguire una serie di scansioni successive corrispondenti ai piani focali via via più profondi all'interno del campione. Queste scansioni prendono il nome di sezioni ottiche, e la loro sovrapposizione ordinata, eseguita da particolari software, consente di ricostruire un'immagine complessiva dell'intero volume scansionato, in cui tutti i piani sono contemporaneamente a fuoco. L'archiviazione su computer di tutti i dati corrispondenti ai pixel delle singole sezioni ottiche consente di eseguire elaborazioni delle immagini, quali la visualizzazione tridimensionale dell'oggetto.

**Variante P\*(0.25)AA50-AF** :Le cellule ECV304 sono state piastrate, alla densità di  $5 \times 10^3$  cellule per pozzetto, in una *multiwell* da 12 contenente vetrini coprioggetto sterili e con M199 completo. Il vetrino era stato prima sterilizzato con etanolo al 70% per 15 minuti e con PBS per i successivi lavaggi, in modo da eliminare l'etanolo. Dopo 24 ore di crescita, le cellule sono state incubate con  $120 \mu\text{g/ml}$  di P\*(0.25)AA50-AF, e sono state prelevate a diversi tempi di incubazione (1, 3, 6 e 24 ore).

**Variante P\*-g-A(100)-FITC**: Le cellule MC3T3 - E1 sono state seminate con una densità di  $5 \times 10^3$  cellule per well in piastre da 12 pozzetti contenenti vetrini coprioggetto sterili in DMEM completo per 24 h. Successivamente, le cellule sono state incubate con una data quantità di P\*-g-A(100)-FITC ( $20 \mu\text{g/well}$ ). Dopo diversi tempi di incubazione, rispettivamente 30 min, 1, 3, 6, 8, 24 e 48 ore, i vetrini sono stati prelevati.

Quindi, dopo il prelievo, i vetrini sono velocemente lavati in PBS per allontanare le nanoparticelle non internalizzate.

Successivamente le cellule sono state fissate con formaldeide 3,6% per 15 minuti e lavate tre volte con PBS. Per "marcare" i nuclei, le cellule sono incubate per un minuto a temperatura ambiente con etidio bromuro (EtBr 1:1000 in PBS). Dopo tre lavaggi in PBS, le cellule sono pronte per essere osservate al microscopio confocale (Olympus 1x70 con sistema laser Mellet Griot).

#### **-Analisi spettrofluorimetrica sull'internalizzazione dei nanogels all'interno delle cellule**

Le cellule MC3T3-E1 sono state seminate in una piastra da 96 pozzetti ad una densità di  $7 \times 10^3$  cellule/well, coltivate per 24 ore in terreno DMEM completo, e incubate in presenza di P\*-G-A (100) FITC (4  $\mu$ g / well) per tempi diversi (0, 30 min, 1, 3, 6, 24, e 48 h). Per ogni tempo, tre pozzetti sono stati sottoposti a letture spettrofluorimetriche (ex/em: 485/538 nm) per misurare la fluorescenza totale del campione, poi, le cellule sono state separate mezzo e lavate due volte con PBS. La fluorescenza delle nanoparticelle presenti all'interno delle cellule, così come quella presente nel medium e nei lavaggi, è stata valutata usando Spectra Max Gemini EM-500 (Molecular Devices, dati rielaborati usando Max Pro software 5.2).

#### **Coniugazione dei nanogels con la proteina BSA**

I NGs P\*-g-A(100)(1,2 ml) sono stati incubati con un uguale volume di soluzione di borax (0,05 M-pH 9.3) con NaCl (0,4 M) per 10 min a temperatura ambiente. Successivamente, è stata aggiunta una soluzione acquosa (600  $\mu$ l) contenente 1 mg di proteina albumina sierica bovina (BSA ultrapura ; Sigma Aldrich). Un sistema di controllo è stato preparato come descritto sopra, ma non è stata aggiunta BSA. Le miscele sono state poi incubate a 37°C per 2h, in agitazione. In seguito, il sistema coniugato alla BSA (P\*-g-A(100)-BSA) e il relativo controllo sono stati accuratamente dializzati contro PBS con membrane 100kDa, per consentire il rilascio della BSA non coniugata. Per confermare la coniugazione, i campioni sono stati analizzati allo spettrofotometro DU 730 Life Science (Beckman Coulter), leggendo in un intervallo tra 200 e 500 nm. Per quantificare la quantità di BSA coniugata alle nanoparticelle, è stata costruita una curva di calibrazione utilizzando soluzioni con concentrazioni crescenti della proteina.

## **Coniugazione dei nanogels con Anticorpi Monoclonali Fluorescenti**

La coniugazione tra P\*-g-A(100) e l'anticorpo (Ab) monoclonale anti-CD44<sup>TRITC</sup> è avvenuta mediante un protocollo standard<sup>[77]</sup> che sfrutta i reagenti EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide) e Sulfo-NHS (N-Hydroxysulfosuccinimide) Aldrich. La procedura di bioconiugazione si articola in due distinte fasi; è infatti necessario prima attivare i gruppi funzionali in modo da renderli reattivi. A tal fine, l'Ab viene fatto reagire con 50µl di EDC (0,1mM), 50µl di sulfo-NHS (0,2mM) e 750µl di MES buffer (pH 5). Il MES rappresenta il tampone ideale per la bioconiugazione tramite EDC e sulfo-NHS. La reazione viene incubata per 30 minuti a 25 °C e 350rpm. Dopodiché, al volume di reazione viene aggiunta la sintesi P\*-g-A(100), e la reazione è portata avanti per 4h a 25 °C e 400rpm. In parallelo, come controllo, è stata portata avanti una reazione analoga presentante 250µl di acqua invece che anticorpo. In seguito alla reazione sono effettuati dei lavaggi con PBS in tubi con filtri da 300kDa, in modo da eliminare i reagenti e le eventuali molecole di anticorpo non legate alle particelle. Per verificare l'avvenuta coniugazione dell'anticorpo alle particelle, complesso identificato come P\*-g-A(100)-antiCD44-<sup>TRITC</sup>, sono state effettuate delle letture di fluorescenza (ex/em: 541/572 nm) dei campioni dopo i lavaggi, dei lavaggi stessi e di un curva di calibrazione utilizzando soluzioni con concentrazioni crescenti dell'Ab libero, usando Spectra Max Gemini EM-500 (Molecular Devices, dati rielaborati usando Max Pro software 5.2).

## **Studi di localizzazione degli immunonanogels in colture cellulari**

Le cellule ECV 304 sono state coltivate ad una densità di  $5 \times 10^3$  cellule/pozzetto in piastre da 12 pozzetti contenenti vetrini sterili in MEM199 completo, per 24 h. Le cellule sono state incubate con 4µg/well di P\*-g-A(100)-antiCD44-<sup>TRITC</sup>. A differenti tempi di incubazione, e in particolare 15', 30', 1h, 3h, 6h, 24h, le cellule sono state rapidamente lavate con PBS per rimuovere nanoparticelle che sono state legate dalla membrana cellulare, fissate con 3,7 % di formaldeide per 15 min, e nuovamente lavate due volte con tampone PBS. In seguito, le cellule sono state colorate con falloidina-FITC (1:500) per 15', che marca i filamenti di actina verdi, e con DAPI (1:100) per 30', che marca in blu i nuclei. La localizzazione degli immunonanogels all'interno delle cellule è stata monitorata mediante analisi di microscopia confocale (Olympus 1X70 con sistema laser Melles Griot) ed a epifluorescenza (Leica).

## **-Studio di colocalizzazione del sistema P\*-g-A(100)<sup>FITC</sup> coniugati all' antiCD44<sup>TRITC</sup> su cellule ECV304**

Le cellule ECV 304 sono state coltivate ad una densità di  $5 \times 10^3$  cellule/pozzetto in piastre da 12 pozzetti contenenti vetrini sterili in MEM199 completo per 24 h. Le cellule sono state incubate con 100 $\mu$ l di P\*-g-A(100)<sup>FITC</sup> coniugati all' antiCD44<sup>TRITC</sup> (10 $\mu$ g) per 3h. Dopo, le cellule sono state fissate con 3,7 % di formaldeide per 15 ', e lavate due volte con PBS . In seguito, le cellule sono state colorate a temperatura ambiente con DAPI (1:100) per 30 ', rendendo blu i nuclei. La colocalizzazione è stata studiata mediante microscopia confocale (Zeiss) .

## **Studi sul meccanismo di internalizzazione dei nanogels**

### **-Inibizione dei pathways di endocitosi**

Gli esperimenti di inibizione sull'internalizzazione dei NGs P\*-g-A(100)-antiCD44-<sup>TRITC</sup> sono stati eseguiti in cellule ECV304. Gli esperimenti sono stati eseguiti in tampone PBS, integrati con 5 mM 2- deossi-D- glucosio (PBS(G) buffer). Dopo la rimozione del mezzo di coltura, ciascun pozzetto è stato lavato due volte e successivamente incubato per 10 ' con PBS(G) buffer. L'Ossido di Phenylarsine o PAO (30 $\mu$ M), nystatin (50  $\mu$ M) e il 5-(N-etil-N -isopropil)amiloride o EIPA (75  $\mu$ M) (Sigma Aldrich) sono gli inibitori utilizzati in questi saggi e sono stati disciolti in DMSO. La concentrazione finale di DMSO era inferiore allo 0,5 %. Le cellule controllo sono state trattate con le stesse concentrazioni di DMSO, in ciascun esperimento. Gli effetti di questi inibitori sono stati valutati incubando i vari campioni cellulari con ciascuno inibitore (PAO, Nystatin, EIPA) in PBS(G) per 10 minuti, a 37°C. Successivamente, sono stati aggiunti 80 $\mu$ g di P\*-g-A(100)-antiCD44<sup>TRITC</sup> per 1h. Per stimare la quota di internalizzazione passiva delle nanoparticelle, le cellule sono state incubate in PBS(G) a 4°C per 10min per bloccare tutti i processi dipendenti da energia, e successivamente con le nanoparticelle per 1h .

### **-Analisi citofluorimetrica**

Per gli esperimenti di citometria a flusso, le cellule ECV 304 sono state coltivate in piastre da 6 pozzetti fino al 70 % di confluenza. Dopo l'inibizione e l'incubazione con i NGs, le cellule sono state lavate una volta con PBS, raccolte mediante tripsina 1X, imbellettate a 1000rpm per 5 min e risospese in 0,5 ml di PBS. L'analisi citofluorimetrica (FACS) è stata effettuata utilizzando un FACS - Calibur (Becton Dickinson, Heidelberg, Germania). Per

ogni campione, sono stati raccolti 10000 eventi considerando i parametri di side e forward scatter, e di emissione di fluorescenza (FL1,FL2-530,585 nm) . Il software Diva BD FACS è stato utilizzato per l'analisi dei dati.

#### **-Analisi di microscopia confocale**

Per l'analisi confocale,  $5 \times 10^3$  cellule sono state piastrate su vetrini sterili in piastre da 12 pozzetti. Dopo gli esperimenti di inibizione e di incubazione con i NGs, le cellule sono state lavate due volte con PBS e poi incubate con  $6\mu\text{M}$  di DiO-C16 (marcatore della membrana plasmatica) per 15 min (Invitrogen). La localizzazione degli immunonanogels è stata monitorata mediante analisi di microscopia confocale (Olympus 1X70 con sistema laser Melles Griot).

#### **Esperimenti di *targeting attivo* mediante *Wound Healing assay***

Le cellule ECV304 sono state seminate ad una densità di  $5 \times 10^3$  su vetrini sterili in piastre da 24 pozzetti e coltivate fino al raggiungimento della confluenza cellulare. Usando la punta di un puntale è stato fatto un graffio, simulando una ferita *in vitro*. Le cellule sono state lavate 3 volte con PBS e poi incubate con terreno completo per 2h. Quindi, le cellule sono state incubate con  $50\mu\text{g}$  di  $\text{P}^*\text{-g-A}(100)\text{anti}\beta 3^{\text{TRITC}}$  per 30 min. In seguito, le cellule sono state fissate con formaldeide 3,6%, il citoscheletro delle cellule è stato marcato con falloidina-FITC (1:500) per 15min ed i nuclei con DAPI (1:100) per 30 min. La localizzazione degli immunonanogels è stata monitorata mediante microscopia a epifluorescenza (Leica).

#### **Protocollo di coniugazione dei nanogels con la Doxorubicina**

Il protocollo di coniugazione dei nanogels funzionalizzati con gruppi -COOH prevede l'attivazione dei gruppi funzionali stessi affinché questi possano essere coinvolti nella reazione. A tal fine, è stato definito un protocollo di coniugazione<sup>[77]</sup> che sfrutta il reagente EDC ( $3,6\text{mM}$ ) in una soluzione di MES a pH 5 a cui è stato aggiunto  $\text{P}^*(0.5)\text{AA50}$  (1 mg) e Doxorubicina (2 mg/ml, Ebewe Pharma), per 3 ore in agitazione a  $37^\circ\text{C}$ . Dopo prolungata dialisi contro acqua sterile in tubi da 100kDa, il coniugato, indicato con  $\text{P}^*(0.5)\text{AA50-DOX}$ , è stato analizzato mediante spettrofotometro, in relazione a delle letture effettuate su campioni di farmaco libero a concentrazioni note.

#### **-Alamar blue test**

L'Alamar Blue è un saggio di vitalità cellulare, di tipo metabolico colorimetrico vitale, che permette di quantificare facilmente il grado di cellularità grazie all'incorporazione di un indicatore di ossido riduzione che vira il proprio colore in risposta alla riduzione chimica del terreno di coltura, indice del metabolismo cellulare. Le cellule HeLa sono state piastrate, alla densità  $6 \times 10^3$  cellule per pozzetto, in una *multiwell* da 96 e addizionate di terreno DMEM completo. Dopo 24 ore di crescita, le cellule sono state incubate con P\*(0.5)AA50-DOX ( $5 \mu\text{M}$  di Doxorubicina) per 24 e 48h. Parallelamente sono stati allestiti dei controlli costituiti da cellule non trattate e cellule incubate con  $5 \mu\text{M}$  di Doxorubicina libera per 24 e 48 h.

Successivamente sono state rimosse le nanoparticelle e le cellule sono state incubate con l'Alamar Blue, diluito 1:10 nel terreno di coltura. Il tempo d'incubazione è di 2 ore a  $37^\circ\text{C}$ . Per eseguire l'analisi si preleva medium e si legge l'intensità di fluorescenza ( $\lambda_{\text{ecc}}$  530/25 nm e  $\lambda_{\text{em}}$  590/35 nm), mediante spettrofluorimetro (Spectra Max Gemini EM-500), che vira in base al grado di vitalità cellulare.

I risultati sono stati espressi come rapporto percentuale della fluorescenza fra il campione trattato e il controllo non trattato.

### **Sviluppo dei nanogels P\*(0.50)AA-AEDP-DOX**

I NGs sono stati coniugati con uno spacer e con il farmaco, mediante un processo in due fasi. Entrambe le fasi sono state effettuate a  $25^\circ\text{C}$ , in MES buffer a pH 5, in eccesso di ligandi rispetto gruppi carbossilici e sotto continua agitazione. La prima reazione di coniugazione avviene tra i gruppi carbossilici del nanogel e l'estremità N-terminale di uno spacer (AEDP, VWR), che presenta un ponte disolfuro all'interno della struttura. La seconda reazione avviene all'estremità C-terminale dello spacer, alla quale si lega il farmaco. Il protocollo<sup>[77]</sup> nel dettaglio comprende un primo step di coniugazione dello spacer (AEDP) ai Ngs: Sulfo-NHS ( $4,5 \text{ mM}$ ), EDC/MES ( $1,8 \text{ mM}$ ), P\*(0.5)AA50 ( $1 \text{ mg}$ ) e AEDP ( $0,5 \text{ mM}$ ). Le soluzioni sono preparate in condizioni di sterilità, filtrate con filtri da  $0,2 \mu\text{m}$ . La reazione è stata condotta in agitazione per due. Successivamente è stata dializzata in acqua sterile, con tubi da dialisi da  $14\text{kDa}$ .

Il secondo step di coniugazione avviene tra P\*(0.25)AA50-AEDP in EDC/MES ( $3,6 \text{ mM}$ ) e Doxorubicina ( $2 \text{ mg/ml}$ , Ebewe Pharma). La reazione è stata condotta in agitazione per due ore. Successivamente è dializzata in acqua sterile, con tubi da dialisi da  $100\text{kDa}$ . I nanogels così ottenuti sono denominati P\*(0.50)AA50-AEDP-DOX.

Per valutare l'efficienza di coniugazione, si è creata una curva di calibrazione standard ottenuta mediante lettura allo spettrofotometro (Spectra Max Gemini EM-500) di diluizioni seriali Doxorubicina libera.

#### **-Studio sulla cinetica di rilascio *in vitro* in condizioni riducenti**

I nanogels P\*(0.25)AA50-AEDP-DOXO coniugati con spacer (AEDP) e Doxorubicina, sono stati sottoposti ad un test di rilascio *in vitro* sfruttando la presenza di DTT (ditiotreitolo, Sigma Aldrich) come agente riducente, nel mezzo di rilascio. 5ml di soluzione contenente i nanogels P\*(0.5)AA50-AEDP-DOX sono posti all'interno di una membrana da dialisi (MWCO 12 kDa) e immersi in 50 ml di tampone (Tris-HCl 1mM pH 7.4) contenente DTT alla concentrazione 10 mM e 0,1mM. È stato allestito anche un controllo in cui la concentrazione DTT è pari a zero. I sistemi sono mantenuti a 37°C in continua agitazione (200 rpm). A intervalli prestabiliti (0, 1, 2, 4, 6, 10, 24 ore), si preleva un aliquota (10 ml) di tampone, che viene rimpiazzata con 10 ml di tampone fresco. La percentuale di Dox rilasciata è determinata tramite misurazioni allo spettrofotometro GloMax®-Multi Detection System.

#### **Studio sul rilascio controllato del farmaco in cellule, mediante stimolazione da parte del glutatione**

##### **-AlamarBlue test**

Per valutare il rilascio controllato di Doxorubicina, mediato dal glutatione, sono stati condotti due tipi di saggio su cellule MC3T3-E1 e HeLa: Alamar Blue test per valutare la vitalità cellulare dopo i trattamenti e analisi di microscopia a fluorescenza per valutare la localizzazione della Doxorubicina nelle cellule. Le cellule MC3T3-E1 e HeLa sono state piastrate, alla densità  $6 \times 10^3$  cellule per pozzetto, in una *multiwell* da 96 e addizionate di terreno DMEM completo. Dopo 24 ore di crescita, le cellule sono state incubate con GSH-OET (Glutathione reduced ethyl ester, Sigma Aldrich) alla concentrazione 10 mM in terreno DMEM completo, per 2 ore a 37°C.

Successivamente il medium con GSH-OET è stato rimosso, le cellule sono state sottoposte a 2 lavaggi con DMEM completo e incubate a 37°C con P\*(0.50)AA50-AEDP-DOX. Le cellule HeLa sono state incubate con i NGs (1µg/ml) per 24 e 48h. Mentre le cellule MC3T3-E1 sono state incubate con (0,3µg/ml) per 48 e 72h. Parallelamente sono stati allestiti dei controlli costituiti da cellule non pretrattate con GSH-OET ma incubate con i

NGs, e cellule incubate con Doxorubicina libera alla stessa concentrazione di farmaco usato nei campioni incubati con P\*(0.5)AA50-AEDP-DOX.

Successivamente sono state rimosse le nanoparticelle e le cellule sono state incubate con una soluzione contenente l'Alamar Blue (10% nel terreno di coltura). Per eseguire l'analisi si preleva medium e si legge l'intensità di fluorescenza ( $\lambda_{ecc}$  530/25 nm e  $\lambda_{em}$  590/35 nm), mediante spettrofluorimetro (SinergyHT BioTech), che vira in base al grado di vitalità cellulare.

I risultati sono stati espressi come rapporto percentuale della fluorescenza fra il campione trattato e il controllo di cellule non trattate.

#### **-Analisi di microscopia a epifluorescenza**

Le cellule MC3T3-E1 ed HeLa sono state piastrate, alla densità di  $12 \times 10^4$  cellule per pozzetto, in una *multiwell* da 12 contenente vetrini coprioggetto sterili in DMEM completo. Dopo 24 ore di crescita, un campione di ciascun tipo di cellule è stato incubato per due ore con GSH-OET (10mM); dopo il periodo d'incubazione le cellule vengono sottoposte a due lavaggi con DMEM completo. Successivamente le cellule sono state incubate per tre ore con i nanogels P\*(0.5)AA50-AEDP-DOX, (1 $\mu$ g/ml). Al termine delle tre ore d'incubazione i vetrini sono fissati con formaldeide 3,6% per 15 minuti e lavati tre volte con PBS. Il citoscheletro di actina è stato marcato con Falloidina-FITC (1:500 in PBS) per 30 minuti; dopo 3 lavaggi con PBS completo, segue un'ulteriore colorazione con DAPI (1:1000 in PBS) per 30 secondi, a temperatura ambiente per marcare i nuclei in blu. Dopo altri tre lavaggi in PBS, le cellule sono pronte per essere osservate al microscopio a epifluorescenza.

#### **-Analisi citofluorimetrica**

Per l'analisi FACS, le cellule HeLa sono state coltivate in piastre da 6 pozzetti fino al raggiungimento della confluenza cellulare. Successivamente, le cellule sono state incubate per due ore con GSH-OET (10mM); Parallelamente è stato allestito un controllo non trattato con GSH-OET. Dopo il periodo d'incubazione le cellule vengono sottoposte a due lavaggi con DMEM completo. Successivamente, le cellule sono state incubate per tre ore con i nanogels P\*(0.5)AA50-AEDP-DOX, (1 $\mu$ g/ml). Quindi, sono state raccolte mediante tripsina 1X, imbellettate a 1000rpm per 5 min e risospese in 0,5 ml di PBS. L'analisi citofluorimetrica (FACS) è stata effettuata utilizzando un FACS Calibur (Becton Dickinson, Germania). Per ogni campione, sono stati raccolti 10000 eventi considerando i

parametri di side e forward scatter, e di emissione di fluorescenza (FL1 585 nm) . Il software Diva BD FACS è stato utilizzato per l'analisi dei dati.

## **Coniugazione dei nanogels ad oligonucleotidi**

Gli oligonucleotidi modificati utilizzati sono i seguenti: FAM (FAM5'-AAA ACT GCA GCC AAT GTA ATC GAA - 3'-NH<sub>2</sub>), REV\_BHQ1(5' - TTC GAT TAC ATT GGC TGC AGT TTT -3' - BHQ1), REV(5'-TTC GAT TAC ATT GGC TGC AGT TTT- 3' ) ( Eurofins ).

### **-Funzionalizzazione di nanogels con oligonucleotidi modificati fluorescenti**

I NGs P\*(0,25)AA50 sono stati coniugati utilizzando soluzione contenente EDC/NHS 50nM/200mM in tampone MES (pH 5.0). L'oligonucleotide FAM è stato direttamente attaccato ai gruppi carbossilici del nanogels attraverso l'ammino-link presente nell'estremità 3'. In primo luogo, 200µl di P\*(0,5)AA50 sono stati incubati con una soluzione di EDC/NHS per 30 min a 37°C, in leggera agitazione; successivamente 10µl di oligonucleotide FAM (2,5 x 10<sup>-2</sup> µmoli) sono stati aggiunti ed incubati per 3 ore a 37 °C , in agitazione. La stessa soluzione, senza oligonucleotide, è stata preparata ed usata come controllo. Entrambi i sistemi sono stati accuratamente dializzati (72 ore) contro acqua Milli-Q utilizzando membrane con MWCO 14 kDa, per rimuovere l'oligonucleotide non coniugato. Al fine di confermare la coniugazione e quantificare l' oligonucleotide coniugato, la è stata stimata la fluorescenza emessa dal fluoroforo FAM (eccitazione 495 nm, emissione 520 nm), presente sulla estremità 5' dell'oligonucleotide FAM, utilizzando Glomax®Multi System (Promega) . Una curva di calibrazione è stata effettuata utilizzando un soluzioni con concentrazioni crescenti dell'oligonucleotide FAM.

### **-Test di annealing e di digestione enzimatica**

La reazione di annealing è stata effettuata utilizzando un termociclatore (Perkin Elmer, GeneAmp, sistema PCR), in cui sono stati effettuati due cicli termici per una miscela contenente P\*(0,25)AA50 FAM, REV\_BHQ1, 50 mM NaCl , tampone TE 1X (10 mM TrisHCl pH 7,5 , 1 mM EDTA), passando attraverso la temperatura di annealing specifica per le due sequenze. Dopo l'annealing, i campioni sono stati lavati più volte con acqua Milli-Q per rimuovere l'oligonucleotide REV-BHQ1 non appaiato, utilizzando filtri da 100KDa (Amicon). Come controllo negativo, la stessa reazione è stata condotta utilizzando REV, un oligonucleotide complementare che manca del quencher. La fluorescenza presente in entrambi i campioni è stata rilevata mediante Glomax®Multi System3 . Il complesso

formato dalle nanoparticelle coniugate al doppio filamento, ottenuto in seguito all'annealing, è stato incubato con l'enzima di restrizione Pst I (75U/ml ; BioLabs) in un appropriato buffer a 37°C per 2 ore. Dopo la fase di digestione, i campioni sono stati lavati 20 volte con un volume uguale di acqua Milli-Q , utilizzando filtri da 100KDa (Amicon), per rimuovere i frammenti di DNA digeriti da PstI. La fluorescenza presente nei campioni digeriti e nei lavaggi è stata rilevata attraverso Glomax®Multi System3 .

## ***Risultati***

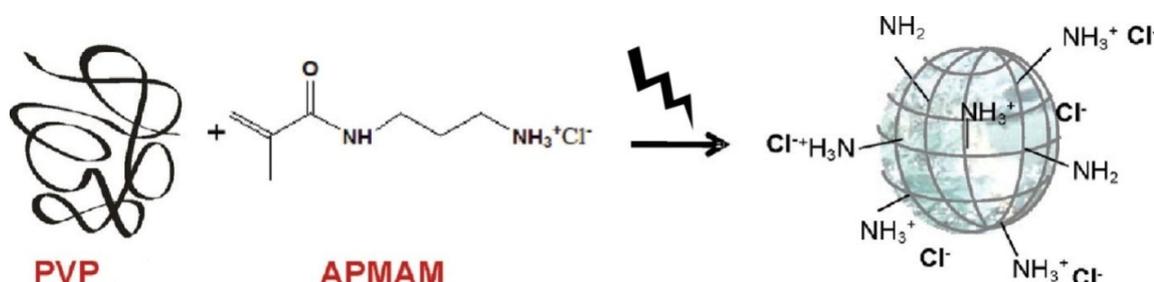
## Caratterizzazione delle nanoparticelle utilizzate

Una nuova generazione di nanogels in poly(N-vinyl pyrrolidone) è stata sviluppata mediante  $\beta$ -irraggiamento, grazie ad una collaborazione col gruppo di ricerca a cui fa capo l'Ing. Dispenza C., dell'Università degli Studi di Palermo. I nanogels prodotti presentano due distinte funzionalizzazioni di superficie, date alla presenza di gruppi chimici reattivi ai quali è possibile coniugare sonde fluorescenti, molecole che mediano un *targeting attivo* o che mostrano una particolare attività biologica.

Nella prima famiglia di nanogels prodotta (indicata con la sigla P\*-g-A (100)), la molecola funzionalizzante APMAM (*aminopropyl-methacrylamide*), conferisce gruppi amminici primari ( $\text{-NH}_2$ ) alla superficie dei nanogels e viene aggiunta al volume di reazione prima della sintesi tramite  $\beta$ -irraggiamento (fig.1). Attraverso misure di *dynamic light scattering* (DLS) è stato possibile misurare il diametro idrodinamico medio delle P\*-g-A (100), che è risultato essere circa 200 nm.

Nella seconda famiglia di nanogels (indicata come P\*(0.25-0.50)AA50), invece, la molecola funzionalizzante è l'acido acrilico che conferisce alla superficie dei nanogels gruppi carbossilici ( $\text{-COOH}$ ). In questo caso il diametro idrodinamico medio registrato varia da 25 a di circa 50 nm. Dopo la fase di irraggiamento, la dispersione di nanogels risulta essere sterile.

Tali nanoparticelle sono state caratterizzate dal punto di vista chimico fisico, attraverso misure del potenziale  $\zeta$ , analisi FTIR e NMR e risultano essere dei sistemi stabili con una densità di carica superficiale, a pH fisiologico, tale da renderli colloidamente stabili<sup>[31-32]</sup>.



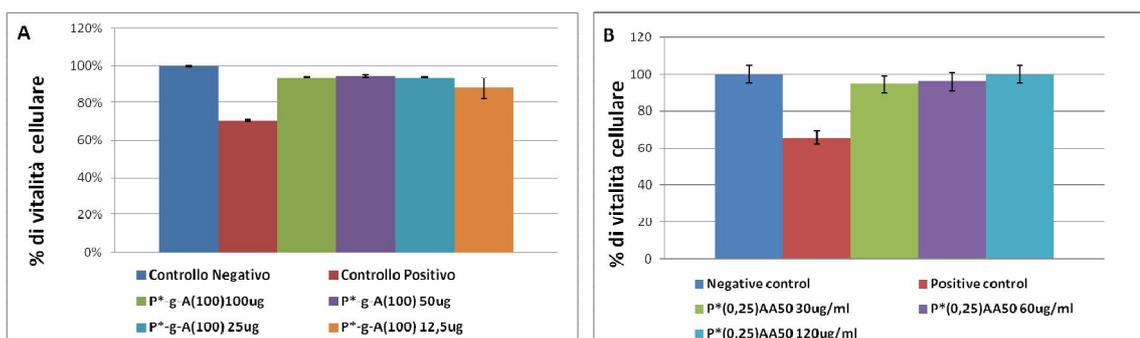
**Figura 1.** Schematizzazione del meccanismo di sintesi tramite  $\beta$ -irraggiamento di nanogels P\*-g-A (100) in cui è possibile inserire nel volume di reazione sia le molecole di polimero che quelle funzionalizzanti (APMAM), ottenendo in un unico step, nanogels la cui superficie presenta gruppi chimici reattivi.

## Valutazione della biocompatibilità

Al fine di verificare se le nanoparticelle in PVP prodotte mediante  $\beta$ -irraggiamento fossero dei buoni candidati per future applicazioni nei sistemi di *drug delivery*, per prima cosa, è stata valutata la loro biocompatibilità con sistemi biologici, *in vitro*.

### -Studi di citotossicità

Attraverso saggi MTT, descritti in materiali e metodi, è stata valutata la vitalità di cellule MC3T3-E1 (osteoblasti murini) incubate con diverse concentrazioni di P\*-g-A(100), ossia 100 $\mu$ g, 50 $\mu$ g, 25 $\mu$ g, 12,5 $\mu$ g, per 24 ore. Come è possibile osservare dall'istogramma (Fig2A.), le cellule incubate con le nanoparticelle mostrano una vitalità comparabile a quella delle cellule non trattate (controllo negativo). Al contrario cellule trattate con la Doxorubicina [5 $\mu$ m] (controllo positivo), mostrano più del 30% di mortalità; a dimostrazione di assenza di citotossicità da parte dei nanogels analizzati.



**Figura2.** Saggi di vitalità cellulare effettuati valutando l'effetto dei sistemi P\*-g-A(100) (A) su cellule MC3T3-E1 e P\*(0.25)AA50 su cellule ECV304(B).

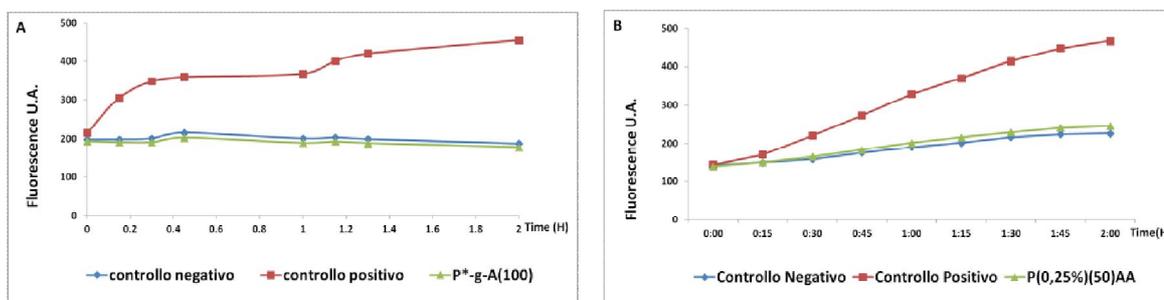
Il saggio MTT è stato eseguito anche per la famiglia di nanogels P\*(0.25)AA50 ed è stata valutata l'assenza di citotossicità su cellule ECV304 (cellule endoteliali), dopo 24 ore di incubazione, in presenza di diverse concentrazioni di nanogels (30 $\mu$ g , 60 $\mu$ g , 120 $\mu$ g). Dalla figura 2B risulta evidente che la vitalità delle cellule in presenza di nanogels è simile a quella di cellule non trattate (controllo negativo), diversamente quelle trattate con Doxorubicina [5 $\mu$ m] (controllo positivo) mostrano una mortalità di circa il 40%.

Come risultato si può concludere che i nanogels, generati mediante  $\beta$ -irraggiamento e funzionalizzati con gruppi amminici o cabossilici, non influenzano la vitalità cellulare, per cui non risultano essere citotossici.

### -Valutazione di fenomeni apoptotici

Al fine di escludere l'instaurarsi di eventi di tipo apoptotico, in seguito al trattamento delle cellule con i nanogels, sono stati effettuati dei saggi di attivazione delle caspasi 3-7-8, in quanto *marker* biochimici del meccanismo apoptotico.

Poiché l'attivazione di tali enzimi avviene in risposta ad un danno cellulare, in seguito all'esposizione a radiazioni, agenti chimici o chemioterapici, la verifica di tale attivazione permette di evidenziare eventuali danni cellulari dovuti all'esposizione con le nanoparticelle. Il metodo usato per la misura delle caspasi attive è la rivelazione fluorometrica, mediante la digestione di substrati sintetici caspasi-specifici. Infatti, le suddette caspasi, nella loro forma attiva, riconoscono come substrato la sequenza di 5 aminoacidi Ac-Asp-Glu-Val-Asp-MCA, che emette fluorescenza quando è digerita dagli enzimi attivi.



**Figura 3.** Saggi di valutazione dell'attivazione delle caspasi 3/7/8 in cellule MC3T3-E1 trattate con il sistemi P\*-g-A(100) (A) e in cellule ECV304 incubate con P\*(0.25)AA50 (B).

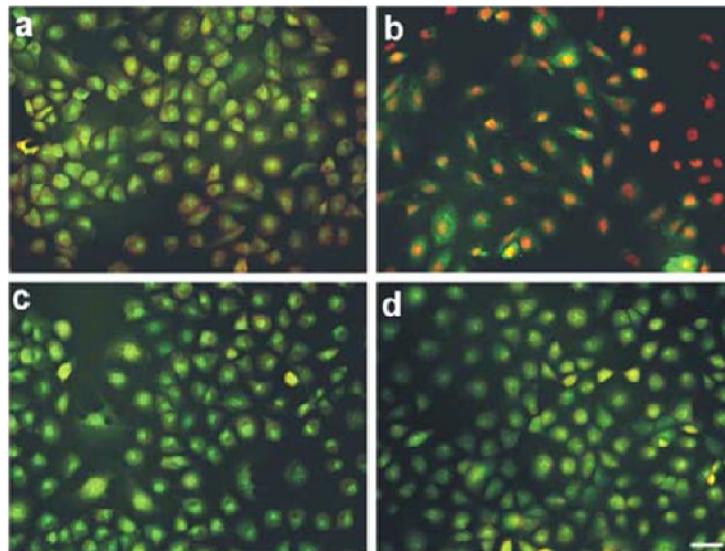
Dopo 24h ore di incubazione con i nanogels, è stato eseguito il test e come è possibile osservare dalla figura 3, in entrambi i casi, la curva relativa ai campioni di cellule trattate con i nanogels segue lo stesso andamento, nel tempo, della curva relativa alle cellule non trattate. Mentre la curva relativa al controllo positivo, rappresentato da cellule trattate con un farmaco, che induce fenomeni apoptotici, ossia la Doxorubicina, si discosta dalle altre, mostrando un'attivazione enzimatica crescente nel tempo. Questi risultati confermano l'assenza di fenomeni di morte cellulare programmata indotta dalla presenza di nanogels P\*(0.25) AA50 e P\*-g-A(100), rispettivamente in cellule ECV304 ed MC3T3-E1.

### -Valutazione dei danni al DNA

Mediante colorazione con Arancio di Acridina è stato possibile analizzare, dal punto di vista morfologico, se le cellule trattate con i nanogels mostrassero dei danni al DNA. L'arancio di acridina è un colorante metacromatico, in grado di emettere fluorescenza verde quando si intercala nel DNA di una cellula sana, mentre emette una fluorescenza

rossa quando entra nel nucleo di una cellula che presenta un DNA frammentato e a singolo filamento.

L'analisi è stata eseguita sia su cellule ECV304 che MC3T3 E1 (di quest'ultime i dati non sono mostrati) incubate con diverse concentrazioni di P\*(0.25) AA50 e P\*-g-A(100), per 24 ore. La Figura 4 mostra le immagini ottenute, mediante microscopia a fluorescenza, in seguito a colorazione con arancio di acridina di cellule ECV304; in particolare, i pannelli c-d della figura 4, mostrano cellule incubate rispettivamente con 60 e 250  $\mu\text{g/ml}$  di P\*(0.25)AA50.



**Figura 4.** Colorazione con Arancio di acridina di cellule ECV304 non trattate (a), trattate con Doxorubicina  $5\mu\text{M}$  (b) e incubate con P\*(0.25)AA50  $60\mu\text{g/ml}$  (c) e  $250\mu\text{g/ml}$  (d).

Dalle immagini si evince che le cellule trattate con i NGs non presentano i classici cambiamenti morfologici associati agli eventi apoptotici (frammentazione nucleare), ma mostrano principalmente nuclei uniformi marcati in verde brillante con strutture organizzate, simili al controllo negativo (pannello a). Viceversa, il DNA danneggiato è evidente in cellule trattate con la Doxorubicina [ $5\mu\text{M}$ ] (pannello b), che sono caratterizzate da nuclei rossi con cromatina condensata o frammentata.

I diversi saggi effettuati sono concordi nel provare che entrambe le famiglie di NGs hanno una buona biocompatibilità nei confronti dei sistemi cellulari in cui sono state valutate, vista l'assenza di danni citotossici, genotossici e di fenomeni apoptotici.

## **Coniugazione delle nanoparticelle con sonde fluorescenti e studi di *up-take* cellulare.**

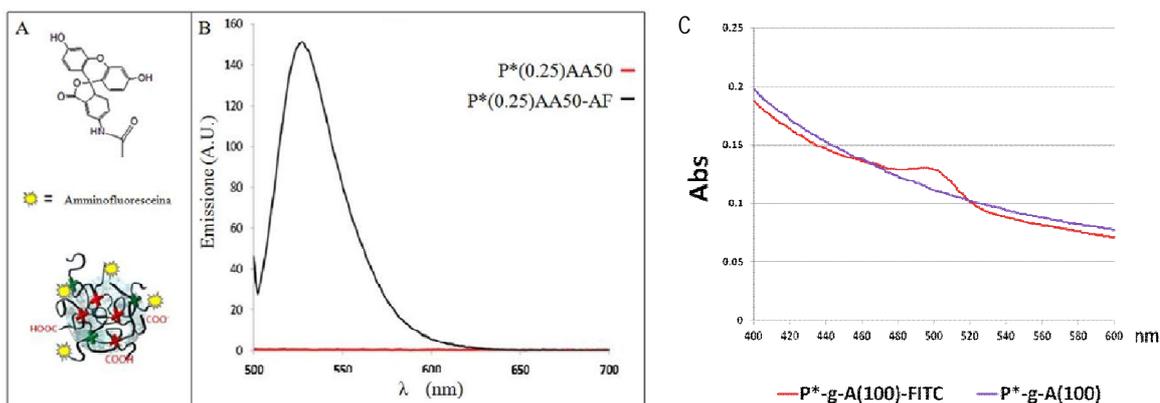
### **-Sviluppo di nanogels fluorescenti**

Grazie alla presenza dei gruppi funzionali presenti sulla superficie dei nanogels è stato possibile mettere a punto dei protocolli per la coniugazione con delle sonde fluorescenti, al fine di renderli visibili e poterne seguire il comportamento e il percorso nei sistemi biologici. Ai gruppi amminici di P\*-g-A(100) è stato coniugato l'isotiocianato di fluoresceina (FITC ex 490/em 520nm) e la conferma dell'avvenuta coniugazione è stata eseguita mediante delle analisi spettrofotometriche UV-vis e spettrofluorimetriche. Nella figura 5C, è mostrato lo spettro di assorbimento relativo ai nanogels coniugati con FITC, che presenta un picco nel punto di massima assorbanza della sonda (ossia a 490nm), a differenza dello spettro relativo ai nanogels non coniugati, in cui risulta assente.

Anche per la famiglia di nanogels P\*(0.25) AA50 è stato messo a punto un protocollo per la coniugazione tra i gruppi carbossilici presenti sulla superficie dei nanogels e l'amminofluoresceina (AF, ex 490/em 520nm). Come è possibile vedere dalla figura 5B, attraverso delle letture allo spettrofluorimetro, eccitando il campione coniugato e il suo controllo (P\*(0.25) AA50 non coniugato), ad una lunghezza d'onda di 490nm ( $\lambda$  di massima eccitazione), è stato possibile verificare la presenza del picco a 520nm solo nello spettro di emissione dei nanogels coniugati ad AF, mentre lo spettro relativo alle nanoparticelle non coniugate presenta una emissione pari a 0.

### **-Studi di *up-take* e di localizzazione dei nanogels in colture cellulari**

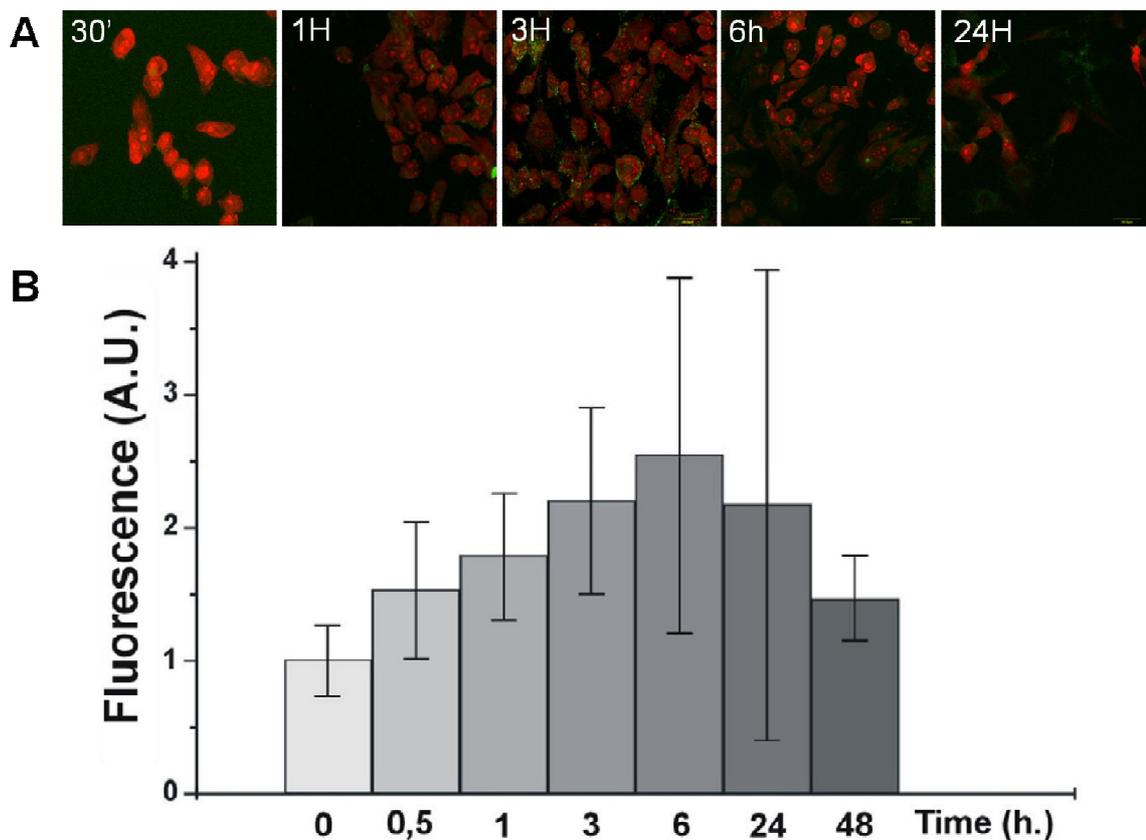
Per studiare il comportamento dei nanogels nei sistemi biologici, sono state utilizzate le varianti fluorescenti (P\*-g-A(100)-FITC, P\*(0.25)50AA-AF), descritte precedentemente. I saggi di *up-take* sono stati eseguiti su cellule MC3T3-E1, incubate con P\*-g-A(100)-FITC per diversi periodi di tempo, allo scopo verificare se i nanogels fossero capaci di oltrepassare la membrana plasmatica e di seguire la loro localizzazione all'interno dei compartimenti cellulari.



**Figura5.** Pannello di sinistra: A) formula chimica dell'amminofluorescena e rappresentazione schematica delle nanoparticelle coniugate alla sonda fluorescente. B) Spettri di emissione di  $P^*(0.25) AA50$  e  $P^*(0.25) AA50-AF$  ottenuti eccitando i sistemi a 490nm. Nel pannello C è mostrato un grafico che rappresenta gli spettri di assorbimento UV-vis dei sistemi  $P^*-g-A(100)$  e  $P^*-g-A(100)-FITC$ .

Dalle immagini di microscopia confocale (Fig. 6A), ottenute dalla sovrapposizione di tutte le scansioni effettuate, è possibile notare che dopo 30 min di incubazione, la maggior parte delle nanoparticelle (fluorescenza verde) si trova ancora in ambiente extracellulare e in minima parte sulle superficie cellulare. Col passare del tempo la concentrazione di nanogels all'interno delle cellule aumenta. Infatti, dopo un'ora di incubazione, la fluorescenza verde intracellulare relativa alla localizzazione delle nanoparticelle risulta maggiore, mentre diminuisce la quota extracellulare. Dopo 3 ore di incubazione la quantità di nanoparticelle all'interno delle cellule continua ad aumentare ulteriormente, fino a raggiungere un massimo di internalizzazione dopo sei 6 ore di incubazione. In seguito all'internalizzazione, la loro distribuzione citoplasmatica è principalmente perinucleare, probabilmente perché, in seguito a meccanismi endocitotici, entrano nel traffico di vescicole collegate all'apparato del Golgi e del reticolo endoplasmatico rugoso. Dopo 24 ore di incubazione la concentrazione dei nanogels all'interno delle cellule comincia a diminuire. Infatti dalle immagini (fig.6A) è evidente che la fluorescenza verde è maggiormente presente in ambiente extracellulare. Questi risultati sono in accordo con quelli ottenuti attraverso delle letture effettuate allo spettrofluorimetro, in cui è stata stimata la fluorescenza presente all'interno delle cellule MC3T3-E1, incubate con i nanogels a diversi periodi di tempo. Dal grafico (fig.6B) si evince che nei primi tempi di incubazione (30'), la fluorescenza all'interno delle cellule è bassa, ma aumenta per tempi di incubazione più lunghi (3-6 ore), per poi tornare a diminuire nelle 24-48 ore successive.

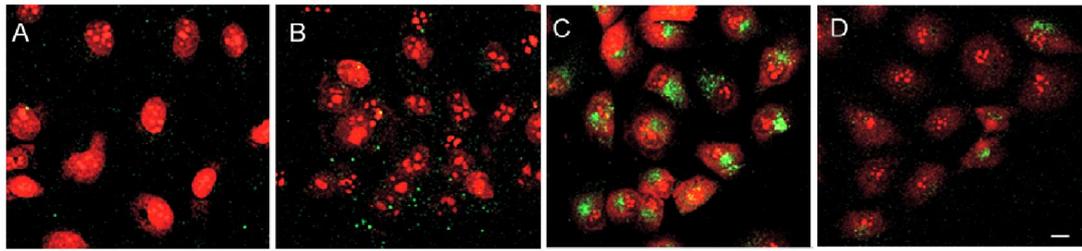
Probabilmente, i nanogels vengono secreti dalle cellule all'esterno, come prodotti di scarto.



**Figura 6.** A) Immagini di microscopia confocale di cellule MC3T3-E1, marcate con EtBr (rosso) incubate con P\*-g-A(100)-FITC (verde) a diversi tempi (30', 1, 3, 6 e 24 ore). Ingrandimento 40X. B) Analisi spettrofluorimetrica: l'istogramma rappresenta la quantità di nanoparticelle fluorescenti presente all'interno delle cellule MC3T3-E1 incubate a diversi tempi (da 0 a 48h).

Gli esperimenti di *uptake* e di localizzazione cellulare sono stati eseguiti anche con la seconda tipologia di nanogels (P\*(0.25)50AA-AF) e sono stati effettuati su cellule ECV304. Anche in questo caso i nanogels mostrano una buona affinità per le cellule e seguono lo stesso percorso, sia spaziale che temporale, di quelli descritti precedentemente. Infatti, dalle immagini (fig.7) di microscopia confocale, risulta chiaro che la quota di nanoparticelle all'interno delle cellule aumenta nel tempo, fino ad essere massima dopo 6 ore di incubazione (C), mentre diminuisce dopo 24ore (D).

Questi risultati indicano che tali nanogels hanno una buona affinità per le cellule. Infatti, è stata dimostrata la loro abilità di oltrepassare le membrane biologiche.

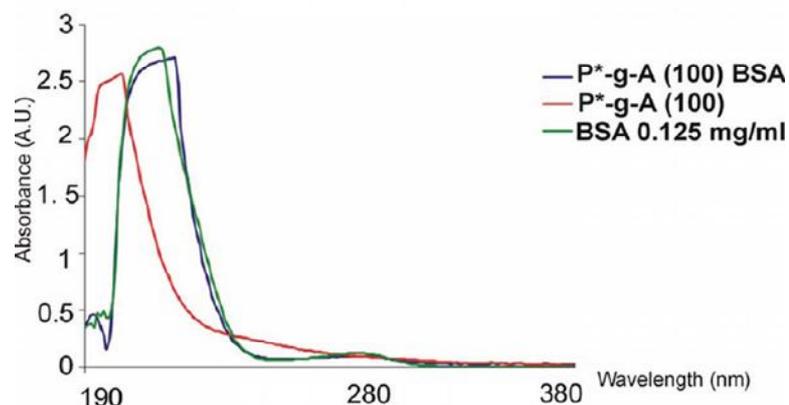


**Figura 7.** Immagini di microscopia confocale di cellule ECV304, marcate con EtBr (rosso) incubate con P\*(0.25)50AA-AF (verde) a diversi tempi: 1h(A), 3h(B), 6h(C) e 24h(D). Ingrandimento 60X.

## Coniugazione dei nanogels P\*-g-A(100) a molecole biologiche.

### -Coniugazione con la proteina BSA

Tutti i dati raccolti indicano un buon grado di biocompatibilità e una buona affinità dei nanogels per i sistemi biologici, per cui è stata valutata la possibilità di coniugarli a delle molecole biologiche, al fine di determinare il loro potenziale utilizzo come carriers per i sistemi di *drug delivery*. Per i primi esperimenti di bioconiugazione è stata scelta, come modello sperimentale, la proteina BSA (siero albumina bovina). In seguito alla bioconiugazione, è stato possibile verificare la presenza della proteina sulla superficie dei nanogels attraverso letture di assorbimento UV. Il grafico presente in figura 8, mostra che lo spettro relativo ai NGs coniugati alla BSA ha un picco a 280 nm che coincide con quello della BSA libera, usata come riferimento standard, mentre risulta assente nel campione non coniugato. L'interazione tra la BSA e le nanoparticelle è abbastanza forte ed è stato stimato che la percentuale in peso di BSA rispetto al polimero è circa il 30%<sup>[31]</sup>.

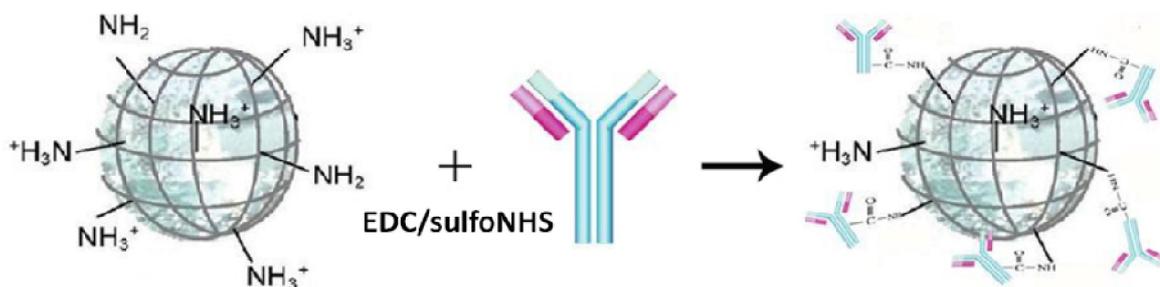


**Figura8.** Nel grafico sono rappresentati gli spettri di assorbimento UV dei campioni coniugati e non con la proteina BSA, rispetto alla proteina nella forma libera.

## Coniugazione dei nanogels con anticorpi monoclonali

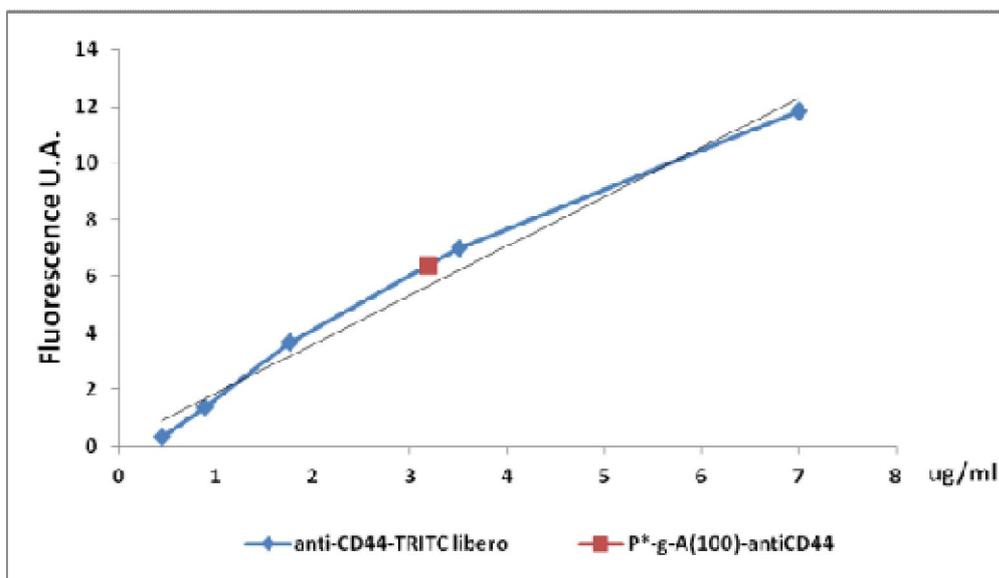
Per la bioconiugazione con anticorpi monoclonali (mAb) è stato messo a punto un protocollo in cui la reazione di coniugazione viene mediata dai carbodiimidi EDC e sulfonil-NHS<sup>[77]</sup>, che hanno permesso la formazione di un legame covalente tra l'anticorpo e i gruppi amminici presenti sulla superficie delle nanoparticelle (figura 9).

L'anticorpo utilizzato, indicato come anti-CD44<sup>TRITC</sup>, è un anticorpo monoclonale murino fluorescente, che riconosce la molecola CD44.



**Figura 9.** Schema che rappresenta la coniugazione delle nanoparticelle P<sup>\*</sup>-g-A(100) con l'anticorpo antiCD44<sup>TRITC</sup> mediante un protocollo basato sull'utilizzo di EDC/Sulfo-NHS.

L'antigene CD44 è la glicoproteina P90, presente sulla superficie cellulare e coinvolta nelle interazioni cellula-cellula, nell'adesione e nella migrazione cellulare. Si tratta di un recettore per l'acido ialuronico (HA), ma può anche interagire con altri ligandi, quali l'osteopontina, il collagene e le metalloproteasi della matrice (MMP). La verifica dell'effettiva bioconiugazione tra l'anticorpo e la nanoparticella è stata confermata da letture in fluorescenza, vista la presenza del fluorocromo TRITC a livello della molecola anticorpale. Infatti, per avere una stima quantitativa sul grado di coniugazione, sono state eseguite delle letture allo spettrofluorimetro (ex/em:541/572 nm) della curva di calibrazione costruita con l'anticorpo libero a concentrazioni note (fig.10) e registrando i valori di fluorescenza relativi. Da tale curva, per interpolazione, è stata ricavata la quantità di anticorpo effettivamente coniugata ai NGs leggendo il valore di fluorescenza del campione coniugato, dopo vari step di purificazione per allontanare l'anticorpo non coniugato. Inoltre, al valore di fluorescenza registrato per l'immunonanogels è stato sottratto quello di auto-fluorescenza delle nanoparticelle, eccitate a 541nm. Le stesse procedure di bioconiugazione (e verifica di questa), sono state eseguite per l'anticorpo monoclonale anti-β<sub>3</sub><sup>TRITC</sup>.



**Figura 10.** Grafico relativo alla curva di calibrazione in fluorescenza dell'anticorpo antiCD44<sup>TRITC</sup> e il relativo valore ottenuto per il sistema coniugato (3,18 $\mu$ g/ml).

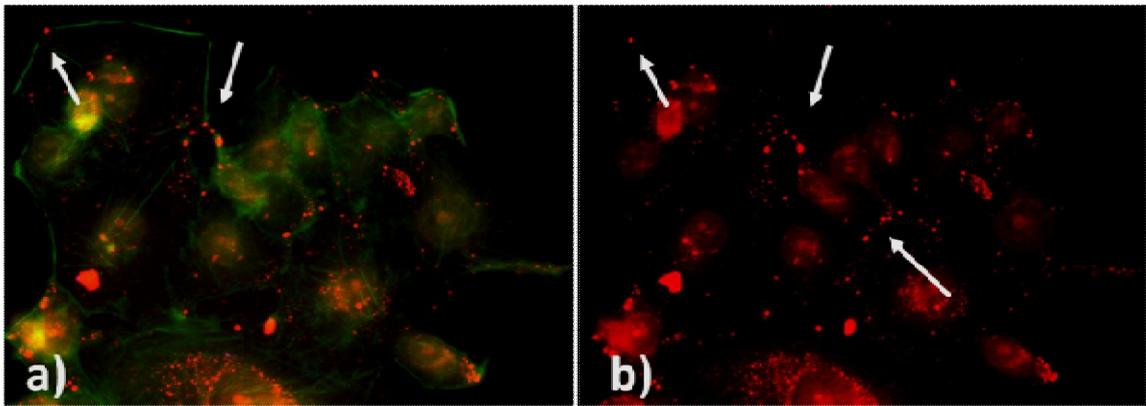
#### **-Studi di localizzazione degli immunonanogels su cellule ECV304**

E' stata esaminata l'interazione tra gli immunonanogels P\*-g-A(100)-antiCD44-<sup>TRITC</sup> e le cellule ECV304, in quanto questa linea cellulare presenta elevati livelli dell'antigene CD44 sulla sua superficie cellulare.

Il riconoscimento specifico antigene-anticorpo e la successiva internalizzazione dell'immunonanogels nelle cellule, è stata studiata sia mediante microscopia confocale che ad epifluorescenza, incubando le cellule ECV304 con gli immunonanogels per diversi tempi, in particolare 15 min, 30 min, 1h , 3h , 6h , 24h.

In questo caso, la fluorescenza rossa identifica il complesso anticorpo-nanoparticelle. Dall'immagine presente in figura 11, è possibile notare come dopo soli 15 minuti di incubazione con le cellule, le nanoparticelle si trovino sulla superficie cellulare.

Infatti, è riportato in letteratura che in seguito al legame con un ligando specifico, l'internalizzazione dell'immuno-complesso avviene nell'arco dei 10 minuti <sup>[43]</sup>. Grazie a questa strategia, si ha la possibilità di direzionare velocemente i NGs a livello cellulare, aumentando il grado di internalizzazione all'interno delle cellule.



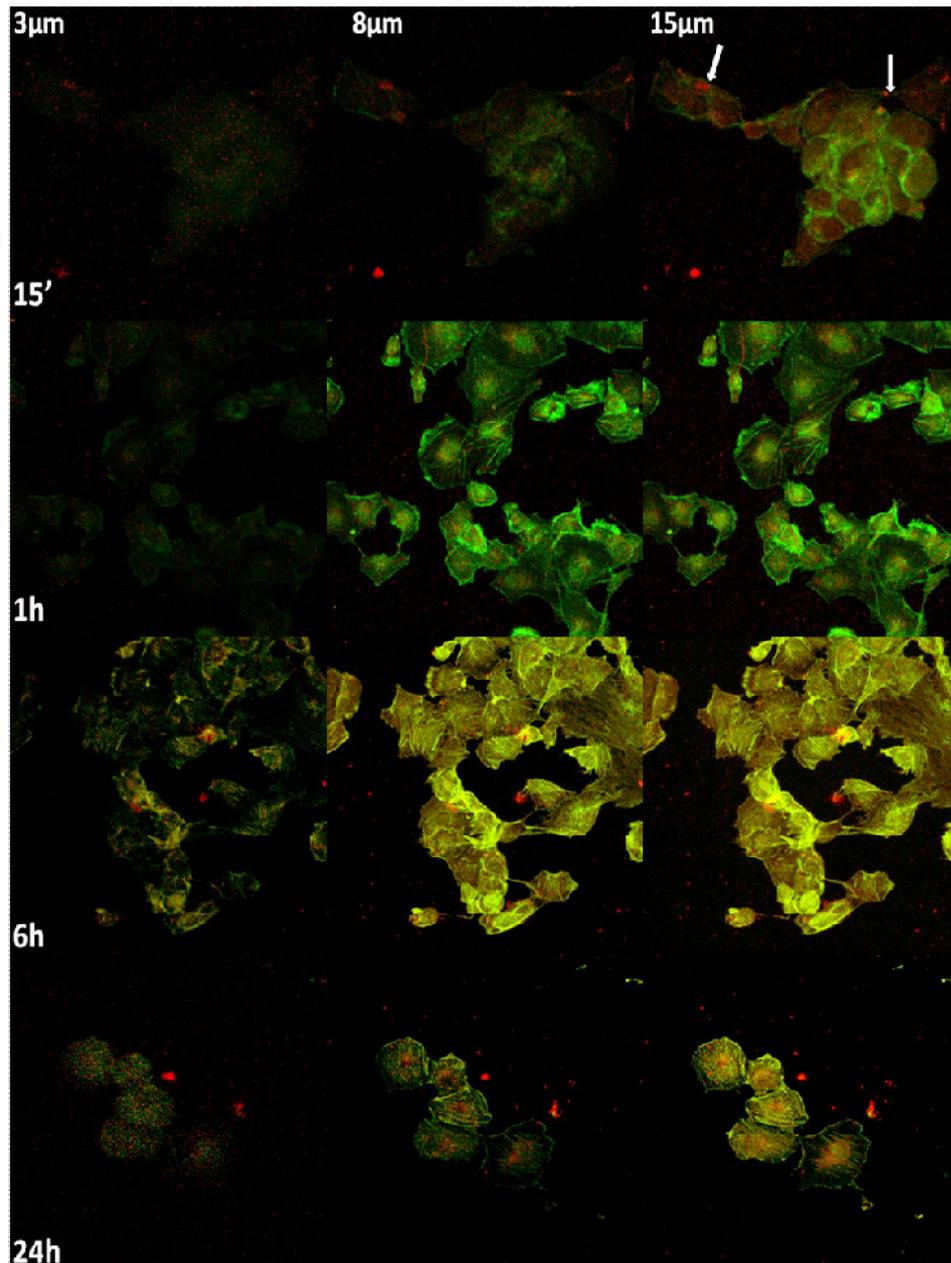
**Figura 11.** Immagini di microscopia a fluorescenza di cellule ECV304 incubate con P\*-g-A(100)-antiCD44-<sup>TRITC</sup> per 15'. Le frecce indicano la localizzazione superficiale dell'immunonanogels. A) immagine merge ottenuta dalla sovrapposizione della fluorescenza rossa (P\*-g-A(100)-antiCD44-<sup>TRITC</sup>) e verde relativa al citoscheletro di actina, marcato con falloidina-FITC b) fluorescenza rossa relativa al complesso P\*-g-A(100)-antiCD44-<sup>TRITC</sup>. Ingrandimento 60x.

Dall'analisi effettuata mediante microscopia confocale, è stato possibile verificare la localizzazione dei NGs all'interno di cellule ECV304 in diversi piani focali e a diversi tempi di incubazione. Come è possibile notare nel pannello rappresentato in figura 12, le sezioni rappresentate corrispondono a diverse "profondità" lungo l'asse di scansione dalla superficie che poggia sul vetrino verso l'interno della cellula.

Infatti, partendo da una scansione totale di circa 20  $\mu\text{m}$ , la sezione a 3  $\mu\text{m}$  di profondità corrisponde alla porzione iniziale della superficie cellulare, la sezione a 8  $\mu\text{m}$  alla zona centrale delle cellule e quella a 15  $\mu\text{m}$  alla "massima superficie cellulare acquisibile" (sezione finale della superficie cellulare).

Alla profondità di 3  $\mu\text{m}$  e per tempi brevi di incubazione (15'), è possibile notare che una buona percentuale di nanoparticelle si trova sulla membrana cellulare, rispetto a quando le nanoparticelle non sono coniugate ad un agente direzionante.

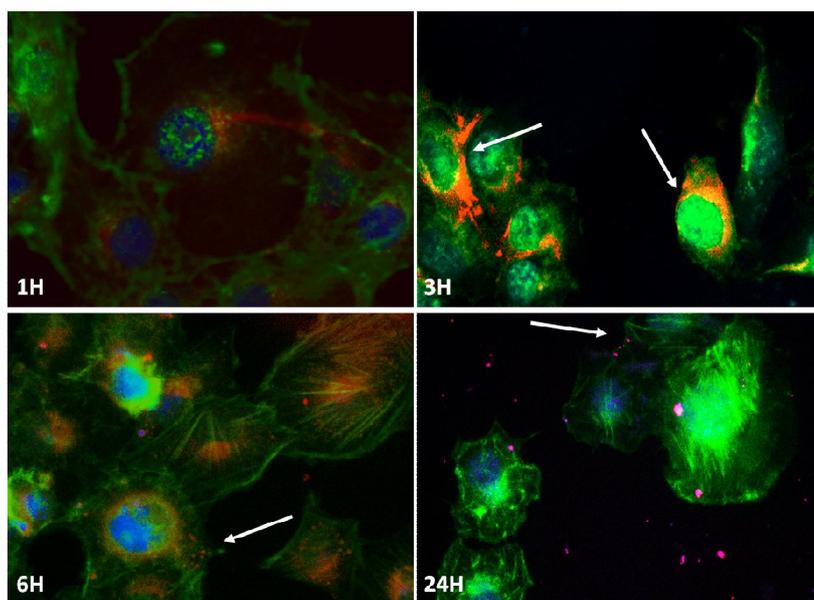
Nel corso del tempo, la quota di immunonanogels aumenta, soprattutto nelle sezioni centrali, quindi all'interno delle cellule, probabilmente circolando tra il Golgi e il reticolo endoplasmatico rugoso attraverso un trasporto vescicolare; mentre comincia a diminuire nelle 24 ore successive. Dalla figura 13, ottenuta mediante microscopia a fluorescenza è evidente che dopo 3 ore di incubazione una buona quantità di nanoparticelle si trova a livello perinucleare.



**Figura 12.** Cellule ECV304 (in verde) incubate per diversi tempi con P\*-g-A(100)-antiCD44-<sup>TRITC</sup> (in rosso). Nell'immagine sono rappresentate le fluorescenze merge (sovrapposizione delle fluorescenze rossa e verde) alle profondità di 3, 8 e 15μm, dei campioni a diversi tempi. Ingrandimento 40x.

Mentre dopo 6 ore di incubazione, la loro distribuzione è più evidente e distribuita tra i vari compartimenti citoplasmatici. Nei campioni incubati per 24 ore, la distribuzione citoplasmatica risulta ancora evidente, anche se in quantità inferiore, mentre sono nuovamente visibili nanoparticelle a livello della superficie cellulare, presumibilmente a causa di fenomeni di esocitosi. Questi risultati dimostrano che, in seguito alla coniugazione con le nanoparticelle, l'anticorpo non perde la sua capacità di riconoscere e legare il suo antigene specifico. Infatti, dopo 15 minuti di incubazione, le NGs si trovano già a livello

della membrana plasmatica, direzionate dall'anticorpo e dall'affinità che esso ha nei confronti del suo ligando specifico.

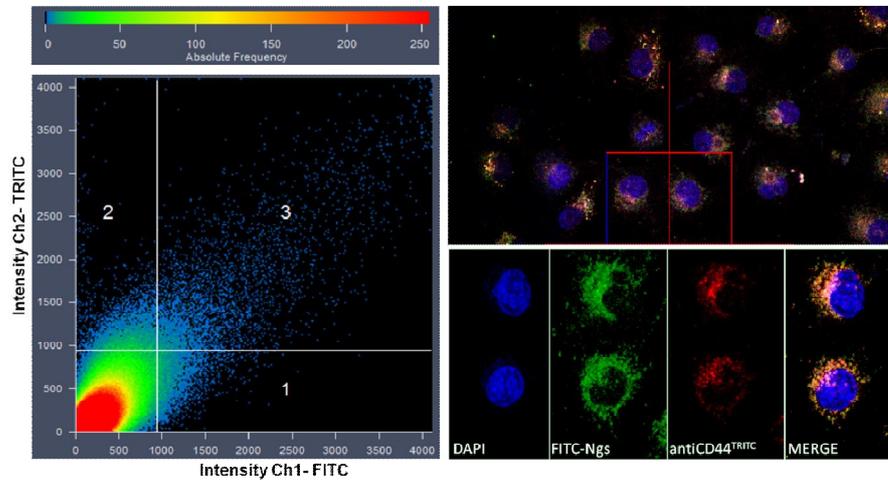


**Figura 13.** Immagini di microscopia a fluorescenza di cellule ECV304 incubate con  $P^*-g-A(100)$ -antiCD44-<sup>TRITC</sup> a 1h, 3h, 6h, 24h. In verde il citoscheletro marcato con falloidina-Fitc, in blu i nuclei marcati con Dapi, in rosso  $P^*-g-A(100)$ -antiCD44-<sup>TRITC</sup>. Le frecce indicano la diversa localizzazione delle nanoparticelle all'interno delle cellule. Ingrandimento 60x.

#### **-Analisi di colocalizzazione degli immunonanogels $P^*-g-A(100)^{FITC}$ coniugati all'antiCD44-<sup>TRITC</sup> su cellule ECV304**

Per capire se il legame tra le nanoparticelle e l'anticorpo è stabile e viene mantenuto anche quando il complesso viene internalizzato dalle cellule, è stata pensata una "doppia coniugazione". Infatti, i NGs prima sono stati legati direttamente alla sonda fluorescente FITC, in condizioni non saturanti, in modo da non occupare tutti i gruppi amminici disponibili, e successivamente con l'anticorpo fluorescente CD44<sup>TRITC</sup>. Dalle immagini ottenute mediante microscopia confocale (figura 14), si può notare che c'è una perfetta colocalizzazione tra le due fluorescenze, verde e rossa, dopo 3 ore di incubazione su cellule ECV304. Attraverso l'analisi dell'immagine ottenuta, è stato possibile elaborare un grafico di colocalizzazione, mettendo in relazione le diverse intensità di fluorescenza presenti nel campo selezionato (fig.14). Infatti, il software rielabora le intensità delle diverse fluorescenze presenti nello stesso pixel e le separa riportandole in un grafico in cui nella zona 1 riporta i pixel in cui è presente solo la fluorescenza verde, nella zona 2 i pixel in cui è esclusivamente presente la fluorescenza rossa, e nella zona 3 i pixel in cui ha

registrato una doppia fluorescenza. Dal grafico, quindi, è possibile concludere che c'è una perfetta colocalizzazione delle due fluorescenze analizzate, per cui il legame tra le nanoparticelle e l'anticorpo risulta essere forte e stabile e permane anche dopo 3 ore di incubazione con le cellule.

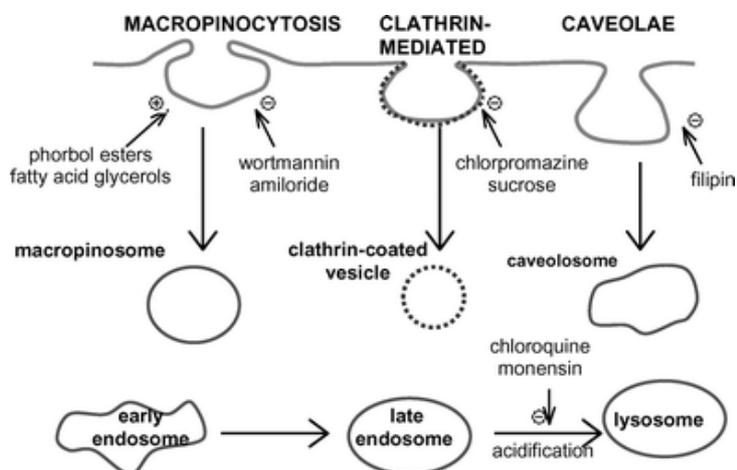


**Figura 14.** Scatter plot di colocalizzazione dei valori di intensità presente in ogni pixel dell'area selezionata nell'immagine a sinistra, della fluorescenza di FITC (ngs) nel canale 1 e TRITC (mAb CD44) nel canale 2. Le aree 1 e 2 rappresentano le intensità a livello dei pixel 'non colocalizing' di ogni canale, 3 rappresenta l'intensità colocalizzazione. A sinistra le immagini di microscopia confocale di cellule ECV304 marcate con Dapi (nuclei blu), e incubate con Ngs-FITC (verde) coniugate con mAb CD44<sup>TRITC</sup> (rosso). Merge rappresenta la sovrapposizione delle 3 fluorescenze. Ingrandimento 40x.

### Meccanismo di internalizzazione cellulare dei nanogels

In letteratura, sono state riportate diverse vie d'internalizzazione cellulare che coinvolgono nanoparticelle di diametro compreso tra i 50 e i 300 nm<sup>[72]</sup>.

Tra queste troviamo l'endocitosi mediata da clatrina, l'endocitosi mediata da caveolina, la macropinosi e i processi passivi, che non dipendono da energia.



**Schema 1.** Rappresentazione dei diversi pathways di endocitosi: macropinosi, endocitosi mediata da clatrina e da caveolina.

Per caratterizzare i meccanismi molecolari che stanno alla base del tipo di endocitosi sfruttato da tali nanogels, sono stati applicati due metodi di indagine indipendenti, ossia mediante analisi citofluorimetrica (FACS) e mediante analisi di microscopia confocale, del complesso P\*-g-A(100)-antiCD44-<sup>TRITC</sup> su cellule endoteliali ECV304.

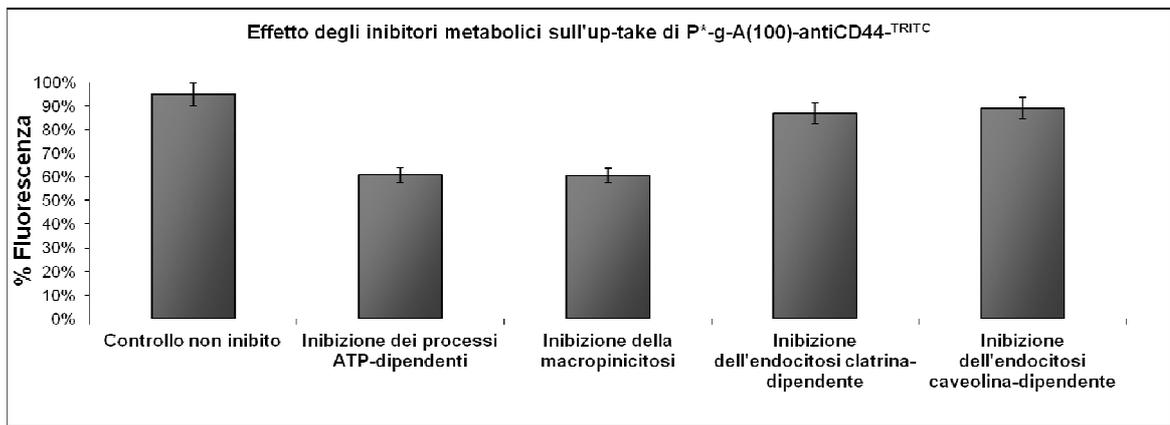
L'analisi FACS è stata usata per ottenere informazioni quantitative sulla diminuzione del grado di internalizzazione dei nanogels, dopo trattamento con inibitori specifici e per ciascun tipo di endocitosi.

Mentre la microscopia confocale è stata utilizzata per osservare l'effetto dell'inibizione sulle cellule trattate con i nanogels, da un punto di vista morfologico-qualitativo.

Al fine di inibire selettivamente un pathway endocitotico specifico, sono stati utilizzati degli inibitori metabolici diversi per ciascuna via. In primo luogo, è stato esaminato l'effetto dell'ossido di fenilarsina (concentrazione 30µM), un inibitore che blocca l'endocitosi clatrina-dipendente. In seguito al trattamento con l'inibitore, le cellule sono state incubate con P\*-g-A(100)-antiCD44<sup>TRITC</sup> per un'ora e dall'analisi citofluorimetrica non c'è stata una riduzione dei livelli di internalizzazione dei nanogels, rispetto a quelli registrati nel controllo di cellule ECV304, non inibite (figura 14). Successivamente, è stato esaminato l'effetto di nystatin, un inibitore specifico per l'endocitosi caveolina-dipendente. I risultati mostrano un grado di internalizzazione simile a quello precedentemente descritto. Infatti, anche nystatin (concentrazione 50 µM) non ha avuto alcun effetto di inibizione sull'ingresso dei nanogels, rispetto al controllo.

Infine, è stato studiato il coinvolgimento della macropinocitosi nell'internalizzazione dei nanogels. A tal fine, è stato utilizzato il 5(N-etil-N-isopropil)amiloride o EIPA (concentrazione 75µM) e come si può notare nel grafico (figura 14) che riepiloga ciascun esperimento di inibizione, nel blocco della macropinocitosi c'è stata una riduzione del 45% nel livello di fluorescenza data dalle nanoparticelle presenti all'interno delle cellule. Inoltre, poichè i tre meccanismi di endocitosi investigati sono dei processi che richiedono energia, è stata condotta un'analisi-controllo, incubando i nanogels con le ECV04 alla temperatura di 4 °C (una condizione che fa entrare le cellule in una sorta di quiescenza in cui si ha il blocco di tutti i processi attivi), al fine di stimare la quantità di nanoparticelle che vengono internalizzate sfruttando solo meccanismi passivi.

In questo caso è stata registrata una internalizzazione del 55%, a conferma del fatto che il rimanente 45% sfrutta un meccanismo di internalizzazione attivo, quale la macropinocitosi.

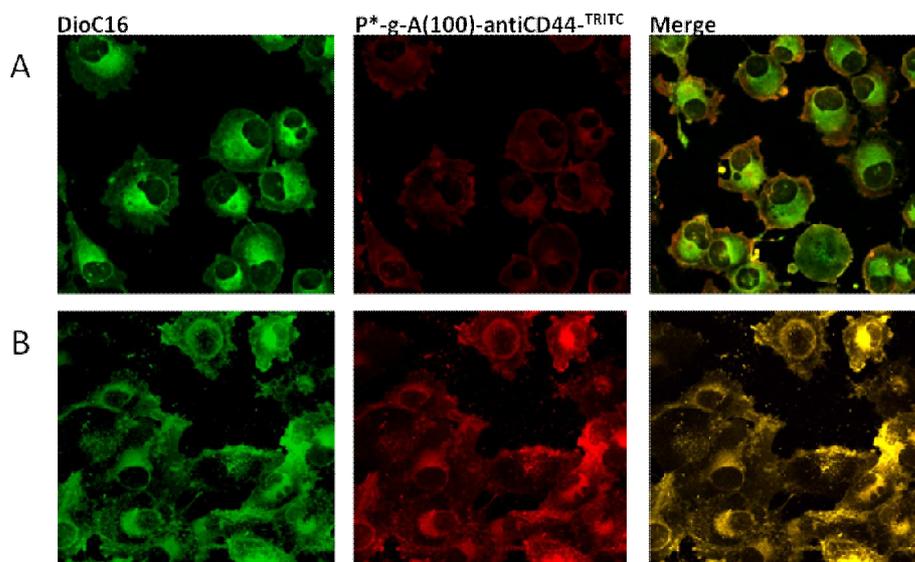


**Figura 14.** Analisi quantitativa mediante citofluorimetria del grado di internalizzazione di immunonanoparticles fluorescenti in cellule ECV304, trattate o meno con inibitori selettivi di diversi pathways endocitotici.

Gli stessi esperimenti di inibizione descritti precedentemente, sono stati condotti mediante microscopia confocale. In accordo con i risultati ottenuti al citofluorimetro, negli esperimenti di inibizione dell'endocitosi caveolina e clatrina-dipendente, non è stata rilevata alcuna differenza sia morfologica che nel grado di fluorescenza intracellulare rispetto al controllo, ossia cellule ECV304 non inibite ma incubate con i NGs.

Mentre, nel caso in cui è stata inibita la macropinocitosi, si può notare come una buona quota di nanoparticelle si trovava confinata sulla superficie cellulare (Fig.15A). È riportato in letteratura che la macropinocitosi interviene nell'incorporazione di macromolecole comprese nel range 0,2-5 $\mu$ m, ed interessa l'intervento di grandi porzioni della membrana citoplasmatica, che subisce un *ruffling* grazie alla riorganizzazione del citoscheletro di actina e alla formazione di lamellipodi che mediano un "bulk-uptake", ossia un'internalizzazione di fluidi e altri componenti solidi, che culmina con la formazione del macropinosoma<sup>[68]</sup>.

Com'è possibile notare in figura 15, c'è una differenza morfologica tra le cellule del campione controllo (B) (non inibite), e quelle inibite con l'EIPA (A). Infatti, le membrane presentano delle protrusioni meno pronunciate, rispetto al controllo, segno dell'effettiva inibizione del meccanismo specifico di macropinocitosi che interviene quando i nanogels vengono internalizzati dalle cellule.



**Figura 15.** Immagini al microscopio confocale di cellule ECV304 (verde) trattate con l'inibitore EIPA (A) che blocca la macropinosi e incubate con gli immunonanogels fluorescenti (rosso). In B) cellule ECV304 incubate con gli immunonanogels non inibite.

### Capacità di "Targeting attivo" da parte dell'immunonanogel P\*-g-A(100)anti $\beta_3$ <sup>TRITC</sup> mediante *Wound Healing assay*.

Per stabilire se gli immunonanogels fossero in grado di mediare un *targeting* attivo *in vitro*, è stato necessario generare un sistema in cui contemporaneamente fossero presenti cellule che esprimevano l'antigene specifico per l'anticorpo coniugato sulla loro superficie e cellule che ne erano prive. Per ottenere questo sistema sperimentale, innanzitutto, è stato coniugato al nanogel P\*-g-A(100) l'anticorpo monoclonale anti- $\beta_3$ <sup>TRITC</sup> ed è stata valutata l'avvenuta bioconiugazione, mediante analisi spettrofluorimetriche.

Per verificare la capacità di *targeting attivo* da parte del complesso P\*-g-A(100)anti $\beta_3$ <sup>TRITC</sup> è stato effettuato il *wound healing assay* su cellule endoteliali ECV304, in cui su un monostrato di cellule a confluenza è stato eseguito un *wound*, ossia un taglio, ottenendo una linea di demarcazione nettamente visibile, nella quale non sono presenti cellule "nell'area della ferita"; come mostrato in figura 16-A.

In genere questo tipo di saggio è utilizzato per valutare la velocità di migrazione di cellule, in diverse condizioni, con cui richiudono la "ferita"; ad esempio, in presenza di sostanze che inibiscono la migrazione o la proliferazione cellulare.

In questo caso, invece, è stata sfruttato il rimaneggiamento delle molecole che mediano la migrazione delle cellule endoteliali, in seguito all'induzione della transizione epitelio/mesenchima (EMT). E' stato ampiamente descritto in letteratura, che le cellule endoteliali, quando sono indotte ad assumere un fenotipo migratorio perdono molte delle loro caratteristiche epiteliali e acquisiscono un fenotipo mesenchimale<sup>[69]</sup>.

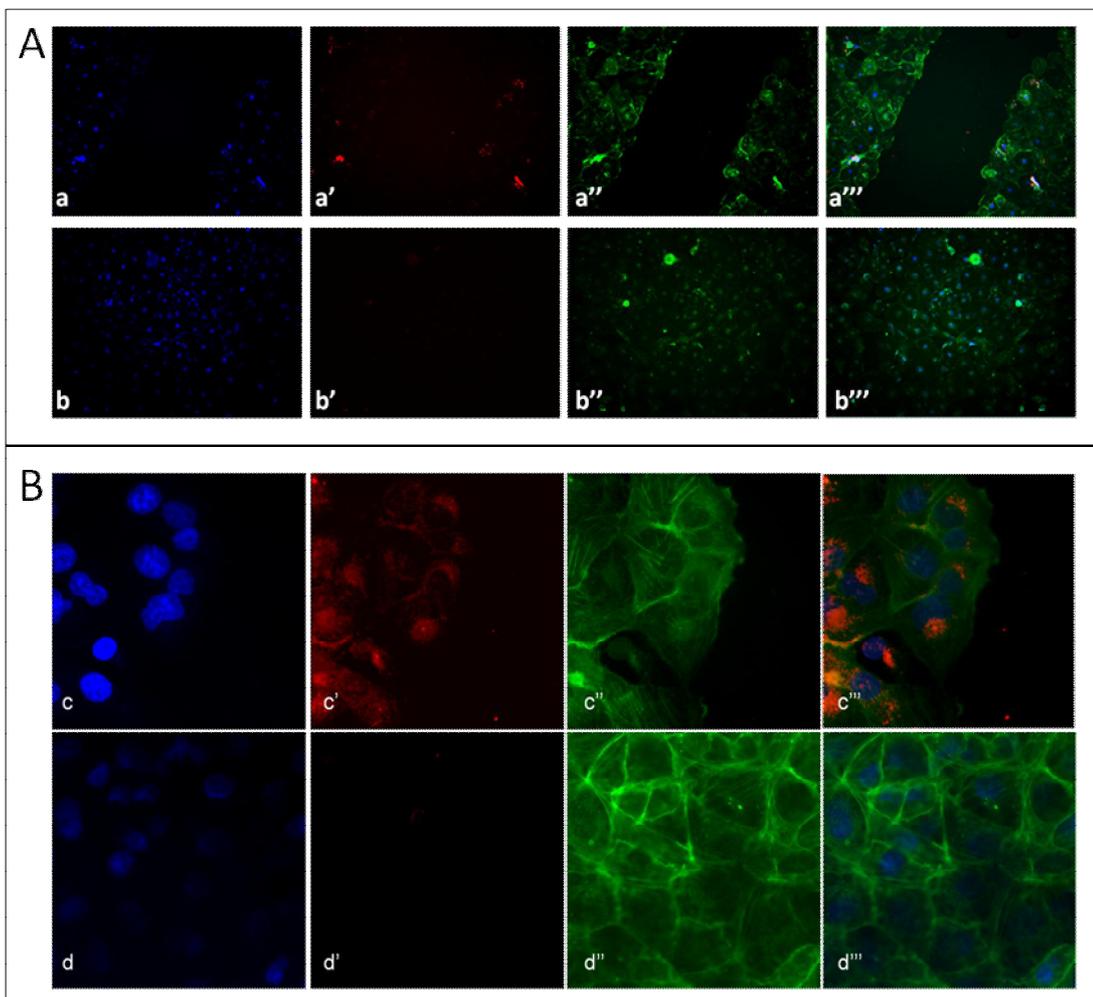
Durante questo processo, esse si riorganizzano perdendo alcuni marcatori di tipo epiteliale, e ne esprimono altri caratteristici del fenotipo mesenchimale acquisito. Si verifica pertanto una "riprogrammazione" molecolare, con nuove istruzioni per la cellula che prevedono la perdita delle fasce aderenti, la riorganizzazione del citoscheletro, la produzione di integrine  $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_v\beta_5$  e di metalloproteasi quali MT1-MMP, MMP-2 e 9 che favoriscono la degradazione della matrice extracellulare. Numerosi dati confermano che le integrine  $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_v\beta_5$  risultano sovraespresse in presenza di patologie neoplastiche sia sulla superficie di cellule endoteliali sia su quella di cellule cancerose, in quanto, in seguito all'interazione con numerosi ligandi nella ECM, le integrine formano dei *cluster* molecolari che attivano più pathways di segnalazione intracellulare che regolano la crescita, la sopravvivenza, la differenziazione e la migrazione cellulare<sup>[70]</sup>. Tra questi si ha il reclutamento di componenti del citoscheletro (actina, talina, vinculina), l'attivazione di chinasi come MAP e FAK, che legano e attivano fattori di crescita e piccole proteine G dando luogo ad una complessa cascata di trasduzione del segnale (*outside-in signalling*). Tutto ciò porta ad un aumento di affinità per i componenti dell'ECM, le cellule diventano polarizzate con una distribuzione asimmetrica di molecole sulla loro superficie e le integrine si concentrano sulla zona anteriore in direzione della migrazione. Per cui la molecola *target* scelta nel sistema sperimentale in questione, l'integrina  $\alpha_v\beta_3$ , risulta essere una proteina implicata nella crescita e nella progressione tumorale e riveste un ruolo di primaria importanza nel processo di angiogenesi.

Quindi, dopo aver effettuato *il wound*, ci saranno zone in cui le cellule sono a confluenza e pertanto mantengono le loro caratteristiche originali, con fenotipo epiteliale, e zone limitrofe al taglio in cui le cellule endoteliali subiranno l'EMT e cominceranno a migrare per andare a richiudere la ferita, avendo acquisito fenotipo mesenchimale.

A due ore dal wound, tali cellule endoteliali sono state incubate per 30' con le nanoparticelle P\*-g-A(100)anti $\beta_3$ <sup>TRITC</sup>. Dall'immagine in figura 16 A a', si evidenzia la localizzazione preferenziale delle nanoparticelle sulla superficie di cellule limitrofe la zona

di *wound* in cui è avvenuta la EMT, mentre risultano completamente assenti nelle zone in cui le cellule sono a confluenza e conservano il fenotipo epiteliale.

Questo risultato è ancora più evidente dalle immagini rappresentate in figura 16B, che mostrano un ingrandimento maggiore, in cui risulta ancora più visibile l'esclusiva presenza delle nanoparticelle nelle cellule vicine al taglio (b') e la differente morfologia tra le due tipologie di cellule presenti: nel pannello c'') il citoscheletro sta subendo una riorganizzazione e sono visibili i fasci di actina, mentre in d'') le cellule mostrano una classica organizzazione del citoscheletro di un endotelio differenziato, ossia contigua alla membrana plasmatica.



**Figura 16.** Wound healing assay su cellule ECV304 incubate con P\*-g-A(100)antiβ3<sup>TRITC</sup>. A:immagini di microscopia a epifluorescenza: (a-a'') area di wound, (b-b'') area di confluenza cellulare. B: ingrandimento dell'area di wound (c-c'') e dell'area di confluenza cellulare (d-d''). Blu: nuclei, rosso: P\*-g-A(100)antiβ3<sup>TRITC</sup>, verde: citoscheletro di actina, Merge: sovrapposizione delle tre fluorescenze.

Il dato appena discusso è un risultato molto promettente, in quanto è stato dimostrato che tali immunonanogels hanno un potere discriminativo all'interno di un sistema

eterogeneo, in cui l'agente direzionante, che in questo caso è l'anticorpo anti- $\beta$ 3, ha veicolato le nanoparticelle esclusivamente verso le cellule che esprimono il target specifico, e non in maniera casuale verso tutte le tipologie cellulare presenti nel sistema. Questo risultato getta le basi per poter utilizzare i nanogels in esperimenti di direzionamento attivo *in vivo*, in vista di una loro futura applicazione in tutte quelle terapie che necessitano il riconoscimento specifico del sito patologico.

## **Sviluppo di nanocarrier per il trasporto di un farmaco chemioterapico, la Doxorubicina**

Uno degli obiettivi fondamentali di questo progetto è quello di riuscire a formulare un sistema alternativo per la cura di patologie neoplastiche. Per fare ciò, è stata valutata la possibilità di utilizzare i nanogels come nanocarriers per il trasporto un farmaco chemioterapico, la Doxorubicina, uno dei farmaci antitumorali più efficaci attualmente conosciuti e comunemente utilizzato nel trattamento del tumore alla mammella.

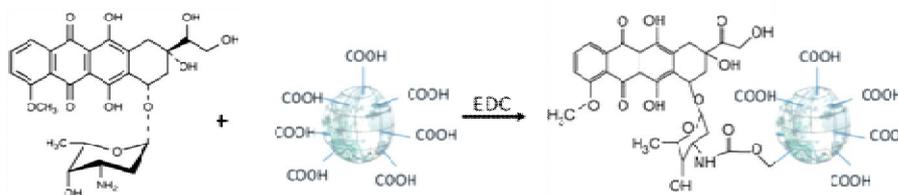
Tuttavia, il suo uso clinico è limitato dalla tossicità dose-dipendente (mielo-soppressione e cardiotoxicità), dalla comparsa di fenomeni di resistenza ai farmaci e dalla sua bassa specificità d'azione contro le cellule tumorali. Questi limiti possono essere superati grazie all'aiuto delle nanotecnologie, allo scopo di sviluppare una promettente alternativa nella terapia del cancro, riducendo gli effetti collaterali sistemici e aumentando l'efficacia terapeutica del farmaco.

Infatti, negli ultimi anni, i numerosi sistemi terapeutici a base di nanoparticelle hanno evidenziato una bassa tossicità, un rilascio del farmaco prolungato specie se associato ad un targeting molecolare.

Lo sviluppo di un sistema basato sull'uso di nanoparticelle può facilitare il trasporto farmaci attivi a livello delle cellule tumorali, utilizzando le conoscenze che si hanno sulla fisiopatologia dei tumori, sfruttando ad esempio la maggiore permeabilità del microambiente tumorale o i cambiamenti metabolici che la cellula neoplastica subisce.

Per fare ciò, inizialmente, sono stati fatti dei saggi di coniugazione tra i nanogels P\*(0.50)AA e la Doxorubicina (Dox) e si è studiato l'effetto del "*nanodrud*" ottenuto sulla vitalità di cellule tumorali HeLa.

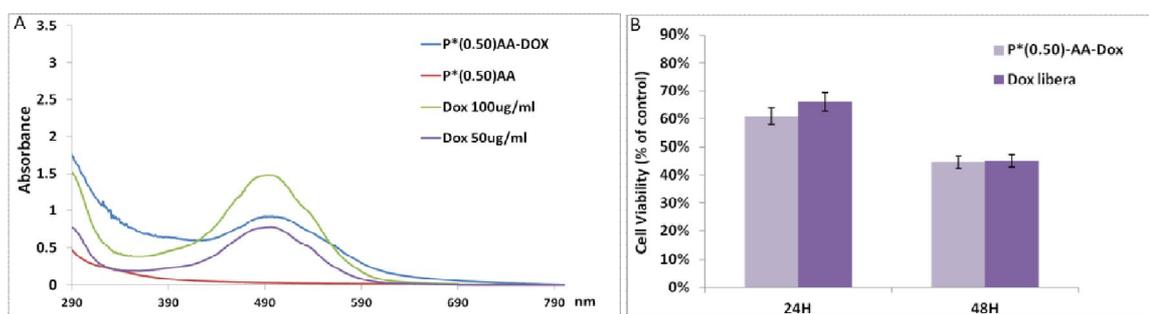
Innanzitutto, è stato messo a punto un opportuno protocollo di coniugazione per l'attacco della Doxorubicina ai nanogels, mediante la formazione di un legame ammidico con i gruppi carbossilici disponibili (vedi fig.17).



**Figura 17.** Schema di coniugazione tra la Doxorubicina e P\*(0.50)AA.

La DOX è una molecola anfipatica grazie al gruppo idrofobico policiclico, dove troviamo il cromoforo antrachinone (fluorescenza rossa, Ex/Em 490/590nm), e per quello idrofilo aminoglicosilico. Queste caratteristiche molecolari fanno sì che tali molecole, immerse in soluzione acquosa possono precipitare, in quanto tendono ad aggregarsi spontaneamente.

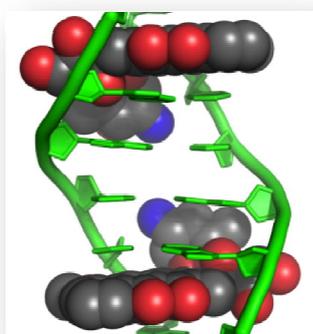
In seguito alla coniugazione è stata effettuata una prolungata dialisi, al fine di allontanare le molecole di Dox non legate. Quindi è stata stimata una concentrazione di farmaco coniugato pari a 60µg/ml, mediante delle luttore spettrofotometriche. In figura 20A, sono riportati gli spettri di assorbimento UV-Vis del sistema coniugato, del controllo relativo alle sole nanoparticelle e del farmaco nella sua formulazione libera, alle concentrazioni di 50 e 100 µg/ml. Il picco massimo di assorbimento a 490nm è stato osservato negli spettri relativi al farmaco libero e al sistema coniugato P\*(0.50)AA-Dox, mentre risulta assente nello spettro relativo a P\*(0.50)AA.



**Figura 18.** A) Spettri di assorbimento UV-vis di P\*(0.50)AA, P\*(0.50)AA-Dox e Doxorubicina libera 50µg/ml e 100µg/ml. B) AlamarBlue test su cellule HeLa incubate per 24 e 48 ore con P\*(0.50)AA-Dox e Doxorubicina (5µM).

Una volta caratterizzate dal punto di vista chimico-fisico, è stata analizzata la citotossicità dei *nanodrug* verso cellule HeLa rispetto all'azione del farmaco libero, incubando le cellule con la stessa concentrazione di Dox ( $5\mu\text{M}$ ). Come è possibile notare in figura 20B, la vitalità delle cellule HeLa ottenuta nelle due condizioni, risulta molto simile sia dopo 24 che 48 ore di incubazione. Questo risultato indica che le molecole di Doxorubicina mantengono la loro capacità di indurre la morte cellulare, anche quando trasportate nel loro sito d'azione dai nanogels.

L'esatto meccanismo d'azione molecolare della Doxorubicina è complesso ed ancora poco chiaro. E' noto che la Doxorubicina interagisce con il DNA intercalandosi nel solco minore e maggiore della doppia elica, inducendone frammentazione e blocco della biosintesi.



**Figura 19.** Rappresentazione schematica dell'intercalazione della Doxorubicina nel DNA.

La porzione aromatica planare cromofora della molecola si intercala tra due paia di basi del DNA, mentre lo zucchero daunosamino si posiziona nel solco minore ed interagisce con le paia di basi a fianco immediatamente adiacenti al sito di intercalazione<sup>[73]</sup>. Nelle coppie di basi a monte e a valle del farmaco intercalato si ha una torsione che causa una modificazione nella conformazione della doppia elica impedendo associazione con le DNA-elicasi, la topoisomerasi II e con le DNA polimerasi che non possono avviare la replicazione del DNA, la sintesi dell'RNA, la traduzione e quindi la divisione cellulare, portando ad apoptosi la cellula con un meccanismo mediato dal gene p-53.

E' stato proposto il meccanismo d'inibizione della topoisomerasi II, un enzima che superavvolge negativamente il DNA, durante la replicazione. E' ipotizzato che la Doxorubicina stabilizza il complesso topoisomerasi II, che dopo aver rotto la catena del DNA durante la replicazione, impedisce alla doppia elica di essere risaldata e quindi blocca il processo di replicazione<sup>[74]</sup>.

Questi risultati preliminari, sebbene molto promettenti, presentano però degli svantaggi. Il sistema *nanodrug*, in queste condizioni, risulta essere colloidalmente instabile. Infatti, la Doxorubicina legata ai nanogels ad elevate concentrazioni precipita in soluzione formando aggregati; di conseguenza si è pensato di sviluppare un sistema alternativo, basato sul un rilascio controllato.

### **Generazione di un sistema di rilascio controllato di farmaci, mediante stimolazione da parte del glutatione.**

Il rilascio di un farmaco antitumorale, mediante stimolazione da parte del glutatione (GSH), rappresenta un approccio innovativo, di tipo non enzimatico, che si propone di controllare la consegna del chemioterapico in modo che avvenga esclusivamente quando il carriers entra nella cellula tumorale, evitando la dispersione aspecifica e sistemica del farmaco.

Questa strategia è basata sulla grande differenza tra la concentrazione di GSH intracellulare (1-10mM) rispetto ai livelli micromolari nel circolo ematico<sup>[75]</sup>.

Inoltre recenti studi hanno riportato un significativo aumento dei livelli di GSH citoplasmatico nelle cellule tumorali, rispetto a quelli presenti nelle cellule normali.

Questi studi riguardano l'origine della farmaco-resistenza dei tumori, un problema significativo nel trattamento del cancro.

Questo problema è ulteriormente aggravato dal fatto che i tumori possono diventare resistenti alla chemioterapia diversificata, ossia con farmaci sinergici aventi meccanismi citotossici diversi. Per cui risulta fondamentale la comprensione del meccanismo molecolare e fisiologico che sta alla base della resistenza ai farmaci, e diventa chiaro che un certo numero di fattori possono essere coinvolti nella lo sviluppo di questa resistenza. Gli studi a livello cellulare hanno dimostrato che la sovraespressione della glicoproteina-P di membrana coinvolta nell'afflusso/efflusso del farmaco, gli elevati livelli di molecole redox attive e l'aumento di attività di enzimi coinvolti nella detossificazione, possano fornire resistenza ai farmaci chemioterapici. La misura in cui questi adattamenti biochimici contribuiscono alla resistenza ai farmaci *in vivo* al momento non è chiara, tuttavia, il glutatione (GSH) e gli enzimi ad esso legati, sono noti per la funzione antiossidante e di disintossicazione cellulare dagli xenobiotici potenzialmente dannosi e

dalle specie reattive dell'ossigeno tossiche. L'importanza del GSH nelle risposte alterate ad alcune chemioterapie è stata dimostrata in virtù dello sviluppo di agenti che inibiscono o stimolano il livello di sintesi di GSH intracellulare. Infatti studi in cui si ha una deplezione di GSH intracellulare hanno dimostrato una migliore citotossicità di molti farmaci chemioterapici e una maggiore attività ipossica da radiosensibilizzanti cellulari.

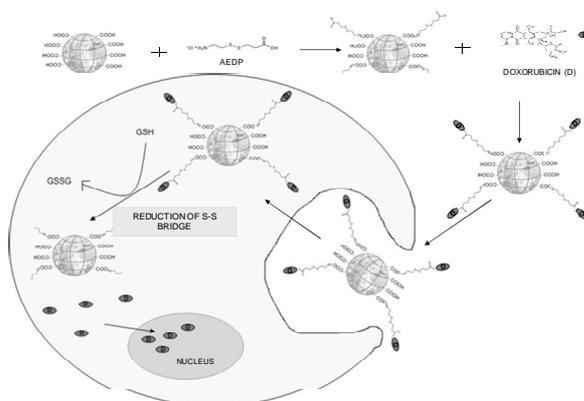
In questo studio, diversamente, viene sfruttato questo meccanismo difensivo che la cellula tumorale adotta per aumentare l'efficacia farmacologica ossia la quantità di farmaco rilasciato a livello della cellula tumorale e proteggere, al contempo, le cellule sane circostanti.

### **-Creazione di P\*(0.50)AA-AEDP-DOX e meccanismo d'azione proposto**

Per la creazione di un sistema di rilascio controllato, si è pensato di inserire uno *spacer* tra il nanogels e la Doxorubicina. Questo *spacer*, indicato con la sigla AEDP, presenta al suo interno un ponte disolfuro, oltre ad un'estremità amminica e una carbossilica che permettono l'aggancio simultaneo al nanogels e al farmaco, mediante due step di coniugazione (vedi Fig 20).

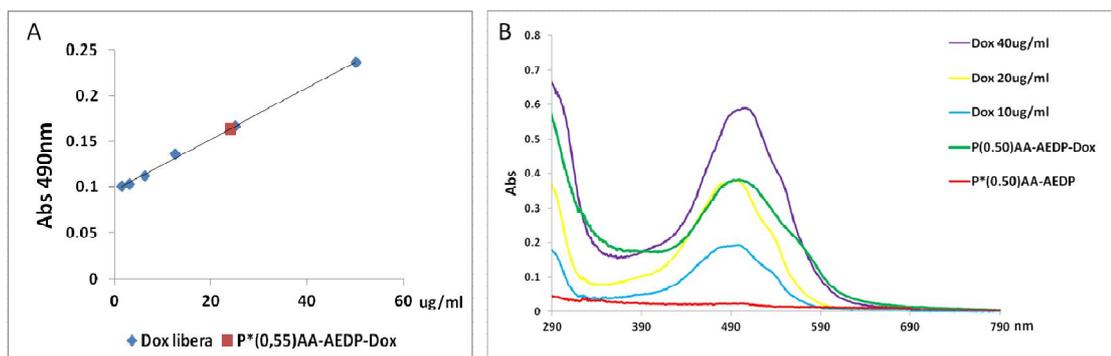
Il meccanismo d'azione proposto prevede quindi la creazione di un *nanodrug stimolo-responsive*, sensibile alle variazioni dello stato redox dell'ambiente in cui si trova.

Infatti, quando la nanoparticella si trova in ambiente extracellulare o nei fluidi corporei, il farmaco rimane agganciato al nanogels, mentre quando penetra in cellule che esprimono alti livelli di glutatione, come quelle tumorali, si ha la rottura del ponte di solfuro da parte del glutatione e il rilascio di Dox nel citosol, che può migrare nel nucleo e indurre morte cellulare programmata.



**Figura 20.** Schema di coniugazione a due step dei nanogels con l'AEDP e la Dox e meccanismo d'azione proposto nei sistemi cellulari

Dopo la coniugazione e la purificazione tramite dialisi dei sistemi ottenuti, è stata stimata la quantità di Doxorubicina legata tramite una curva di calibrazione, leggendo i valori di assorbanza a 490nm del farmaco libero a concentrazioni note. Interpolando il valore di assorbanza registrato per il sistema coniugato P\*(0.50)AA-AEDP-DOX, sottraendo il valore di assorbanza registrato per P\*(0.50)AA-AEDP, è stato possibile calcolare che sono stati coniugati circa 24µg/ml di Doxorubicina. Inoltre, sono stati osservati gli spettri di assorbimento UV-Vis del farmaco libero e del sistema coniugato (Fig. 21A-B).

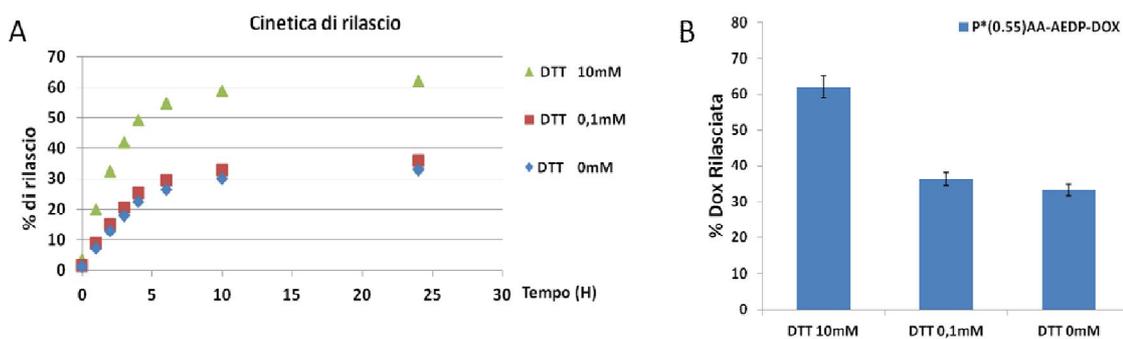


**Figura 21.** A) Curva di Calibrazione a 490nm di Dox libera a diverse concentrazioni e interpolazione del valore di P\*(0.50)AA-AEDP-DOX. B) Spettri di assorbimento UV-vis di P\*(0.50)AA-AEDP, P\*(0.50)AA-AEDP-Dox e Doxorubicina libera (40µg/ml, 20µg/ml e 10µg/ml).

Inoltre, i *nanodrug* ottenuti risultano colloidamente stabili, probabilmente grazie a una minore concentrazione di Doxorubicina presente nel sistema. Infatti, dopo una fase di ottimizzazione dei protocolli di coniugazione è stato trovato il giusto rapporto NGs-AEDP e Dox, che ha conferito a tali nanoparticelle una maggiore solubilità e stabilità.

### -Studi di rilascio *in vitro* su P\*(0.50)AA-AEDP-DOX

Il ponte disolfuro presente tra la nanoparticella e il farmaco può subire una rottura quando il sistema si trova in presenza di un ambiente riducente. Per studiare la capacità di rispondere a tale stimolo, le nanoparticelle P\*(0.50)AA-AEDP-DOX sono state trattate con un agente riducente che è in grado di rompere i ponti disolfuro, ossia il ditiotreitolo (DTT), alle concentrazioni 10mM e 0,1mM (rispettivamente le concentrazioni che si ritrovano nel citoplasma di una cellula tumorale e nel circolo ematico). Come controllo, il rilascio della Dox è stato condotto in un tampone, senza DTT. A diversi intervalli di tempo è stata misurata allo spettrofotometro la quota di Doxorubicina rilasciata nel mezzo dalle nanoparticelle.



**Figura 21.** A) Cinetica di rilascio di Dox da P\*(0.50)AA-AEDP-DOX in tampone Tris-HCl 1mM, pH 7.4 a 37°C, con o senza DTT (10mM e 0,1mM). B) Istogramma della percentuale di Dox rilasciata da P\*(0.50)AA-AEDP-DOX nelle tre condizioni dopo 24 ore.

Come è possibile osservare dal grafico relativo allo studio sulla cinetica di rilascio della Dox (fig.21A), la quota di Dox rilasciata sale più velocemente quando le nanoparticelle si trovano in presenza di un forte ambiente riducente (10mM), e raggiunge il 60% dopo 12 ore; mentre risulta molto più bassa quando le nanoparticelle si trovano in condizioni riducenti pari a 0. Dalla curva relativa alla cinetica di rilascio dei campioni trattati con DTT 0,1mM si evidenzia che il rilascio è leggermente più accelerato, anche se segue lo stesso andamento del controllo (0mM DTT). Quindi la quantità di farmaco rilasciata nelle 24 ore è circa il doppio rispetto al controllo, in cui il legame rimane stabile nel tempo. Quindi, è possibile concludere che il ponte disolfuro presente a livello delle nanoparticelle P\*(0.50)AA-AEDP-DOX può essere ridotto in presenza di uno stimolo riducente, accelerando il rilascio della Doxorubicina.

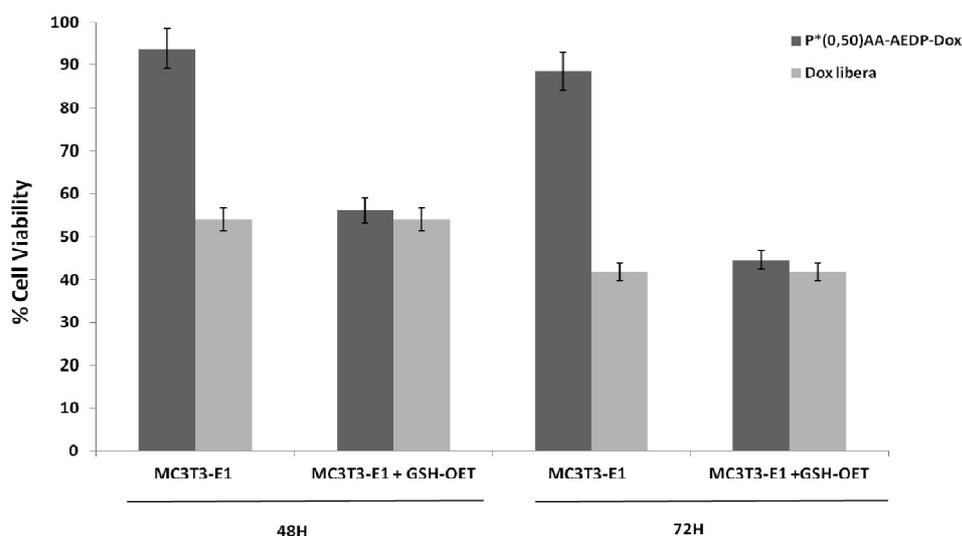
**- Studi sul rilascio di Doxorubicina dal nanodrug, mediante stimolo del GSH intracellulare.**

L'up-take cellulare di P\*(0.50)AA-AEDP-Dox è stato valutato per determinare l'effetto sul rilascio della Dox a livello cellulare, quando le nanoparticelle si trovano in presenza di stimolo riducente.

In questo caso, lo stimolo è rappresentato dal glutathione, molecola che interviene inibendo l'azione di metaboliti tossici di scarto che vengono prodotti durante i normali processi metabolici o in situazioni di stress. La sua funzione di forte antiossidante lo rende una barriera riducente che previene l'eccessiva ossidazione dei comparti cellulari da parte dei radicali liberi. Alcune delle funzioni basilari del GSH sono legate alle reazioni del gruppo sulfidrilico della cisteina, che come altri tioli, può subire numerose reazioni redox.

La forma ossidata, in particolare, include i disolfidi (GSSG) composti da due molecole di GSH legate tramite i residui di cisteina, oppure i disolfidi misti dove il GSH lega con altri tioli. I composti in grado di ossidare il GSH, in larga misura, sono le specie reattive dell'ossigeno, come lo ione superossido e il radicale ossidrile. Di conseguenza il glutathione agisce come molecola *scavenger*, per evitare l'ossidazione di componenti cellulari

Per monitorare il rilascio controllato della Doxorubicina, si è scelto di utilizzare come modello cellulare non tumorale gli osteoblasti murini MC3T3-E1 e come modello tumorale le cellule HeLa. Nel sistema sperimentale adottato e per tutti gli esperimenti di seguito descritti, è stato indotto l'aumento del GSH citoplasmatico tramite una sostanza chiamata GSH-OET (glutathione mono-estere). Il GSH-OEt penetra facilmente all'interno delle cellule inducendo un aumento della concentrazione citoplasmatica di glutathione nella sua forma ridotta. Il GSH-OET viene usato, quindi, per implementare il pool di GSH *in vitro* e *in vivo* [76]. Il trattamento prevede l'incubazione delle cellule con GSH-OEt, che induce un aumento della concentrazione di GSH citoplasmatico fino a 10 mM e permette di simulare le condizioni riducenti presenti nelle cellule tumorali. Mediante saggi di vitalità cellulare, è stato studiato l'effetto del farmaco in due condizioni sperimentali, ossia in cellule pretrattate o meno con il GSH-OET, e rispetto anche all'azione del farmaco nella formulazione libera alla medesima concentrazione.

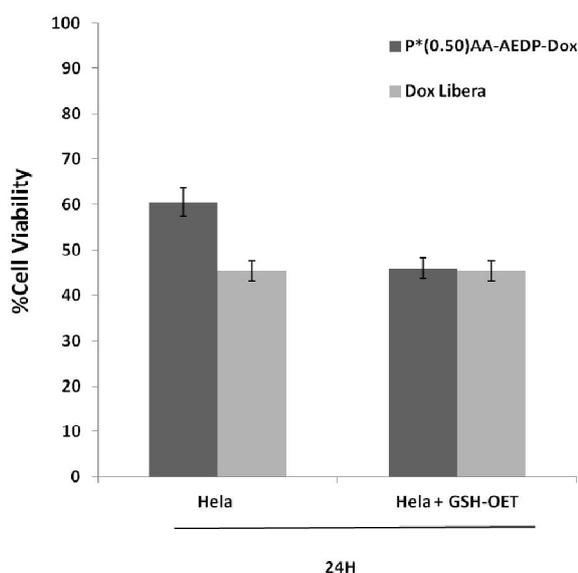


**Figura 22.** Alam Blue assay su cellule MC3T3-E1 pretrattate o meno con GSH-OET e incubate per 48 e 72 ore con P\*(0.50)AA50-AEDP-Dox e Dox libera [0,3 µg/ml]. % rispetto al controllo di cellule non trattate.

Come si può osservare nell'istogramma in Figura 22, i risultati di vitalità cellulare rivelano

una significativa differenza tra quella delle cellule MC3T3-E1 pretrattate e non con GSH-OET, sia a 48 che a 72 ore. Infatti, le cellule in cui è stato indotto un aumento di GSH citoplasmatico e incubate con P\*(0.50)AA50-AEDP-Dox, mostrano un tasso di vitalità cellulare inferiore pari al 55% rispetto a quello delle cellule non pretrattate e incubate con i nanogels, che mostrano una buona vitalità, pari al 96%. Inoltre, dopo 72 ore d'incubazione, le cellule non pretrattate e incubate con i nanogels mostrano una vitalità del 90% rispetto al 45% di vitalità delle cellule pretrattate. Inoltre, le cellule con elevati livelli di GSH intracellulare mostrano una mortalità simile a quella che si ha quando la Doxorubicina viene somministrata nella sua formulazione libera, in entrambi i tempi di incubazione. Questo risultato fa supporre che la Doxorubicina coniugata ai nanogels è stata rilasciata in seguito alla rottura del ponte, svolgendo una azione simile a quella del farmaco libero.

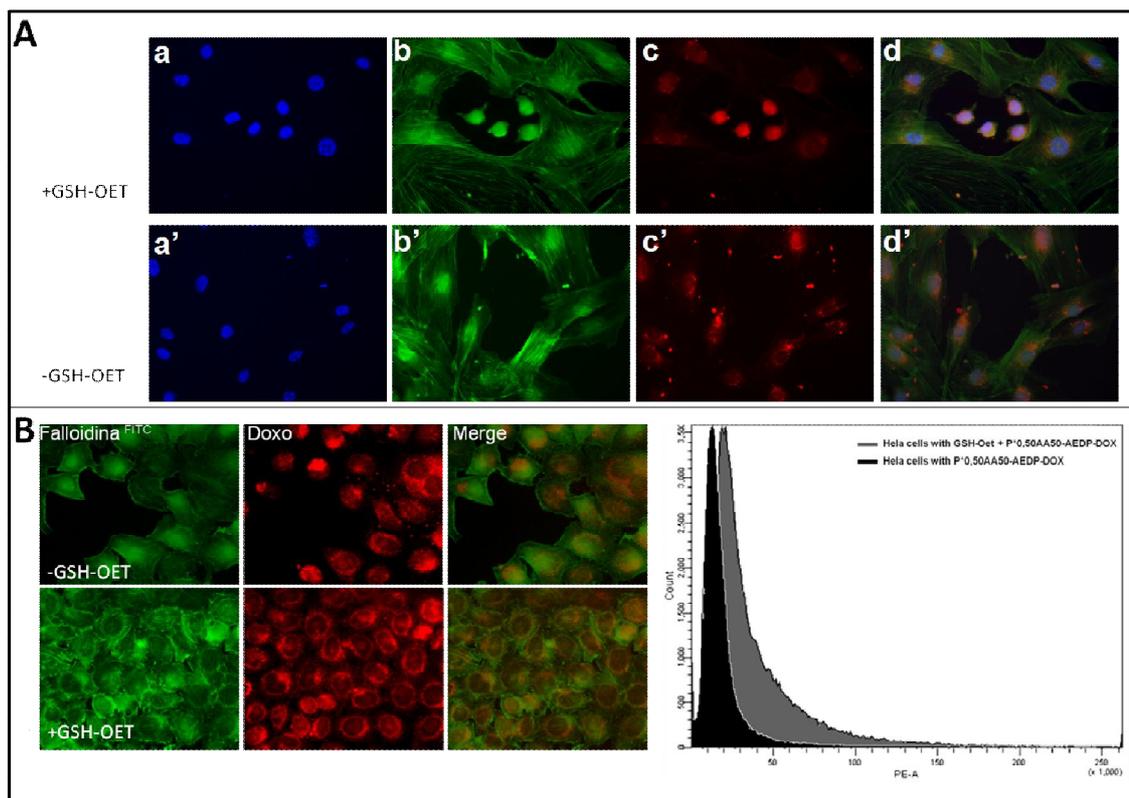
Lo stesso tipo di saggio è stato effettuato per le cellule HeLa, una linea di cellule tumorali che ha un livello basale di GSH maggiore rispetto a quello delle MC3T3-E1.



**Figura 23.** *Alam Blue assay su cellule HeLa pretrattate o meno con GSH-OET e incubate per 24 ore con P\*(0.50)AA50-AEDP-Dox e Dox libera [1µg/ml]. % rispetto al controllo di cellule non trattate.*

In questo caso, infatti, la vitalità delle HeLa incubate con le nanoparticelle P\*(0.50)AA50-AEDP-Dox, già a 24 ore risulta molto ridotta, pari al 60%, mentre quella delle cellule pretrattate col GSH-OET risulta ancora minore (45%) e paragonabile a quella che si ha per le cellule incubate con la Doxorubicina libera. Per cui nelle cellule tumorali, rispetto a quelle normali, si ha un'induzione di morte cellulare più rapida e anche in questo caso, l'induzione dei livelli di GSH aumentano l'efficacia del sistema, amplificando il rilascio del farmaco. Questi risultati trovano conferma negli esperimenti di seguito riportati. Infatti,

mediante osservazioni di microscopia a fluorescenza, è stato possibile analizzare la diversa localizzazione intracellulare della Doxorubicina, in seguito al rilascio controllato, in quanto questa molecola emette un autofluorescenza rossa. In questo caso sia le cellule MC3T3-E1 che le HeLa, sono state pre-trattate o meno con GSH- OET e incubate per 3 ore con le nanoparticelle P\*(0.50)AA50-AEDP-Dox [1µg/ml]. Le immagini in Figura 24-A, relative alle MC3T3-E1 evidenziano una netta differenza morfologica nelle cellule in cui è stato indotto un aumento dei livelli di GSH. Questa diversa morfologia cellulare è correlata alla differente distribuzione delle molecole di Doxorubicina. Infatti, si possono osservare delle cellule che si presentano con una morfologia sferica, tipicamente apoptotica, che hanno perso i contatti con le cellule adiacenti. In dettaglio, in queste cellule la Doxorubicina si localizza a livello della porzione interna del nucleo (Fig.24Ac), il citoscheletro di actina perde la sua struttura ramificata (Fig.24-Ab) e in sede nucleare il materiale genetico si trova in stato eterocromatico, tipico di cellule in fase di morte (Fig.24-Aa).



**Figura 24.** A) Cellule MC3T3-E1 e B) cellule HeLa pretrattate e non con GSH-OET e incubate per 3 ore con P\*(0.50)AA50-AEDP-Dox [1µg/ml]. (Nuclei blu=Dapi, Citoscheletro= falloidina FITC, Dox=rosso). B) A destra: Profilo del diagramma dell'intensità di fluorescenza ottenuto mediante analisi citofluorimetrica di cellule HeLa pretrattate o meno con GSH-OET e incubate per 3 ore con P\*(0.50)AA50-AEDP-Dox [1µg/ml].

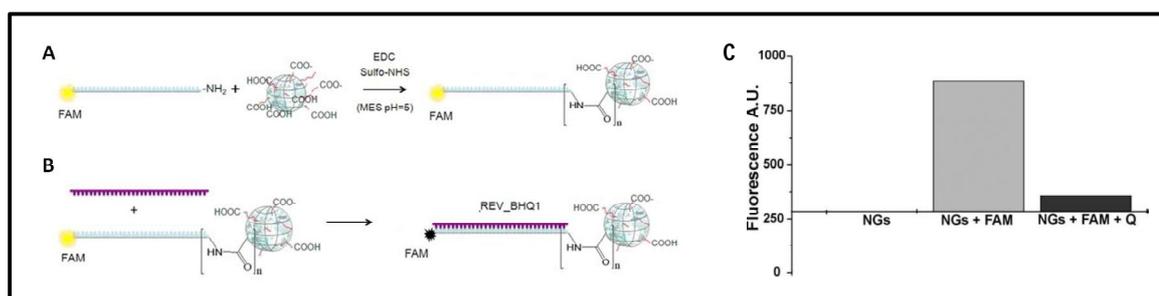
Le cellule non pretrattate con GSH-OET non mostrano una morfologia correlabile a fenomeni apoptotici, e la Doxorubicina è ancora legata ai nanogels come si può vedere dall'immagine in c'; inoltre il citoscheletro di actina si presenta ramificato e ben strutturato (Fig.24-Ab'), permettendo così alle cellule di mantenere i contatti con quelle adiacenti. In queste cellule, lo scarso ambiente riducente fa sì che il legame tra la Doxorubicina e le nanoparticelle rimanga stabile, per cui il farmaco non è libero di migrare nel nucleo e intercalarsi nel DNA. Nelle cellule HeLa, in entrambi i casi si ha una più spiccata localizzazione della Dox a livello perinucleare, e sono già visibili cellule con fenotipo apoptotico in entrambi i casi, anche se nei campioni indotti dal GSH-OET, il farmaco ha una distribuzione più diffusa. Mentre, nel controllo non trattato, sono ancora visibili strutture più marcate e delocalizzate che fanno pensare che il farmaco si trovi ancora complessato con il nanogel. Questi risultati sono in accordo con l'analisi citofluorimetrica effettuata su queste cellule dopo 3 ore di incubazione con le nanoparticelle P\*(0.50)AA50-AEDP-Dox [1µg/ml]. Nella figura 24-B, è rappresentato il grafico relativo all'intensità di fluorescenza rossa presente per cellula. Nel diagramma, il profilo relativo alle cellule pretrattate con GSH-OET, presenta un valore più alto di intensità di fluorescenza rossa, che infatti si sposta verso destra, rispetto al profilo osservato per il campione di cellule HeLa non pretrattate. Questi risultati, indicano che effettivamente l'aumento dei livelli di glutathione fanno aumentare la velocità di rilascio del farmaco, grazie a una più rapida rottura dei ponti disolfuro a livello di *spacers* e un rilascio più efficiente dai nanogels. Questo sistema di rilascio controllato permette quindi di migliorare la farmacocinetica della Doxorubicina, migliorando la sua efficacia farmacologica nella cura delle patologie neoplastiche.

### **Coniugazione dei nanogels con oligonucleotidi modificati**

Al fine di utilizzare i nanogels P\*(0.25)AA50 in esperimenti futuri di silenziamento genico, sono stati effettuati dei saggi preliminari per la messa a punto del sistema sperimentale, utilizzando degli oligonucleotidi (ODN) da 20pb<sup>[32]</sup>. Tali oligonucleotidi sono stati costruiti in modo da presentare delle modifiche chimiche, ossia un C3-amminolink a livello dell'estremità 3', che ha permesso il legame dell'oligonucleotide ai gruppi carbossilici dei nanogels, e una molecola fluorescente (FAM, ex/em: 494/522nm) all'estremità 5'(vedi Fig 25A). Come per gli esperimenti descritti precedentemente, la reazione di coniugazione è stata effettuata adattando il protocollo al sistema in questione e la quantità di

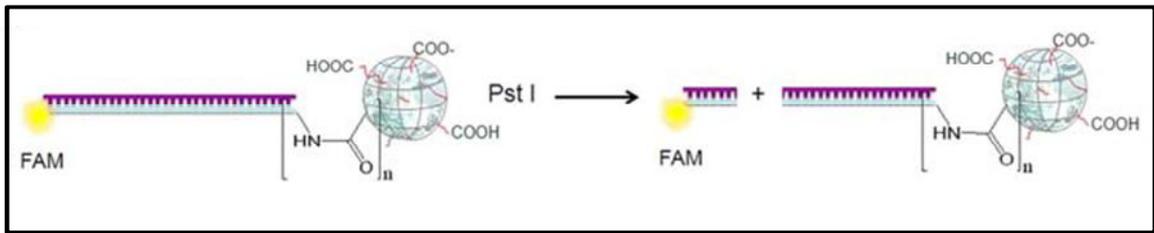
oligonucleotide legato alle nanoparticelle è stata stimata mediante analisi fluorimetrica. Dal momento che le nanoparticelle presentano un'auto-fluorescenza in corrispondenza del picco di emissione del fluorocromo FAM (522 nm), questo valore è stato sottratto all'intensità di fluorescenza ottenuta per i nanogels coniugati agli ODN (Fig.25C). Inoltre, per verificare se la sequenza oligonucleotidica fosse ancora funzionale nonostante il legame con le nanoparticelle sono stati progettati dei saggi specifici.

Inizialmente sono stati eseguiti degli esperimenti di *annealing* con due differenti sequenze complementari all'ODN coniugato, per verificare l'accessibilità della sequenza in esperimenti di appaiamento specifico, escludendo quindi, ripiegamenti interni alla struttura del nanogels o legami aspecifici. La prima sequenza (REV\_ BHQ1) presenta un *black hole quencher* a livello dell'estremità 5', in grado di spegnere la fluorescenza del FAM nel caso in cui avvenga l'appaiamento corretto delle sequenze (Fig 25B); mentre la seconda sequenza, utilizzata come controllo interno, risulta complementare all'ODN coniugato ma priva di *quencher* (REV).



**Figura 25.** A) Schema di coniugazione dei nanogels con l'oligonucleotide fluorescente. B) Reazione di *annealing* con la sequenza REV\_BHQ1. C) Intensità di fluorescenza emessa dai nanogels (NGs), dal complesso NGs-oligonucleotide fluorescente (NGs-FAM) e dello stesso in seguito al quenching dovuto all'appaiamento con la sequenza REV-BHQ1 (NGs-FAM+Q).

Dopo due cicli termici alla temperatura di *annealing* e diversi lavaggi per allontanare l'ODN non appaiato, sono state fatte delle letture fluorimetriche del complesso ottenuto ed è stata registrata una diminuzione di fluorescenza del fluorocromo FAM di 20 volte nel campione *annealato* con REV\_BHQ1 (Fig. 25B-C). Un'ulteriore prova del corretto appaiamento di basi è stata ottenuta mediante degli esperimenti di digestione enzimatica. Le sequenze oligonucleotidiche, infatti, sono state disegnate in modo da contenere al centro della sequenza un sito di restrizione per l'enzima PST I, un endonucleasi che taglia esclusivamente il doppio filamento di DNA, generando estremità coesive 3'-*protruding*. Lo schema mostrato in figura 26 rappresenta la reazione enzimatica operata da Pst I, che comporta la perdita di estremità 5' in cui è presente il fluorocromo FAM.



**Figura 26.** A) *Reazione di digestione enzimatica del doppio filamento legato ai nanogels da parte dell'endonucleasi di restrizione Pst I.*

Infatti, in seguito all' incubazione con l'enzima di restrizione, e alla successiva purificazione del complesso rimanente, grazie a delle letture fluorimetriche è stato possibile verificare che i NGs non emettevano più fluorescenza.

Questo risultato è concorde con quello precedentemente descritto, in quanto se l'appaiamento delle basi non fosse stato corretto non si sarebbe potuto formare il doppio filamento contenente il sito di restrizione per Pst I, per cui l'enzima non avrebbe potuto operare il taglio sequenza-specifico.

## ***Conclusioni***

La nanomedicina ha come obiettivo quello di riuscire ad assemblare diverse funzionalità in un unico nanosistema opportunamente ingegnerizzato, ossia un "*nanocarrier intelligente*" progettato in modo da trasportare e rilasciare in maniera "controllata" una molecola biologicamente attiva o un farmaco, esclusivamente, a livello del sito bersaglio interessato dalla patologia.

In particolare, il campo del *drug delivery* prevede lo sviluppo di sistemi alternativi per l'indirizzamento dei farmaci in specifici distretti dell'organismo, in modo da circoscriverne l'effetto biologico su una determinata tipologia di cellule, migliorando l'efficacia e riducendo la tossicità di una terapia.

Lo scopo del progetto di ricerca che è stato descritto nel presente lavoro è quello di sviluppare dei nanocarriers, costituiti da nanogels in *poly(N-vinyl pyrrolidone)* (PVP), prodotti mediante  $\beta$ -irraggiamento, funzionalizzati in modo da riconoscere dei siti target e rilasciare molecole biologicamente attive, sotto controllo di specifici stimoli.

Dai primi studi sulla biocompatibilità, è emerso che tali nanogels risultano essere ben tollerati dai sistemi biologici *in vitro*, vista l'assenza di fenomeni citotossici e genotossici nelle cellule oggetto di studio, trattate con le nanoparticelle.

Quindi, è stata dimostrata la loro capacità di oltrepassare le membrane biologiche, sviluppando delle varianti di nanogels fluorescenti. Infatti, grazie alla presenza di gruppi chimici reattivi, amminici e carbossilici, presenti sulla superficie di tali nanoparticelle, è stato possibile mettere a punto dei protocolli per la coniugazione con diverse molecole, tra cui delle sonde fluorescenti. I nanogels mostrano una buona affinità per le cellule, vista la loro capacità di oltrepassare la membrana plasmatica e la loro presenza all'interno delle cellule. Inoltre, dopo circa 6 ore di incubazione, si ha la massima quota di internalizzazione cellulare. In particolare, è stata riscontrata una localizzazione preferenziale nella regione perinucleare, presumibilmente dovuta alla veicolazione dei nanogels mediante traffico vescicolare. Dopo 24 ore, la quota di nanoparticelle comincia a diminuire all'interno delle cellule, probabilmente in seguito all'instaurarsi di meccanismi di esocitosi che portano ad una secrezione delle stesse nanoparticelle in ambiente extracellulare.

Quindi è stato dimostrato che tali nanoparticelle sono in grado di interagire con le cellule ed accumularsi al loro interno nel tempo, senza provocare modifiche morfologiche o creare danni cellulari gravi, che avrebbero innescato fenomeni di citossicità o genotossicità.

Grazie alla presenza di gruppi chimici reattivi sulla loro superficie, è stato possibile studiare dei protocolli per la bioconiugazione delle nanoparticelle con molecole biologiche. La prima molecola coniugata è stata la proteina BSA, usata come sistema modello. Dopo aver messo a punto il sistema, si è pensato di coniugare i nanogels con delle molecole biologicamente funzionali come gli anticorpi monoclonali, in vista di una loro applicazione in terapie basate sul *targeting attivo*. Per cui, sono stati sviluppati degli immunonanogels, coniugando le nanoparticelle con l'anticorpo monoclonale fluorescente anti-CD44, che riconosce una glicoproteina di membrana capace legare l'acido ialuronico ed altre glicoproteine della matrice extracellulare. Gli immunonanogels ottenuti sono stati impiegati in esperimenti di up-take cellulare, utilizzando cellule endoteliali ECV304 che sovraesprimono sulla loro superficie l'antigene specifico per l'anticorpo in questione. Come è stato possibile verificare mediante analisi di microscopia confocale e a fluorescenza, rispetto alle varianti fluorescenti prive di agenti direzionanti, dopo 15 minuti di incubazione, una buona quota di immunonanogels si trova sulla membrana plasmatica. Infatti, la presenza dell'anticorpo guida la nanoparticella, più velocemente, in prossimità della superficie cellulare. Inoltre, è stato dimostrato che il legame nanoparticella-anticorpo è stabile anche in ambiente intracellulare, e che la fluorescenza osservata negli esperimenti di up-take è attribuibile effettivamente agli immunonanogels, mediante degli esperimenti di colocalizzazione di fluorescenze a diversa lunghezza d'onda. Inoltre, è stato chiarito che il loro meccanismo di internalizzazione cellulare preferenziale segue la via della macropinosi, attraverso esperimenti di inibizione selettiva dei diversi pathways endocitotici, dati che hanno trovato conferma sia in studi di citofluorimetria che di microscopia confocale.

La verifica che gli immunonanogels potessero mediare un *targeting* di tipo attivo, si è avuta sfruttando il *wound-healing assay* su cellule endoteliali ECV304, utilizzando dei nanogels coniugati con un anticorpo monoclonale fluorescente che riconosce l'integrina  $\alpha_v\beta_3$ . Questo risultato dimostra che tali nanoparticelle sono in grado di mediare un riconoscimento specifico all'interno di un sistema eterogeneo, e questa capacità fondamentale getta le basi per una futura sperimentazione dei NGs nei sistemi tumorali *in vivo*, in cui è necessario un riconoscimento specifico del sito bersaglio interessato della patologia.

A questo punto, le nanoparticelle sono state coniugate ad un farmaco chemioterapico, la Doxorubicina. Questa molecola appartiene alla famiglia delle antracicline, ed è dotata di

un ampio spettro antitumorale. L'efficacia citotossica del farmaco coniugato alle nanoparticelle è stata dimostrata in cellule tumorali HeLa, ma il sistema ottenuto risultava essere colloidalmente poco stabile. Quindi è stato cambiato il tipo di approccio sperimentale ed è stato progettato un sistema che permettesse di avere un controllo sul rilascio del farmaco dalla nanoparticella, e si è pensato di sfruttare la stimolazione da parte del glutatione, che a livello del citoplasma delle cellule tumorali risulta notevolmente più elevato rispetto a quello presente nel citosol delle cellule normali.

Al fine di ottenere il costrutto desiderato, è stato inserito uno *spacer* tra la nanoparticella e il farmaco. Questo *spacer* presenta al suo interno un ponte di solfuro che risulta chimicamente labile, in presenza di un ambiente riducente.

L'efficacia del sistema proposto è stata verificata, *in vitro*, mediante degli studi in cui è stata registrata una rapida cinetica di rilascio del farmaco dalle nanoparticelle, in presenza di una concentrazione di agenti riducenti simile a quella registrata nella cellula tumorale, e la percentuale cumulativa di farmaco rilasciato risulta pari al 60% dopo 24 ore, mentre si ha un rilascio più lento e di un massimo del 30% nelle 24 ore, in presenza di concentrazioni micromolari o in assenza di agenti riducenti.

Inoltre, il rilascio controllato del farmaco è stato valutato studiando la vitalità cellulare di osteoblasti murini e cellule tumorali, pretratti o meno con una sostanza (GSH-OET) che induce un aumento di glutatione a livello citoplasmatico. I risultati mostrano una bassa mortalità nelle cellule controllo, mentre nelle cellule in cui sono presenti alti livelli di glutatione, la mortalità risulta nettamente maggiore, pari a quella registrata per le cellule incubate con la stessa concentrazione di farmaco, ma nella formulazione libera. Inoltre, nelle cellule tumorali si ha una più rapida induzione di morte cellulare rispetto alle cellule normali. Questi risultati trovano conferma sia nelle osservazioni di microscopia a fluorescenza che nelle indagini citofluorimetriche effettuate. Tutti i dati raccolti indicano che l'aumento dei livelli di glutatione amplifica la velocità di rilascio del farmaco, grazie a una più rapida rottura dei ponti disolfuro a livello degli *spacers* e a un rilascio delle Doxorubicina più efficiente da parte dei nanogels.

Infine, sono stati fatti degli esperimenti preliminari di coniugazione dei nanogels con acidi nucleici, seguiti da studi di riconoscimento enzimatico, per un futura applicazione in terapie basate sul silenziamento genico.

Quindi, la possibilità di coniugare simultaneamente differenti molecole biologiche e non (anticorpi, sonde fluorescenti, oligonucleotidi e agenti terapeutici) a tali nanogels,

consentirà lo sviluppo di un sistema che permette sia l'indirizzamento specifico verso dei siti *target* presenti a livello di cellule tumorali, che il rilascio controllato del farmaco o di un agente biologico, come per esempio un siRNA, in grado di bloccare pathways chiave implicati nella progressione tumorale.

La combinazione di un processo di sintesi innovativo basato sul  $\beta$ -irraggiamento e di proprietà essenziali quali la biocompatibilità e la facile funzionalizzazione di superficie, rende questa tipologia di nanogeli degli ottimi candidati per lo sviluppo di un approccio terapeutico innovativo, per il trattamento di patologie neoplastiche.

## Bibliografia

1. Feynman, R. 1960. *Engineering and Science*, Vol. 23, No. 5, February, pp. 22-36.
2. Eric Drexler, 1986. "Engines of creation: the coming era of nanotechnology".
3. Szwarc M, "Living" polymers. *Nature*. 1956; 176: 1168–9.
4. Whitesides, 2003. The "right" size in nanotechnology. *Nature Biotechnology*. Vol. 11 October 2003.
5. T. Andrew Taton, "Nanostructures as Tailored Biological Probes." *Trends Biotechnol.* 2002, 20, 277-279
6. Nagavarma B VN, Hemant K. S.Yadav\*, Ayaz A, Vasudha L.S, Shivakumar H.G, Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles- a review, *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* Vol 5, Suppl 3, 2012 ISSN - 0974-2441.
7. Elisabeth S. Papazoglou. *Bionanotechnology*. Pag.15
8. Arndt, Markus; O. Nairz, J. Voss-Andreae, C. Keller, G. van der Zouw, A. Zeilinger, 1999. Wave-particle duality of C60. *Nature* 401 (6754): 680–682. DOI:10.1038/44348. PMID 18494170.
9. A. S. Barnard, S. P. Russo, e I. K. Snook (2003). Size dependent phase stability of carbon nanoparticles: Nanodiamond versus fullerenes. *J. Chem. Phys.* 118: 5094-5098.
10. OV Salata, Applications of nanoparticles in biology and medicine, *Journal of Nanobiotechnology* 2004, 2:3.
11. Nuria Sanvicens and M. Pilar Marco, Multifunctional nanoparticles –properties and prospects for their use in human medicine, *Trends in Biotechnology* Vol.26 No.8.
12. Fabrice Vallée, Optical properties of metallic nanoparticles, CNRS and Université Lyon 1 (2008).
13. Claude Ostiguy, Brigitte Roberge, Catherine Woods, Brigitte Soucy, *Engineered Nanoparticles, Current Knowledge about OHS Risks and Prevention Measures* Second Edition.
14. Oberdorster, G., E. Oberdorster, and J. Oberdorster. 2005. Nanotechnology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 113:823-39.

15. Ryman-Rasmussen JP., Riviere JE., Monteiro-Riviere NA. (2006). Penetration of Intact Skin by Quantum Dots with Diverse Physicochemical Properties. *Toxicol. Sci.* 91 (1):159-165.
16. O.Muskens, D.Christolos, N. Del Fatti, F.Vallée, Optical response of a single noble metal nanoparticle, *J.Opt.A: Pure Appl.Opt.* 8 (2006),S264-S272.
17. Ayako Okuzaki, Shoko Kida, Junpei Watanabe, Zumi Hirasawa, Yutaka Tabei, Efficient plastid transformation in tobacco using small gold particles (0.07–0.3 µm), *Plant Biotechnology* 30, 65–72 (2013).
18. VJ Mohanraj<sup>1\*</sup> and Y Chen<sup>2</sup>, Nanoparticles – A Review, *Trop J Pharm Res*, June 2006; 5 (1).
19. Mrinmoy De, Partha S. Ghosh, Vincent M. Rotello, Applications of Nanoparticles in Biology, *Adv. Mater.* 2008, 20, 4225–4241.
20. Moghimi, S. M., A. C. Hunter, et al. (2001), Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice, *Pharmacol Rev* 53(2): 283-318.
21. Moghimi, S. M., A. C. Hunter, et al. (2005), Nanomedicine: current status and future prospects, *Faseb J* 19(3): 311-30.
22. Yogesh Patil, Udaya Toti, Ayman Khdaif, Linan Ma, and Jayanth Panyam, Single-Step Surface Functionalization of Polymeric Nanoparticles for Targeted Drug Delivery, *Biomaterials*. 2009 February ; 30(5): 859–866.
23. Frank Alexis, Eric M. Pridgen, Robert Langer, and Omid C. Farokhzad, Nanoparticle Technologies for Cancer Therapy, *Handbook of Experimental Pharmacology* 197, DOI 10.1007/978-3-642-00477-3\_2.
24. Dispenza C., Sabatino M. A., Grimaldi N., Spadaro G., Bulone D., Bondi M. L., Adamo G., Rigogliuso S., 2012, Large-scale Radiation Manufacturing of Hierarchically Assembled Nanogels, *Chemical Engineering transactions*, 27, 229-234, DOI:10.3303/CET1227039.
25. Alexander V. Kabanov, Serguei V. Vinogradov, Nanogels as Pharmaceutical Carriers: Finite Networks of Infinite Capabilities, *Angew Chem Int Ed Engl.* 2009 ; 48(30): 5418–5429.doi:10.1002/anie.200900441.
26. Iwona Gibas, Helena Janik, Review: synthetic polymer hydrogels for biomedical applications, *Chemistry & chemical technology* vol. 4, no. 4, 2010.
27. Miyata, T., Urugami, T., and Nakamae, K. (2002), Biomolecule-sensitive hydrogels, *Adv Drug Deliv Rev.* 54,79-98.

28. Y. Yun, et al., Nanoparticles for oral delivery: Targeted nanoparticles with peptidic ligands for oral protein delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2012),
29. Hennink WE, van Nostrum CF, Novel crosslinking methods to design hydrogels, *Adv Drug Deliv Rev.* 2002 Jan 17;54(1):13-36.
30. Jonghwi Lee, Intrinsic Adhesion Properties of Poly(vinyl pyrrolidone) to Pharmaceutical Materials: Humidity Effect, *Macromolecules Bioscience*
31. Clelia Dispenza, Maria Antonietta Sabatino, Natascia Grimaldi, Donatella Bulone, Maria Luisa Bondi, Maria Pia Casaletto, Salvatrice Rigogliuso, Giorgia Adamo, and Giulio Ghersi, Minimalism in Radiation Synthesis of Biomedical Functional Nanogels.
32. Clelia Dispenza, Giorgia Adamo, Maria Antonietta Sabatino, Natascia Grimaldi, Donatella Bulone, Maria Luisa Bondi, Salvatrice Rigogliuso, Giulio Ghersi, Oligonucleotides-Decorated-Poly(N-vinyl pyrrolidone) Nanogels for Gene Delivery. *J. APPL. POLYM. SCI.* 2013, 131(2), 39774-39782.
33. Archana Swami , Jinjun Shi , Suresh Gadde , Alexander R. Votruba , Nagesh Kolishetti , and Omid C. Farokhzad, Nanoparticles for Targeted and Temporally Controlled Drug Delivery, *Nanostructure Science and Technology*, DOI 10.1007/978-1-4614-2305-8\_2.
34. J. C. Leroux, E. Allemann, F. DeJaeghere, E. Doelker, R. J. Gurny, Controlled Release, 1996, 39, 339-350.
35. Serguei V. Vinogradov, Colloidal microgels in drug delivery applications, *Curr Pharm Des.* 2006 ; 12(36): 4703–4712.
36. Lilian E van Vlerken & Mansoor M Amiji, Multi-functional polymeric nanoparticles for tumour-targeted drug delivery, 10.1517/17425247.3.2.205 © 2006 Ashley Publications ISSN 1742-5247.
37. Dhiraj Kuma, Brian J Meenan, Dorian Dixon, Glutathione-mediated release of Bodipy from PEG cofunctionalized gold nanoparticles, *International Journal of Nanomedicine* 2012;7 4007–4022.
38. Yuan-Jia Pan , Yuan-Yuan Chen , Dong-Rui Wang , ChuanWei , Jia Guo , Da-Ru Lu, Chih-Chang Chu, Chang-Chun Wang, Redox/pH dual stimuli-responsive biodegradable nanohydrogels with varying responses to dithiothreitol and glutathione for controlled drug release, *Biomaterials* 33 (2012) 6570e6579.

39. Petros RA, DeSimone JM (2010) Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications, *Nat Rev Drug Discov* 9(8):615–627.
40. Parisa Yousefpour, Fatemeh Atyabi, Ebrahim Vasheghani-Farahani, Ali-Akbar Mousavi Movahedi, Rassoul Dinarvand, Targeted delivery of Doxorubicin-utilizing chitosan nanoparticles surface-functionalized with anti-Her2 trastuzumAb, *International Journal of Nanomedicine* September 2011 Volume 2011:6 Pages 1977 – 1990.
41. Maeda H., et al. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review *Journal of Controlled Release* Volume 65, Issues 1–2, 1 March 2000, Pages 271–284
42. Lee H, Mok H, Lee S, Oh YK, Park TG. J, *Control Release* 2007;119:245–252.
43. P.A. Trail, H.D. King, G.M. Dubowchik, Monoclonal antibody drug immunoconjugates, *Cancer Immunol. Immunother.* 52 (5) (2003) 328–337.
44. J.M. Lambert, Drug-conjugated monoclonal antibodies for treatment of cancer, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5 (5) (2005) 543–549.A.
45. Funaro, A.L. Horenstein, P. Santoro, C. Cinti, A. Gregorini, F. Malavasi. Monoclonal antibodies and therapy of human cancers, *Biotechnol. Adv.* 18 (5) (2000) 385–401
46. Nagayama S, Ogawara K-I, Fukuoka Y, Higaki K, Kimura T (2007) Time-dependent changes in opsonin amount associated on nanoparticles alter their hepatic uptake characteristics. *Int J Pharm* 342(1–2):215–221.
47. Parisa Yousefpour, Fatemeh Atyabi, Ebrahim Vasheghani-Farahani, Ali-Akbar Mousavi Movahedi, Rassoul Dinarvand, Targeted delivery of Doxorubicin-utilizing chitosan nanoparticles surface-functionalized with anti-Her2 trastuzumAb, *International Journal of Nanomedicine* September 2011 Volume 2011:6 Pages 1977 – 1990.
48. N. Dinauer, S. Balthasar, C. Weber, J. Kreuter, K. Langer, H. von Briesen. Selective targeting of antibody-conjugated nanoparticles to leucemic cells and primary T-lymphocytes, *Biomaterials* 26 (29) (2005) 5898–5906
49. Chiu T-C, Huang C-C (2009), Aptamer-functionalized nano-biosensors. *Sensors* 9(12):10356–10388.
50. Huang Y-F, Sefah K, Bamrungsap S, Chang H-T, Tan W (2008), Selective photothermal therapy for mixed cancer cells using aptamer-conjugated nanorods, *Langmuir* 24(20):11860–11865.

51. K. Petrak, Essential properties of drug-targeting delivery systems, *Drug Discov. Today* 10 (23–24) (2005) 1667–1673.
52. David A, Kopeckova P, Kopecek J, Rubinstein A (2002), The role of galactose, lactose, and galactose valency in the biorecognition of N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymers by human colon adenocarcinoma cells, *Pharm Res* 19(8):1114–1122.
53. Managit C, Kawakami S, Nishikawa M, Yamashita F, Hashida M (2003), Targeted and sustained drug delivery using PEGylated galactosylated liposomes, *Int J Pharm* 266(1–2):77–84.
54. Chan JM et al (2010), Spatiotemporal controlled delivery of nanoparticles to injured vasculature, *Proc Natl Acad Sci USA* 107(5):2213–2218.
55. B. Stella, S. Arpicco, M.T. Peracchia, D. Desmaële, J. Hoebeke, M. Renoir, J. D'Angelo, L. Cattel, P. Couvreur, Design of folic acid-conjugated nanoparticles for drug targeting, *J. Pharm. Sci.* 89 (11) (2000) 1452–1464
56. Ross JF, Chaudhuri PK, Ratnam M (1994), Differential regulation of folate receptor isoforms in normal and malignant tissues in vivo and in established cell lines, Physiologic and clinical implications. *Cancer* 73(9):2432–2443.
57. John F. Ross B.S. Differential regulation of folate receptor isoforms in normal and malignant tissues in vivo and in established cell lines. Physiologic and clinical implications. *Cancer* Volume 73, Issue 9, pages 2432–2443, 1 May 1994
58. Nagayama S, Ogawara K-I, Fukuoka Y, Higaki K, Kimura T (2007) Time-dependent changes in opsonin amount associated on nanoparticles alter their hepatic uptake characteristics. *Int J Pharm* 342(1–2):215–221.
59. Schwendener RA, Lagocki PA, Rahman YE (1984) The effects of charge and size on the interaction of unilamellar liposomes with macrophages. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Biomembranes* 772(1):93–101.
60. Schwendener RA, Lagocki PA, Rahman YE (1984) The effects of charge and size on the interaction of unilamellar liposomes with macrophages. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Biomembranes* 772(1):93–101.
61. Yuan F et al (1995) Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size. *Cancer Res* 55(17):3752–3756.

62. Ira Mellman And Helen Plutner. Internalization and Degradation of Macrophage Fc Receptors Bound to Polyvalent Immune Complexes. "The Journal Of Cell Biology " Volume 98 April 1984 1170-1177.
63. Luck, M., Paulke, B. R., Schroder, W., Blunk, T., and Muller, R. H.; Analysis of plasma protein adsorption on polymeric nanoparticles with different surface characteristics; Journal of Biomedical Materials Research 1998, 39(3), 478-485
64. Shapero K, Fenaroli F, Lynch I, Cottell DC, Salvati A, Dawson KA. Time and space resolved uptake study of silica nanoparticles by human cells. Mol BioSyst. 2011;7(2):371–378.
65. Walkey CD, Chan WC (2011) Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment. Chem Soc Rev. doi:10.1039/c1cs15233e.
66. Waters KM, Masiello LM, Zangar RC, Tarasevich BJ, Karin NJ, Quesenberry RD, Bandyopadhyay S, Teeguarden JG, Pounds JG, Thrall BD. Macrophage responses to silica nanoparticles are highly conserved across particle sizes. Toxicol Sci. 2009;107(2):553–569.
67. Kreuter, J.; Evaluation of nanoparticles as drug-delivery systems. II: Comparison of the body distribution of nanoparticles with the body distribution of microspheres (diameter greater than 1 micron), liposomes, and emulsions; Pharmaceutica Acta Helvetiae, 1983, 58(8), 217-226
68. Falcone et al. Macropinocytosis: regulated coordination of endocytic and exocytic membrane traffic events. November 15, 2006 J Cell Sci 119, 4758-4769
69. Jean Paul Thiery and Jonathan P. Sleeman. Complex networks orchestrate epithelial–mesenchymal transitions. Nature Reviews Molecular Cell Biology Volume 7 February 2006.
70. Yilmaz, M., and Christofori, G. (2009). EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. Cancer Metastasis Rev, 28(1-2), 15-33.
71. N. Grimaldi, M.-A. Sabatino, D. Bulone, G. Adamo, S. Rigogliuso, G. Ghersi\*, C. Dispenza, Water-borne Polymeric Nanoparticles for Glutathione-Mediated Intracellular Delivery of Anticancer Drugs.
72. Panyam Jayanth, Wen-Zhong Zhou, Swayam Prabha, Sanjeeb K. Sahoo, and Vinod Labhasetwar 2002, rapid endo-lysosomal escape of poly(DL-lactide-co-glycolide)

nanoparticles: implication for drug and gene delivery, the FASEB journal, volume 16, pag.1217-1226.

73. Pigram, W.J., Fuller, W., and Hamilton, L.D. (1972). Stereochemistry of intercalation: interaction of daunomycin with DNA. *Nature, New Biol.* 235(53):17–19.
74. Momparler RL, Karon M, Siegel SE, Avila F. Effect of adriamycin on DNA, RNA, and protein synthesis in cell-free systems and intact cells. *Cancer Res.* 1976. 36, 2891-5.
75. Felix Kratz, Peter Senter, Henning Steinhagen. *Drug Delivery in Oncology: From Basic Research to Cancer Therapy.*
76. M E Anderson et. al. Glutathione monoethyl ester: preparation, uptake by tissues, and conversion to glutathione. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 239(2), 538-548 (1985).
77. Bauminger S, Wilchek M. *Methods Enzymol* 70, 151-159 (1980) . "The use of carbodiimides in the preparation of immunizing conjugates."