



# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato di ricerca in Scienze Molecolari e Biomolecolari  
Curriculum: “tecnologie delle sostanze biologicamente attive”  
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche (STEBICEF)  
Settore Scientifico Disciplinare CHIM 09

## **Nanosistemi polimerici con un *core* di oro colloidale per la veicolazione di farmaci antineoplastici ed *imaging* di tumori solidi**

IL DOTTORE  
ANNA LI VOLSI

IL COORDINATORE  
CH.MA PROF.SSA PATRIZIA DIANA

IL TUTOR  
CH.MO PROF. GAETANO GIAMMONA

IL CO TUTOR  
CH.MO PROF. MARIANO LICCIARDI

CICLO XXIX  
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2017

*“La scienza non è nient’altro che una perversione se non ha come suo fine ultimo il  
miglioramento delle condizioni dell’umanità”*

*Nikola Tesla*

# Indice

---

## **Introduzione**

1.1 Nanotecnologia e nanomedicina.....	1
1.2 Nanotecnologia in terapia: nano drug delivery systems per la terapia di tumori solidi .....	3
1.3 Strategie di <i>targeting</i> tumorale.....	8
1.4 Nanosistemi a base di oro colloidale per diagnosi, <i>imaging</i> e terapia antitumorale.....	17
1.4.1 Risonanza Plasmonica di Superficie.....	18
1.4.2 Sintesi di Nanostrutture a base di oro.....	21
1.4.3 Applicazioni dell'oro colloidale in campo biomedico.....	23
1.4.4 Applicazioni in diagnosi.....	25
1.4.5 Applicazioni in <i>Imaging</i> diagnostico.....	27
1.4.6 Applicazioni in terapia antitumorale.....	34
1.4.7 Nanosistemi a base di oro colloidale in fase clinica ed approvati dalla <i>Food and Drug Administration</i> .....	40
1.4.8 Interazione dell'oro colloidale con cellule ed organismo.....	41

## **Scopo della tesi**

2.1 Nanosfere di oro rivestite con un derivato amminico dell'inulina per il trattamento tumore-specifico del cancro.....	45
2.2 Preparazione e caratterizzazione di nanosfere di oro rivestite con un derivato dell'inulina coniugato con acido folico per il rilascio direzionato di doxorubicina alle cellule del cancro della mammella.....	46
2.3 Termoablazione di cellule tumorali mediante composti nanostrutturati Grafene ossido/oro direzionati con acido folico.....	47

2.4 Gold nanorods funzionalizzati con acido folico sensibili ad un laser infrarosso per la diagnosi e la terapia dell'osteosarcoma.....	48
---	----

## **Parte sperimentale**

3.1 Materiali.....	51
--------------------	----

3.2 Metodi.....	52
-----------------	----

3.2.1 Nanosfere di oro rivestite con un derivato amminico dell'inulina per il trattamento tumore-specifico del cancro.....	53
--	----

*Sintesi seed-mediated di nanosfere di oro stabilizzate in tampone citrato (Au@citrato).*

*Sintesi del copolimero inulina-2-aminoetil-carbammato (INU-EDA).*

*Rivestimento delle nanoparticelle di oro con PEG-SH e INU-EDA (Au@PEG INU).*

*Loading di doxorubicina in Au@PEG-INU(Au@PEG INU Doxo).*

*Trasmission electron microscopy (TEM).*

*Spettroscopia UV-Visibile.*

*Misure di Dynamic Light Scattering (DLS) e analisi di potenziale Zeta*

*Determinazione della quantità di farmaco caricata in Au@PEG-  
INU/Doxo e studi di rilascio*

*Saggio di citotossicità su cellule del cancro della cervice uterina (HeLa) e su cellule del cancro polmonare umano (A549).*

*Studi di uptake cellulare.*

3.2.2 Preparazione e caratterizzazione di nanosfere di oro rivestite con un derivato dell'inulina coniugato con acido folico per il rilascio direzionato di doxorubicina alle cellule del cancro della mammella.....	60
--	----

*Sintesi del copolimero INU-FA.*

*Preparazione di GNPs funzionalizzate con INU-FA e INU-FA/Doxo.*

*Determinazione del farmaco caricato in Au@INU-FA/Doxo e studi di rilascio.*

*Microscopia a trasmissione elettronica (TEM).*

*Spettroscopia UV-Visibile*

*Misure di Dynamic Light Scattering (DLS) e analisi di potenziale Zeta*

*Analisi a dispersione di raggi X della superficie di Au@INU-FA/Doxo.*

*Saggio di citotossicità in vitro.*

*Esperimenti di inibizione recettoriale.*

*Studi di Uptake cellulare di Au@INU-FA/Doxo*

*Analisi statistiche.*

3.2.3 Termoablazione di cellule tumorali mediante compositi nanostrutturati Grafene ossido/oro direzionati con acido folico.....	66
--	----

*Sintesi del copolimero INU-FA.*

*Preparazione dei nanocompositi grafene ossido/ nanosfere di oro rivestite con INU-FA (GO/Au@INU-FA.)*

*Caricamento di paclitaxel nei nanocompositi GO/Au@INU-FA.*

*Spettroscopia UV-VIS*

*Calorimetria a scansione differenziale (DSC).*

*SEM e Energy dispersive X-ray analisi della superficie di GO/Au@INU-FA.*

*Microscopia a forza atomica (AFM).*

*Studi di rilascio.*

*Saggio di citotossicità in vitro.*

*Valutazione in vitro dell'effetto ipertermico*

*Trattamento di termoablazione (in acuto) su cellule MCF7.*

*Effetto indotto dall'ipertermia (cronico) sulle cellule MCF7*

*Analisi statistiche.*

3.2.4 Gold nanorods funzionalizzati con acido folico sensibili  
ad un laser infrarosso per la diagnosi e la terapia dell'osteosarcoma.....71

*Sintesi "seed mediated" di Nanorods di oro stabilizzati  
con CTAB (AuNRs@CTAB).*

*Sintesi del copolimero INU-LA*

*Sintesi del polimero PEG-FA.*

*Sintesi del copolimero INU-LA-PEG-FA.*

*Sintesi del copolimero PHEA-EDA-FA.*

*Preparazione di GNRs funzionalizzati con INU-LA-PEG-FA, INU-LA-  
PEG-FA/Nut, PHEA-EDA-FA e PHEA-EDA-FA/Nut.*

*Microscopia a trasmissione elettronica (TEM).*

*Microscopia a scansione elettronica (SEM) e analisi a dispersione di  
raggi X*

*Spettroscopia VIS-NIR.*

*Misure di potenziale Zeta.*

*Determinazione della quantità di nutlin-3 caricato in AuNRs@INU-LA-  
PEG-FA/Nut e AuNRs@PHEA-EDA-FA/Nut e studi di rilascio*

*Valutazione in vitro dell'effetto ipertermico.*

*Colture cellulari e reagenti biologici*

*Formazione di organoidi di osteosarcoma*

*Saggio di tossicità cellulare*

*Trattamento di termoablazione di cellule U2OS e HDFa.*

*Determinazione quantitativa dell'internalizzazione cellulare di nutlin3*

*Imaging cellulare di cellule U2OS tramite luminescenza a due fotoni.*

*Analisi statistiche*

## **Risultati e discussione**

4.1 Nanosfere di oro rivestite con un derivato amminico dell'inulina per il trattamento tumore-specifico del cancro.....	83
<i>Sintesi del copolimero INU-EDA</i>	
<i>Preparazione e caratterizzazione di Au@PEG-INU</i>	
<i>Studi di rilascio</i>	
<i>Studi biologici in vitro</i>	
4.2 Preparazione e caratterizzazione di nanosfere di oro rivestite con un derivato dell'inulina coniugato con acido folico per il rilascio direzionato di doxorubicina alle cellule del cancro della mammella.....	98
<i>Sintesi del copolimero INU-FA.</i>	
<i>Preparazione e caratterizzazione di GNPs rivestite con INU-FA (Au@INU-FA).</i>	
<i>Studi di rilascio della doxorubicina.</i>	
<i>Studi biologici in vitro</i>	
4.3 Termoablazione di cellule tumorali mediante compositi nanostrutturati Grafene ossido/oro direzionati con acido folico.....	112
<i>Sintesi del copolimero INU-FA.</i>	
<i>Preparazione e caratterizzazione dei nanocompositi GO/Au@INU-FA.</i>	
<i>Valutazione del rilascio di farmaco ed ipertermia</i>	
<i>Caratterizzazione biologica del nanosistema: valutazione in vitro dell'effetto citotossico.</i>	
<i>Effetto ipertermico in vitro di PTX-GO/Au@INU-FA su cellule MCF7.</i>	

4.4 Gold nanorods funzionalizzati con acido folico sensibili ad un laser infrarosso per la diagnosi e la terapia dell'osteosarcoma .....	131
--	-----

*Sintesi e caratterizzazione dei copolimeri INU-LA-PE-FA e PHEA-EDA-FA.*

*Preparazione e caratterizzazione di GNRs rivestite con INU-LA-PEG-FA e PHEA-EDA-FA (AuNRs@INU-LA-PEG-FA, AuNRs@PHEA-EDA-FA).*

*Valutazioni biologiche in vitro*

*Effetto ipertermico in vitro di AuNRs@PHEA-EDA-FA/Nut e AuNRs@INU-LA-PEG-FA/Nut*

## **Conclusioni**

5.1 Nanosfere di oro rivestite con un derivato amminico .....	170
dell'inulina per il trattamento tumore-specifico del cancro	
5.2 Preparazione e caratterizzazione di nanosfere di oro rivestite con un derivato dell'inulina coniugato con acido folico per il rilascio direzionato di doxorubicina alle cellule del cancro della mammella.....	171
5.3 Termoablazione di cellule tumorali mediante compositi nanostrutturati Grafene ossido/oro direzionati con acido folico.....	172
5.4 Gold nanorods funzionalizzati con acido folico sensibili ad un laser infrarosso per la diagnosi e la terapia dell'osteosarcoma.....	173

<b>Bibliografia</b> .....	175
---------------------------	-----

# Introduzione

---

*Alle dimensioni comprese fra 1 e 100 nanometri, la materia è caratterizzata da proprietà fisiche, chimiche e biologiche uniche, completamente diverse da quelle della materia di base.*

## 1.1 NANOTECNOLOGIA E NANOMEDICINA

La nanotecnologia si occupa dello studio, progettazione, manipolazione e sviluppo di materiali nonché dell'impiego delle proprietà di questi su scala nanometrica. Questa tecnologia sfrutta gli effetti di confinamento quantistico e la capacità di manipolare singoli atomi o molecole. Essa ha permesso di compiere numerosi progressi in diversi campi di ricerca quali medicina, biotecnologia, scienze ambientali e in quasi tutte le branche della tecnologia in particolare nei settori connessi con l'energia, l'elettronica, l'ottica e la sensoristica, dando così la possibilità di sviluppare nuovi materiali con proprietà avanzate rispetto ai materiali in "bulk" (Menon et al. 2013; Nobile and Nobile 2016). Secondo la definizione data nel 2000 nell'ambito della National Nanotechnology Initiative (NNI): *"Nanotecnologia è lo studio e il controllo della materia alle dimensioni comprese fra 1 e 100 nanometri, dimensioni alle quali avvengono fenomeni che sono in grado di conferire ai materiali proprietà fisiche, chimiche e biologiche uniche e completamente diverse da quelle della materia di base"*. Le prospettive rivoluzionarie associate alla nanotecnologia derivano dal fatto che, come detto, a questi livelli di dimensioni, pari ad un aggregato di atomi, le caratteristiche e il comportamento della materia cambiano drasticamente. Le tre principali ragioni per le quali i materiali

nanostrutturati differiscono dai materiali su scala micro/macroscofia sono le seguenti (Roco 2011):

1) a causa delle leggi di scala, le forze dominanti sono diverse. Le forze elettromagnetiche, che dipendono strettamente dalla carica elettrica, dominano nella nanoscala poichè le forze gravitazionali sono funzioni della massa e sono pertanto trascurabili.

2) la superficie gioca un ruolo fondamentale (maggiore rapporto superficie/volume) nella nanoscala e le proprietà degli atomi di superficie sono diverse rispetto a quelle degli atomi di volume

3) la meccanica quantistica (e non la meccanica classica) è il modello adeguato per descrivere le proprietà dei materiali alla nanoscala (confinamento quantico).

Per queste motivazioni il comportamento della materia alla scala nanometrica cambia radicalmente. Rivestimenti di superfici intelligenti, nuovi materiali, biosensori, catalizzatori, componenti elettroniche all'avanguardia, nuovi dispositivi ottici e fotonici sono solo pochi esempi di questa scienza interdisciplinare e queste prime applicazioni pratiche dimostrano chiaramente il suo enorme potenziale.

Le nanotecnologie hanno trovato applicazioni sempre più frequenti anche nel settore biomedico. La medicina moderna infatti deve affrontare complesse sfide scientifiche, sociali ed etiche che stanno avendo un importante impatto socio-economico e in questo contesto, negli ultimi anni si è assistito ad un aumento esponenziale del numero di studi che dimostrano la varietà di applicazioni mediche delle nanotecnologie e dei nanomateriali (Yih and Al-Fandi 2006).

La nanomedicina è una delle più importanti applicazioni e dei più promettenti sviluppi delle nanotecnologie (Riehemann et al. 2009). Infatti, la dimensione "nano" presenta notevoli vantaggi anche, e forse soprattutto, in campo biomedico e farmacologico, dove la riduzione dei volumi a beneficio delle superfici di scambio è in grado di migliorare in maniera sensibile le interazioni fra i nanomateriali e le cellule viventi.

Questa moderna branca della medicina in continua crescita comprende un'ampia serie di attività di ricerca che vanno dallo sviluppo di biosensori, nanomateriali con applicazioni biomediche, alla realizzazione di nanovettori a scopo terapeutico e diagnostico (teranostica).

## 1.2 NANOTECNOLOGIA IN TERAPIA: NANO DRUG DELIVERY SYSTEMS PER LA TERAPIA DI TUMORI SOLIDI

Attualmente, le nanotecnologie applicate alla medicina più promettenti e già in fase di sperimentazione riguardano lo sviluppo di nano-vettori per la distribuzione mirata dei farmaci (drug delivery system) e per l'*imaging* diagnostico ed i cosiddetti "lab-on-a-chip" insieme con altri tipi di Micro Electro Mechanical Systems (MEMS), utilizzabili a scopo diagnostico (Roco 2003). In particolare, l'interesse da parte della comunità scientifica è stato posto sullo sviluppo di sistemi nanostrutturati di distribuzione mirata dei farmaci nell'organismo in grado di circoscrivere l'effetto biologico della terapia a una determinata tipologia di cellule, migliorandone l'efficacia e riducendone, nel contempo, la tossicità sistemica (Conti et al. 2006). I nanovettori rappresentano una delle alternative migliori per la somministrazione di medicinali ai malati cronici, che necessitano di trattamenti continuativi, solitamente ad alti dosaggi, che comportano spesso l'insorgenza di effetti collaterali tossici anche gravi. A questo proposito, va sottolineato come vi sia grande interesse a sviluppare nuovi sistemi di "*nanodelivery*" per farmaci che sono già sul mercato, soprattutto farmaci antineoplastici (Conti et al. 2006). Attualmente, uno dei principali interessi della nanomedicina è la diagnosi ed il trattamento precoce del cancro e in generale delle malattie neoplastiche. Queste ultime hanno un importante impatto socio-economico nei paesi sviluppati, dove risultano essere una delle principali cause di morte, secondo solo alle malattie cardiovascolari (Gindy and Prud'homme 2009). Diagnosi precoci, l'accessibilità delle cure, la ricerca e lo sviluppo di nuove terapie hanno permesso di migliorare significativamente la prognosi e la sopravvivenza dei pazienti affetti da tali patologie. Infatti, è stato stimato che circa i due terzi delle neoplasie possono

essere curate, anche se permangono marcate differenze tra i diversi tipi di tumore(Urruticoechea et al. 2010). In passato il trattamento di elezione per la cura dei tumori solidi era l'asportazione chirurgica della massa tumorale. Oggi invece disponiamo di trattamenti sofisticati che si avvalgono dell'utilizzo di diversi approcci terapeutici. I più comuni trattamenti si basano su(Herbst et al. 2006):

- Rimozione chirurgica e radioterapia, qualora il tumore sia localizzato e ci sia la possibilità di intervenire chirurgicamente.
- Chemioterapia (per trattamento sistemico).
- Terapia genica.
- Prevenzione farmacologica della metastatizzazione del tumore primario (antiangiogenetici).
- Potenziamento delle difese immunitarie del paziente (terapia adiuvante)
- Terapia ormonale (specifica per alcuni tipi di tumore, come il cancro alla prostata, all'ovaio etc.).
- Immunoterapia (anticorpi monoclonali, interferoni).

Con l'avvento della radioterapia negli anni '20 e della chemioterapia negli anni '40 si è ottenuto un fondamentale progresso nella cura dei tumori. Queste tecniche infatti, a differenza della chirurgia, sono le sole in grado di uccidere effettivamente parte delle cellule tumorali in ogni ciclo di trattamento. Inoltre la possibilità di utilizzare cocktails di farmaci (chemioterapia combinata) ha permesso di migliorare l'efficacia delle terapie, riducendo il rischio di recidive, minimizzando la possibilità di sviluppare resistenza ad un farmaco e consentendo di agire contemporaneamente su diversi bersagli. Ad oggi la somministrazione di farmaci chemioterapici può avvenire con differenti intenti, quale ad esempio ottenere un effetto curativo, ma anche con semplice fine palliativo, per alleviare i sintomi della patologia e prolungare per quanto possibile la vita del paziente. Diversi approcci terapeutici possono comunque essere combinati tra di loro in quelle che vengono definite come:

- Chemioterapia neoadiuvante o trattamento preoperativo: una prima linea chemioterapica viene effettuata per ridurre le dimensioni del tumore

primario, in modo da rendere poi il trattamento locale (chirurgico o radioterapico) più efficace o comunque meno invasivo.

- Chemioterapia adiuvante o trattamento post-operativo: un trattamento chemio-radioterapico può in genere essere effettuato per evitare il rischio di recidive o di metastasi a seguito della rimozione chirurgica del tumore.

Questi approcci terapeutici convenzionali hanno consentito di compiere notevoli progressi, soprattutto nella cura di neoplasie maligne e fatali come il carcinoma testicolare, il linfoma, in particolare il linfoma di Hodgkins, e le leucemie. Tuttavia la remissione del tumore rimane in molti casi difficile da ottenere, soprattutto nel caso di neoplasie solide come quelle a colon, prostata, mammella e polmone, che sono oggi le più diffuse. Bisogna inoltre sottolineare che vi sono diverse problematiche legate all'utilizzo di tali strategie terapeutiche, che generalmente non mostrano selettività per le cellule cancerose, danneggiando in tal modo tessuti e organi sani (Sriraman, Aryasomayajula, and Torchilin 2014).

In contrasto ai protocolli terapeutici convenzionali, le nanotecnologie offrono un'alternativa meno invasiva per la cura del cancro, essendo in grado di ridurre la tossicità sistemica e migliorare la qualità di vita del paziente. L'utilizzo di sistemi nanostrutturati di veicolazione di molecole bioattive (farmaci, oligonucleotidi, peptidi terapeutici), progettati per migliorare l'efficacia terapeutica, permettono infatti di superare i problemi degli approcci terapeutici convenzionali che in alcuni casi falliscono a causa dello sviluppo di metastasi, di resistenza farmacologica che può portare a recidive, o per l'insorgenza di effetti tossici anche molto gravi (Conti et al. 2006). Queste limitazioni terapeutiche sono dovute principalmente allo scarso accumulo del farmaco nella massa tumorale, che danneggia in questo modo i tessuti e le cellule sane.

I nanovettori, se ben progettati, sono quindi in grado di rilasciare gli agenti terapeutici in un distretto specifico dell'organismo, come ad esempio la massa tumorale, aumentando in tal modo la frazione di farmaco biodisponibile che raggiunge il sito d'azione e riducendo la tossicità sistemica. I nanosistemi determinano altri benefici quali

l'aumento della solubilità di farmaci scarsamente solubili in ambienti acquosi (quali i sistemi fisiologici); la protezione degli agenti terapeutici dalla inattivazione e dalla degradazione enzimatica e chimica (come per esempio proteine e acidi nucleici); il prolungamento del tempo di permanenza in circolo del nanosistema dovuta ad un ridotta escrezione renale. Sono stati sviluppati numerosi nanosistemi in grado di agire da *drug delivery systems* (DDS) in terapia antitumorale costituiti da diversi materiali di partenza, tra cui lipidi(T M Allen 1994), polimeri(Moghimi 2006) e materiali inorganici(Bönnemann and Richards 2001), ottenendo così dei sistemi con differenti proprietà chimico-fisiche che trovano differenti applicazioni. Visti i numerosi vantaggi associati all'impiego di tali sistemi carrier nanostrutturati, esiste una grande varietà di sistemi colloidali utilizzati in campo biomedico, sia in terapia che in *imaging* diagnostico alcuni dei quali sono attualmente in commercio e molti in fase di sviluppo, come ad esempio: liposomi, nanoparticelle polimeriche, lipidiche solide (SLN), polimerosomi, dendrimeri, nanoparticelle metalliche, micelle e profarmaci macromolecolari(Nie et al. 2007)(K. Cho et al. 2008). L'utilità dei nanosistemi per il rilascio di agenti terapeutici è stata ben dimostrata in vivo e molte formulazioni di doxorubicina, daunorubicina e paclitaxel, così come nanosistemi che fungono da mezzo di contrasto per *imaging* diagnostico, sono già disponibili in commercio (tabella 1).

Tabella 1. Esempi rappresentativi di drug delivery systems e mezzi di contrasto nanostrutturati in commercio

<b>Nome commerciale</b>	<b>Carrier nanostrutturato</b>	<b>agente attivo</b>	<b>indicazione approvata</b>
<b><i>Drug Delivery</i></b>			
Doxil Caelyx	Liposomi Pegylati	doxorubicina	Cancro ovarico, sarcoma di Kaposi, cancro alla mammella
Myocet	Liposomi	doxorubicina	Terapia combinata con ciclofosfamide per il cancro ovarico, sarcoma di Kaposi, cancro alla mammella
DaunoXone	Liposomi	Daunorubicina	Sarcoma di Kaposi
Onco TCS	Liposomi	Vincristina	Linfoma
Abraxane	Albumina	Paclitaxel	Cancro alla mammella metastatico
Abelcet Amphotec	Liposomi	Amfotericina B	Infezioni fungine
Ambisome	Liposomi	Amfotericina B	Infezioni fungine in pazienti neutropenici; lesmania
<b><i>Imaging diagnostico</i></b>			
Lumiren Gastromark	Silice	SPIONs	Imaging del tratto gastro intestinale tramite MRI
Endoderm Feridex	Destrano	SPIONs	Imaging tramite MRI di lesioni metastatiche a fegato e milza
Resovist	Carbodestrano	SPIONs	MRI di lesioni epatiche
Sinerem	Destrano	SPIONs	Imaging di linfonodi

### 1.3 STRATEGIE DI *TARGETING* TUMORALE

L'obiettivo dei "*drug delivery systems*" nel trattamento di tumori solidi è quello di veicolare e direzionare l'agente terapeutico alla massa tumorale bersaglio, sfruttando le differenze biochimiche e metaboliche fra cellule "malate" e cellule "sane", e di rilasciarlo in maniera prolungata nel tempo. La fisiologia del tumore solido si differenzia da quella del tessuto sano per una serie di aspetti molto importanti. Per conseguire una maggiore efficacia e selettività dei trattamenti antitumorali l'attenzione è stata rivolta alle principali differenze fra tessuto sano e neoplastico, sia a livello cellulare che molecolare. Le difformità fisiopatologiche più marcate che si riscontrano a livello del tessuto neoplastico riguardano l'incremento della temperatura tissutale, l'abbassamento del pH extracellulare, l'alterazione del potenziale redox e l'amplificazione del corredo enzimatico. Alterazioni di tipo morfologico sono osservabili a carico del sistema vascolare e linfatico, con aumento della permeabilità dei vasi sanguigni e inefficienza del drenaggio della linfa rispetto alle necessità del tessuto in rapida espansione (Brown and Giaccia 1998). Oggi è ben noto che la vascolatura del tessuto tumorale risulta essere differente da quella del tessuto sano sia per quanto concerne l'architettura sia per gli aspetti biologici. Il tumore in progressione facilmente diventa ipossico e necrotico a causa della rapida proliferazione e dell'insufficiente apporto di sangue (Pugh and Ratcliffe 2003). Per questo motivo, l'angiogenesi a livello del tessuto tumorale è particolarmente attiva ed estesa, dovuta allo *switch* angiogenico (produzione di segnali che stimolano l'angiogenesi) cui vanno incontro i tumori. La convenzionale struttura dei vasi sanguigni periferici composti di arteriole, capillari e venule viene abolita. Al suo posto morfologicamente si osservano ramificazioni e germogli irregolari di vasi neoformati, diverse composizione cellulare della parete endoteliale, forma della membrana basale e dimensioni delle fenestrazioni. I vasi sanguigni neoformati sono rivestiti in modo disordinato da periciti, che sono i regolatori della maturazione e differenziazione dei capillari. La permeabilità dei vasi è estremamente elevata, non solo per l'aumentata larghezza delle giunzioni intercellulari (da

50-60 nm per le fenestrazioni del tessuto sano a centinaia di nm nel caso dei tumori) e per l'incompletezza della membrana basale, ma anche per la presenza di numerosi fattori di permeabilizzazione (McDonald and Choyke 2003). La vascolatura del tessuto canceroso è quindi spesso caratterizzata da elevata permeabilità, emorragie e intensa attività proteolitica (Furuya et al. 2005). Analogamente al sistema circolatorio ematico, anche nel sistema linfatico si osservano marcate differenze morfologico-strutturali tra tessuto sano e canceroso. Il sistema linfatico in condizioni fisiologiche svolge il ruolo di trasportare fluidi e macromolecole dagli spazi interstiziali alla circolazione ematica. In condizioni fisiologiche le terminazioni capillari dei vasi linfatici sono normalmente delimitate da un singolo strato di endotelio, presentano giunzioni endoteliali larghe e sono permeabili alle macromolecole provenienti dal fluido interstiziale (Karpanen and Alitalo 2008). Nel tessuto tumorale invece manca un sistema organizzato di drenaggio linfatico. Pertanto le macromolecole sono in grado di fuoriuscire dai vasi sanguigni e raggiungere il tumore, ma non riescono ad entrare nella circolazione post capillare e non possono quindi essere drenate in alcun modo. Inoltre, non essendo in grado di diffondere nell'interstizio del tumore per riemergere in superficie, restano confinate in profondità nella massa tumorale. I farmaci antitumorali spesso sono agenti citotossici che colpiscono preferenzialmente cellule in fase di mitosi interagendo con il loro ciclo proliferativo. Le cellule in rapida proliferazione sono in genere più sensibili a farmaci che funzionano con questo meccanismo. Tuttavia l'aspecificità dell'azione antiproliferativa di questi principi attivi si riflette in una tossicità nei confronti delle cellule sane. Questo effetto, insieme alla resistenza sviluppata da numerosi tumori solidi nei confronti dei classici antineoplastici, costituisce il fattore maggiormente limitante dei trattamenti chemioterapici e risulta in prognosi sfavorevoli per i pazienti. Per superare tali problematiche nel corso degli ultimi decenni sono state spese molte energie per lo sviluppo di sistemi di drug delivery in grado di discriminare tra cellule normali e cancerose, evitando di conseguenza i gravi effetti collaterali legati alla chemioterapia convenzionale. Le strategie di targeting

indagate mirano a discriminare il tessuto tumorale in base alle caratteristiche fisiopatologiche che lo distinguono, come ad esempio il basso pH extracellulare o la presenza di un elevata quantità di enzimi, l'ambiente ipossico nel centro del tumore stesso, recettori o specifici antigeni sovraespressi o espressi unicamente sulla superficie delle cellule cancerose(Singh, Palombo, and Sinko 2008). Tenendo conto di queste caratteristiche peculiari del tessuto tumorale, vi si possono direzionare selettivamente farmaci mediante sistemi di targeting attivo o passivo(Langer 1998). Una delle scoperte più importanti per quanto concerne la fisiopatologia del tumore e la possibilità di veicolare farmaci antitumorali in modo sito-specifico, ha riguardato l'“Enhanced Permeability and Retention Effect” (effetto EPR) da parte di Maeda H. e Matsumura Y. Questo effetto è riscontrabile in tutti i tumori tranne il cancro alla prostata e al pancreas in quanto ipovascolarizzati.(Matsumura and Maeda 1986):(Maeda H. n.d.) Grazie all'effetto EPR è possibile trasportare passivamente farmaci e promuovere il loro accumulo nel tessuto tumorale semplicemente modificando la molecola farmacologicamente attiva con biopolimeri o polimeri sintetici, o caricandola in sistemi nanoparticellari (liposomi, nanosfere) che agiscono come carriers inerti(R. Duncan 2006). Queste macromolecole o particelle non interagiscono con le cellule tumorali in modo selettivo ma influenzano marcatamente la biodistribuzione del farmaco. Un tessuto in rapida proliferazione come quello tumorale necessita di formare nuovi vasi per approvvigionarsi dei nutrienti richiesti per la sua crescita. Questi vasi, come visto precedentemente, presentano un endotelio anormale con fenestrazioni che hanno sezioni tra i 100 e i 600 nm. Nel tessuto sano invece l'endotelio può essere di tipo continuo, fenestrato o discontinuo. Generalmente i capillari sono caratterizzati da un endotelio di tipo continuo, con giunzioni del diametro di 2-6 nm. In alcuni organi tuttavia, proprio per le funzioni che essi stessi svolgono (reni, intestino, organi endocrini etc.), l'endotelio è di tipo fenestrato, con aperture di circa 50-60 nm. I carrier supramolecolari in genere sono strutturati in modo da avere un volume idrodinamico nel range 10-100 nm, il che consente la loro

extravasazione nel tessuto tumorale ma non nel sano. I sistemi di veicolazione quindi, rimangono nel torrente circolatorio quando l'endotelio dei vasi è normale, mentre extravasano a livello tumorale attraverso le ampie fenestrazioni, garantendo una sorta di effetto di targeting, definito per l'appunto passivo. Una volta giunti nell'interstizio tumorale i carriers rilasciano il farmaco in prossimità delle cellule, secondo vari meccanismi legati all'architettura del carrier stesso. All'effetto contribuisce anche l'inefficiente e inadeguato sistema di drenaggio linfatico che favorisce accumulo e ritenzione del farmaco nel tessuto bersaglio (Theresa M Allen and Cullis 2004). Per utilizzare al meglio l'effetto EPR è fondamentale che i sistemi di veicolazione riescano a eludere il controllo del sistema immunitario e che restino in circolo il più a lungo possibile. Affinchè questo si possa verificare risultano cruciali tre caratteristiche dei carriers:

1. la maggior parte delle fenestrazioni dell'endotelio vascolare tumorale sono minori di 400 nm. D'altra parte i reni sono capaci di filtrare solo particelle più piccole di 10 nm mentre il fegato cattura per effetto di primo passaggio quelle di dimensioni superiori ai 100 nm. Pertanto la dimensione ideale per un sistema supramolecolare è di 10-100 nm (Albanese, Tang, and Chan 2012).

2. i reni sono inoltre in grado di filtrare sistemi macromolecolari dotati di carica positiva, per cui è altrettanto importante mantenere il sistema neutro o anionico per evitare l'eliminazione renale.

3. infine, i carriers devono essere adeguatamente mascherati al sistema del reticolo endoteliale (RES), che riconosce e distrugge materiale estraneo tramite opsonizzazione seguita da fagocitosi. Questo in genere si ottiene rivestendo i sistemi supramolecolari con polimeri idrofilici. Il metodo comunemente più utilizzato per evitare il riconoscimento da parte del RES è la PEGilazione, ossia il rivestimento superficiale dei sistemi di veicolazione con PEG. La teoria più ampiamente accettata per spiegare l'aumento del tempo di circolazione è che il PEG riduca le interazioni della superficie dei carriers con le proteine del sangue prevenendo il fenomeno

dell'opsonizzazione(Howard et al. n.d.). Un numero elevato di nanocarriers che sono direzionati mediante il passive targeting sono stati sviluppati tra gli anni '80 e '90, e alcuni di questi sono stati approvati per l'utilizzo clinico. Il targeting passivo ha comunque alcuni limiti. Innanzitutto, l'effetto di accumulo nel tumore è fortemente dipendente dal grado di vascolarizzazione e angiogenesi raggiunto dal tumore. La porosità e la dimensione stessa delle fenestrazioni variano con tipo e stato di proliferazione del tumore. Di conseguenza, il direzionamento passivo non dà esito ugualmente positivo in tutti i tumori. In secondo luogo, l'elevata pressione del liquido interstiziale, condizione comune nei tumori solidi, impedisce una distribuzione omogenea e un uptake efficiente dei carrier e/o farmaci nel tessuto tumorale. Infine, nel caso di prodotti PEGilati, la presenza del PEG può inibire l'interazione del farmaco o del sistema supramolecolare con la superficie cellulare limitandone l'internalizzazione. L'effetto EPR è in ogni modo una condizione fisiopatologica fondamentale, di cui bisogna tener conto nello sviluppo di sistemi di drug delivery per farmaci antitumorali. Per aumentare le interazioni specifiche tra cellule bersaglio e carriers ed migliorare così la selettività dei *nano-drug delivery systems*, si può ricorrere al *targeting* attivo che prevede la coniugazione di agenti direzionanti a farmaci o alla superficie dei nanosistemi di rilascio (Gao, Fain, and Rapoport 2005). Esempi di *targeting agents* comprendono anticorpi monoclonali(Carter 2001), ligandi, peptidi, acidi nucleici e altre molecole come ad esempio l'acido folico che legano direttamente e in modo specifico recettori o antigeni sovraespressi sulla superficie delle cellule tumorali. Questi bersagli di superficie si dividono in due classi, a seconda della loro capacità di endocitare il ligando e ciò che ad esso è stato legato: internalizzanti e non. Nel caso di recettori non internalizzanti, il farmaco legato o caricato nel sistema di veicolazione può essere rilasciato a livello extracellulare e diffondere all'interno della cellula. Nel caso di recettori internalizzanti invece, il rilascio del farmaco, per diffusione o per cleavage dal carrier se legato chimicamente, ha luogo in strutture subcellulari di tipo endosomiale(van Vlerken, Vyas, and Amiji 2007). L'idea del targeting attivo

fu introdotta per la prima volta da Paul Ehrlich nel XIX secolo, prima della scoperta di un qualsiasi ligando per cellule tumorali. Ehrlich coniò il famoso termine “magic bullet”, definendo con esso un sistema capace di raggiungere uno specifico sito del nostro organismo e di rilasciare selettivamente i farmaci con cui era stato caricato (Lavasanifar, Samuel, and Kwon 2002) . Quest’idea fu immediatamente trasferita nel campo della chemioterapia antitumorale allo scopo di ridurre gli effetti tossici sistemici ad essa legati. Il razionale dei sistemi di targeting attivo sta per l’appunto nell’incrementare le interazioni specifiche tra cellule bersaglio e carriers, favorendo il rilascio selettivo di farmaci solo a livello delle cellule cancerose. L’efficienza e la selettività di sistemi di rilascio funzionalizzati con agenti direzionanti è stata dimostrata in numerosi studi in vitro e in vivo. Ormai abbiamo a disposizione un range vasto ed in continua espansione di agenti per il targeting tumorale, dimostratisi effettivamente in grado di incrementare la capacità dei sistemi di drug delivery di legare, penetrare ed uccidere le cellule neoplastiche rispetto ad analoghi sistemi non direzionati. Il targeting attivo consente quindi di migliorare l’effetto anti-tumorale di un farmaco facilitando l’uptake cellulare e la ritenzione intracellulare del carrier. In particolare questa strategia è un’importante strumento per superare il problema della multi-drug-resistance (MDR), garantendo tali sistemi una riserva intracellulare di farmaco (Gullotti and Yeo n.d.). Numerosi recettori di superficie e antigeni sono stati impiegati per il direzionamento attivo, come riportato in Tabella 2.

Tabella 2. Classi di molecole utilizzabili per operare un targeting attivo e loro bersagli.

<b>Classi</b>	<b>Targets</b>
antigeni	Clusters di differenziazione (CD20, CD33, CD44), Carcinoembryonic antigen, Blood group carbohydrates, Mucin-type glycoproteins (MUC1, CanAg), Lewis Y, Lewis X, Cancer testis antigens (CT7, MAGE-A3), proteasi specifiche per antigeni di membrana
recettori vascolari	Integrine ( $\alpha\beta3$ , $\alpha\beta5$ ), Nucleoline, Aminopeptidasi N, Endogline, fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF1-4).
recettori per proteine plasmatiche	Low-density lipoprotein, Transferrin
recettori peptidici	Somatostatin receptors, Bombesin receptors, Neuropeptide Y receptors, Leuteinizing-hormone
recettori per fattori di crescita e vitamine	Folate receptors (FR- $\alpha$ , FR- $\beta$ , FR- $\gamma$ ), Epidermal growth factor receptors (EGF1, EGF2, Her2), Transforming growth factor receptor and fibroblast growth factor receptors
recettori per carboidrati	Asialoglycoprotein receptor, Galectins (galectin 1, galectin 2), Selectins (E-selectin, P-selectin), Hyaluronic acid receptors (CD44, RHAMM, HARLEC).

L'acido folico è uno tra i ligandi target proposti con maggior successo per il *drug delivery* tumore-specifico, poichè la maggior parte delle cellule tumorali presenta una sovraespressione sulla loro superficie di recettori specifici per il folato (H. Zhao and Yung 2008)·(Mariano Licciardi et al. 2008). L'acido folico, un ligando ad elevata affinità per i recettori del folato, è uno tra i ligandi target proposti. Un importante caratteristica dell'acido folico è che quando è derivatizzato o coniugato attraverso il suo gruppo  $\gamma$ -carbossilico mantiene inalterate la sua capacità a legarsi ai recettori(Cavallaro et al. 2006).

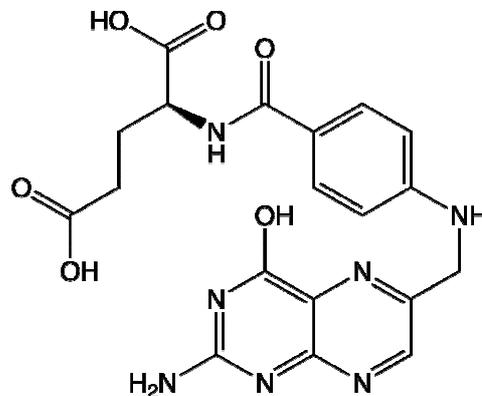


Figura 1. Struttura chimica dell'acido Folico

L'acido folico è una vitamina a basso peso molecolare richiesta dalle cellule eucariote, in quanto è coinvolto in alcune vie metaboliche nella sintesi di nucleotidi.

Poiché l'acido folico è essenziale per la biosintesi di basi nucleotidiche, la vitamina è consumata in elevate quantità dalle cellule proliferanti, nonostante le cellule animali manchino della via biosintetica del folato. Per questa ragione, le cellule normali trasportano fisiologicamente i folati attraverso la membrana plasmatica tramite carrier per il folato ridotto e recettori per il folato (FR)(Elnakat and Ratnam 2004).

Il primo meccanismo, potenzialmente presente in tutte le cellule, coinvolge una proteina transmembrana a bassa affinità, che trasporta i folati ridotti direttamente nel citosol delle cellule e costituisce la principale via responsabile dell'uptake dei folati fisiologici.

Il secondo meccanismo si trova principalmente sulle cellule epiteliali polarizzate e sui macrofagi attivati(Nakashima-Matsushita et al. 1999); tali recettori FR, glicoproteici ad alta affinità, legano e internalizzano preferenzialmente i folati ossidati attraverso endocitosi mediata da recettore(Shen et al. 1994).

Piccole concentrazioni di acido folico sono sufficienti affinché il recettore per il folato ridotto fornisca il giusto apporto di folato alla maggior parte delle cellule normali; invece l'FR è frequentemente sovraespresso nelle cellule tumorali umane, probabilmente consentendo alle cellule maligne di competere per la vitamina allo scarseggiare delle risorse(Bueno et al. 2001).

La presenza dei FRs in molte cellule cancerose, di fatto, identifica questa classe di recettori come un potenziale target per molti sistemi terapeutici direzionabili al tumore. Infatti, come ampiamente descritto in letteratura, poiché i recettori FR sono sovraespressi in un gran numero di cellule tumorali maligne (cellule del cancro dell'ovaio, della mammella, cerebrale, osteosarcoma, polmonare, colon-rettale etc..), l'acido folico è diventato una delle più popolari molecole per il *drug-targeting* alle cellule tumorali.

L'uso dell'acido folico come agente targeting è ulteriormente supportato dal suo legame ad alta affinità ( $K_d \pm 10^{-10}M$ ), bassa immunogenicità, facile manipolazione, piccola dimensione ( $M_r = 441.4$ ), stabilità durante la conservazione, compatibilità con solventi organici e acquosi, basso costo e facile reperibilità. La coniugazione dell'acido folico a macromolecole o a *drug delivery system* colloidali può essere facilmente ottenuta attivando i gruppi carbossilici dell'acido folico per farli reagire con i gruppi basici primari presenti nella macromolecola d'interesse(Mariano Licciardi et al. 2010).

Dati sperimentali hanno dimostrato che se la formazione dei coniugati avviene per reazione tra il gruppo  $\gamma$ -carbossilico dell'acido folico e la macromolecola di interesse il coniugato che si forma può interagire con i recettori FR(Chen et al. 2013), viceversa l'associazione con il recettore FR è fortemente compromessa. Tuttavia, ciò non rappresenta un problema reale, poiché in diversi studi è stato dimostrato che, seppure le reazioni di derivatizzazione possono avvenire sia a livello del gruppo  $\gamma$ - o  $\alpha$ -carbossilico

dell'acido folico, si ha una resa di attivazione dell'80% del gruppo  $\gamma$ -carbossilico e del 20% del gruppo  $\alpha$ -carbossilico(Supriya Shukla et al. 2002).

#### 1.4 NANOSISTEMI A BASE DI ORO COLLOIDALE PER DIAGNOSI, *IMAGING* E TERAPIA ANTITUMORALE

Nanostrutture a base di metalli nobili rappresentano una tipologia di *nanocarrier* innovativa che ha destato un crescente interesse negli ultimi vent'anni trovando applicazioni in campo biomedico e in particolare in diagnosi (*biosensing*), *imaging* e terapia antitumorale. Tra questi metalli, l'oro colloidale possiede una combinazione di proprietà uniche, non presenti nel materiale in "*bulk*": possiede proprietà ottiche ed elettriche peculiari, resiste all'ossidazione in ambiente fisiologico, è caratterizzato da un'elevata area superficiale ed è possibile modificarne la superficie sfruttando la sua elevata affinità per i gruppi tiolici ed amminici. Inoltre è biocompatibile, citocompatibile e bioeliminabile (al di sotto dei 5 nm). Tali caratteristiche ne fanno un candidato ideale per applicazioni in campo biomedico, permettendo di realizzare con un unico nanosistema multifunzionale, diagnosi, *imaging* e rilascio di farmaci al tessuto bersaglio(Longmire, Choyke, and Kobayashi 2008). La realizzazione contemporanea di diagnosi e terapia, sfruttando le proprietà di sistemi di dimensioni nanometriche viene chiamata con un solo termine, nanoteranostica (Fig 1).

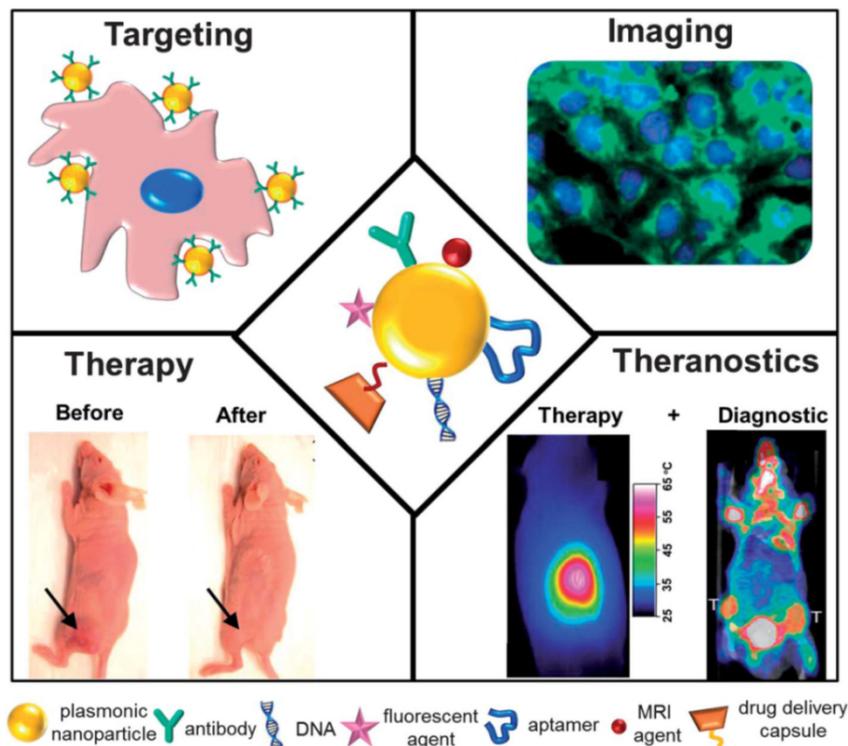


Figura 2. Rappresentazione schematica di nanostrutture a base di oro colloidale impiegate per realizzare simultaneamente una terapia antitumorale direzionata, e imaging diagnostico sia *in vitro* che *in vivo*. Copyright 2008 and 2009 AACR Publishing and 2010 Wiley-VCH Verlag GmbH.

#### 1.4.1 RISONANZA PLASMONICA DI SUPERFICIE

Le proprietà ottiche ed elettriche dell'oro colloidale, dalle quali dipendono importanti applicazioni in campo biomedico, sono determinate dal fenomeno di Risonanza Plasmonica di Superficie (SPR). Tale fenomeno, in accordo alla teoria di Mie, dipende dalle dimensioni nanometriche dell'oro colloidale e consiste nella creazione di un campo magnetico sulla superficie delle nanoparticelle di oro quando queste interagiscono con radiazioni elettromagnetiche di opportuna lunghezza d'onda, comprese nella regione del Visibile (400-800 nm) e del Vicino Infra Rosso (NIR: 800-110 nm)(Ungureanu et al. 2011). In particolare, l'energia associata a tali radiazioni incidenti determina un'oscillazione collettiva degli elettroni di

superficie dell'oro che, formando un dipolo oscillante, genera un campo magnetico sulla superficie stessa (Figura 1)(Jain et al. 2007). L'intensità e la lunghezza d'onda della banda SPR alla quale si verifica il massimo assorbimento e la massima ampiezza dell'oscillazione degli elettroni di superficie, detta appunto Risonanza Plasmonica di Superficie, dipende da diversi fattori che influenzano la densità elettronica sulla superficie delle particelle così come il tipo di metallo, la dimensione, forma, struttura, composizione delle particelle, e la costante dielettrica del mezzo, come descritto dalla teoria di Mie:

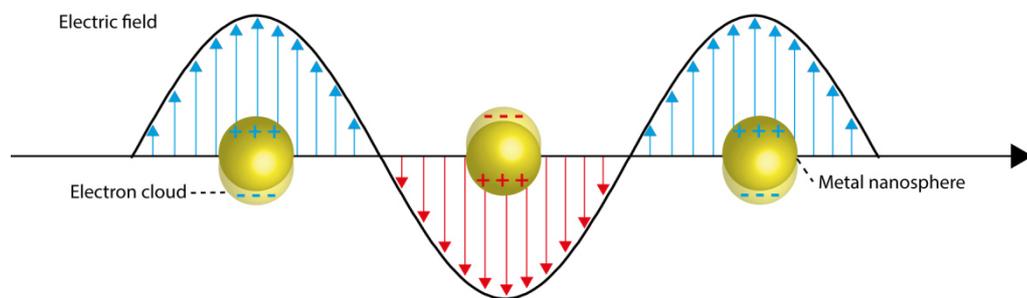


Figura 3. Rappresentazione schematica del fenomeno di Risonanza Plasmonica di Superficie delle nanoparticelle di oro.

Sotto l'influenza di un campo elettrico, gli elettroni di superficie delle nanoparticelle metalliche oscillano. Alla frequenza di risonanza plasmonica queste oscillazioni sono significativamente aumentate risultando in una separazione di carica che varia nel tempo.

La risonanza plasmonica di superficie determina un forte assorbimento e diffusione della radiazione incidente. Questo aspetto ha degli interessanti risvolti in campo biomedico: nel primo caso infatti, l'energia della radiazione elettromagnetica assorbita viene convertita in calore, e questo può essere sfruttato in terapia per realizzare ad esempio l'ablazione termica di tumori solidi. Nel secondo caso le onde elettromagnetiche diffuse possono essere

utilizzate per l'acquisizione di immagini, per effettuare in tal modo la diagnosi e il monitoraggio di determinate patologie(Jain et al. 2006).

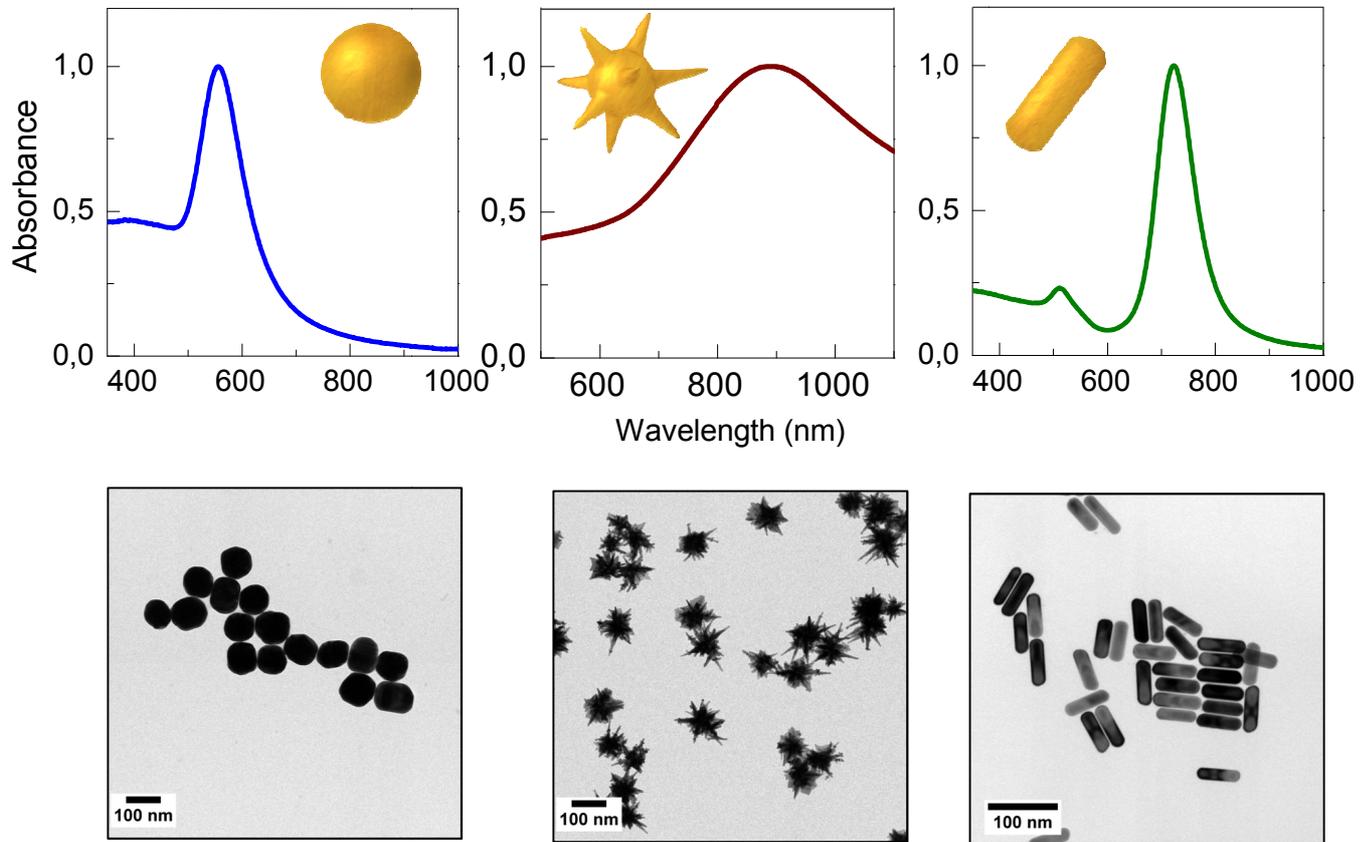


Figura 4. Caratteristici spettri di assorbimento UV-Vis e Vis-NIR di nanosfere, nanorods e nanostar di oro (da sinistra a destra) e relative immagini TEM.

Grazie ai progressi della chimica sintetica esistono numerose tipologie di oro colloidale: nanosfere, nanorods (ovvero particelle di forma quasi cilindrica), nanostar (a forma di stella), bipiramidi, ottaedri, nanocubi, nanocage (ibridi di argento e oro) e nanoshell (nanosfere costituite da un *core* di silice rivestito da una sottile lamina di oro) delle quali è possibile controllare con precisione morfologia e dimensioni (Figura 4)(J. Ye et al. 2009)(Nehl, Liao, and Hafner 2006). Ogni tipologia di oro colloidale possiede una propria

banda di assorbimento SPR e proprietà ottiche e chimico-fisiche uniche. Ad esempio la banda SPR delle nanosfere di oro è compresa fra 500 e 550 nm e subisce *red shift* all'interno di questo intervallo all'aumentare delle dimensioni particellari (Fig 5) e al diminuire della distanza interparticellare, ovvero in seguito ad aggregazione delle nanoparticelle, con conseguente variazione del colore della dispersione colloidale da rosso a blu. Per le nanostars e le nanorods, la banda SPR è splittata in due: una fissa a circa 500 nm e una compresa nella regione del vicino IR (NIR) che subisce *red shift* all'aumentare del rapporto lunghezza/altezza delle nanoparticelle (Aspect Ratio: AR)(X. Ye et al. 2012). Le diverse bande di assorbimento SPR delle differenti tipologie di nanoparticelle comportano applicazioni differenti in campo biomedico.

#### 1.4.2 SINTESI DI NANOSTRUTTURE A BASE DI ORO

È stata dedicata molta attenzione alla sintesi di nanoparticelle di oro aventi diversa morfologia. I metodi sintetici più semplici utilizzati per produrre nanosfere di oro sono i metodi di *Turkevich* e di *Brust-Schiffrin*(Brust et al. 1994)(Turkevich, Stevenson, and Hillier 1951a). Questi si basano sulla riduzione chimica dello ione aurico Au III sottoforma di complesso tetracloroaurico  $[AuCl_4]^-$  a oro metallico Au<sup>0</sup>, facendo uso di un opportuno agente riducente e di un agente di rivestimento stabilizzante (*capping ligand*). Il metodo di *Turkevich*, conosciuto anche come metodo sintetico in mezzo acquoso, prevede la riduzione dello ione aurico Au III con citrato in acqua. Il citrato in questo caso funziona sia da agente riducente sia da agente stabilizzante.

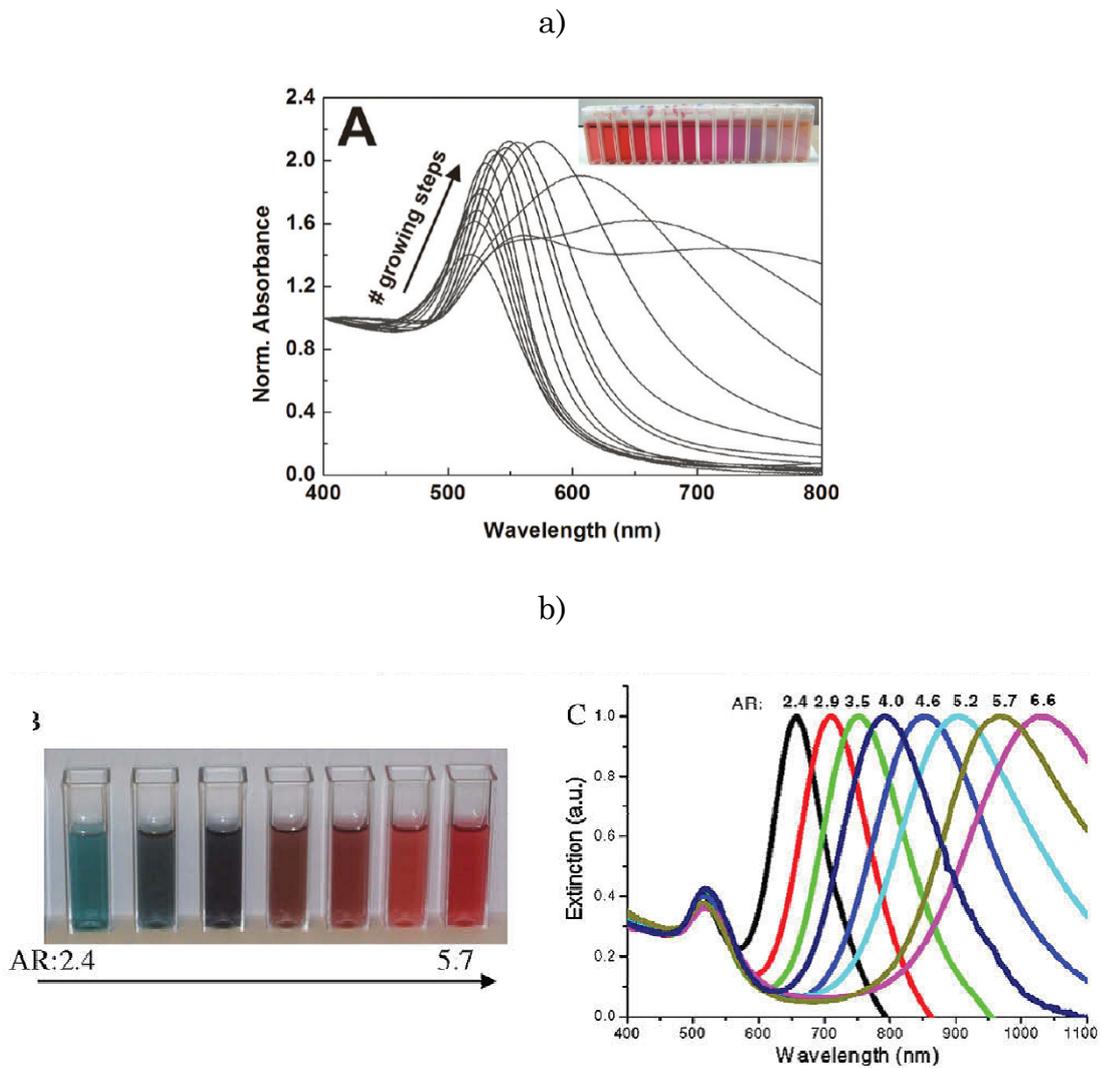


Figura 5. Tipiche bande di assorbimento SPR di nanosfere di oro (a) e nanorods di oro (b) che mostrano un evidente redshift della  $\lambda_{max}$  di assorbimento all'aumentare delle loro dimensioni e dell' aspect ratio (AR) con conseguente variazione del colore della dispersione colloidale.

Le particelle ottenute con questo metodo hanno dimensioni comprese tra 15 e 150 nm (in funzione della concentrazione di agente riducente), sono disperdibili in acqua, ma si aggregano in soluzioni saline e richiedono perciò in tal caso un idoneo rivestimento idrofilo per poter essere utilizzate *in vivo* (Rayavarapu et al. 2010).

Il secondo metodo sintetico, ovvero il metodo di *Brust-Schiffrin*, è condotto in un sistema bifasico acqua/ toluene. Questo prevede il trasferimento del

complesso tetracloroaurico  $[\text{AuCl}_4]^-$  dalla fase acquosa alla fase organica, utilizzando un catalizzatore di trasferimento di fase (ad esempio il tetraottilammonio bromuro, TOAB) e la successiva riduzione dell' Au III ad Au<sup>0</sup> con sodio boroidruro NaBH<sub>4</sub> in presenza di un alcantiolo come agente stabilizzante (ad esempio il dodecantiolo). Le nanoparticelle così prodotte hanno dimensioni comprese tra 1 e 5 nm e sono disperdibili in solventi non polari (Brust et al. 1994). Altri approcci sintetici prevedono l'impiego di metodi fisici come le microonde e l'irradiazione con raggi UV, che portano alla riduzione dell'oro grossolano in materiale finemente suddiviso di dimensioni colloidali (1-500 nm) (Panda and Deepa 2011). Un'ultima tecnica sintetica prevede la produzione di nanoparticelle assistita da microorganismi, che prende il nome di “*green chemistry*”, avendo un basso impatto ambientale (Dhanasekar et al. 2015).

Variazioni di questi metodi, come l'impiego di opportuni *templates* e/o sali (come ad esempio l'AgNO<sub>3</sub>) che favoriscono la crescita trasversale delle nanosfere prodotte, hanno portato alla realizzazione di nanoparticelle di oro aventi diversa morfologia (es. nanorods di oro) (Scarabelli et al. 2015).

#### 1.4.3 APPLICAZIONI DELL'ORO COLLOIDALE IN CAMPO BIOMEDICO

Grazie allo studio approfondito delle proprietà ottiche, elettriche e chimico-fisiche dell'oro colloidale da parte di fisici, chimici e matematici e grazie ai progressi ottenuti nel controllo di dimensioni e morfologia delle nanoparticelle di oro, l'oro colloidale ha trovato numerose applicazioni in campo biomedico, in particolare in diagnosi, *imaging* e terapia antitumorale (Ivan H. El-Sayed, Xiaohua Huang, and Mostafa A. El-Sayed\* 2005). Sebbene le nanoparticelle di oro siano prodotte con agenti stabilizzanti per prevenirne l'aggregazione in mezzo acquoso, e sebbene siano citocompatibili e “inerti” nell'ambiente fisiologico, per applicazioni biologiche ed *in vivo*, spesso è necessario rivestirle con polimeri idrofili per assicurarne la stabilità fisica in mezzo fisiologico, la biocompatibilità e la

citocompatibilità(Rayavarapu et al. 2010). La superficie dell'oro colloidale reagisce facilmente con gruppi tiolici (-SH), formando un legame covalente oro-zolfo. Inoltre l' $Au^0$  reagisce con gruppi amminici per formare un complesso elettrostatico tra gruppi amminici protonati e ioni  $AuCl_4^-/AuCl_2^-$  presenti in superficie, e/o reagisce con essi per formare il complesso più stabile  $[AuCl(NH_2R)]$  (Kumar et al, 2003).

Pertanto molecole che presentano gruppi tiolici, come ad esempio polimeri idrofili funzionalizzati con gruppi -SH, e/o amminici possono essere utilizzati per rivestire le nanoparticelle di oro. Il polimero più ampiamente utilizzato per aumentare la biocompatibilità di nanosistemi a base di oro è il polietilenglicole (PEG) funzionalizzato con un gruppo tiolico ad un'estremità(W.-S. Cho et al. 2010). Altri rivestimenti polimerici utilizzati sono i polimeri di natura polisaccaridica (come ad esempio l'acido Ialuronico(H. Lee et al. 2008), l'Eparina(K. Lee et al. 2010) e la gomma Arabica(Wu and Chen 2010) funzionalizzati con gruppi tiolici) e proteica (come l'albumina del siero bovino)(Scott H. Brewer et al. 2005). Nel caso di rivestimenti con proteine aventi domini idrofobici, il meccanismo di rivestimento più accreditato è l'adsorbimento fisico della proteina sulla superficie dell'oro.

Sono state realizzate anche nanostrutture a base di oro rivestite con materiale non polimerico, come ad esempio zuccheri (glucosio, fruttosio, lattosio, mannosidi, derivatizzati con gruppi -SH)(Marradi et al. 2011) e fosfolipidi (ad esempio nanoparticelle di oro incorporate in liposomi)(Chithrani et al. 2010). Il rivestimento oltre a garantire la stabilità fisica del sistema, deve consentire il caricamento di molecole bioattive e agenti direzionanti e in più deve rispondere ai criteri di biocompatibilità e citocompatibilità necessari per applicazioni *in vivo*. Inoltre, sempre sfruttando l'affinità dell'oro per i gruppi tiolici, è possibile legare direttamente alla superficie delle nanoparticelle di oro agenti terapeutici e agenti direzionanti opportunamente derivatizzati(Paciotti, Kingston, and Tamarkin 2006).

#### 1.4.4 APPLICAZIONI IN DIAGNOSI

Grazie alla versatilità dell'oro colloidale è stato possibile realizzare diverse tipologie di sensori basati sulle proprietà di questo metallo per la *detection in vitro* di ioni, biomolecole (DNA, proteine, glucosio,  $\text{Ca}^{+2}$  ecc...) e cellule, che possono rappresentare dei *markers* di determinate patologie. I sensori a base di oro colloidale sono caratterizzati da un'elevata selettività e sensibilità, ovvero permettono di individuare esclusivamente l'analita cercato anche se presente a bassissime concentrazioni (*one molecule detection*), consentendo di realizzare una diagnosi precoce di alcune patologie, per lo più tumorali ed infiammatorie (J. E. Kim et al. 2016).

I sensori a base di oro colloidale finora sviluppati sono i seguenti:

- sensori a risposta elettrochimica
- sensori colorimetrici
- sensori fluorescenti
- sensori a diffusione Raman, detti sensori SERS (*Surface Enhanced Raman Scattering*).

I sensori a risposta elettrochimica si basano sulla eccellente conduttività e sull'elevata area superficiale dell'oro colloidale. Un esempio di biosensore a risposta elettrochimica è rappresentato da nanosfere di oro di 5 nm coniugate con l'*Horse Radish Peroxidase* per la rilevazione del perossido di idrogeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) presente in concentrazione compresa tra 50 nM e 5  $\mu\text{M}$  (S. Guo and Wang 2007). L'oro colloidale immobilizza la proteina ad attività ossidoreduttasica sulla sua superficie, creando un microambiente idoneo al trasferimento di elettroni dal sito catalitico dell'enzima all'elettrodo rilevatore, in presenza del substrato  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Sfruttando l'intenso assorbimento dell'oro colloidale nella regione del Visibile, è stato possibile realizzare sensori colorimetrici a base di oro. Questi sensori permettono di rilevare una variazione del colore della dispersione di oro, in presenza dell'analita cercato. Il principio sul quale si basano tali sensori è il *red-shift* della banda di assorbimento SPR causato

dall'aggregazione delle nanoparticelle che avviene solo in presenza dell'analita. Pertanto visivamente si verifica una variazione del colore della dispersione colloidale da rosso a blu(Liu and Lu 2006). Un sensore colorimetrico approvato dalla *Food and Drug Administration* per la ricerca in vitro di frammenti di DNA, è costituito da nanosfere di oro funzionalizzate con mercaptonucleotidi aventi una sequenza complementare alla sequenza di DNA ricercata(Elghanian et al. 1997). In assenza della specifica sequenza ricercata, la dispersione appare rossa in quanto non si verifica aggregazione particellare, mentre in presenza della sequenza cercata, si verifica appaiamento delle basi complementari, aggregazione del sistema, *red shift* della banda SPR e variazione del colore da rosso a blu (Figura 6).

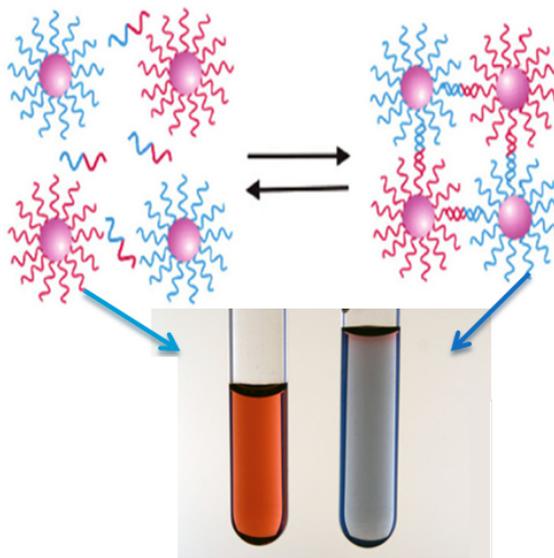


Figura 6. Rappresentazione schematica di nanosfere di oro funzionalizzate con mercaptonucleotidi per la ricerca in vitro di frammenti di DNA.

Un'altra tipologia di sensori a base di oro colloidale sono i sensori a fluorescenza. Questi sfruttano la capacità dell'oro di determinare il *quenching*, ovvero lo spegnimento della fluorescenza di sonde poste vicine alla sua superficie, a cui segue il successivo ripristino della fluorescenza quando la sonda viene allontanata dalla superficie dell'oro, solo in presenza

dell'analita cercato. Questa proprietà si basa sui trasferimenti di energia detti NSET, ovvero *Nanometal Surface Energy Transfer*, e FRET, *Förster Resonance Energy Transfer*, che si differenziano per il meccanismo con il quale l'energia viene trasferita dalla sonda fluorescente all'oro e per la distanza massima del fluoroforo dalla superficie dell'oro alla quale si verifica il suddetto fenomeno. Tale distanza risulta di 20 nm per il NSET e minore (circa 4 nm) nel caso del FRET(Eunkeu Oh et al. 2005).

L'ultima tipologia di sensori a base di oro colloidale è rappresentata dai sensori che si basano sulla spettroscopia di emissione Raman, detta SERS, ovvero *Surface Enhanced Raman Scattering*. Tale tecnica è utilizzata in genere per studiare i movimenti vibrazionali e rotazionali delle molecole e fornisce uno spettro che rappresenta "l'impronta digitale" della molecola. Tuttavia, la spettroscopia di emissione Raman è limitata dalla sua bassa sensibilità, infatti solo  $1/10^8$  fotoni delle radiazioni elettromagnetiche incidenti comprese nel range del NIR viene diffuso dalle molecole. Il forte campo elettromagnetico presente sulla superficie delle nanoparticelle di oro permette di amplificare la diffusione Raman di molecole coniugate o adsorbite sulla superficie dell'oro, con conseguente aumento della sensibilità della tecnica(Sepúlveda et al. 2009).

#### 1.4.5 APPLICAZIONI IN *IMAGING* DIAGNOSTICO

Sfruttando le proprietà dell'oro colloidale è stato possibile utilizzare quest'ultimo come mezzo di contrasto per diverse tecniche di *Imaging* diagnostico. Le principali sono:

- *l'optical imaging*,
- *l'imaging* di fluorescenza,
- *l'imaging* con raggi X (Axial Computed Tomography, TAC)
- il *Surface Enhanced Raman Scattering imaging*,
- *l'Imaging* fotoacustico, ad ultrasuoni (ecografia) ed optoacustico (OAT)

- *Two Photon Luminescence Imaging*
- *Risonanza magnetica nucleare (MRI)*

L'*optical imaging* consiste nell'acquisizione di immagini dovuta alla forte diffusione di una luce laser incidente avente lunghezza d'onda corrispondente alla banda di assorbimento SPR delle nanoparticelle utilizzate. La strumentazione richiesta per tale tecnica è un microscopio ottico a campi scuri che consente di ottenere una maggior brillantezza delle immagini. *El Sayed et al* hanno utilizzato nanosfere e nanorods di oro funzionalizzate con anticorpo anti EGFR (Endothelial Growth Factor Receptor) per la visualizzazione delle cellule del cancro del cavo orale che sovraesprimono tale recettore, riuscendo ad ottenere un efficiente accumulo nel tumore sfruttando il direccionamento attivo al tessuto bersaglio (Figura 7)(Xiaohua Huang et al. 2006).

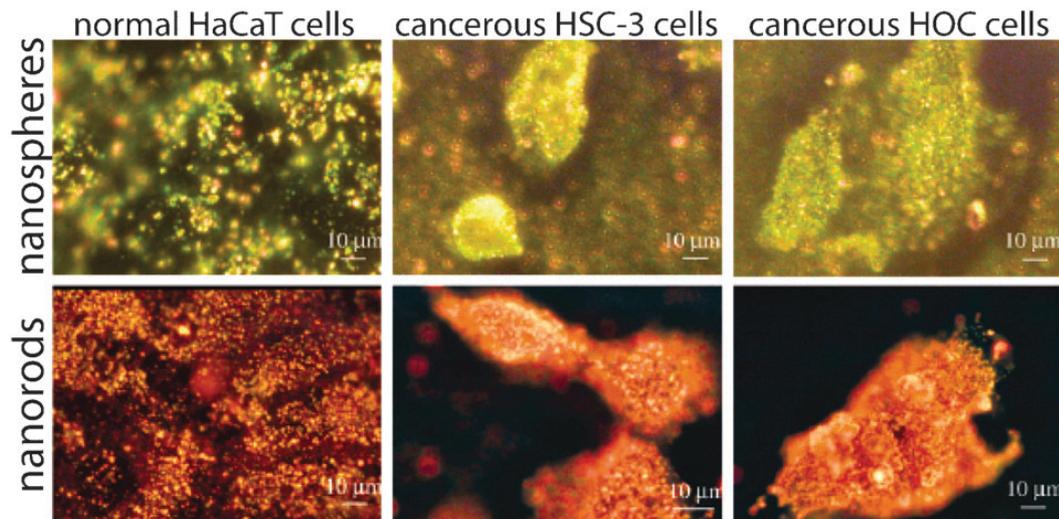


Figura 7. Immagini al Microscopio Ottico a campi scuri di nanosfere e nanorods di oro per l'Imaging specifico di cellule (HSC e HOC) del cancro del cavo orale. Copyright© 2006 American Chemical Society.

L'*imaging* di fluorescenza, analogamente a quanto detto per i sensori a fluorescenza, sfrutta i fenomeni di NSET e FRET, ovvero si basa sul *quenching* della fluorescenza di un fluoroforo posto vicino alla superficie delle

nanoparticelle di oro e sul successivo ripristino della fluorescenza in seguito all'allontanamento dalla superficie dell'oro, causato ad esempio da un particolare microambiente a livello del tessuto da visualizzare. Per applicazioni *in vivo*, la sonda fluorescente da coniugare alla superficie dell'oro o al suo rivestimento, deve essere scelta opportunamente. Questa deve avere una lunghezza d'onda di emissione che cada nella regione del vicino Infra Rosso (NIR), in quanto a tale lunghezza d'onda le onde elettromagnetiche sono caratterizzate da un elevato potere penetrante nei tessuti, consentendo così un'efficace visualizzazione anche dei tessuti più profondi e hanno un basso contenuto energetico, tale da non danneggiare i tessuti sani circostanti (Y. Zhang et al. n.d.). Hyukjin L et al, nel 2008 hanno utilizzato nanosfere di oro di circa 30 nm, funzionalizzate con acido Ialuronico a basso peso molecolare (oligo-HA), derivatizzato con gruppi tiolici e marcato con la sonda fluorescente *Hylite-Fluor-647* (HHAuNPs), per la ricerca *in vivo* di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e Ialuronidasi (HAse). Entrambe queste specie sono sovraesprese in patologie infiammatorie come l'artrite reumatoide e in tumori solidi già in stadio metastatico. ROS e HAse idrolizzano le catene di acido Ialuronico coniugate alle nanoparticelle, determinando l'allontanamento della sonda fluorescente dalla superficie dell'oro (figura 8). In questo modo viene registrata emissione di fluorescenza solo nei tessuti infiammati e tumorali nei quali si verifica l'idrolisi delle catene dell'oligo-HA (H. Lee et al. 2008).

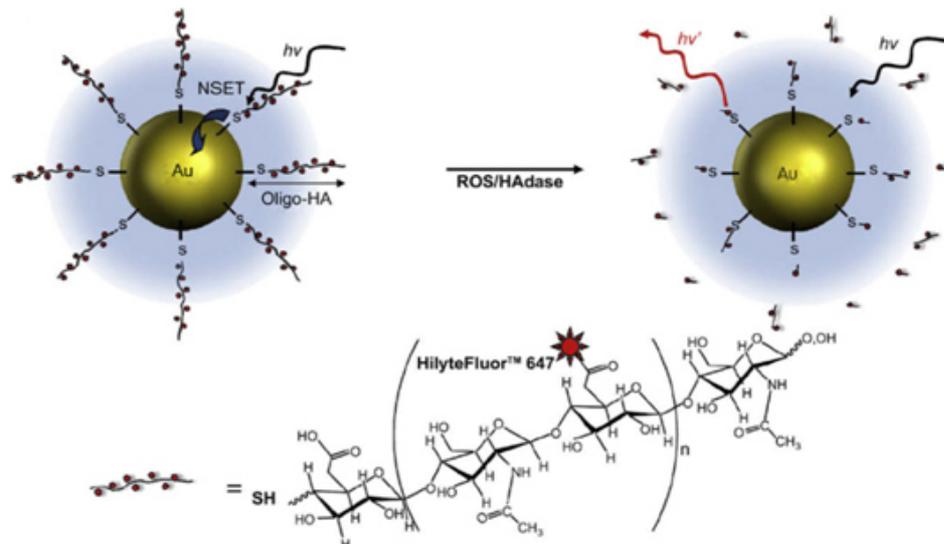


Figura 8. Illustrazione schematica dell'interazione NSET tra l'oligo-HA marcato con la sonda *Hylite-Fluor-647* e le nanoparticelle di oro: sulla sinistra si verifica *quenching* della fluorescenza, mentre sulla destra si registra un ripristino della fluorescenza in presenza di ROS e Ialuronidasi (HADase). Copyright © 2008 Elsevier Ltd.

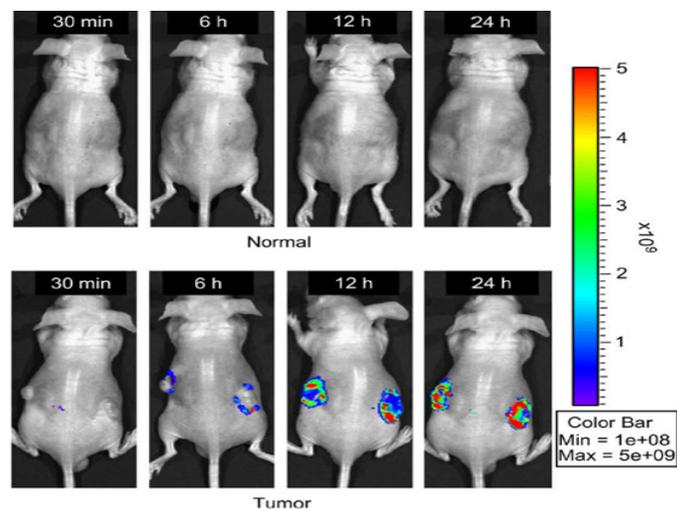


Figura 9. Imaging di fluorescenza *in vivo* su modelli murini portanti uno *xenograft* di cellule del cancro delle ovaie (OVCAR-3) dopo somministrazione endovenosa di 10 pmol di HHAuNPs. Copyright © 2008 Elsevier Ltd.

Una tecnica di Imaging strettamente correlata al imaging di fluorescenza è l'*imaging* di fluorescenza con eccitazione a due fotoni, ovvero la *Two photon Luminescence (TPL) imaging* (Nicholas J. Durr et al. 2007). Questa è una tecnica relativamente nuova per eccitare molecole fluorescenti e in questo caso l'oro colloidale. Dal punto di vista teorico, la TPL si basa sul simultaneo assorbimento di due fotoni da parte dell'oro colloidale e sulla successiva emissione dell'energia assorbita sotto forma di onde elettromagnetiche (fluorescenza). Sperimentalmente l'eccitazione a due fotoni è resa possibile dall'uso di un laser che emette impulsi ad alta potenza di picco e temporalmente molto concentrati, e dalla focalizzazione di tali impulsi luminosi sul campione attraverso l'obbiettivo ad alta apertura numerica di un microscopio. La fotoluminescenza dell'oro colloidale può pertanto essere monitorata utilizzando un laser multifotone che permette di visualizzare tessuti biologici in profondità e pertanto si presta per l'*imaging* su modelli animali.

L'oro, grazie al suo peso atomico (196,97 Da) e all'elevata densità elettronica, può essere sfruttato come agente di contrasto per raggi X, ovvero per quella che è chiamata comunemente TAC (Computed Axial Tomography) (Galper et al. 2012).

I nanosistemi a base di oro presentano dei vantaggi rispetto ai mezzi di contrasto tradizionali attualmente utilizzati in clinica, gli iodinati. Infatti questi ultimi sono caratterizzati da elevata tossicità renale, possibilità di reazioni allergiche anche gravi fino allo shock anafilattico e da un breve tempo di acquisizione delle immagini (solo pochi minuti). Di contro l'oro colloidale permette un elevato tempo di acquisizione delle immagini (maggiore di 24 h), è biocompatibile e citocompatibile, e inoltre permette di realizzare un direzionamento passivo e/o attivo al tessuto da visualizzare, migliorando pertanto la qualità delle immagini (Z. Zhang, Ross, and Roeder 2010). Altre applicazioni in *imaging* diagnostico sono la *Surface Enhanced Raman Scattering (SERS)* e l'*imaging* foto ed optoacustico e ad ultrasuoni (ecografia). Nel caso del *SERS imaging* le nanoparticelle di oro, analogamente a quanto visto per i sensori SERS, amplificano il fenomeno

della diffusione Raman di molecole presenti sulla loro superficie o nelle vicinanze consentendo di registrare spettri di emissione caratterizzati da un'elevata sensibilità nella tecnica (Figure 10)(Giner-Casares et al. 2016).

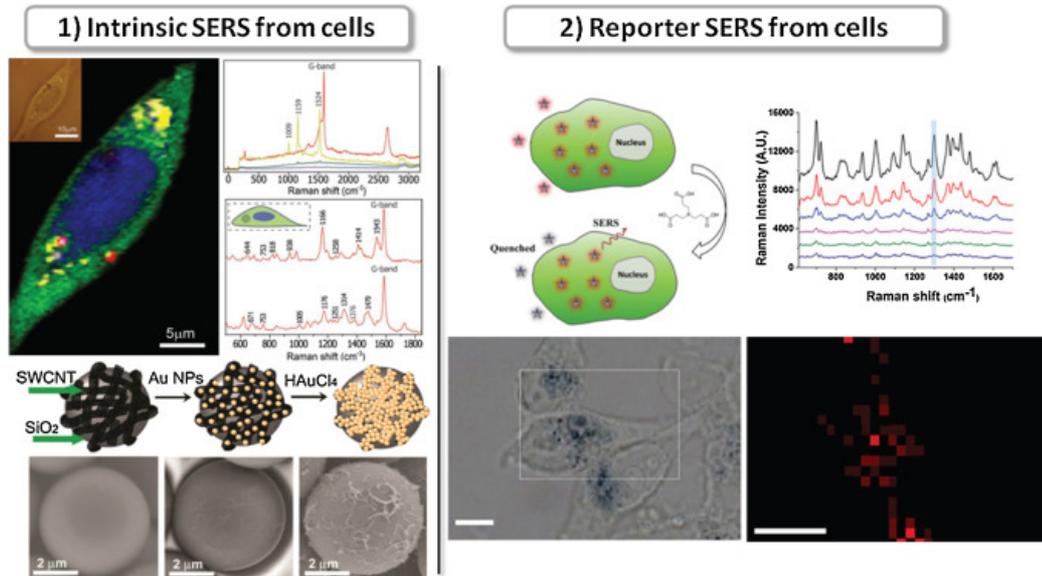


Figura 10. SERS *imaging* mostra l'ambiente intracellulare di cellule vive. Le nanoparticelle di oro migliorano sensibilmente il segnale Raman di componenti intracellulari. Il nucleo e il citoplasma sono mappate tramite SERS fornendo un'immagine dettagliata dell'ambiente intracellulare. Copyright 2013, Wiley-VCH.

L'imaging fotoacustico e ad ultrasuoni così come l'imaging optoacustico sfruttano la conversione di una luce laser pulzata incidente di lunghezza d'onda corrispondente alla banda SPR delle nanoparticelle utilizzate in onde sonore ed ultrasuoni, consentendo di acquisire in tal modo immagini tridimensionali del tessuto da visualizzare(Manohar, Ungureanu, and Van Leeuwen n.d.). Inoltre conferendo proprietà magnetiche alle nanoparticelle di oro è possibile sfruttare queste ultime come mezzo di contrasto per MRI. Ad esempio particelle superparamagnetiche sono state rivestite con uno shell di oro per aumentarne le prestazioni. In questo modo, nanoparticelle ibride contenenti un core magnetico ed uno shell di oro possono essere utilizzati come agenti di contrasto nella MRI (Magnetic Resonance

Imaging), una tecnica usata in ambito medico che misura il rilassamento di spin nucleare protonico nei tessuti, riuscendo a trasformare il segnale in immagine (Narayanan et al. 2011).

La tabella 3 riporta un riepilogo delle principali applicazioni dell'oro colloidale come agente di contrasto per varie tecniche di *imaging* diagnostico e le tipologie di particelle maggiormente utilizzate per ciascuna tecnica di *imaging*.

Tabella 3. Riepilogo delle applicazioni in *imaging* di nanoparticelle di oro, proprietà richieste e tipologie di nanoparticelle utilizzabili.

<b>Applicazione in Imaging</b>	<b>Proprietà richieste</b>	<b>Tipologia di AuNPs</b>
X-ray imaging	Assorbimento di raggi X	Varie, nanosfere molto usate nella pratica clinica
Fluorescence imaging	Coniugazione con fluorofori	Rods, shells, sfere marcate
Surface enhanced Raman spectroscopy imaging (SERS)	Campo magnetico (SPR) accentuato	Stars, nanosfere
imaging foto ed opto acustico	Forte assorbimento nel NIR	Cages, aggregati di nanosfere, rods, nanoshell
Two Photon Luminescence imaging	Forte assorbimento nel NIR per applicazioni <i>in vivo</i>	Nanorods, nanostars,
Optical imaging	Accentuata diffusione della luce	nanosfere
Risonanza magnetica nucleare (MRI)	proprietà super e paramagnetiche	nanosfere ibride SPIONs/oro

#### 1.4.6 APPLICAZIONI IN TERAPIA ANTITUMORALE

Allo stato attuale ci sono numerosi sistemi a base di oro colloidale in via di sviluppo utilizzati come sistemi di rilascio di farmaci e di materiale genico. Tuttavia l'oro colloidale non è semplicemente un nanocarrier inerte di molecole bioattive, bensì può essere esso stesso un agente terapeutico, come nel caso della terapia fototermica, fotodinamica e della radioterapia (R. Guo et al. 2010).

Le nanostrutture a base di oro presentano una combinazione di proprietà che lo rendono un candidato ideale per applicazioni nel *drug e gene delivery*. Infatti il *core* di questo metallo nobile è biologicamente inerte, presenta una bassa citotossicità ed elevata biocompatibilità ed è possibile controllare dimensioni e morfologia delle nanostrutture (Connor et al. 2005). Queste proprietà sono imprescindibili per applicazioni in *vivo*. Altre importanti proprietà sono l'elevata area superficiale e l'affinità verso gruppi tiolici ed amminici che consentono di modificarne chimicamente la superficie in base alle diverse esigenze di tipo tecnologico-farmaceutico (B. Duncan, Kim, and Rotello 2010). Sistemi a base di oro colloidale sono stati ampiamente studiati per applicazioni in terapia antitumorale per mettere a punto nuovi ed efficaci trattamenti per questa patologia sempre più diffusa. Heo et al hanno riportato un complesso sistema a base di oro colloidale costituito da nanosfere di oro di 50 nm peghilate e funzionalizzate tramite formazione di un legame covalente oro-zolfo, con biotina come agente direzionante e  $\beta$  ciclodestrina derivatizzata con gruppi tiolici, per caricare tramite formazione di un complesso di inclusione *host-guest*, l'agente terapeutico anticancro Paclitaxel, e la Rhodamina B per effettuare contestualmente alla terapia l'*imaging* del tessuto tumorale modello. Tale sistema è stato saggiato su tre linee cellulari tumorali dell'adenocarcinoma polmonare, ovvero le HeLa, A549 ed MG63, che sovraesprimono i recettori per la biotina (Heo et al. 2012). Dopo 24 h di incubazione del nanosistema con tali linee cellulari, è stata dimostrata qualitativamente l'internalizzazione del sistema sfruttando sia un microscopio ottico a campi scuri, sia l'*imaging* di

fluorescenza, ed è stato quantificato l'oro sul lisato cellulare, tramite spettrometria di Massa con ionizzazione al plasma (ICP-MS). Dai risultati sperimentali ottenuti il nanosistema si accumula all'interno delle cellule, determinando il dimezzamento della vitalità cellulare dopo 24 h di incubazione. Questo è un sistema multifunzionale che permette di realizzare la contemporanea terapia e *imaging* delle cellule bersaglio, costituendo un esempio di medicina teranostica. Il *gene delivery*, è un altro campo in cui le nanoparticelle di oro sono state ampiamente utilizzate. La versatilità di funzionalizzazione della superficie dell'oro ha permesso numerosi e differenti approcci per il caricamento e rilascio di materiale oligonucleotidico. *Lee et al* hanno utilizzato nanorods di oro rivestite con fosfolipidi cationici per la veicolazione ed il rilascio di acidi nucleici. La carica positiva dei fosfolipidi cationici presenti in superficie è stata sfruttata per complessare elettrostaticamente DNA, RNA e siRNA carichi negativamente (S. E. Lee et al. 2009).

Come detto in precedenza, l'oro colloidale non è un semplice veicolo inerte per agenti terapeutici, bensì può avere esso stesso attività terapeutica. La capacità dell'oro di convertire l'energia elettromagnetica assorbita in calore ha permesso di realizzare la terapia fototermica, utilizzata soprattutto per realizzare l'ipertermia e l'ablazione termica di tumori. L'esposizione delle nanoparticelle di oro ad una sorgente laser di opportuna lunghezza d'onda (corrispondente alla banda di assorbimento SPR delle nanoparticelle utilizzate), induce un rialzo termico che porta a morte cellulare a causa della denaturazione di macromolecole vitali e del danneggiamento delle membrane cellulari (Li and Gu 2010). L'utilizzo del calore per la terapia antitumorale non è nuovo. Già Ippocrate, il padre della medicina, sosteneva che i tumori superficiali potevano essere cauterizzati applicando un ferro caldo. La terapia fototermica nel campo del trattamento localizzato del tumore rappresenta una strategia terapeutica poco invasiva rispetto alla classica chemioterapia. Essa si basa sull'ipertermia definita come un processo attraverso il quale la temperatura di un tessuto vivente aumenta sopra il valore fisiologico di 37°C. In alcuni casi, tale incremento di

temperatura è sfruttato per portare cellule e tessuti malati (es. tessuti tumorali) in condizioni citotossiche, ovvero fra 43 e 48°C. A queste temperature, si verificano blandi effetti citotossici come la denaturazione proteica che provoca una morte cellulare “non aggressiva” e inoltre determina la sensibilizzazione delle cellule tumorali ai tradizionali agenti chemioterapici. In altri casi, la temperatura può aumentare anche oltre i 50°C, portando alla così detta termoablazione che causa danni severi alle cellule e conseguente morte cellulare tramite necrosi coagulativa e lisi della membrana (Maestro et al. 2014).

I trattamenti di ipertermia sono stati impiegati anche per aumentare l'efficienza del rilascio di molecole bioattive in quanto determinano vasodilatazione aumentando pertanto il flusso sanguigno dei tessuti bersaglio e favoriscono l'internalizzazione del nanosistema grazie all'aumentata permeabilità cellulare indotta dall'incremento termico. Attualmente in alcuni protocolli terapeutici sono utilizzati agenti di ipertermia sensibili alle radiazioni NIR, come ad esempio l'indocianina verde. Il sale sodico di quest'ultima è ampiamente utilizzato nella pratica clinica ma soffre di alcune limitazioni quali la breve emivita plasmatica ( $t_{1/2} = 3-4$  minuti), la scarsa stabilità in ambiente acquoso e la mancanza di selettività verso il tessuto tumorale bersaglio. Per superare queste limitazioni sono stati proposti come agenti di ipertermia varie tipologie di sistemi nanostrutturati (Yan and Qiu 2015). Pertanto sfruttando l'accumulo dei sistemi colloidali al tessuto bersaglio tramite il meccanismo di *Enhanced Permeability and Retention* (EPR) e/o tramite direzionamento attivo, la terapia fototermica può essere altamente localizzata alle cellule bersaglio e riduce i tempi di irradiazione e la potenza da utilizzare, diminuendo pertanto la possibilità che si verifichino eventi trombotici ed infiammatori nei tessuti sani.

L'oro colloidale quando irradiato con una sorgente laser di lunghezza d'onda corrispondente alla sua banda SPR, è in grado di convertire l'energia elettromagnetica assorbita in calore e ha pertanto permesso di realizzare la terapia fototermica per il trattamento di tumori solidi (Wei 2008). Per

applicazioni *in vivo* è necessario che la banda di assorbimento SPR delle nanoparticelle cada nel vicino infra rosso (NIR), come nel caso di nanorods, nanostars e nanoshell. Infatti a questa lunghezza d'onda la luce laser è caratterizzata da un'elevata capacità penetrante attraverso i tessuti biologici e un ridotto contenuto energetico che non danneggia i tessuti sani (Lowery et al. 2006). Nel 2006, El Sayed et al hanno dimostrato l'efficacia dei nanorods di oro per la terapia fototermica *in vitro*. Gold nanorods funzionalizzati con l'anticorpo anti-EGFR per direzionarli in maniera specifica alle cellule cancerose ENT sono stati utilizzati per realizzare la terapia fototermica. In seguito ad esposizione laser utilizzando un laser 800 nm per 4 minuti alla potenza di 10 W/cm<sup>2</sup> le cellule tumorali risultavano danneggiate, mentre le cellule non tumorali non mostravano alcun effetto citotossico fino ad una potenza di laser raddoppiata, a dimostrazione della selettività dei nanorods coniugati con l'anti EGFR (El-Sayed, Huang, and El-Sayed 2006). In studi più recenti, El-Sayed e collaboratori, in un modello xenograft di cancro ENT hanno dimostrato che nanorods di oro funzionalizzati con PEG-SH 5000 e iniettati per via endovenosa e subcutanea erano in grado di rallentare la crescita tumore dopo esposizione ad un laser NIR a diodi 808 nm avente la potenza di 1-2 W/cm<sup>2</sup> per 10 minuti (Dickerson et al. 2008a).

Oltre all'oro colloidale, tra le varie tipologie di nanosistemi proposti per tale scopo rientrano le particelle superparamagnetiche (SPIONs) e nanostrutture a base di derivati del Grafene. Le SPIONs sottoposte ad un campo magnetico oscillante, si riscaldano, raggiungendo una temperatura che dipende dalle proprietà magnetiche del materiale, dalla forza del campo magnetico e dalla frequenza di oscillazione e permette di raggiungere valori prossimi o superiori ai 45°C incompatibili con la vita cellulare (Laurent et al. 2011). Il grafene comprende una classe di nanomateriali di carbonio bidimensionale di spessore monomolecolare costituito da atomi di carbonio aventi ibridazione sp<sup>2</sup>, con eccezionali proprietà elettriche, meccaniche ed elettroniche. Numerosi derivati del grafene si sono dimostrati promettenti per realizzare la terapia fototermica di tumori solidi sia *in vitro* che *in vivo*.

Infatti quando irradiato da una sorgente laser NIR (ad esempio 808 nm, 2 W/cm<sup>2</sup>) questo è in grado di scaldare il mezzo circostante e quindi anche il tessuto tumorale fino a temperature maggiori di 48°C(Akhavan et al. 2012).

L'oro colloidale ed i derivati del grafene offrono alcuni vantaggi rispetto alle SPIONs: consentono di realizzare l'ipertemia con una semplice applicazione di una luce laser continua o pulsata avente una potenza compresa tra 2 e 120 W/cm<sup>2</sup> di superficie irradiata e pertanto non necessitano l'impiego di elevati campi magnetici che richiedono apparecchiature costose e personale specializzato(Huang et al. 2006).

Un'altra interessante caratteristica delle nanoparticelle di oro è la sua proprietà radiosensibilizzante che ne ha consentito l'impiego in radioterapia. Questo approccio terapeutico è ampiamente utilizzato nella terapia antitumorale in quanto radiazioni ad elevato contenuto energetico, come ad esempio raggi X, inducono danni al DNA cellulare, determinando la morte delle cellule cancerose(S. H. Cho 2005). L'elevata densità elettronica dell'oro e il suo elevato numero atomico determinano un efficiente assorbimento dei raggi X, al quale segue l'espulsione di fotoni ed elettroni che causano danno al DNA ed a macromolecole vitali, provocando la morte cellulare. Le nanoparticelle di oro, accumulandosi nel tessuto tumorale, consentono di minimizzare la dose di raggi X ai tessuti sani e di massimizzarla nel tessuto tumorale bersaglio(Hainfeld et al. 2008). In tabella 4 sono riepilogate le applicazioni terapeutiche dell'oro colloidale e le tipologie di particelle maggiormente utilizzate.

Tabella 4. Riepilogo delle applicazioni in terapia delle nanoparticelle di oro, le proprietà richieste e le tipologie di particelle maggiormente utilizzate.

Applicazione terapeutica	Proprietà richiesta	Tipologia di AuNPs
Drug delivery	Il rilascio dipende dalle caratteristiche di superficie	Varie, nanosfere molto usate nella pratica clinica
Nucleic acid delivery	Il rilascio dipende dalle caratteristiche di superficie	Varie, nanosfere molto usate nella pratica clinica
Photothermal therapy	Forte assorbimento nel NIR ed efficiente conversione della luce in calore	Rods, shells, cages
Radiotherapy	Forma e dimensione non influenzano l'efficacia della terapia	Varie, nanosfere molto usate nella pratica clinica

#### 1.4.7 NANOSISTEMI A BASE DI ORO COLLOIDALE IN FASE CLINICA ED APPROVATI DALLA *FOOD AND DRUG ADMINISTRATION*

I sistemi a base di oro colloidale approvati dalla FDA sono solo quelli utilizzati in campo diagnostico per la ricerca *in vitro* ed *ex vivo* di *markers* di determinate patologie. Nel 2000 è stato approvato un sensore colorimetrico a base di nanosfere di oro funzionalizzate con mercaptonucleotidi per la ricerca *in vitro* di sequenze di DNA (Elghanian et al. 1997). Sono pochi ancora i nanosistemi a base di oro colloidale in fase clinica I e II per applicazioni terapeutiche e di *imaging in vivo*. Nel Settembre 2010 un sistema sviluppato da *Paciotti et al* è entrato in fase clinica I per il trattamento di tumori solidi (melanoma, carcinoma, sarcoma). Questo sistema è costituito da nanosfere di oro di 30 nm peghilate e funzionalizzate covalentemente con il peptide terapeutico ad attività antitumorale TNF $\alpha$  (CYT-6091) (Libutti et al. 2010). Tramite imaging ai raggi X è stato dimostrato che il CYT-6091 somministrato per via endovenosa a dosi scalari da 50  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  a 600  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  di superficie corporea (ben tollerate dai 30 pazienti volontari affetti da diverse tipologie di tumori solidi), si accumula in sede tumorale 9 volte più efficacemente del TNF- $\alpha$  somministrato tal quale per via endovenosa, sfruttando l'effetto EPR (*Enhanced Permeability and Retention*) di accumulo passivo nel tumore. Inoltre ha consentito il raggiungimento della concentrazione minima efficace al tessuto tumorale di 1 mg, senza che si verifici la comparsa di effetti collaterali gravi quali shock e ipotensione, tipici di questo peptide terapeutico.

Altri sistemi in fase clinica sono: l'Aurolase, il NANOM PCI ed il NANO FIM.

L'Aurolase ha completato la fase clinica I nel 2013 per il trattamento di tumori refrattari e/o ricorrenti di testa e collo. A tre gruppi di trattamento da cinque pazienti ciascuno, sono state somministrate per via endovenosa nanoshell formate da un core di silice ed un rivestimento di oro, ed è stato irradiato il tessuto tumorale con luce laser ad 800 nm per realizzare

l'ablazione fototermica delle cellule tumorali (Pilot Study of AuroLase(tm) Therapy in Refractory and/or Recurrent Tumors of the Head and Neck n.d.). NANO PCI e NANO FIM sono in fase clinica rispettivamente I e II per il trattamento dell'aterosclerosi dei vasi coronarici. Questi sistemi, costituiti da un *core* di silice rivestito rispettivamente con oro e con ibridi di oro e ossido di ferro, vengono incapsulati in uno *stent* polimerico flessibile a base di politetrafluoroetilene (Teflon) che viene impiantato con un intervento chirurgico per via endovascolare nei vasi coronarici affetti da ateroma(Kharlamov et al. 2015). Successivamente viene effettuato un irraggiamento con luce laser a circa 850 nm che, inducendo un rialzo termico nella placca aterosclerotica, determina la diminuzione del volume della placca e conseguente aumento del lume del vaso.

#### 1.4.8 INTERAZIONE DELL'ORO COLLOIDALE CON CELLULE ED ORGANISMO

L'oro nella sua forma in *bulk* è stato sempre considerato un metallo nobile, inerte e non tossico. Quando questo metallo è ridotto a dimensioni colloidali presenta un profilo di tossicità strettamente correlato alle sue dimensioni particellari. *Yu et al* hanno dimostrato che nanoparticelle di oro maggiori di 15 nm sono citocompatibili e determinano inoltre una diminuzione della produzione di specie reattive dell'Ossigeno (ROS) e di citochine proinfiammatorie. Invece, per particelle di diametro compreso tra i 2 ed i 10 nm si verificano fenomeni di tossicità cellulare acuta che portano all'apoptosi e necrosi cellulare, rendendo indispensabile pertanto, per applicazioni in *vivo*, un opportuno rivestimento che mascheri queste caratteristiche sfavorevoli(Pan et al. 2007). Infatti i profili di citotossicità e biocompatibilità dipendono anche dalle caratteristiche di superficie, ovvero dalla natura del rivestimento delle nanoparticelle di oro.

Anche la biodistribuzione delle nanoparticelle di oro dipende strettamente dalle dimensioni particellari e dalla natura del rivestimento. *Teremtyuk GS et al* hanno condotto studi di biodistribuzione dell'oro colloidale peggiorato dopo somministrazione in modelli murini di nano particelle di 15, 50 e 160

nm alla concentrazione di 0,3 mg di oro/Kg di ratto(Terentyuk et al. 2009). Dopo 24 h le particelle di diametro di 150 e 50 nm mostrano un accumulo preferenziale al fegato e milza, mentre nanoparticelle di 15 nm si accumulano in maniera aspecifica in più organi (reni, sangue, polmoni, cervello). Per quantificare l'oro nei tessuti biologici ( $\mu\text{g}$  di oro/g di tessuto), si esegue dopo sacrificio dell'animale, un'omogenizzazione dei tessuti, successiva mineralizzazione con acido nitrico a caldo ed analisi allo spettrometro di massa con ionizzazione al plasma (ICP-MS). In modelli murini affetti da tumori solidi è stato dimostrato, tramite *imaging* ai raggi X e successivamente dopo sacrificio dell'animale tramite ICP-MS del tessuto tumorale, un accumulo passivo nel tessuto tumorale dovuto all'effetto EPR. Inoltre funzionalizzando la superficie dell'oro con opportuni agenti direzionanti, è possibile ottenere un direzionamento attivo al tessuto bersaglio, migliorando così l'effetto di accumulo e la successiva internalizzazione cellulare

Quando si progetta un sistema da somministrare *in vivo*, è fondamentale che questo sia bioeliminabile e/o biodegradabile dall'organismo. Studi di *imaging* ai raggi X accoppiati alla ICP-MS condotti su modelli murini hanno dimostrato che le nanoparticelle di oro sono bioeliminate per via renale o per via epato-biliare in base alle loro dimensioni.

Le particelle più piccole, con diametro inferiore agli 6 nm, subiscono filtrazione glomerulare e sono eliminate per via renale, come mostrano le immagini ai raggi X che evidenziano accumulo nei reni, nella vescica e nell'uretra (figura 11) e come è stato confermato da analisi ICP-MS sulle urine dei ratti raccolte dopo 30 minuti dall'iniezione endovenosa di nanoparticelle di oro di diametro inferiore agli 8 nm rivestite con gomma Arabica (figura 12)(Terentyuk et al. 2009).

Invece le particelle di diametro maggiore di 6 nm, avendo una dimensione maggiore del *cut-off* di filtrazione glomerulare, vengono escrete preferenzialmente per via epato-biliare ed espulse con le feci(Lin et al. 2013).

Sebbene i profili di citocompatibilità, biocompatibilità, biodistribuzione e di bioeliminazione siano stati ampiamente studiati, per poter trasferire le numerose e promettenti applicazioni dell'oro colloidale nella pratica clinica sono necessari ulteriori studi per valutarne la tossicità a lungo termine e da accumulo.

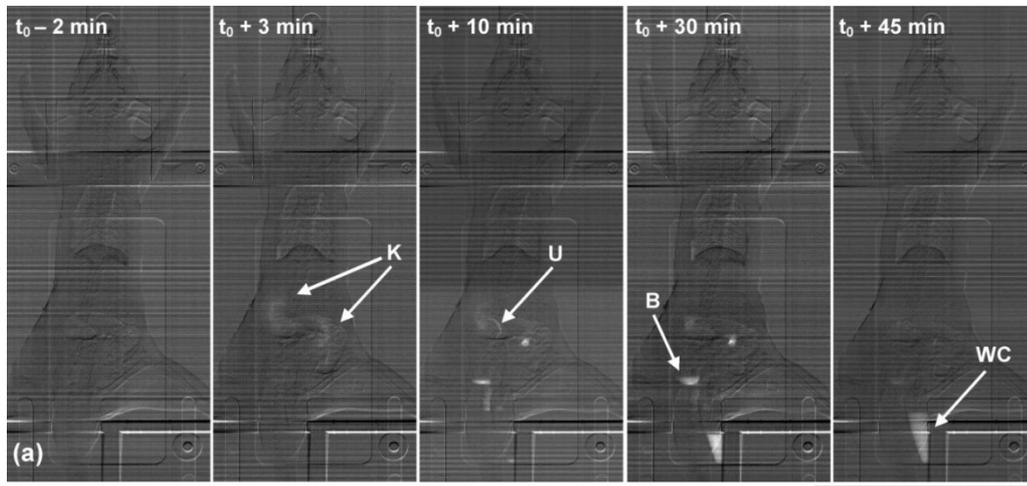


Figura 11. Imaging ai raggi X prima ( $t_0$ ) e dopo iniezione endovenosa di nanoparticelle di oro rivestite con gomma arabica, in ratti. Le immagini sono state acquisite a tempi diversi: 3,10,30,45 minuti dopo iniezione endovenosa (K: reni, U:ureteri, B: vescica, WC: uretra).

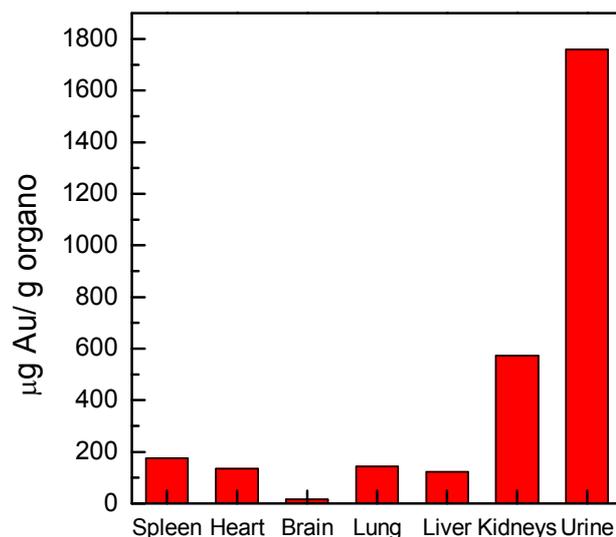


Figura 12. ICP-MS condotta su alcuni organi e sull'urina di un ratto sacrificato dopo 30 minuti dall'iniezione endovenosa di nano particelle di oro rivestite con gomma arabica(Terentyuk et al. 2009).

# Scopo della tesi

---

Alla luce di quanto detto nel capitolo introduttivo sull'importanza dei carrier nanostrutturati come vettori per il rilascio di molecole attive in distretti specifici dell'organismo come ad esempio la massa tumorale (Liong et al. 2008), il presente lavoro di ricerca è stato rivolto alla preparazione e alla caratterizzazione di diversi sistemi colloidali polimerici contenenti un core di oro colloidale potenzialmente utilizzabili in ambito biomedico per la veicolazione di farmaci antineoplastici e per l'*imaging* diagnostico del tessuto tumorale. Tali sistemi sono stati preparati utilizzando differenti derivati polimerici, ottenuti a partire dalla  $\alpha,\beta$ -poli(N-2-idrossietil)-D,L-aspartammide (PHEA), un polimero di sintesi a struttura poliamminoacidica, altamente solubile in acqua e nei più comuni solventi organici e dall'inulina, polimero naturale a struttura polisaccaridica, biocompatibile, bioeliminabile e biodegradabile costituito da unità di fruttosio  $\beta$  1-2 e un'unità di glucosio all'estremità riducente. Caratteristica fondamentale del PHEA (Mariano Licciardi et al. 2012) e dell'inulina (M. Licciardi et al. 2014) è la presenza di numerosi gruppi ossidrilici, mediante i quali è possibile legare covalentemente al *backbone* polimerico molecole di varia natura portanti opportuni gruppi funzionali e che possono, quindi, conferire ai due polimeri le caratteristiche desiderate. Viste le ottime caratteristiche di reattività chimica e di tollerabilità biologica del PHEA e dell'inulina, obiettivo del mio lavoro di dottorato è stato quello di valutare la possibilità di ottenere nuovi copolimeri di tipo *graft* da usare come agenti di rivestimento di nanoparticelle di oro. In virtù delle grandi potenzialità offerte dall'oro colloidale, ampiamente descritte nel capitolo introduttivo, sono stati preparati e caratterizzati sistemi a base di nanoparticelle di oro (nanosfere e nanorods), rivestiti con differenti copolimeri *graft* del PHEA e dell'inulina, per la realizzazione di *drug delivery systems* potenzialmente utilizzabili per l'*imaging* diagnostico, per il trattamento dei tumori attraverso ipertemia e come veicolo di distribuzione direzionata di farmaci

ai tessuti tumorali, minimizzando in tal modo gli effetti secondari sistemici negativi dei farmaci antineoplastici e aumentandone significativamente l'efficacia terapeutica.

## 2.1 NANOSFERE DI ORO RIVESTITE CON UN DERIVATO AMMINICO DELL'INULINA PER IL TRATTAMENTO TUMORE-SPECIFICO DEL CANCRO

Nanostrutture a base di metalli nobili rappresentano una tipologia di nanocarrier innovativa che ha destato un interesse crescente negli ultimi vent'anni, trovando applicazioni in campo biomedico e in particolare in diagnosi (biosensing), imaging e terapia antitumorale. Uno dei problemi che ne limitano l'impiego nella pratica clinica è che è necessario rivestirle con polimeri idrofili per prevenirne l'aggregazione in mezzo fisiologico e per assicurarne la biocompatibilità e la citocompatibilità.

Pertanto, lo scopo di questo lavoro è stato quello di mettere a punto un rivestimento polimerico citocompatibile per nanosfere di oro di 40 nm, a base di un derivato amminico dell'inulina (M. Licciardi et al. 2014) e di un derivato tiolico del PEG in grado di rivestire e stabilizzare efficacemente tali nanosfere di oro in diversi mezzi fisiologici. L'inulina, un polisaccaride naturale, biocompatibile, bioeliminabile e biodegradabile costituito da unità di fruttosio  $\beta$  1-2 e un'unità di glucoosio all'estremità riducente, presenta numerosi gruppi ossidrilici sfruttabili per comuni reazioni di *coupling*. Nel presente studio, sfruttando la versatilità di funzionalizzazione di tale polimero, è stato utilizzato il derivato amminico dell'inulina INU-EDA, come agente di rivestimento di nanosfere di oro, sfruttando la nota affinità dei gruppi amminici per l'oro metallico  $Au^0$ . In una prima fase del lavoro è stato messo a punto il rivestimento delle nanosfere di oro ed è stata studiata la stabilità del sistema colloidale così ottenuto in diversi mezzi simulanti fluidi fisiologici tramite spettroscopia UV-Vis; in una seconda fase, è stata dimostrata la capacità del nanosistema a base di oro stabilizzato da inulina e PEG di caricare significative quantità di doxorubicina durante il processo

di rivestimento e di rilasciarla in condizioni fisiologiche. Inoltre è stata studiata la capacità del sistema di accumularsi in maniera preferenziale nelle cellule tumorali sfruttando l'aumentata attività metabolica e di fagocitosi di queste ultime, agendo in tal modo come un potenziale nanosistema per la terapia anticancro.

## 2.2 PREPARAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI NANOSFERE DI ORO RIVESTITE CON UN DERIVATO DELL'INULINA CONIUGATO CON ACIDO FOLICO PER IL RILASCIO DIREZIONATO DI DOXORUBICINA ALLE CELLULE DEL CANCRO DELLA MAMMELLA

Gli approcci terapeutici convenzionali impiegati nel trattamento di patologie neoplastiche fanno uso di metodi invasivi e spesso inefficaci a lungo termine, come ad esempio la rimozione chirurgica della massa tumorale, la chemioterapia o la radioterapia (Ahmad et al. 2010) che non sono in grado di discriminare cellule maligne da cellule sane, comportando inevitabilmente seri effetti tossici sistemici. Queste limitazioni terapeutiche sono dovute principalmente allo scarso accumulo del farmaco nella massa tumorale, che danneggia in questo modo i tessuti e le cellule sane. In contrasto ai protocolli terapeutici convenzionali, le nanotecnologie offrono un'alternativa meno invasiva per la cura del cancro, essendo in grado di ridurre la tossicità sistemica e migliorando la qualità di vita del paziente. Nanosistemi ingegnerizzati con molecole direzionanti in grado di riconoscere le cellule tumorali si sono rivelati strumenti efficaci per ovviare alla mancanza di specificità degli agenti chemoterapici convenzionali.

Alla luce dei promettenti risultati biologici ottenuti nel precedente studio nel quale nanosfere di oro di 40 nm sono state peghilate e successivamente rivestite con un derivato amminico dell'inulina (INU-EDA) e caricate con doxorubicina, lo scopo del presente lavoro è stato quello di migliorare la formulazione del rivestimento di tali nanosfere, non rendendo necessario l'impiego di PEG-tiolo come agente pre-stabilizzante e introducendo molecole di acido folico al backbone di INU-EDA sfruttando l'elevata

reattività dei gruppi amminici nei confronti del gruppo carbossilico dell'acido folico attivato via carbodiimide. In questo modo è stato realizzato un nanosistema a base di oro colloidale rivestito unicamente con un coniugato folato dell'inulina in grado di stabilizzare nanosfere di oro di 40 nm e di aumentare l'accumulo nelle cellule del cancro della mammella umano grazie all'interazione con i FRs sovraespressi in tale linea cellulare tumorale. Il sistema caricato con doxorubicina, è stato testato in termini di stabilità chimico-fisica, rilascio di farmaco e tossicità in diversi mezzi fisiologici e su linee cellulare tumorali e non tumorali. Infine, l'endocitosi mediata da recettore per il folato è stata dimostrata tramite studi di inibizione dei recettori per il folato (FRs) e tramite la quantificazione della doxorubicina internalizzata da cellule del carcinoma della mammella e da cellule epiteliali non tumorali.

### 2.3 TERMOABLAZIONE DI CELLULE TUMORALI MEDIANTE COMPOSITI NANOSTRUTTURATI GRAFENE OSSIDO/ORO DIREZIONATI CON ACIDO FOLICO

La medicina moderna sta andando incontro ad un cambiamento radicale nel trattamento delle patologie, passando da un approccio classico basato sulla diagnosi e successivo trattamento terapeutico e monitoraggio di una determinata malattia, ad un modello di trattamento personalizzato che si basa sulla simultanea diagnosi, terapia direzionata e monitoraggio di una determinata condizione patologica (teranostica). Lo sviluppo di nanovettori compositi sta emergendo come potente strumento teranostico, in quanto questi permettono di rilasciare efficacemente un agente terapeutico in maniera selettiva nel sito di azione e, contestualmente all'esplicazione dell'effetto terapeutico, permettono di monitorare lo stato patologico attraverso l'impiego di singole o multiple modalità di imaging diagnostico (Crawley, Thompson, and Romaschin 2014). Differenti materiali nanostrutturati sono stati utilizzati per scopi teranostici, come ad esempio nanoparticelle polimeriche (Tian et al. 2014), metalliche (Song, Zhou, and Duan 2012) o ancora derivati del grafene (S. Shi et al. 2013). Recentemente, i

derivati del grafene sono stati impiegati in combinazione con nanoparticelle di oro (GNPs) per applicazioni teranostiche nel trattamento del cancro, e per realizzare la terapia fototermica di tumori solidi, che si è rivelata essere uno strumento altamente localizzato ed efficace nella terapia antitumorale. La maggior parte di questi nanocompositi grafene/oro sono ottenuti tramite complesse tecniche di crescita *seed-mediated* (Y. Wang, Polavarapu, and Liz-Marzán 2014) dell'oro sulla superficie del grafene o tramite processi di elettrodeposizione (F. Shi et al. 2016), limitando pertanto il loro impiego in campo medico. Scopo di questo lavoro è stato quello di realizzare tramite una procedura relativamente semplice e riproducibile un nuovo nanocomposito teranostico grafene/oro citocompatibile, rivestito con un derivato dell'inulina coniugato con acido folico, in grado di caricare paclitaxel e dotato di eccellente stabilità chimico-fisica. I nanocompositi grafene ossido/oro sono stati ottenuti attraverso un self-assembling di GNPs con i fogli di dimensioni nanometriche (circa 600-700 nm) di grafene ossido (GO) seguito dall'adsorbimento del coniugato polimerico sulla superficie delle GNPs. Sfruttando pertanto l'efficiente caricamento e rilascio di paclitaxel nel nanocomposito grafene/oro e l'effetto fototermico del grafene, sono stati studiati molteplici meccanismi che possono cooperare sinergicamente all'effetto anticancro mediato dal nanocomposito.

## 2.4 GOLD NANORODS FUNZIONALIZZATI CON ACIDO FOLICO SENSIBILI AD UN LASER INFRAROSSO PER LA DIAGNOSI E LA TERAPIA DELL'OSTEOSARCOMA

L'Osteosarcoma (OS) è la più comune neoplasia maligna primaria del tessuto osseo e ha la maggiore incidenza in età pediatrica, adolescenziale e nel giovane adulto (8-11 per milione nella popolazione con età compresa fra i 15 e i 19 anni). Nonostante la sua rarità, l'OS è la seconda causa principale di morte legata al cancro nei bambini e negli adolescenti (Siclarì and Qin 2010). Le strategie terapeutiche attuali prevedono una terapia molto aggressiva che comprende una chemioterapia in fase pre-operatoria (neoadiuvante), alla quale segue la rimozione chirurgica degli arti interessati e una chemioterapia post-operatoria (adiuvante). Attualmente i farmaci chemioterapici più attivi per l'OS sono una combinazione di metotrexato ad alte dosi, doxorubicina e cisplatino insieme all'utilizzo di IFN- $\alpha$  e di immunomodulatori nella terapia adiuvante. Nonostante la terapia estremamente aggressiva, caratterizzato da gravissimi effetti tossici sistemici, l'OS spesso sviluppa resistenza farmacologica a questi farmaci convenzionali, dando luogo a recidive. Inoltre, l'80-90% dei pazienti affetti da OS presentano micrometastasi subcliniche e difficili da diagnosticare con le attuali tecniche di imaging diagnostico. Proprio le metastasi diminuiscono drasticamente l'aspettativa di sopravvivenza dei pazienti dal 70% al 10-30% a 3-5 anni dalla diagnosi (Anderson et al. 2014). Pertanto, è necessario lo sviluppo di nuove efficaci strategie terapeutiche e diagnostiche per migliorare l'outcome di questa malattia. In questo contesto, lo scopo del presente lavoro è stato quello di studiare l'efficacia diagnostica e terapeutica (teranostica) di nanorods di oro (GNRs) rivestiti con due copolimeri aventi natura diversa ma entrambi funzionalizzati con acido folico, per il trattamento dell'osteosarcoma. I due copolimeri impiegati sono un derivato anfifilico dell'inulina funzionalizzato con acido folico e con molecole di acido  $\alpha$ -lipoico che presenta gruppi tiolici protetti in grado di legarsi chimicamente alla superficie delle GNRs, e un derivato amminico della  $\alpha$ - $\beta$  poliidrossietil D,L aspartammide (PHEA) anch'esso funzionalizzato con acido folico. I due

sistemi risultanti sono stati confrontati in termini di efficienza di incapsulazione del farmaco antitumorale (in fase clinica I) nutlin-3 e di stabilità in diversi mezzi fisiologici ed in plasma umano. Sono state studiate inoltre la capacità di agire da mezzo di contrasto per la tecnica di fotoluminescenza a due fotoni (TPL) e la capacità di espletare il loro effetto citotossico dovuto alla termoablazione localizzata e all'effetto chemioterapico, in maniera selettiva su cellule tumorali di osteosarcoma. In vista di applicazioni *in vivo* è stata testata la capacità dei GNRs di agire da agenti fototermici e chemioterapici su modelli tridimensionali (3-D) di osteosarcoma in grado di simulare in maniera più realistica l'organizzazione del microambiente tumorale.

# Parte sperimentale

---

## 3.1 MATERIALI

L'  $\alpha,\beta$ -poli(N-2-idrossietil)-D,L-aspartammide (PHEA) è stata sintetizzata e purificata secondo la procedura riportata in letteratura (Giammona, Carlisi, and Palazzo 1987). La caratterizzazione spettroscopia  $^1\text{HNMR}$  è in accordo con la struttura attribuita:  $^1\text{HNMR}$  300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $25^\circ\text{C}$ ,  $\delta$ ): 2,82 (m, 2H, -CH-CH<sub>2</sub>-CONH-), 3,36 (t, 2H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH), 3,66 (t, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH), 4,72 (m, 1H, -NH-CH-CO-CH<sub>2</sub>-). Il copolimero PHEA-2-amminoetil carbammato (PHEA-EDA) è stato sintetizzato come riportato in letteratura (Mariano Licciardi et al. 2006). L'inulina-2-amminoetil carbammato (INU-EDA) è stata sintetizzata come riportato in precedenza (M. Licciardi et al. 2014). Nanosfere di 40 nm (*GNPs*) con una ristretta distribuzione dimensionale sono state sintetizzate come riportato precedentemente (Bastús, Comenge, and Puntès 2011). L'inulina estratta da tuberi di dalia, l'etilendiammina (EDA), la trietilammina (TEA), l' N-etil N-(3-dimetilamminopropil) carbodiimide idrocloruro (EDC HCl), l' N-idrossisuccinimide (NHS), il bis(4-nitrofenil)carbonato (BNPC), il diammino-poli(etilenglicole) 2 KDa, l'acido ( $\pm$ )- $\alpha$ - lipoico, la dicicloesilcarbodiimide (DCC), la 4-dimetilamminopiridina (DMAP), l'esadeciltrimetiammonio bromuro (CTAB  $\geq 96\%$ ), l'acido 5-bromosalicilico (5-BrSA) (grado tecnico, 90%), l'argento nitrato ( $\text{AgNO}_3$ ,  $\geq 99.0\%$ ), l'acido L-ascorbico ( $\geq 99\%$ ) (AA), il sodio boridruro ( $\text{NaBH}_4$ , 99%), la doxorubicina idrocloruro (DOXO-HCl), il paclitaxel (PTX), il nutlin-3, l'acido folico (FA), il grafene ossido (GO), l'acido tetracloroaurico triidrato ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  99%), il sodio citrato tribasico diidrato, l'O-[2-(3-Mercaptopropionilammino)etil]-O'-metilpolietilen glicole (PEG-SH), il kit di acido bicineconico per la determinazione delle proteine, l'etanolo, il metanolo e l'acetonitrile sono stati acquistati da Aldrich (Milano, Italia). Sephadex G-15 e la

dimetilformammide anidra (DMF) sono stati acquistati da Fluka (Svizzera). Tutti i reagenti e solventi sono di grado analitico se non indicato diversamente. Le membrane da dialisi SpectraPor sono state acquistate da Spectrum Laboratories, Inc. (Inghilterra).

### 3.2 METODI

I pesi molecolari dei copolimeri sintetizzati e dei polimeri di partenza sono stati determinati tramite cromatografia ad esclusione dimensionale (SEC) utilizzando un sistema Agilent 1260 Infinity Multi Detectors Bio-SEC solution dotata di due colonne Phenogel acquistate da Phenomenex (5 $\mu$ m particles size, 10<sup>3</sup> Å e 10<sup>4</sup> Å of pore size) e detectors Bio Dual Angle LS/DLS e RI. La miscela DMF + LiBr 0,1% è stata utilizzata come miscela eluente ad un flusso di 0,8 ml/min, concentrazione dei campioni 10 mg/ml. Standard di poliossietilene (range 10 –1.5 kDa) sono stati utilizzati per costruire la curva di calibrazione.

Gli spettri <sup>1</sup>H NMR sono stati registrati utilizzando uno spettrometro Bruker Avance II 300, 300 MHz.

La cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) è stata effettuata utilizzando un apparato HPLC Agilent dotato di due colonne C<sub>18</sub> Gemini connesse ad un detector UV-Vis.

Le immagini a trasmissione elettronica (TEM) sono state acquisite utilizzando un microscopio a trasmissione elettronica JEOL JEM-1400PLUS (120kV) (Japan) dotato di GATAN US1000 CCD camera (2k x 2k).

Gli spettri UV-Vis e VIS-NIR sono stati acquisiti utilizzando uno spettrofotometro Shimadzu UV-2400.

La microscopia a scansione elettronica e le analisi a dispersione di raggi X sono state effettuate con un microscopio elettronico a scansione ESEM Philips XL30.

Le misure di potenziale Z e di diametro idrodinamico sono state effettuate utilizzando un Malvern Zetasized NanoZS.

Le immagini di microscopia a fluorescenza sono state acquisite utilizzando un microscopio a fluorescenza Axio Vert.A1 (Zeiss) dotato di telecamera Axio Cam MRm (Zeiss).

Il laser utilizzato per gli studi di ipertermia è un laser chirurgico GBox 15A/B by GIGA Laser , 810 nm di lunghezza d'onda, 14W di potenza.

### 3.2.1 NANOSFERE DI ORO RIVESTITE CON UN DERIVATO AMMINICO DELL'INULINA PER IL TRATTAMENTO TUMORE-SPECIFICO DEL CANCRO

*Sintesi seed-mediated di nanosfere di oro stabilizzate in tampone citrato (Au@citrate).* Una soluzione 2,2 mM di sodio citrato in acqua Milli-Q (150 ml), posta in un pallone a tre colli da 250 ml, è stata riscaldata utilizzando un'isomanta scaldante, sotto vigorosa agitazione, fino ad ebollizione. È stato utilizzato un condensatore a canna liscia per prevenire l'evaporazione del solvente. Subito dopo l'ebollizione è stato aggiunto 1 ml di HAuCl<sub>4</sub> 25 mM. Il colore della soluzione è cambiato da giallo a blu grigio e quindi a rosso-vino in 10 minuti. Le particelle risultanti (seeds, ~10 nm, ~3 x10<sup>12</sup> NPs/ml) sono rivestite da ioni citrato carichi negativamente che conferiscono al sistema una buona stabilità in acqua. Immediatamente dopo la sintesi dei *seeds* di oro, lo stesso pallone di reazione, è stato raffreddato fino ad una temperatura di 92°C. Quindi, è stato aggiunto 1 ml di HAuCl<sub>4</sub> 25 mM e dopo 30 minuti la soluzione risultante è stata diluita estendendo 60 ml di campione e aggiungendo 58 ml di acqua e 2,2 ml di sodio citrato 2,2 mM in acqua. Questa soluzione è stata utilizzata quindi come soluzione di crescita e tale processo è stato ripetuto cinque volte per ottenere nanosfere di 40 nm (Bastús, Comenge, and Puentes 2011).

*Sintesi del copolimero inulina-2-aminoetil-carbammato (INU-EDA).* La derivatizzazione dell'inulina con l'EDA, al fine di ottenere il copolimero INU-EDA, è stata condotta seguendo una procedura già riportata in precedenza (M. Licciardi et al. 2014). Brevemente, la sintesi di INU-EDA è

stata condotta utilizzando un metodo alternativo alle classiche reazioni organiche, chiamato “Enhanced Microwave Synthesis” (EMS). I gruppi ossidrilici primari dell’ inulina sono stati attivati con BNPC (moli di BNPC/moli di unità ripetitive di inulina = 0.5), irradiando la miscela di reazione per 1 h con un reattore a microonde (CEM Discover Microwave Reactor) settato a 25 W di potenza e mantenendo la temperatura a circa 60°C. La soluzione risultante di inulina attivata è stata aggiunta goccia a goccia ad una soluzione di EDA (moli di EDA/moli di BNPC = 5) ed incubata per 1 h a temperatura ambiente. Dopo purificazione tramite due lavaggi in acetone e ulteriore purificazione mediante cromatografia di permeazione su gel utilizzando Sephadex G-15 come gel di separazione, l’analisi  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ ) ha rivelato i picchi caratteristici  $\delta$  2,74 e  $\delta$  3,15 dell’etilendiammina (EDA) ( $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ ) e il grado di derivatizzazione molare di INU-EDA è stato stimato essere del 25 % mol/mol rispetto alle unità ripetitive di inulina. Il peso molecolare e l’indice di polidispersità del copolimero ottenuto, INU-EDA, è stato determinato tramite analisi SEC utilizzando standard di poliossietileni (range 10 –1,5 kDa) per costruire la curva di calibrazione. Il prodotto finale INU-EDA è stato ottenuto con una resa del 98% (p/p) rispetto all’inulina di partenza.

*Rivestimento delle nanoparticelle di oro con PEG-SH e INU-EDA (Au@PEG INU).* A 5 ml di GNPs Au@citrato di 40 nm 0,15 mg/ml in  $\text{H}_2\text{O}$  Milli-Q sono stati aggiunti sotto agitazione, 381  $\mu\text{l}$  di una soluzione di PEG-SH (5000 Da) 0,1 mM (in  $\text{H}_2\text{O}$  Milli-Q), in modo da ottenere un rapporto teorico (R) molecole di PEG-SH/ $\text{nm}^2$  di Au@citrato pari a 4. Il sistema è stato incubato a temperatura ambiente per 30’, quindi il PEG-SH non legato alla superficie delle nanoparticelle di oro è stato rimosso lavando due volte in 5 ml di  $\text{H}_2\text{O}$  Milli-Q e centrifugando di volta in volta a 6000 rpm per 20 minuti. Alla dispersione acquosa di nanoparticelle di oro rivestite con PEG-SH (Au@PEG) così ottenuta, sono stati aggiunti sotto vorticoso agitazione e goccia a goccia 952,5  $\mu\text{l}$  di una soluzione acquosa di INU-EDA 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  per ottenere un rapporto teorico molecole di INU-EDA/ $\text{nm}^2$  di Au@PEG pari a 10. La dispersione così ottenuta è stata purificata tramite due lavaggi in

acqua Milli-Q, centrifugando dopo ogni lavaggio a 6000 rpm per 20 minuti. Quindi le Au@PEG-INU sono state nuovamente disperse in H<sub>2</sub>O Milli-Q e conservate a temperatura ambiente.

*Loading di doxorubicina in Au@PEG-INU (Au@PEG INU Doxo).* Per caricare un'opportuna quantità di doxorubicina in Au@PEG INU, 750 µl di una soluzione acquosa di doxorubicina idrocloruro (0,2 mg/ml,  $0,34 \times 10^{-2}$  mmoli) precedentemente trattati con 1 µl di TEA ( $0,7 \times 10^{-2}$  mmoli), sono stati aggiunti a 952,5 µl di una soluzione acquosa di INU-EDA (250 µg/ml) per avere successivamente un rapporto molecole INU-EDA/nm<sup>2</sup> Au<sup>0</sup> pari a 10. La soluzione così ottenuta di doxorubicina e INU-EDA è stata aggiunta goccia a goccia e sotto agitazione a 5 ml (0,15 mg/ml) di dispersione acquosa di Au@PEG per avere un rapporto in peso Au<sup>0</sup>/doxorubicina pari a 5. La soluzione ottenuta è stata incubata *overnight* e purificata tramite due lavaggi in H<sub>2</sub>O Milli-Q, centrifugando di volta in volta (20', 6.000 rpm). I surnatanti sono stati analizzati tramite spettroscopia UV-VIS, misurando l'assorbanza a 543 nm per determinare la quantità di farmaco caricata nel sistema.

*Transmission electron microscopy (TEM).* Le nanoparticelle di oro sintetizzate sono state osservate prima e dopo il rivestimento con PEG ed INU-EDA utilizzando un microscopio a trasmissione elettronica JEOL JEM-1400PLUS (40kV - 120kV) (Japan) dotato di GATAN US1000 CCD camera (2k x 2k). 6 µl di campione 0,15 mg/ml sono stati posti su una griglia di rame (Ted-pella, Inc.) rivestita con un film ultrasottile di Carbonio amorfo (Formvar-coated 200-mesh copper grid) e lasciati seccare a temperatura ambiente.

*Spettroscopia UV-Visibile.* Gli spettri UV-VIS dei sistemi ottenuti (Au@citrato, Au@PEG, Au@PEG INU, Au@PEG-INU/Doxo) dispersi in acqua sono stati registrati utilizzando uno spettrofotometro Shimadzu UV-2400 A. Tutte le analisi UV sono state condotte su 1 ml di campione, nel range 400-800 nm, a temperatura ambiente.

*Misure di Dynamic Light Scattering (DLS) e analisi di potenziale Zeta.* Le misure di size condotte al DLS e le misure di potenziale Zeta sono state eseguite a 25°C utilizzando uno strumento Malvern Zetasizer NanoZS, settato con una luce laser di 532 nm ed un detector ad un angolo fisso di scattering di 173°. In questo modo sono state analizzate soluzioni acquose di Au@citrato, Au@PEG, Au@PEG INU, Au@PEG-INU/Doxo (0,015 mg/ml). Il diametro idrodinamico riportato come Z Average e l'indice di polidispersità (PDI) sono stati ottenuti tramite analisi della funzione di autocorrelazione. Il potenziale Zeta (mV) è stato calcolato dalla mobilità elettroforetica utilizzando la relazione di Smoluchoski e assumendo che  $K \cdot a \gg 1$  (dove K e a sono rispettivamente i parametri di debye-Huckel e il raggio particellare).

*Determinazione della quantità di farmaco caricata in Au@PEG-INU/Doxo e studi di rilascio.* La quantità di doxorubicina caricata in Au@PEG-INU/Doxo è stata determinata tramite due metodi: spettroscopia UV-VIS e HPLC. In particolare nel primo metodo una quantità precisa di Au@PEG-INU/Doxo è stata lavata con acqua diverse volte e la dispersione centrifugata (5000 rpm, 20 minuti) per rimuovere l'eccesso di doxorubicina. I surnatanti sono stati raccolti e analizzati tramite spettroscopia UV-VIS misurando l'assorbanza a 543 nm per determinare l'eccesso di doxorubicina non caricata in Au@PEG INU/Doxo. La curva di calibrazione è stata ottenuta utilizzando soluzioni di doxorubicina trattata con TEA a differenti concentrazioni, in acqua bidistillata. Il contenuto di farmaco caricato nel sistema è stato calcolato per differenza dalla quantità totale di doxo utilizzata per la preparazione del sistema ed è stata espressa come percentuale in peso di doxorubicina caricata per unità di massa di oro, ed è risultata essere del  $13 \pm 0,5$  % (p/p), mentre l'efficienza di incorporazione è stata calcolata essere del 66%. Nel secondo metodo, una quantità precisa di Au@PEG INU/Doxo è stata dispersa in acqua Milli-Q a pH 4 per estrarre il farmaco caricato. Dopo 3 h di incubazione sotto agitazione, la dispersione è stata centrifugata (5000 rpm, 20 min) e il surnatante congelato e liofilizzato. Il surnatante liofilizzato è stato solubilizzato nella miscela eluente scelta per l'analisi HPLC ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.4 M / Acetonitrile 68:32 v/v), filtrato su un filtro di cellulosa rigenerata di cut off 0,2 µm e iniettato in una colonna HPLC C<sub>18</sub> Gemini. Il contenuto di farmaco caricato nel sistema

è stato calcolato utilizzando una curva di calibrazione ottenuta da soluzioni di doxorubicina nell'eluente diluite in serie ed espresse come quantità di doxorubicina caricata per unità in massa di Au<sup>0</sup>. Esso è risultato pari a 11,8±1,2 % (p/p) con un'efficienza di incapsulazione pari al 59,9 %. Per gli studi di rilascio, 2 ml di AuNPs@INU PEG Doxo (3 mg/ml Au<sup>0</sup>, corrispondenti a 390 µg/ml di doxorubicina) dispersi in PBS a pH 7,4 sono stati posti in una membrana da dialisi di cut-off 12 KDa, immersi in 10 ml di PBS a pH 7,4 e incubati a 37°C sotto continua agitazione (100 rpm) in un Orbital Shaker Benchtop 808 420, per 48 h. Ad intervalli di tempo prestabiliti, sono state prelevate aliquote (1 ml) del mezzo esterno e rimpiazzate con un uguale volume di mezzo fresco. I campioni prelevati sono stati analizzati tramite analisi HPLC per determinare la quantità di farmaco rilasciato. I profili di rilascio sono stati determinati confrontando la quantità di farmaco rilasciata in funzione del tempo di incubazione, con la quantità totale di farmaco caricato nel sistema. La stessa analisi è stata condotta utilizzando PBS pH 5,5 come mezzo di rilascio. Tutti i dati ottenuti sono stati confrontati con il profilo di diffusione della doxorubicina idrocloruro da sola e di doxorubicina base libera (390 µg/ml) ottenuti ripetendo la stessa procedura.

*Saggio di citotossicità su cellule del cancro della cervice uterina (HeLa) e su cellule del cancro polmonare umano (A549).* La citotossicità dei sistemi è stata valutata tramite il saggio di vitalità cellulare MTT su cellule del cancro della cervice uterina (HeLa) e su cellule del cancro polmonare umano (acquistate da ATCC, LGC Standards, Barcellona). Le cellule sono state piastrate in piastre a 96 pozzetti alla densità di 2 x10<sup>5</sup> cellule per pozzetto, e cresciute in Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM) arricchito con il 10% (HeLa) di FBS (siero bovino fetale) e l'1% di penicillina/streptomina, e incubate a 37°C con il 5% di CO<sub>2</sub>, in atmosfera umidificata. Dopo 24 e 48 h il mezzo è stato sostituito con 200 µl di mezzo di coltura contenente Au@PEG INU, Au@PEG-INU/Doxo e doxorubicina idrocloruro da sola. Sono state utilizzate concentrazioni di oro Au<sup>0</sup> pari a 100, 50, 25 e 16 µg/ml e concentrazioni di doxorubicina pari a circa 10, 5, 2,5 e 1,6 µg/ml per

pozzetto, queste ultime corrispondenti alle concentrazioni della sola Doxorubina idrocloruro testata nel controllo positivo. Dopo 48 e 72 h, il DMEM è stato rimosso e sostituito con 100 µl per pozzetto di soluzione MTT/DMEM 1:20 (v/v). Dopo un'ora di incubazione a 37°C, le cellule sono state lavate due volte in PBS 10 mM e sono stati aggiunti 100 µl di DMSO per pozzetto. Quindi è stata misurata l'assorbanza a 550 nm usando uno spettrofotometro per piastre cellulari.

*Studi di uptake cellulare.* L'uptake cellulare di Au@PEG-INU/Doxo è stato valutato utilizzando un microscopio a fluorescenza Zeiss "AXIO Vert. A1" Microscope Inverted. Le linee cellulari Hela e A549 sono state fatte aderire incubando overnight su Ibidi 8-well slides alla densità di  $2 \times 10^4$  cellule per pozzetto a 37°C con il 5% di CO<sub>2</sub>, in atmosfera umidificata. Quindi Au@PEG-INU/Doxo e Doxo da sola sono state aggiunte alla concentrazione di 40 µg/ml di Au<sup>0</sup>, corrispondenti a circa 4 µg/ml di doxorubicina per pozzetto e le cellule sono state incubate per 4, 24 e 48 h a 37°C. Dopo ogni tempo di incubazione, le cellule sono state lavate con tampone PBS 10 mM e fissate con una soluzione di formaldeide diluita al 4% v/v per 30 minuti. Successivamente la soluzione di formaldeide è stata rimossa e le cellule sono state lavate con PBS 10 mM. Quindi prima è stato marcato il nucleo aggiungendo una soluzione di DAPI diluita 1/600 in mezzo cellulare, incubando per 20 minuti a temperatura ambiente. Successivamente è stata marcata la membrana cellulare utilizzando una soluzione di Wheat Germ Agglutinin, Alexa Fluor® 647 Conjugate (WGA647) diluita 1/200 v/v in mezzo cellulare e incubando per 20 minuti a temperatura ambiente. Quindi sono stati eseguiti lavaggi in PBS 10 mM ed infine le cellule sono state osservate utilizzando un microscopio a fluorescenza a luce trasmessa utilizzando i filtri per DAPI, membrana cellulare e doxorubicina. Le immagini sono state acquisite utilizzando un Axio Cam MRm. Per studiare la selettività per le cellule tumorali di Au@PEG INU/Doxo, sono state messe a punto due tipologie di co-culture che mimano i tessuti tumorali dell'adenocarcinoma polmonare umano e del carcinoma della mammella. Le cellule A549 di adenocarcinoma polmonare sono state posta in co-cultura in

piastre Ibidi 96-pozzetti con cellule dell'epitelio bronchiale umano 16HBE e con fibroblasti umani HDFa. In particolare, le cellule A549 sono state piastrate alla densità di  $1 \times 10^5/\text{ml}$ ,  $200 \mu\text{l}/\text{pozzetto}$  e lasciate aderire overnight. Quindi le cellule 16HBE e HDFa, preventivamente marcate (concentrazione finale di  $0.1 \text{ mM}$  per 1 ora a  $37^\circ\text{C}$ ) con le sonde CMFDA (verde) e CMF2HC (blu) (Invitrogen) rispettivamente, sono state piastrate alla densità di  $1,5 \times 10^4/\text{pozzetto}$ . Il giorno seguente, il mezzo è stato sostituito con soluzioni di doxorubicina o Au@PEG-INU/Doxo alla concentrazione di  $40 \mu\text{g}/\text{Au}^0$  corrispondenti a  $\sim 4 \mu\text{g}/\text{ml}$  di doxorubicina. Le cellule sono state visualizzate con un microscopio Zeiss utilizzando i filtri per il Dapi per visualizzare la sonda di membrana blu e il filtro per la Rhodamina per visualizzare la doxorubicina, dopo un'ora e mezza dall'aggiunta dei sistemi dopo essere state abbondantemente lavate con DPBS. Il microscopio è dotato di controllo della temperatura e della pressione di  $\text{CO}_2$

### 3.2.2 PREPARAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI NANOSFERE DI ORO RIVESTITE CON UN DERIVATO DELL'INULINA CONIUGATO CON ACIDO FOLICO PER IL RILASCIO DIREZIONATO DI DOXORUBICINA ALLE CELLULE DEL CANCRO DELLA MAMMELLA.

*Sintesi del copolimero INU-FA.* inulina-2-aminoetil-carbammato (INU-EDA), con un grado di derivatizzazione in gruppi amminici primari ( $DD_{EDA}$ ) pari al 25 mol% riferite alle unità ripetitive di inulina, è stato usato come copolimero di partenza (M. Licciardi et al. 2014). Una quantità precisa di acido folico (143,9mg, 0,326 mmoli) è stata solubilizzata in acqua Milli-Q a pH 7,02, quindi NHS (56,24 mg, 0,488 mmol) ed EDC HCl (93,68 g, 4,88 mmoli) in polvere sono stati aggiunti alla miscela di reazione aggiustando il pH a 7,02. La soluzione risultante è stata aggiunta goccia a goccia a 2 mL di una soluzione di INU-DA in acqua Milli-Q (200 mg, 1,086 mmoli di gruppi amminici primari) e lasciata reagire a 25°C per 18 h. Il coniugato INU-FA è stato quindi purificato tramite cromatografia ad esclusione dimensionale utilizzando Sephadex G-15 come fase stazionaria. Quindi la soluzione di INU-FA è stata liofilizzata; il prodotto puro è stato ottenuto con una resa dell' 88% p/p rispetto all'inulina di partenza. SEC:  $M_w$  6784,  $M_w/M_n$  1,24.  $^1H$  NMR (300MHz,  $D_2O$ ):  $\delta$  2,90–3,40 (4H EDA,  $-NHCH_2-CH_2-NH_2$ ), 3,60–3,90 (5H INU,  $-CH_2-OH$ ;  $-CH-CH_2-OH$ ;  $-C-CH_2-O-$ ), 3,92–4,30 (2H INU,  $-C-CH-OH$ ;  $-CH-OH$ ),  $\delta$  7,517–6,685 (4H FA, phenyl group).

*Preparazione di GNPs funzionalizzate con INU-FA e INU-FA/Doxo.* Una soluzione del copolimero INU-FA (952,5  $\mu$ l, 250  $\mu$ g/ml), trattato con 2  $\mu$ l di TEA, è stata aggiunta ad una dispersione di GNPs stabilizzate con citrato (Au@citrato), utilizzando un rapporto molecole di INU-FA/Au<sup>0</sup> nm<sup>2</sup> pari a 10. La dispersione è stata quindi incubata per 30 minuti a temperatura ambiente. Le particelle rivestite (Au@INU-FA) sono state lavate due volte in acqua Milli-Q, centrifugate (5000 rpm, 20 minuti) per allontanare il copolimero in eccesso, e conservate a 4°C come dispersione colloidale alla concentrazione di 150  $\mu$ g/ml di Au<sup>0</sup>. In queste condizioni le nanoparticelle

rivestite con INU-FA mantengono inalterate le loro caratteristiche chimico-fisiche per almeno sei mesi. Per la preparazione delle GNP caricate con doxorubicina (Au@INU-FA/Doxo), 60  $\mu\text{l}$  di una soluzione acquosa di doxorubicina idrocloruro 1 mg/ml preventivamente trattate con TEA (1  $\mu\text{l}$ ,  $0,7 \times 10^{-2}$  mmol), sono stati aggiunti ad una soluzione di INU-FA (423  $\mu\text{l}$ , 250  $\mu\text{g/ml}$ ). La soluzione ottenuta è stata aggiunta ad una dispersione acquosa di Au@citrato 1 ml 0,240 mg/ml per ottenere un rapporto (R) Au<sup>0</sup>/Doxo pari a 4 p/p. Dopo una notte di incubazione a temperatura ambiente, la dispersione colloidale è stata centrifugata (20 min, at 5000 rpm) e lavata due volte per rimuovere l'eccesso di doxorubicina.

*Determinazione del farmaco caricato in Au@INU-FA/Doxo e studi di rilascio.* La quantità di farmaco caricato in Au@INU-FA/Doxo è stata valutata tramite analisi HPLC. Una quantità recisa di Au@INU-FA/Doxo è stata dispersa in un volume preciso di miscela di acqua Milli-Q pH 4,5/etanolo 2:1 (v/v) per estrarre il farmaco caricato. Dopo due ore di estrazione sotto agitazione, la dispersione è stata centrifugata (20 minuti, a 5000 rpm) e il surnatante è stato liofilizzato. Quindi il residuo solido del farmaco estratto è stato solubilizzato nella miscela eluente utilizzata per l'analisi HPLC (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,4 M /Acetonitrile 68 : 32 v/v, filtrato su filtro di cellulosa rigenerata avente cut-off 0,2  $\mu\text{m}$  e iniettato in una colonna HPLC C<sub>18</sub> Gemini. Il contenuto di farmaco caricato nel sistema è stato calcolato utilizzando una curva di calibrazione ottenuta da soluzioni di doxorubicina nell'eluente diluite in serie ed espresse come quantità di doxorubicina caricata per unità in massa di Au<sup>0</sup>. Esso è risultato pari a 18 $\pm$ 2 % (p/p) con un'efficienza di incapsulazione pari al 93 %. Per gli studi di rilascio, un'appropriata quantità di Au@INU-FA/Doxo disperso in PBS a pH 7,4 è stata posta in una membrana da dialisi di cut-off 12 KDa, immersa in 10 ml di PBS a pH 7,4 e incubata a 37°C sotto continua agitazione (100 rpm) in un Orbital Shaker Benchtop 808 420, per 48 h. Ad intervalli di tempo prestabiliti, sono state prelevate aliquote (1 ml) del mezzo esterno e rimpiazzate con un uguale volume di mezzo fresco. I campioni prelevati sono

stati analizzati tramite analisi HPLC per determinare la quantità di farmaco rilasciato. I profili di rilascio sono stati determinati confrontando la quantità di farmaco rilasciata in funzione del tempo di incubazione, con la quantità totale di farmaco caricato nel sistema. La stessa analisi è stata condotta utilizzando PBS pH 5,5 come mezzo di rilascio. Tutti i dati ottenuti sono stati confrontati con il profilo di diffusione della doxorubicina base libera ottenuti ripetendo la stessa procedura.

*Microscopia a trasmissione elettronica (TEM).* Le nanoparticelle di oro sintetizzate sono state osservate prima e dopo il rivestimento con PEG ed INU-EDA utilizzando un microscopio a trasmissione elettronica JEOL JEM-1400PLUS (40kV - 120kV) (Japan) dotato di GATAN US1000 CCD camera (2k x 2k). 10 µl di campione 0,15 mg/ml sono stati posti su una griglia di rame (Ted-pella, Inc.) rivestita con un film ultrasottile di Carbonio amorfo (Formvar-coated 200-mesh copper grid ) e lasciati seccare a temperatura ambiente.

*Spettroscopia UV-Visibile.* Gli spettri UV-VIS dei sistemi ottenuti (Au@citrato, Au@INU-FA, Au@INU-FA/Doxo) dispersi in acqua sono stati acquisiti utilizzando uno spettrofotometro Shimadzu UV-2400 A. Tutte le analisi UV sono state condotte su 1 ml di campione, nel range 400-800 nm, a temperatura ambiente. Per la determinazione della quantità di acido folico legato al backbone di inulina, è stata misurata l'assorbanza a 364 nm di una quantità precisa di INU-FA solubilizzato in acqua Milli-Q pH 8 per NaOH 1N, e questo valore è stato confrontato con quelli di una curva di calibrazione ottenuta da soluzioni standard di acido folico in acqua milli-Q pH 8 (range di concentrazione: da 0,003125 a 0,1 mg/ml;  $R^2 = 0,998$ ).

*Misure di Dynamic Light Scattering (DLS) e analisi di potenziale Zeta.* Le misure di size condotte al DLS e le misure di potenziale Zeta sono state eseguite a 25°C utilizzando uno strumento Malvern Zetasizer NanoZS, settato con una luce laser di 532 nm ed un detector ad un angolo fisso di scattering di 173°. In questo modo sono state analizzate soluzioni acquose di Au@citrato, Au@INU-FA e Au@INU-FA/Doxo (0,015 mg/ml). Il diametro

idrodinamico riportato come Z Average e l'indice di polidispersità (PDI) sono stati ottenuti tramite analisi della funzione di autocorrelazione. Il potenziale Zeta (mV) è stato calcolato dalla mobilità elettroforetica utilizzando la relazione di Smoluchoski e assumendo che  $K \cdot a \gg 1$  (dove K e a sono rispettivamente i parametri di debye-Huckel e il raggio particellare).

*Analisi a dispersione di raggi X della superficie di Au@INU-FA/Doxo.* La composizione chimica elementare qualitativa del sistema Au@INU-FA liofilizzato è stata studiata utilizzando un microscopio a scansione elettronica ESEM Philips XL30. I campioni sono stati posti su un film biadesivo di carbonio applicato su uno stub metallico prima della analisi elementare.

*Saggio di citotossicità in vitro.* La citotossicità dei sistemi colloidali prodotti, Au@INU-FA e Au@INU-FA/Doxo, è stata valutata tramite saggio MTS su cellule del cancro della mammella umano (MCF7) e cu cellule dell'epitelio bronchiale umano (16HBE), tutte le linee cellulari sono state coltivate in DMEM arricchito con il 10% di FBS e l'1% di penicillina/streptomina. Le cellule sono state mantenute in atmosfera umidificata a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Tutti i reagenti usati sono stati acquistati da Invitrogen. Le cellule sono state piastrate in piastre da 96 pozzetti alla densità di 2x10<sup>4</sup> cellule per pozzetto. In seguito ad adesione overnight delle cellule, il mezzo è stato rimpiazzato con 200 µl di mezzo fresco contenente Au@INU-FA e Au@INU-FA/Doxo alla concentrazione per pozzetto pari a 330, 165, 82,5, 41,25 e 20,62 µg/ml di Au<sup>0</sup>, corrispondenti a concentrazioni di doxorubicina pari a 100, 50, 25, 12,5 e 6,125 µM. Dopo 4, 24 e 48 h i campioni sono stati rimossi dai pozzetti e sostituiti da 100 µl di mezzo fresco e 20 µl di soluzione di MTS. Le cellule sono state quindi incubate per altre due ore a 37°C ed è stata letta l'assorbanza a 490 nm utilizzando un lettore per piastre Multiskan, Thermo, U.K.). Le cellule trattate con solo mezzo cellulare sono state utilizzate come controllo negativo. I risultati sono stati espressi come % di vitalità rispetto alle cellule controllo. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato.

Soluzioni di doxorubicina idrocloruro alle stesse concentrazioni testate sono state impiegate come controllo positivo.

*Esperimenti di inibizione recettoriale.* Il saggio di inibizione dei recettori per l'acido folico (FRs) è stato condotto su cellule MCF7 in quanto è una linea cellulare che sovraesprime tali recettori. Le cellule sono state piastrate in piastre da 96 pozzetti alla densità di  $2 \times 10^4$  cellule per pozzetto e coltivate in DMEM senza acido folico. In seguito ad adesione *overnight* delle cellule il mezzo è stato sostituito con 200  $\mu$ l di mezzo fresco arricchito con 250 mg/ml di acido folico per saturare i FRs. Dopo 3 h di incubazione a 37°C, il mezzo è stato sostituito con mezzo fresco contenente Au@INU-FA/Doxo alla concentrazione per pozzetto pari a 330, 165, 82,5, 41,25 e 20,62  $\mu$ g/ml di Au<sup>0</sup> corrispondenti a 100, 50, 25, 12,5 e 6,125  $\mu$ M di doxorubicina per pozzetto. Dopo 4, 24 e 48 h i campioni sono stati rimossi ed è stato condotto il saggio di vitalità MTS come riportato sopra. Le cellule trattate con solo mezzo cellulare sono state utilizzate come controllo negativo. I risultati sono stati espressi come % di vitalità rispetto alle cellule controllo. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato. Soluzioni di doxorubicina idrocloruro alle stesse concentrazioni testate sono state impiegate come controllo positivo.

*Studi di Uptake cellulare di Au@INU-FA/Doxo.* Cellule MCF7 e 16HBE sono state piastrate in piastre da 96 pozzetti alla densità di  $2 \times 10^4$  cellule per pozzetto e coltivate come riportato in precedenza. In seguito ad adesione *overnight* delle cellule il mezzo è stato sostituito con 200  $\mu$ l di mezzo fresco contenente Au@INU-FA/Doxo alla concentrazione di 12  $\mu$ g/ml di Au<sup>0</sup> corrispondenti a doxorubicina 5  $\mu$ M e le cellule sono state incubate per 30 minuti, 1 ora e 2 ore. Dopo ogni tempo di incubazione, il mezzo è stato rimosso e le cellule lavate due volte con DPBS e fissate con formaldeide al 4% per 30 minuti. Successivamente, la soluzione di formaldeide è stata rimossa, le cellule lavate nuovamente con DPBS e i nuclei sono stati colorati con 4,6-diamidino-2-fenilindolo (DAPI). Dopo 20 minuti di incubazione, la

soluzione è stata rimossa, le cellule lavate due volte e osservate tramite microscopio a fluorescenza Axio Vert.A1 (Zeiss) dotato di telecamera Axio Cam MRm (Zeiss). Per gli studi di uptake quantitativo di Au@INU-FA/Doxo, dopo i tempi di incubazione (30 minuti, 1 e 2 ore), le cellule sono state lisate in 50  $\mu\text{l}$  di Lysis buffer (1% Triton X-100, 2% SDS in DPBS) a 37°C. 25  $\mu\text{l}$  di lisato sono stati trasferiti in una nuova piastra a 96 pozzetti e diluiti con 75  $\mu\text{l}$  (volume finale: 100  $\mu\text{L}$ ) di acqua Milli-Q per le misure dell'intensità di fluorescenza ( $\lambda\text{Ex}$ : 490nm;  $\lambda\text{Em}$ : 580 nm) eseguite per mezzo di un fluorimetro Eppendorf plate reader. I rimanenti 25  $\mu\text{l}$  di lisato sono stati utilizzati per determinare il contenuto di proteine utilizzando il kit specifico di acido biconico, seguendo le specifiche del fornitore. I segnali di fluorescenza sono stati normalizzati per la quantità di proteine in ogni campione. La doxorubicina libera (5  $\mu\text{M}$ ) è stata utilizzata è stata utilizzata come controllo positivo per gli studi di uptake quantitativo. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato.

*Analisi statistiche.* Un T test è stato applicato per confrontare gruppi di campioni differenti. I risultati sono considerati statisticamente significativi con un valore di  $p < 0,05$ . Tutti i valori riportati sono la media di tre esperimenti  $\pm$  la deviazione standard.

### 3.2.3 TERMOABLAZIONE DI CELLULE TUMORALI MEDIANTE COMPOSITI NANOSTRUTTURATI GRAFENE OSSIDO/ORO DIREZIONATI CON ACIDO FOLICO

*Sintesi del copolimero INU-FA.* La sintesi del copolimero INU-FA è stata eseguita come riportato in precedenza (paragrafo 3.2.2) e la caratterizzazione  $^1\text{H NMR}$  è in accordo con la struttura attribuita: SEC: Mw 6784, Mw/Mn 1,24.  $^1\text{H NMR}$  (300MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  2,90–3,40 (4H EDA, - $\text{NHCH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$ ), 3,60–3,90 (5HINU, - $\text{CH}_2\text{-OH}$ ; - $\text{CH-CH}_2\text{-OH}$ ; - $\text{C-CH}_2\text{-O-}$ ), 3,92–4,30 (2H INU, - $\text{C-CH-OH}$ ; - $\text{CH-OH}$ ),  $\delta$  7,517–6,685 (4H FA, phenyl group).

*Preparazione dei nanocompositi grafene ossido/ nanosfere di oro rivestite con INU-FA (GO/Au@INU-FA.)* A 5 ml di dispersione acquosa di Au@citrato (0.2 mg/mL), è stato aggiunto 1 ml di grafene ossido (100  $\mu\text{g/ml}$ ) sotto agitazione. La miscela ottenuta è stata incubata a temperatura ambiente per 30 minuti e quindi centrifugata per 20 minuti a 4000 rpm. Il solido ottenuto (GO/Au) è stato lavato tre volte in acqua Milli-Q per rimuovere l'eccesso di GO e risospeso in 1 ml di acqua Milli-Q. Quindi 4 ml di soluzione acquosa di INU-FA (5 mg/ml in acqua milli-Q) sono stati aggiunti alla dispersione di GO/Au e incubati per 30 minuti a temperatura ambiente. Il nanocomposito ottenuto rivestito con il copolimero, GO/Au@INU-FA, è stato purificato lavandolo per tre volte con acqua Milli-Q per rimuovere l'eccesso di INU-FA, centrifugando per 20 minuti a 4000 rpm e ridisperdendolo in 5 ml di acqua milli-Q.

*Caricamento di paclitaxel nei nanocompositi GO/Au@INU-FA.* Per la preparazione dei nanocompositi carichi di paclitaxel (PTX-GO/Au@INU-FA), 4,22 mg di paclitaxel in polvere (drug loading massima 20% p/p) sono stati aggiunti ad 1 ml di dispersione acquosa di GO/Au preparata come descritto in precedenza, e il volume è stato portato a 5 ml, con acqua Milli-Q. la miscela ottenuta è stata sonicata in un bagnetto ad ultrasuoni per un

periodo di tempo prolungato ( 6 cicli di sonicazione da 15 minuti ciascuno) a 25°C. Quindi 4 ml di soluzione acquosa di INU-FA 5 mg/ml sono stati aggiunti alla sospensione acquosa ottenuta di PTX-GO/Au. Dopo 30 minuti di incubazione, la miscela è stata centrifugata e il residuo solido è stato lavato due volte in 5 ml di etanolo per rimuovere l'eccesso di paclitaxel. Il prodotto ottenuto è stato disperso in 5 ml di acqua Milli-Q e quindi liofilizzato. La quantità di farmaco caricato in PTX-GO/Au@INU-FA è stata determinata tramite analisi HPLC ed è risultata pari al  $1,7 \pm 2$  % p/p. In particolare, una quantità precisa di PTX-GO/Au@INU-FA (5 mg) è stata dispersa in un volume esatto di acetonitrile (5 ml) per estrarre il farmaco caricato. Dopo 3 ore di incubazione sotto agitazione, la dispersione è stata filtrata su un filtro in nylon di cut off 0,2  $\mu\text{m}$  e aliquote di 50  $\mu\text{l}$  della soluzione ottenuta sono state iniettate in una colonna C<sub>18</sub> per HPLC. È stata impiegata un'eluizione isocratica per ottenere una separazione cromatografica utilizzando come fase mobile una miscela di ammonio acetato 35 mM pH 5 ed acetonitrile 55/45 v/v. Il flusso è stato settato ad 1 ml/min. La quantità di farmaco caricato è stata calcolata utilizzando una curva di calibrazione ottenuta diluendo una soluzione a titolo noto di paclitaxel in fase mobile ed espressa come percentuale di paclitaxel caricato per unità di massa di sistema GO/Au@INU-FA.

*Spettroscopia UV-VIS.* Gli spettri UV-VIS sono stati registrati con uno spettrofotometro Shimadzu UV-2400. Tutti i campioni sono stati dispersi in acqua Milli-Q (Au@citrate, GO, INU-FA, GO/Au, GO/Au@INU-FA, PTX-GO/Au@INU-FA) e posizionati nella cella apposita per l'analisi spettroscopica nel range 200-800 nm a temperatura ambiente.

*Calorimetria a scansione differenziale (DSC).* Analisi DSC sono state condotte utilizzando un DSC 131 EVO (SETARAM Instruments) sotto atmosfera di azoto (flusso 1 ml/ min) e su circa 2 mg di campione secco posizionato in un crogiolo di alluminio. La velocità di riscaldamento

applicata è stata di 40-350°C, 10°C al minuto. La derivata prima delle curve ottenute (dHf) sono state anche calcolate e riportate.

*SEM e Energy dispersive X-ray analisi della superficie di GO/Au@INU-FA.* Per gli studi di morfologia e di analisi chimica elementare, il nanocomposito GO/Au@INU-FA liofilizzato è stato visualizzato utilizzando un microscopio elettronico a scansione ESEM Philips XL30. I campioni sono stati posti su uno stub adesivo e le immagini SEM sono state registrate senza *sputtering* con oro. Per l'analisi elementare invece il campione è stato posto direttamente su uno stub di alluminio senza supporto di carbonio.

*Microscopia a forza atomica (AFM).* Misure AFM sono state eseguite in *tapping mode* utilizzando un microscopio Bruker dimension fastscan equipaggiato con scanners del tipo closed-loop. Il probe usato è stato un fastscan triangolare (resonance frequency=1400 KHz, Tip radius=5 nm). Il nanosistema in dispersione acquosa (0,001 mg/ml) è stato gocciolato su una superficie di mica e lasciato essiccare overnight prima dell'analisi.

*Studi di rilascio.* Gli studi di rilascio sono stati eseguiti in tre mezzi di rilascio differenti : plasma umano, tampone fosfato pH 7,4 e 5,5, entrambi arricchiti con il 10% v/v di siero bovino fetale (FBS). 100 µl di dispersione di PTX-GO/Au@INU-FA o paclitaxel libero in tampone fosfato 10 mM pH 7,4 sono stati aggiunti ad 1 ml di ogni mezzo di rilascio. I campioni sono stati tenuti a 37°C sotto agitazione. Ad intervalli di tempo prefissati (da 30 minuti a 48 ore), i campioni sono stati filtrati su filtri in cellulosa 0,2 µm di cut-off per rimuovere il sistema. Quindi 1,5 mL di metanolo/acido acetico 10% v/v sono stati aggiunti ad un volume preciso (500 µl) di campione filtrato per precipitare le proteine plasmatiche e del FBS. La miscela è stata vortexata per 5 minuti e tenuta sotto agitazione per 15 minuti per estrarre il paclitaxel dalle proteine precipitate. Dopo centrifugazione a 9000 rpm per 3 minuti, il surnatante contenente la fase organica è stato raccolto e tirato a

secco e il residuo secco ricostituito in fase mobile acetonitrile/ammonio acetato 35 mM pH 5 (45:55 v/v), filtrato su filtro di Nylon 0,2  $\mu\text{m}$  e analizzato all'HPLC. L'efficienza di estrazione del paclitaxel è stata maggiore dell'85 % in tutte le matrici testate.

*Saggio di citotossicità in vitro.* La citotossicità dei nanocompositi è stata valutata tramite saggio MTS su cellule del cancro della mammella umano (MCF7) e su cellule dell'epitelio bronchiale umano (16HBE), tutte le linee cellulari sono state coltivate in DMEM arricchito con il 10% di FBS e l'1% di penicillina/streptomina. Le cellule sono state mantenute in atmosfera umidificata a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Tutti i reagenti usati sono stati acquistati da Invitrogen. Le cellule sono state piastrate in piastre da 96 pozzetti alla densità di  $2 \times 10^4$  cellule per pozzetto. In seguito ad adesione *overnight* delle cellule, il mezzo è stato rimpiazzato con 200  $\mu\text{l}$  di mezzo fresco contenente GO/Au@INU-FA alla concentrazione per pozzetto pari a 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,625 mg/ml di sistema, o PTX-GO/Au@INU-FA a differenti concentrazioni (75, 37,5, 18,75, 9,37,4,68, 3,34  $\mu\text{g/ml}$  di sistema), corrispondenti ad equivalenti concentrazioni di paclitaxel pari a 1,5, 0,85, 0,425, 0,212, 0,106  $\mu\text{g/ml}$ . Dopo 4, 24 e 48 ore, i campioni sono stati rimossi dai pozzetti e sostituiti da mezzo fresco (100  $\mu\text{l}$ ) e 20  $\mu\text{l}$  di soluzione di MTS. Le cellule sono state quindi incubate per altre due ore a 37°C ed è stata letta l'assorbanza a 490 nm utilizzando un lettore per piastre Multiskan, Thermo, U.K.). Soluzioni di paclitaxel alle stesse concentrazioni ( da 0,106 a 1,5  $\mu\text{g/ml}$ ) sono state usate come controllo positivo e preparate da una soluzione madre ottenuta solubilizzando una quantità pesata di paclitaxel in 100  $\mu\text{l}$  di DMSO e diluendo con DMEM arricchito con il 10% di FBS. Le sole cellule in mezzo cellulare sono state usate come controllo negativo. I risultati di vitalità cellulare sono espressi come percentuale rispetto al controllo di sole cellule. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato.

*Valutazione in vitro dell'effetto ipertermico.* Dispersioni di GO/Au, GO/Au@INU-FA e PTX-GO/Au@INU-FA in acqua sono state preparate e trattate con un laser chirurgico di 810 nm di lunghezza d'onda (GBox 15A/B by GIGA Laser) con la potenza fissata a  $2,8 \times 10^{-3} \text{ W mm}^{-3}$ . Ad intervalli di tempo fissati è stata registrata la temperatura delle dispersioni e riportata in funzione del tempo di esposizione al laser. Lo stesso esperimento è stato condotto su nanosfere di oro di 30 nm (Au@citrato 1 mg/ml) in acqua e su acqua Milli-Q come bianco. Per valutare l'effetto ipertermico di PTX-GO/Au@INU-FA in mezzo cellulare, sono state preparate dispersioni di quest'ultimo in mezzo cellulare a diverse concentrazioni (75, 37,5, 18,75, 9,37, 4,68, 3,34  $\mu\text{g/ml}$  di sistema) e trattate con lo stesso laser chirurgico ad 810 nm di lunghezza d'onda,  $7 \times 10^{-2} \text{ W mm}^{-3}$  di potenza, per 100 e 300 secondi.

*Trattamento di termoablazione (in acuto) su cellule MCF7.* Per questi esperimenti, le cellule sono state piastrate in una piastra a 96 pozzetti alla densità di  $2 \times 10^4$  cellule per pozzetto ed incubate per 4 ore con mezzo fresco contenente o GO/Au@INU-FA, o PTX-GO/Au@INU-FA o paclitaxel libero (PTX) alla concentrazione di 15  $\mu\text{g/ml}$  di sistema corrispondente a 0,3  $\mu\text{g/ml}$  di paclitaxel. Per il saggio di citotossicità le cellule sono state irradiate con un raggio laser di 810 nm di lunghezza d'onda per due tempi differenti, 100 e 300 secondi. Dopo il trattamento laser, il mezzo contenente i sistemi e il farmaco libero è stato rimosso, le cellule sono state lavate due volte con DPBS e la vitalità cellulare è stata valutata tramite saggio MTS come descritto in precedenza. Le cellule trattate con laser sono state usate come controllo negativo.

*Effetto indotto dall'ipertermia (cronico) sulle cellule MCF7.* Per valutare l'effetto indotto dall'ipertermia in cronico, oltre al fatto che il saggio MTS è stato condotto dopo 24 ore di post-incubazione seguenti il trattamento laser, è stata seguita una procedura analoga a quella riportata per l'esperimento in acuto. Le cellule trattate con lo stesso laser chirurgico, alla stessa

potenza e per gli stessi tempi (100 e 300 secondi) sono state usate come controllo negativo. Tutti i risultati sono stati espressi come percentuale rispetto al controllo di sole cellule. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato.

*Analisi statistiche.* Un T test è stato applicato per confrontare gruppi di campioni differenti. I risultati sono considerati statisticamente significativi con un valore di  $p < 0,05$ . Tutti i valori riportati sono la media di tre esperimenti  $\pm$  la deviazione standard.

### 3.2.4 GOLD NANORODS FUNZIONALIZZATI CON ACIDO FOLICO SENSIBILI AD UN LASER INFRAROSSO PER LA DIAGNOSI E LA TERAPIA DELL'OSTEOSARCOMA

*Sintesi "seed mediated" di Nanorods di oro stabilizzati con CTAB (AuNRs@CTAB).* I seeds di oro sono stati sintetizzati secondo la procedura standard CTAB/NaBH<sub>4</sub> (Scarabelli, Grzelczak, and Liz-Marzán 2013). Brevemente 25  $\mu$ l di una soluzione 0,05 M di HAuCl<sub>4</sub> è stata aggiunta a 4,7 mL di una soluzione di CTAB 0,1 M. Quindi 300  $\mu$ l di una soluzione preparata di fresco di NaBH<sub>4</sub> 0,01 M è stata aggiunta sotto agitazione vigorosa. In una tipica sintesi di 50 ml di GNRs, 50 mg di 5-BrSA sono stati aggiunti a 25 mL di CTAB 0,1 M. Dopo la completa solubilizzazione del 5-BrSA, sono stati aggiunti anche 480  $\mu$ l di AgNO<sub>3</sub>. La soluzione è stata posta ad agitare per 15 minuti a temperatura ambiente e quindi 25 mL di HAuCl<sub>4</sub> 0,001 M sono stati aggiunti alla miscela di reazione. Per iniziare lo step di pre-riduzione, 130  $\mu$ L di AA 0,1 M sono stati aggiunti sotto vigorosa agitazione, e in seguito 80  $\mu$ l di soluzione di seed di oro precedentemente sintetizzati. Dopo 30 secondi, l'agitazione è stata interrotta e la miscela di reazione è stata fatta reagire a temperatura ambiente per almeno 4 h.

*Sintesi del copolimero INU-LA.* 200 mg di inulina (1,23 mmol U.R di inulina) sono stati solubilizzati in 3 mL di DMFa. A questa soluzione è stata

aggiunta una soluzione di acido lipoico (127 mg, corrispondenti a 0,615 mmoli, in 2 ml di DMFa). Quindi alla miscela ottenuta è stata aggiunta una soluzione di DCC/DMAP (152 mg e 90 mg rispettivamente) solubilizzati in 2 ml di DMFa e la reazione è stata condotta per 24 h a 25°C. Trascorso il tempo di reazione, la miscela di reazione è stata filtrata su filtro di carta per allontanare la dicicloesil urea formatasi e quindi concentrata all'evaporatore rotante e precipitata e lavata 4 volte in etere dietilico. Dopo la purificazione il prodotto è stato ottenuto con una resa del 111% rispetto all'inulina di partenza. <sup>1</sup>HNMR: 3,60-3,90 (5H<sub>INU</sub>, -CH<sub>2</sub>-OH; -CH-CH<sub>2</sub>-OH; -C-CH<sub>2</sub>-O-), 3,92-4,30 (2H<sub>INU</sub>, -C-CH-OH; -CH-OH), δ 1,39 (m, 2H<sub>LA</sub>, -HO-CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-cCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-S-), 1,59 (2H<sub>LA</sub>, -HO-CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-cCH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-S-), 1,97 (m, 2H<sub>LA</sub>, -HO-CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-cCH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-S-), 2,23 (m, 2H<sub>LA</sub> -HO-CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-cCH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-S-), 2,54 (m, 2H<sub>LA</sub> -HO-CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-cCH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-S-).

*Sintesi del polimero PEG-FA.* 250 mg di diammino PEG sono stati solubilizzati in 5 ml di acqua milli-Q. A questa soluzione sono stati aggiunti 42 mg di acido folico e 31 mg di NHSS. Il pH della soluzione ottenuta è stato aggiustato a 6,8 con NaOH 0,1 N e quindi sono stati aggiunti 27 mg di EDC HCl, mantenendo sempre il pH costante a 6,8. La reazione è stata condotta per 18 h a 25°C e successivamente il prodotto ottenuto è stato purificato tramite cromatografia ad esclusione dimensionale utilizzando Sephadex G-25 come gel di separazione. Il prodotto puro è stato quindi liofilizzato ed ottenuto con una resa del 98% p/p rispetto al PEG di partenza. <sup>1</sup>HNMR: 3,70 (m, 176H<sub>PEG 2000</sub>, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>44</sub>-), δ 7,52 – 6,69 4H FA, phenyl group.

*Sintesi del copolimero INU-LA-PEG-FA.* 41,4 mg di bis-nitro fenil carbonato (0,136 mmol) sono stati aggiunti a 6 ml di soluzione di INU-LA 50 mg/ml in

DMFa. La miscela di reazione è stata irradiata per 30 minuti con un reattore a microonde CEM Discover alla potenza di 25 W alla temperatura di 60°C. Quindi la miscela di reazione è stata aggiunta goccia a goccia ad una soluzione di PEG-FA (330 mg di PEG-FA pari a 0,136 mmol di PEG in 5 ml di a-DMF). La miscela di reazione è stata posta ad agitare per 4 h a 25°C. Il prodotto ottenuto è stato precipitato in acetone e la sospensione centrifugata a 5°C per 5 minuti a 10.000 rpm. Il prodotto solido ottenuto è stato lavato tre volte in acetone per rimuovere l'eccesso di PEG-FA e di BNPC non reagiti. Quindi il prodotto è stato solubilizzato in 2 ml di acqua bidistillata e ulteriormente purificato tramite cromatografia ad esclusione dimensionale utilizzando Sphadex G-25 come fase gel di separazione. Dopo la purificazione il prodotto INU-LA-PEG-FA è stato liofilizzato e ottenuto con una resa del 97% rispetto all'INU-LA di partenza. <sup>1</sup>HNMR: 3,60-3,90 (5H<sub>INU</sub>, -CH<sub>2</sub>-OH; -CH-CH<sub>2</sub>-OH; -C-CH<sub>2</sub>-O-), 3,92-4,30 (2H<sub>INU</sub>, -C-CH-OH;-CH-OH), δ 1,39 (m, 2H<sub>LA</sub>, -HO-CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-cCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-S-), 1,59 (2H<sub>LA</sub>, -HO-CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-cCH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-S-), 1,97 (m, 2H<sub>LA</sub>, -HO-CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-cCH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-S-), 2,23 (m, 2H<sub>LA</sub> -HO-CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-cCH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-S-), 2,54 (m, 2H<sub>LA</sub> -HO-CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-cCH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-S-), 3,70 (m, 176H<sub>PEG 2000</sub>, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>44</sub>-), δ 7,52 - 6,69 4H FA, phenyl group.

*Sintesi del copolimero PHEA-EDA-FA.* A 2 ml di PHEA-EDA 100 mg/ml in acqua milli-Q (0,326 mmol di unità ripetitive di PHEA) è stata aggiunta sotto agitazione una soluzione di acid folico in acqua milli-Q a pH 8 per l'aggiunta di NaOH 0,1 N (43 mg, 0,097 mmoli). Quindi sono stati aggiunti NHS (16,11 mg, 0,14 mmoli) ed EDC HCl (26,8 mg, 0,14 mmoli) sotto agitazione. Il pH della miscela di reazione è stato mantenuto stabile a 6,5-6,8 con NaOH 0,1 N e la reazione è stata condotta per 24 h a 25°C. Il prodotto è stato purificato tramite cromatografia ad esclusione dimensionale

utilizzando Sephadex G-25 come gel di separazione e recuperato dopo liofilizzazione con una resa del 92% rispetto al PHEA-EDA di partenza.<sup>1</sup>H NMR:  $\delta$  2,8 (m, 2H, -CH-CH<sub>2</sub>-CO-NH), 3,01 (m, 2H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>), 3,38 (m, 2 H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH), 3,43 (m, 2H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>), 3,68 (m, 2H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH), 4,15 (m, 2 H, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O(CO)NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>) 4,73 (m, 1 H, -NH-CH(CO)CH<sub>2</sub>),  $\delta$  7,52 – 6,69 4H FA, phenyl group.

*Preparazione di GNRs funzionalizzati con INU-LA-PEG-FA, INU-LA-PEG-FA/Nut, PHEA-EDA-FA e PHEA-EDA-FA/Nut.* Prima di essere utilizzati gli AuNRs@CTAB sono stati lavati due volte con acqua milli-Q tramite centrifugazione ad 8000 rpm per 15 minuti per rimuovere l'eccesso di tensioattivo cationico (CTAB). Per la preparazione di GNRs rivestiti con INU-LA-PEG-FA (AuNRs@INU-LA-PEG-FA), una soluzione di questo polimero (40  $\mu$ l, 1 mg/ml in acqua Milli-Q) è stata aggiunta alla dispersione di AuNRs@CTAB (30  $\mu$ g/ml Au<sup>0</sup>) per ottenere un rapporto (R) molecole di INU-LA-PEG-FA/nm<sup>2</sup> di Au<sup>0</sup> pari a 10. La miscela di reazione è stata incubata per 30 minuti a 37°C. I GNRs rivestiti (AuNRs@INU-LA-PEG-FA) sono quindi stati lavati due volte in acqua milli-Q centrifugando di volta in volta a 8000 rpm per 15 minuti, e conservati a temperatura ambiente. Per la preparazione dei GNRs rivestiti con il copolimero PHEA-EDA-FA (AuNRs@PHEA-EDA-FA), a parte il fatto che è stato impiegato un rapporto di molecole di PHEA-EDA-FA/nm<sup>2</sup> Au<sup>0</sup> pari a 2, è stata seguita una procedura analoga a quella riportata per la preparazione di AuNRs@INU-LA-PEG-FA. GNRs caricati con nutlin-3 (AuNRs@INU-LA-PEG-FA/Nut and AuNRs@PHEA-EDA-FA/Nut) sono stati preparati aggiungendo una soluzione in metanolo di nutlin-3 (35  $\mu$ l 1 mg/ml) ai copolimeri secchi. Quindi la miscela è stata essiccata sotto vuoto, dispersa in 500  $\mu$ l di acqua milli-Q e aggiunta ad una dispersione acquosa di AuNRs@CTAB (30  $\mu$ g/ml Au<sup>0</sup>) per ottenere un R molecole di polimero/ nm<sup>2</sup> Au<sup>0</sup> uguale a quello utilizzato per la preparazione dei sistemi vuoti ed un rapporto in peso nutlin-3/ Au<sup>0</sup> pari al 50%. Dopo 3 h di incubazione a 37°C, i sistemi sono

stati centrifugati (15 minuti a 8000 rpm) e lavati in miscela acqua milli-Q/metanolo 1:2 per rimuovere l'eccesso di nutlin-3.

*Microscopia a trasmissione elettronica (TEM).* 5  $\mu$ l di Au@CTAB, lavati due volte in acqua milli-Q prima dell'analisi TEM, sono stati depositati su una griglia di rame (Ted-pella, Inc.) rivestita con un film ultrasottile di carbonio amorfo (Formvar-coated 200-mesh) e lasciati essiccare a temperatura ambiente. I GNRs sono stati osservati utilizzando un microscopio a trasmissione elettronica JEOL JEM-1400PLUS (120kV) (Japan) dotato di GATAN US1000 CCD camera (2k x 2k).

*Microscopia a scansione elettronica (SEM) e analisi a dispersione di raggi X.* 10  $\mu$ l di GNRs sono stati depositati su una griglia di rame (Ted-pella, Inc.) rivestita con un film ultrasottile di carbonio amorfo applicata su un film biadesivo di carbonio applicato su uno stub di alluminio e lasciati essiccare a temperatura ambiente prima dell'analisi.

*Spettroscopia VIS-NIR.* Gli spettri VIS-NIR sono stati registrati con uno spettrofotometro Shimadzu VIS-NIR 2400. Tutti i campioni sono stati dispersi in acqua Milli-Q e posizionati nella cella apposita per l'analisi spettroscopica nel range 400-900 nm, a temperatura ambiente.

*Misure di potenziale Zeta.* Le misure di potenziale Zeta sono state eseguite a 25°C utilizzando uno strumento Malvern Zetasizer NanoZS. Sono state analizzate dispersione acquose di GNRs (0,015 mg/ml Au<sup>0</sup>). Il potenziale Zeta (mV) è stato calcolato dalla mobilità elettroforetica utilizzando la relazione di Smoluchoski e assumendo che  $K \cdot a \gg 1$  (dove K e a sono rispettivamente i parametri di debye-Huckel e il raggio particellare).

*Determinazione della quantità di nutlin-3 caricato in AuNRs@INU-LA-PEG-FA/Nut e AuNRs@PHEA-EDA-FA/Nut e studi di rilascio.* La quantità di farmaco caricato in Au NRs@INU-LA-PEG-FA/Nutlin e in Au NRs@PHEA-EDA-FA/Nutlin (drug loading %) è stata determinata tramite cromatografia

liquida ad alte prestazioni (HPLC) e tramite spettroscopia UV-VIS. Nel primo metodo, una quantità precisa di Au NRs@INU-LA-PEG-FA/Nut o Au NRs@PHEA-EDA-FA/Nut è stata dispersa in 5 ml di acetonitrile per estrarre il farmaco caricato. Dopo tre ore di estrazione sotto agitazione magnetica, la dispersione è stata centrifugata (15 minuti, 8000 rpm), il surnatante è stato filtrato su un filtro in Nylon di cut-off 0,2  $\mu\text{m}$  ed un'aliquota di 50  $\mu\text{l}$  è stata iniettata in una colonna HPLC C<sub>18</sub> Gemini. La miscela eluente utilizzata per l'analisi HPLC è stata una soluzione 0,02 M KHPO<sub>4</sub><sup>-</sup> / ACN/ MeOH 45:35: 20 (v/v) al flusso di 1 ml/min. La quantità di farmaco caricato nei sistemi è stata calcolata utilizzando una curva di calibrazione ottenuta da soluzioni di nutlin-3 a differenti concentrazioni nella fase mobile. Nel secondo metodo, per estrarre il farmaco dai sistemi è stata seguita una procedura analoga a quella appena descritta. Quindi il surnatante ottenuto in seguito a centrifugazione della dispersione dei sistemi in acetonitrile, è stato analizzato tramite spettroscopia UV misurando l'assorbanza a 260 nm per determinare la quantità di nutlin-3 presente nei GNRs rivestiti. La quantità di farmaco caricato è stata calcolata utilizzando una curva di calibrazione ottenuta diluendo una soluzione a titolo noto di nutlin-3 nella miscela eluente ed espressa come percentuale di nutlin-3 caricato per unità di massa dei sistemi GNRs rivestiti.

La drug loading % media calcolata tramite HPLC e spettroscopia UV è risultata essere uguale a  $12,45 \pm 1,5$  % (p/p) e  $13,75 \pm 0,7$  % con un'efficienza di incapsulazione del 40,95 % e 50,02% per Au NRs@INU-LA-PEG-FA/Nut e Au NRs@PHEA-EDA-FA/Nut rispettivamente.

Gli studi di rilascio sono stati eseguiti in tre diversi mezzi: plasma umano, tampone fostato (PBS) a pH 7,4 e a pH 5,5, entrambi arricchiti con siero bovino fetale (FBS) al 10% v/v. 100  $\mu\text{l}$  di Au NRs@INU-LA-PEG-FA/Nut, Au NRs@PHEA-EDA-FA/Nut o nutlin-3 libero sono stati aggiunti ad 1 ml di ogni mezzo di rilascio. I campioni sono stati incubati a 37°C in Orbital Shaker. Ad intervalli di tempo prestabiliti (da 30 minuti a 48 ore), i campioni sono stati centrifugati per 15 minuti ad 8000 rpm per rimuovere i

GNRs e interrompere così il rilascio di farmaco. Quindi 1,5 mL di acetonitrile sono stati aggiunti ad un volume preciso (500  $\mu$ l) dei surnatanti per precipitare le proteine plasmatiche e quelle dell'FBS. La miscela quindi è stata vortexata per 5 minuti e mantenuta sotto agitazione per 15 minuti per estrarre il nutlin-3. Dopo centrifugazione (3 minuti a 3000 rpm), un volume preciso di surnatante è stato filtrato su filtro in Nylon con cut-off 0,2  $\mu$ m ed analizzato tramite HPLC. L'efficienza di estrazione del nutlin-3 è stata maggiore del 98% in tutti e tre mezzi di rilascio. Il rilascio di farmaco indotto dall'ipertermia è stato valutato irradiando una dispersione di Au NRs@INU-LA-PEG-FA/Nut o Au NRs@PHEA-EDA-FA/Nut in PBS pH 5,5/FBS 10% v/v con un laser avente 810 nm di lunghezza d'onda ed una potenza di  $3,5 \times 10^{-2}$  W/mm<sup>3</sup> per tempi differenti (da 30 a 90 secondi) e quindi confrontando la quantità di farmaco rilasciata dopo 1, 2 e 4 h a 37°C con quella del controllo non trattato con laser.

*Valutazione in vitro dell'effetto ipertermico.* Dispersioni acquose di Au NRs@INU-LA-PEG-FA/Nut o Au NRs@PHEA-EDA-FA/Nut a differenti concentrazioni comprese tra 1,6 e 30  $\mu$ g/ml sono state trattate con un laser chirurgico avente lunghezza d'onda 810 nm (GBox 15A/B by GIGA Laser) e settato alla potenza di  $2,8 \times 10^{-3}$  W/mm<sup>3</sup>. Ad intervalli di tempo prestabiliti è stata registrata la temperatura della dispersione e riportata in funzione del tempo di esposizione. Lo stesso esperimento è stato condotto su un'aliquota di acqua Milli-Q utilizzato come bianco.

*Colture cellulari e reagenti biologici.* Cellule di osteosarcoma umano (U2OS) sono state acquistate da ATCC. Le cellule dell'epitelio bronchiale umano sono state acquistate dall'istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (Italia) e i fibroblasti del derma umano (HDFa) sono stati acquistati da Invitrogen. Le cellule 16HBE e HDFa sono state cresciute in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) arricchito con il 10% v/v di siero bovino fetale (FBS), penicillina/streptomina (100 U/ml penicillina and 100 mg/mL streptomina), l'1% di glutammina e lo 0,5% di amfotericina B, a 37°C con il 5% di CO<sub>2</sub> in atmosfera umidificata.

Le cellule U2OS sono state cresciute in mezzo Mc Coy's arricchito con il 10% di FBS, l'1% di penicillina/streptomina e l'1% di glutammina. DMEM e Mc Coy's medium e gli altri costituenti sono stati comparati da Euroclone e ATCC rispettivamente. Cell Titer 96 Aqueous One Solution (reagent MTS per il saggio di proliferazione cellulare) è stato acquistato da Thermo Scientific. Il Kit di acido bicinonico per la determinazione delle proteine, le Piastre perfecta 3D® con tecnologia "hanging drop" e la matrice extracellulare (ECM) derivante da Engelbreth-Holm-Swarm sarcoma murino sono state acquistate da Sigma-Aldrich. Il plasma venoso umano è stato ottenuto da donatori volontari sani ed utilizzato immediatamente.

*Formazione di organoidi di osteosarcoma.* Gli organoidi di osteosarcoma sono stati formati seguendo il protocollo fornito dalla ditta fornitrice Perfect3D®. Brevemente, 40 µl di una sospensione cellulare alla densità di 100 cellule/µl arricchita con il 2,5 % di gel ECM per aumentare la compattezza degli organoidi, sono stati posti in ogni pozzetto delle piastre con tecnologia *hanging-drop* Perfecta 3D®. Il mezzo di coltura è stato cambiato ogni giorno rimuovendo 10 µl di mezzo e aggiungendo 14 µl di mezzo fresco.

*Saggio di tossicità cellulare.* La citotossicità dei sistemi a base di GNRs è stata valutata tramite saggio MTS su cellule di osteosarcoma umano (U2OS), su cellule dell'epitelio bronchiale umano (16HBE) e su fibroblasti umani (HDFa). Le tre linee cellulari sono state coltivate come descritto precedentemente. Per il saggio di citotossicità su colture cellulari bidimensionali (2D), le cellule sono state piastrate in piastre da 96 pozzetti alla densità di  $2 \times 10^4$  cellule per pozzetto. In seguito ad adesione *overnight* delle cellule, il mezzo è stato rimpiazzato con 200 µl di mezzo fresco contenente AuNRs@INU-LA-PEG-FA, AuNRs@INU-LA-PEG-FA/Nut, AuNRs@PHEA-EDA-FA ed AuNRs@PHEA-EDA-FA/Nut alla concentrazione per pozzetto pari a 15, 7,5, 3,75, 1,87 µg/ml di Au<sup>0</sup>, corrispondenti a concentrazioni di nutlin-3 pari a 3, 1,5, 0,75, 0,375 µM. Dopo 24 o 48 h, i campioni sono stati rimossi dai pozzetti e sostituiti da

mezzo fresco (100  $\mu$ l) e 20  $\mu$ l di soluzione di MTS. Le cellule sono state quindi incubate per altre due ore a 37°C ed è stata letta l'assorbanza a 490 nm utilizzando un lettore per piastre Multiskan, Thermo, U.K.).

Le cellule trattate con solo mezzo cellulare sono state utilizzate come controllo negativo. I risultati sono stati espressi come % di vitalità rispetto alle cellule controllo. Soluzioni di nutlin-3 alle stesse concentrazioni testate, impiegate come controllo positivo, sono state preparate da una soluzione madre ottenuta solubilizzando una quantità pesata di nutlin-3 in 100  $\mu$ l di DMSO e diluendo con DMEM arricchito. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato.

Per il saggio di tossicità su colture tridimensionali (3D) di U2OS, gli organoidi sono stati formati e coltivati per 3 giorni come descritto in precedenza. Il quarto giorno, 10  $\mu$ l di mezzo sono stati rimossi e sostituiti con mezzo fresco contenente Au NRs@INU-LA-PEG-FA, AuNRs@PHEA-EDA-FA, AuNRs@INU-LA-PEG-FA/Nut o Au NRs@PHEA-EDA-FA/Nut alle concentrazioni per pozzetto pari a 260, 130, 52, 26, 5,2  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> of Au<sup>0</sup> corrispondenti a concentrazioni di nutlin-3 pari a 50, 25,10, 5, 1  $\mu$ M. Dopo 72 h di incubazione, i campioni sono stati rimossi dai pozzetti, gli organoidi lavati con DPBS e infine sono stati aggiunti 25  $\mu$ l di mezzo fresco e 5  $\mu$ L di soluzione di MTS per ogni pozzetto. Gli organoidi sono stati incubati quindi per 24 h a 37°C ed è stata letta l'assorbanza a 490 nm come descritto in precedenza. Gli organoidi trattati con solo mezzo cellulare sono stati utilizzati come controllo negativo. I risultati sono stati espressi come % di vitalità rispetto agli organoidi controllo. Soluzioni di nutlin-3 alle stesse concentrazioni testate sono state impiegate come controllo positivo. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato.

*Trattamento di termoablazione di cellule U2OS e HDFa.* Per il trattamento di termoablazione su colture bidimensionali, le cellule U2OS e HDFa sono state piastrate in piastre da 96 pozzetti alla densità di  $2 \times 10^4$  cellule per pozzetto e coltivate come descritto in precedenza. In seguito ad adesione *overnight*, le cellule sono state incubate per 4 h con mezzo fresco contenente

AuNRs@INU-LA-PEG-FA, AuNRs@INU-LA-PEG-FA/Nut, AuNRs@PHEA-EDA-FA, AuNRs@PHEA-EDA-FA/Nut o nutlin-3 libero alla concentrazione di 3,75  $\mu\text{g/ml}$  of Au<sup>0</sup> corrispondente a 0,75  $\mu\text{M}$  di nutlin-3. Dopo il tempo di incubazione, i sistemi sono stati rimossi, le cellule lavate per due volte con DPBS ed irradiate con un laser avente 810 nm di lunghezza d'onda, settato alla potenza di  $3.5 \times 10^{-2} \text{ W/mm}^3$ , per 10, 30, 60 e 120 secondi. In seguito al trattamento laser, le cellule sono state incubate per altre 24 h a 37°C. La vitalità cellulare è stata valutata tramite saggio MTS come descritto in precedenza dopo 24 h di post-incubazione seguenti il trattamento laser. Le cellule trattate con lo stesso laser, alla stessa potenza e per gli stessi tempi di esposizione sono state utilizzate come controllo negativo. I risultati sono stati espressi come % di vitalità rispetto alle cellule controllo. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato. Il trattamento di termoablazione è stato eseguito anche su colture tridimensionali di osteosarcoma umano. In particolare gli organoidi sono stati coltivati per tre giorni come già descritto. Il quarto giorno gli organoidi sono stati incubati per 24 h con AuNRs@INU-LA-PEG-FA, AuNRs@PHEA-EDA-FA, AuNRs@INU-LA-PEG-FA/Nut o Au NRs@PHEA-EDA-FA/Nut o nutlin-3 alla concentrazione di 52  $\mu\text{g/ml}$  di Au<sup>0</sup> corrispondenti a nutlin-3 10  $\mu\text{M}$ . Dopo 24 ore di incubazione, gli organoidi sono stati lavati con DPBS e irradiati con il laser ad 810 nm di lunghezza d'onda per 30, 60, 90 e 200 secondi. In seguito al trattamento laser, gli organoidi sono stato incubati per altre 48 ore a 37°C e la vitalità cellulare è stata valutata tramite saggio MTS come descritto precedentemente. Gli organoidi trattati con lo stesso laser, alla stessa potenza e per gli stessi tempi di esposizione sono state utilizzate come controllo negativo. I risultati sono stati espressi come % di vitalità rispetto agli organoidi controllo. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato.

*Determinazione quantitativa dell' internalizzazione cellulare di nutlin-3.* Cellule U2OS e HDFa sono state piastrate alla densità di  $2 \times 10^4$  cellule per pozzetto e coltivate come già descritto. In seguito ad adesione overnight, il

mezzo è stato rimosso e sostituito con 200 µl di mezzo fresco contenente AuNRs@INU-LA-PEG-FA/Nut o AuNRs@PHEA-EDA-FA/Nut o nutlin-3 alla concentrazione di 15 µg/ml Au<sup>0</sup>, corrispondenti a nutlin-3 3 µM e incubate per 4 h a 37°C. Per la determinazione quantitativa della quantità di farmaco internalizzata dalle cellule, queste sono state lavate due volte in DPBS e lisate con 600 µl lysis buffer (1% Triton X-100 in DPBS) a 37°C. 575 µl del lisato cellulare raccolto sono stati liofilizzati e quindi ricostituiti con 500 µl di acetonitrile per estrarre il nutlin-3. Dopo 3 ore di estrazione, il lisato cellulare ricostituito in acetonitrile è stato centrifugato per 5 minuti a 5000 rpm, il surnatante è stato filtrato su un filtro di Nylon con cut-off 0.45 µm e analizzato tramite analisi HPLC utilizzando i parametri descritti in precedenza. I rimanenti 25 µl di lisato cellulare sono stati utilizzati per la determinazione del contenuto di proteine utilizzando il kit di acido bicinconico seguendo il protocollo del fornitore. Per studiare l'internalizzazione del farmaco indotta dall'ipertermia, è stata seguita una procedura analoga a parte il fatto che dopo l'aggiunta di AuNRs@INU-LA-PEG-FA/Nut, Au NRs@PHEA-EDA-FA/Nut o nutlin-3 alle colture cellulari di U2OS e HDFa, le cellule sono state irradiate per 90 secondi con un laser con lunghezza d'onda 810 nm, settato alla potenza di  $3.5 \times 10^{-2}$  W/mm<sup>3</sup>, e quindi incubate per 4 h a 37°C.

*Imaging cellulare di cellule U2OS tramite luminescenza a due fotoni.* L'uptake cellulare dei GNRs rivestiti con INU-LA-PEG-FA e PHEA-EDA-FA è stato valutato qualitativamente tramite luminescenza a due fotoni utilizzando un microscopio confocale dotato di laser multifotone (le cellule sono state visualizzate con una risoluzione 1024x1024 pixel utilizzando un Leica TCS SP5confocal laser scanning microscope with a 63x oil objective NA= 1.4 (Leica Microsystems, Germany).

Le cellule U2OS sono state piastrate in piastre da 8 pozzetti con fondo in vetro, alla densità di  $3 \times 10^3$  per pozzetto e lasciate aderire *overnight*. AuNRs@INU-LA-PEG-FA e AuNRs@PHEA-EDA-FA sono stati aggiunti alla concentrazione finale per pozzetto di 2 µg/ml of Au<sup>0</sup> e incubati per 6 o 24 h. Dopo ciascun tempo di incubazione, le cellule sono state lavate con DPBS e i

nuclei colorati con la sonda 40,6-diamidino-2-fenilindolo (DAPI) diluito 1/600 in DPBS. Dopo 15 minuti di incubazione a temperatura ambiente seguiti da due lavaggi in DPBS, le cellule sono state fissate con la miscela glicerolo/DPBS 80:20 v/v a temperatura ambiente e visualizzate al microscopio confocale.

*Analisi statistiche.* Un T test è stato applicato per confrontare gruppi di campioni differenti. I risultati sono considerati statisticamente significativi con un valore di  $p < 0,05$ . Tutti i valori riportati sono la media di tre esperimenti  $\pm$  la deviazione standard.

# Risultati e discussione

---

## 4.1 NANOSFERE DI ORO RIVESTITE CON UN DERIVATO AMMINICO DELL'INULINA PER IL TRATTAMENTO TUMORE-SPECIFICO DEL CANCRO

*Sintesi del copolimero INU-EDA.* L'inulina, un comune polisaccaride, presenta nella sua struttura numerosi gruppi ossidrilici che possono essere utilizzati per reazioni di *coupling*. Nonostante ciò, questi gruppi ossidrilici presentano una reattività diversa essendo i gruppi primari più reattivi dei secondari. Questo aspetto riduce la riproducibilità delle reazioni di coniugazione eseguibili sul *backbone* di inulina. Pertanto, per migliorare la riproducibilità delle reazioni di *coupling* e per aumentare l'affinità nei confronti dell'oro metallico ( $Au^0$ ), gruppi amminici primari sono stati coniugati all'inulina tramite reazione con etilendiammina (EDA) (M. Licciardi et al. 2014). Il copolimero risultante presenta un'elevata solubilità in  $H_2O$  e un numero ben definito e programmabile di gruppi amminici primari reattivi che permettono successive reazioni di coniugazione, per esempio con la superficie dell'oro, con altre catene polimeriche, con agenti terapeutici e agenti direzionanti. I gruppi ossidrilici primari pendenti presenti nel *backbone* di inulina sono stati prima attivati con BNPC in DMF anidra a  $60^\circ C$  utilizzando un reattore a microonde. Il rapporto molare (R) tra le moli di agente attivante (BNPC) e le unità ripetitive di inulina permette di ottenere un grado di funzionalizzazione preciso e riproducibile dei gruppi ossidrilici del polisaccaride. Ad esempio, utilizzando un R di 0,5 e un tempo di attivazione di 1 h, è stato ottenuto un grado di attivazione dei gruppi ossidrilici pari al 30%. Successivamente, l'inulina attivata è stata fatta reagire con un eccesso di EDA, ottenendo così il copolimero INU-EDA con una funzionalizzazione riproducibile in EDA del 25 mol%. Il peso molecolare e la polidispersità del copolimero così ottenuto sono stati determinati tramite analisi SEC che non ha evidenziato significative

riduzioni del peso molecolare, passando da 6,31 KDa dell'inulina di partenza a 6,5 KDa di INU-EDA.

*Sintesi seed-mediated di nanosfere di oro di 40 nm stabilizzate con tampone citrato.* Seguendo una procedura sintetica messa a punto precedentemente (Bastús, Comenge, and Puntès 2011), è stato possibile realizzare la sintesi e la crescita controllata di *seeds* di oro sfruttando la riduzione dello ione aurico  $\text{Au}^{\text{III}}$  ad  $\text{Au}^0$ , ad opera del citrato in acqua. In particolare, i *seeds* di oro sono stati preparati aggiungendo una soluzione acquosa del precursore  $\text{HAuCl}_4$  ad una soluzione bollente di citrato di sodio e la reazione è stata condotta fino all'ottenimento di una soluzione dal colore rosso-vino. Quindi la temperatura della soluzione di reazione è stata diminuita fino a  $92^\circ\text{C}$ , è stato aggiunto altro precursore  $\text{Au}^{\text{III}}$  e la soluzione è stata diluita con acqua e sodio citrato 2,2 mM. La diminuzione della temperatura fino a  $92^\circ\text{C}$  ha permesso di inibire la formazione di nuovi centri di nucleazione e ha permesso il rallentamento della cinetica di reazione, consentendo di effettuare un controllo più accurato di quest'ultima. Ripetendo la stessa procedura per cinque volte, è stato possibile ottenere nanoparticelle di oro aventi un diametro osservato al TEM di 40 nm (figura 1). La dispersione di oro risultante è stata analizzata anche tramite spettroscopia UV-VIS che ha mostrato una stretta banda di assorbimento SPR a 530 nm (figura 2).

In questo modo sono state ottenute nanoparticelle di oro stabilizzate con citrato in acqua, aventi una ristretta distribuzione dimensionale (tabella 1) e una forma uniforme e quasi-sferica confermata dall'analisi TEM. Questa procedura sintetica permette di inibire la formazione di nuovi centri di nucleazione secondaria durante il processo di crescita omogenea, tramite il controllo di alcuni fattori cinetici di reazione quali la temperatura, il rapporto tra concentrazione di  $\text{Au}^{\text{III}}$  e concentrazione di *seed* ( $\text{Au}^0$ ) e il pH. Questo metodo offre numerosi vantaggi: produce particelle con elevata monodispersità, permette un miglior controllo delle dimensioni e della distribuzione dimensionale delle particelle e porta ad una maggior

concentrazione di particelle rispetto ai metodi tradizionali di sintesi (Turkevich, Stevenson, and Hillier 1951a, 1951b). Inoltre, le particelle di oro sintetizzate con questo metodo, possono essere ulteriormente funzionalizzate con una gran varietà di molecole, in quanto il citrato adsorbito fisicamente può essere facilmente spiazzato da molecole più affini alla superficie dell'oro, come ad esempio tioli ed ammine formando un legame covalente con l' $\text{Au}^0$  energeticamente favorito. Pertanto questo è un metodo sintetico di nanoparticelle sferiche di oro promettente per applicazioni in campo biomedico.

*Preparazione e caratterizzazione di Au@PEG-INU.* Le nanoparticelle di oro rivestite da materiale polimerico idrofilico sono state ottenute aggiungendo una soluzione acquosa del polimero PEG-tiolo (PEG-SH) goccia a goccia ad una dispersione acquosa di nanoparticelle di oro (Au@citrato), in modo da formare uno *shell* polimerico di PEG in grado di conferire eccellenti proprietà *stealth* al sistema. Successivamente, al sistema peghilato, è stata aggiunta una soluzione di INU-EDA, portando in questo modo alla formazione di un sistema dotato di eccellente stabilità chimico fisica e utilizzabile come carrier per agenti terapeutici. La forza trainante che permette la formazione del rivestimento polimerico sulla superficie delle nanoparticelle di oro è l'elevata affinità dell' $\text{Au}^0$  nei confronti di gruppi tiolici ed amminici che porta alla formazione di veri e propri legami covalenti Au-S ed Au-N. In questo modo è stato possibile formare un rivestimento polimerico idrofilo in grado di stabilizzare le nanoparticelle di oro in acqua ed in condizioni simulanti i mezzi fisiologici. Le immagini TEM (Fig.1) mostrano una popolazione di nanoparticelle sferiche con un diametro di circa 40 nm e confermano la presenza di materiale polimerico che riveste le particelle di oro (figura 2b).

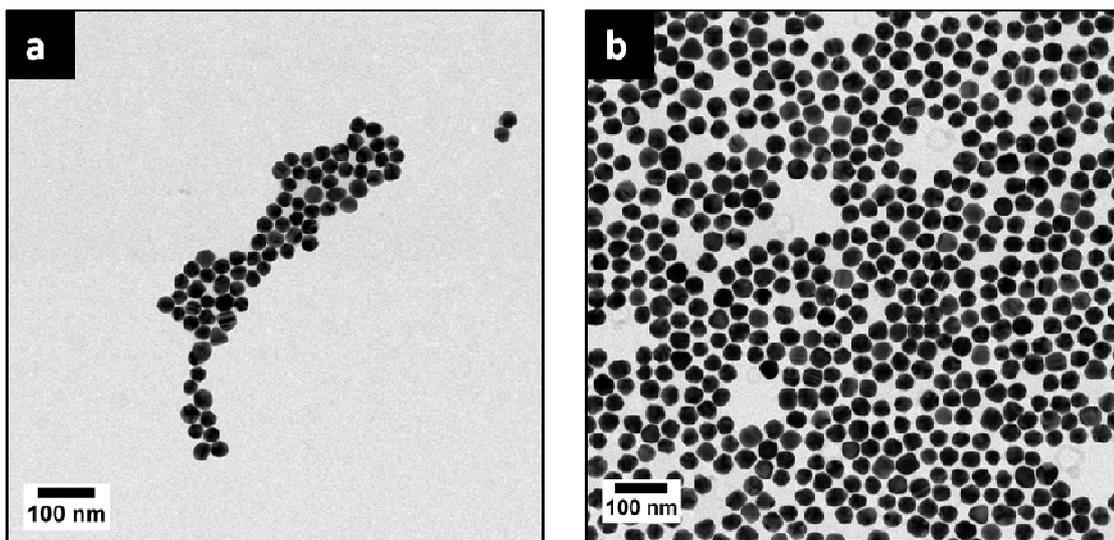


Figura 1. Immagini TEM di Au@citrate (a) e Au@PEG-INU(b). Scale bar 100 nm.

Questi risultati sono stati confermati anche dalle misure di DLS le quali indicano che le particelle Au@PEG-INU osservate al TEM, in H<sub>2</sub>O Milli-Q mostrano un diametro idrodinamico di circa 60 nm e un PDI di 0.19 (tabella. 1). Il leggero incremento del diametro osservato rispetto alle misure TEM è attribuibile alla presenza di una consistente sfera di idratazione dello *shell* polimerico idrofilo presente sulla superficie dell'oro che garantisce la stabilità del sistema. Al fine di conoscere la polarità delle particelle, sono state condotte misure di potenziale Zeta (tabella 1). A conferma dell'avvenuto rivestimento con il polimero INU-EDA, le misure mostrano una netta inversione di segno del potenziale Zeta delle nanoparticelle, da negativo quando sono stabilizzate con citrato o con PEG-SH (rispettivamente -29,1 e -15,2 mV), a positivo (20,5 mV) dopo l'avvenuta funzionalizzazione della superficie dell'oro con il polimero cationico INU-EDA. Tale inversione di segno è attribuibile alla presenza dei gruppi amminici protonati di INU-EDA esposti sulla superficie delle nanoparticelle. Il potenziale Zeta elevato e positivo di Au@PEG-INU è utile per favorire l'*uptake* cellulare e contribuisce a garantire un'elevata stabilità e *shelf life* del sistema che può essere conservato anche come dispersione acquosa a

temperatura ambiente, mostrando inalterate le sue proprietà chimico fisiche.

Tabella 1. Misure di DLS e potenziale Zeta di Au@citrato, Au@PEG, Au@PEG INU, Au@PEG-INU/Doxo in H<sub>2</sub>O Milli-Q.

Campione	Z average (nm)	PDI	$\Psi$ (mV)
Au@citrato	45,14	0,2	-29,1
Au@PEG	54,3	0,18	-15,2
Au@PEG-INU	61,6	0,19	20,5
Au@PEG-INU/Doxo	58,7	0,21	14,3

Per stabilire la capacità del sistema di funzionare come *drug delivery system* è stato caricato un farmaco antitumorale modello, la doxorubicina. È stata scelta questa molecola in quanto possiede proprietà fluorescenti che possono essere sfruttate per valutare il suo *uptake* cellulare tramite un microscopio a fluorescenza e/o un citofluorimetro a flusso. La procedura di *loading* è stata condotta aggiungendo una soluzione di doxorubicina precedentemente trattata con trietilammina (TEA)(M. Licciardi et al. 2014) ad una soluzione di INU-EDA. La risultante soluzione concentrata di farmaco e polimero è stata quindi fatta adsorbire sulla superficie delle nanosfere di oro rivestite con PEG. È stato aggiunto un eccesso molare di TEA alla soluzione di farmaco per ottenere doxorubicina base libera, che presenta una minore solubilità in acqua ed è in grado di interagire meglio col *core* di oro idrofobico. Dopo aver incubato *overnight* il sistema, sono stati eseguiti due lavaggi in acqua Milli-Q e successive centrifugazioni. Il surnatante via via raccolto è stato analizzato tramite spettroscopia UV-VIS ed è stata misurata l'assorbanza a 543 nm per determinare la quantità di farmaco caricata nel sistema per differenza con la quantità di doxorubicina inizialmente

aggiunta. La *drug loading* così calcolata è stata del  $13 \pm 0,5$  % (p/p) e l'efficienza di incorporazione è stata stimata essere del 66%. I risultati delle misure di DLS e potenziale Zeta non mostrano significative variazioni né in termini di diametro idrodinamico né di potenziale Z rispetto al sistema vuoto, non carico di farmaco (tabella 1), facendo supporre che la doxorubicina interagisca prevalentemente col *core* idrofobico di oro mentre le catene di PEG-SH e INU-EDA agiscono da colloidali protettori idrofili saldamente ancorati alla superficie dell'oro. Tali dati mostrano solo un leggero incremento dell'indice di polidispersità. A supporto delle misure di DLS, per valutare la stabilità delle nanoparticelle di oro, dopo il rivestimento con PEG-SH e INU-EDA e dopo il caricamento di doxorubicina è stata eseguita una semplice analisi spettroscopica UV-VIS tra 400 e 800 nm. Come mostrato in figura 2, gli spettri di assorbimento di tutti e tre i sistemi, Au@PEG, Au@PEG-INU e Au@PEG-INU/Doxo dispersi in acqua Milli-Q, non mostrano segni di aggregazione, non essendo presente nessun significativo *red shift* né allargamento della banda di assorbimento SPR rispetto al sistema Au@citrato di partenza, come supportato anche dalle immagini TEM (figura 2b).

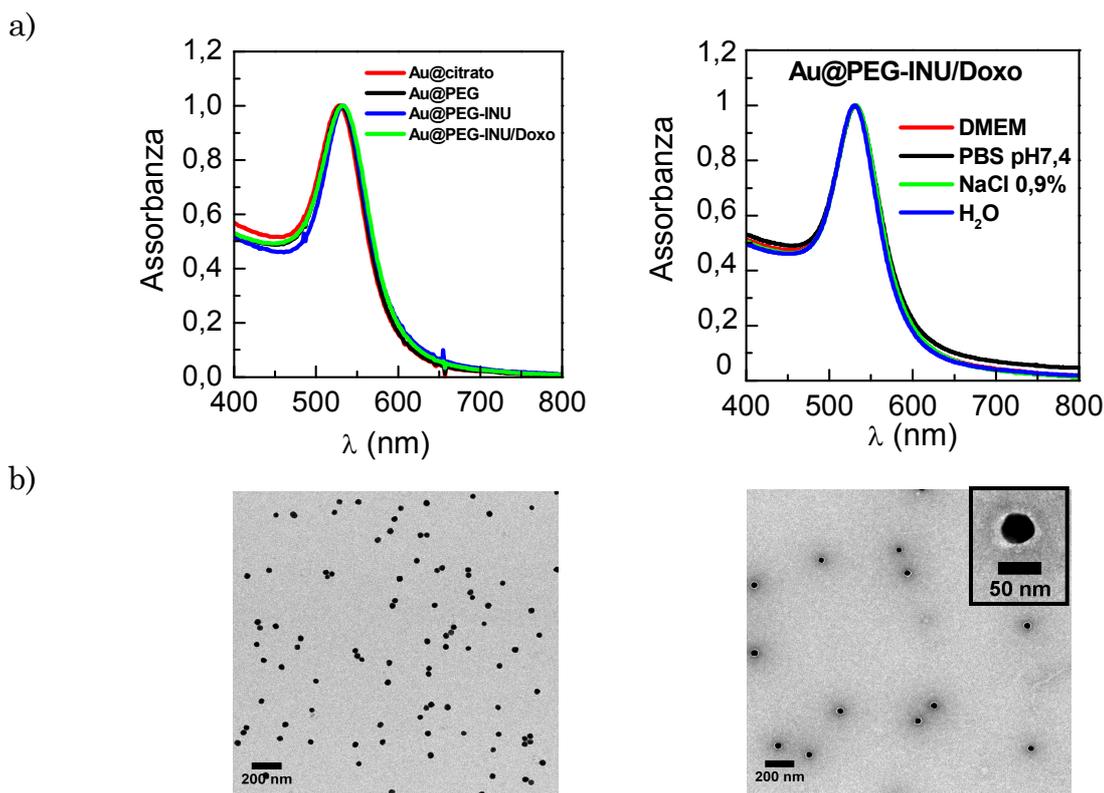
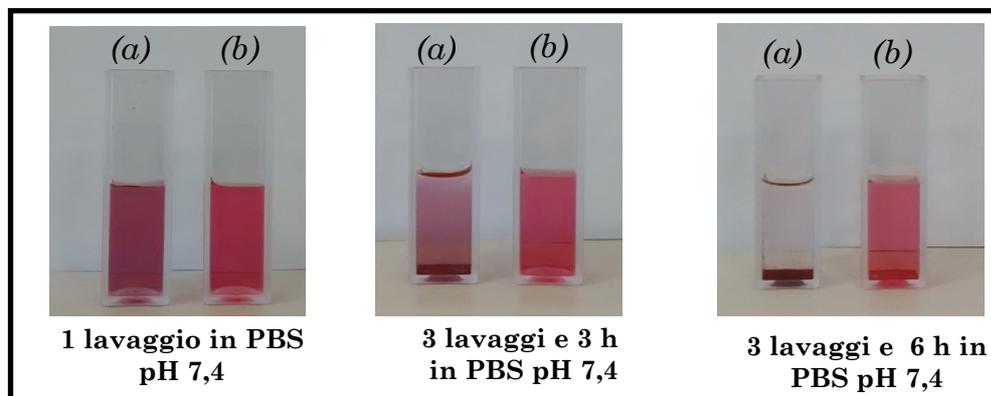


Figura 2. Spettri UV-VIS dei sistemi Au@citrato, Au@PEG, Au@PEG-INU, Au@PEG-INU/Doxo in H<sub>2</sub>O Milli-Q (a). Immagini TEM delle nanosfere Au@citrato di partenza (sinistra) e Au@PEG-INU/Doxo (destra). L'inset mette in risalto lo shell organico di rivestimento di una singola nanosfera di oro.

Per comprendere meglio l'effettiva importanza di utilizzare oltre al PEG-tiolo anche INU-EDA come agente di rivestimento, sono stati confrontati i sistemi Au@PEG-INU/Doxo e il suo analogo Au@PEG Doxo non funzionalizzato con INU-EDA. Quest ultimo è stato preparato utilizzando la stessa procedura vista per Au@PEG-INU/Doxo ma senza aggiungere il polimero INU-EDA durante l'incorporazione del farmaco. In particolare sono state studiate la capacità di *loading* e la stabilità in tampone PBS a pH 7,4 dei sue sistemi. Per il sistema privo di INU-EDA, Au@PEG Doxo, la quantità di doxorubicina caricata nel sistema è stata calcolata essere pari al  $5 \pm 0,8\%$  p/p, con un'efficienza di incorporazione del 29%. Questi valori, se confrontati con quelli di Au@PEG-INU/Doxo (drug loading:  $13 \pm 0,5\%$  p/p,

efficienza di incorporazione: 66%) dimostrano chiaramente che INU-EDA permette di caricare più del doppio di doxorubicina rispetto al sistema contenente solo PEG. Ad ulteriore conferma dell'importanza che riveste INU-EDA nel sistema, gli studi di stabilità condotti in PBS pH 7,4 hanno dimostrato che tale polimero ne aumenta notevolmente la stabilità nel suddetto tampone. In figura 3a è possibile osservare una graduale aggregazione fino alla completa precipitazione di Au@PEG/Doxo, dopo 3 lavaggi e dopo 6 ore a 25°C in PBS a pH 7,4. Questa progressiva destabilizzazione del sistema privo di INU-EDA è stata monitorata tramite spettroscopia UV-VIS che ha mostrato, in accordo con quanto osservato, un graduale *red shift* e allargamento della banda di assorbimento SPR di Au@PEG/Doxo (Figura 3b). Al contrario, il sistema funzionalizzato con INU-EDA mostra inalterate le sue caratteristiche chimico fisiche anche dopo ripetuti lavaggi e dopo due settimane nello stesso tampone a 4°C.

a)



b)

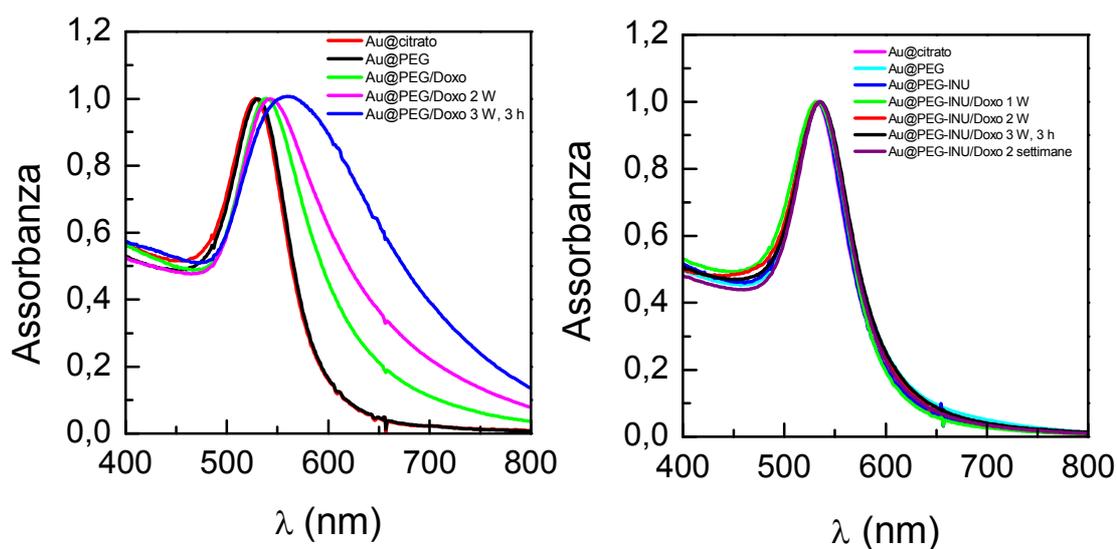


Figura 3. Studi di stabilità dei sistemi Au@PEG Doxo e Au@PEG-INU/Doxo in PBS pH 7,4. In figura 3a) sono mostrate le fotografie dei sistemi Au@PEG/Doxo (A) e Au@PEG-INU/Doxo (B) dopo 1 lavaggio in PBS pH 7,4 (I), dopo 3 lavaggi e 3 ore in PBS pH 7,4 a 25°C (II) e dopo 3 lavaggi e 6 ore in PBS pH 7,4 a 25°C (III). In figura 3b) sono riportati gli spettri UV-VIS di Au@PEG/Doxo (A) e Au@PEG-INU/Doxo (B) in PBS pH 7,4.

*Studi di rilascio.* Al fine di valutare la capacità del sistema Au@PEG-INU/Doxo di rilasciare il farmaco modello caricato, sono stati condotti studi di rilascio utilizzando due differenti tamponi, simulanti due diversi compartimenti dell'organismo. In particolare, sono stati utilizzati: tampone fosfato (PBS) a pH 7,4 che mima il mezzo fisiologico del plasma e dei fluidi interstiziali e un tampone fosfato a pH 5,5 che mima il pH endosomiale e lisosomiale. Durante gli esperimenti di rilascio ai due diversi valori di pH, è stata determinata la quantità di doxorubicina rilasciata nel mezzo esterno, a intervalli di tempo predeterminati, fino a 48 h. In figura 4 è riportata la quantità di doxorubicina rilasciata espressa come percentuale di farmaco rilasciato in funzione del tempo, rispetto alla quantità totale di doxorubicina caricata nel sistema. Come si evince dai profili di rilascio, il sistema nanoparticellare Au@PEG-INU/Doxo è in grado di rilasciare doxorubicina, nella sua forma biologicamente attiva, per un periodo di tempo prolungato e senza la presenza di un "burst effect" iniziale ad entrambi i valori di pH. Ad esempio, dopo 48 h, circa il 13 % e il 15 % della doxorubicina caricata nel sistema è stata lentamente rilasciata rispettivamente in PBS pH 7,4 e in PBS pH 5,5, garantendo pertanto il lento rilascio del farmaco una volta raggiunta la massa tumorale.

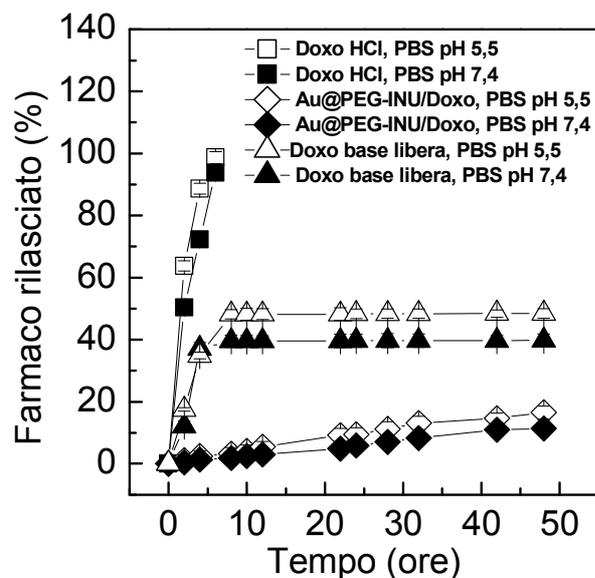


Figura 4. Profilo di rilascio di Au@PEG-INU/Doxo e doxorubicina idrocloruro in PBS pH 7,4 e PBS pH 5,5

*Studi biologici in vitro.* L'efficacia del *nanocarrier* proposto in questo studio è stata stabilita indirettamente valutando la citotossicità dei sistemi Au@PEG INU, Au@PEG-INU/Doxo e doxorubicina idrocloruro su due linee cellulari tumorali ovvero le cellule del cancro della cervice uterina umano (Hela) e le cellule del cancro polmonare umano (A549). Entrambe queste linee cellulari sono utilizzate per studiare l'attività anticancro di farmaci ed il loro meccanismo di azione. Il test utilizzato per valutare la vitalità cellulare è stato il saggio MTT. Questo test è basato sulla capacità delle cellule vive di metabolizzare il composto bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) nel corrispettivo formazano, insolubile in mezzo cellulare, di colore blu/viola. Dopo la successiva rottura delle membrane cellulari con DMSO e solubilizzazione del formazano con lo stesso solvente, la colorazione impartita da questo metabolita è stata quantificata spettrofotometricamente misurando l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 550 nm. L'assorbanza così misurata è proporzionale al numero di cellule vive in coltura. In figura 5 sono riportati i profili di citotossicità dopo 48 e 72 h di incubazione di Au@PEG-INU/Doxo e doxorubicina idrocloruro con le cellule Hela (Fig. 5a) e le A549 (Fig. 5b). Sono state utilizzate concentrazioni di sistema comprese tra 100 e 16 µg/ml di Au<sup>0</sup> corrispondenti a concentrazioni di doxorubicina comprese tra 10 µg e 1,6 µg/ml per pozzetto, queste ultime corrispondenti alle concentrazioni della sola doxorubicina testata nel controllo positivo. Le figure 5a e 5b mostrano un profilo di tossicità dose dipendente della doxorubicina da sola per entrambe le linee cellulari passando ad esempio nel caso delle *Hela cells* da un 19,2 % di vitalità cellulare alla concentrazione di 1,6 µg/ml all' 1% alla concentrazione di 10 µg/ml dopo 48 h di incubazione. Dopo 72 h di incubazione con la sola doxorubicina, per entrambe le linee cellulari, la vitalità è risultata essere praticamente nulla ovvero prossima allo 0%. Per Au@PEG-INU non sono stati evidenziati effetti di tossicità rilevanti né a 48 né a 72 h per tutte le concentrazioni testate, rispetto al controllo di sole cellule, indicando una buona citocompatibilità del sistema vuoto (Fig 5c). Di contro, il profilo di citotossicità del sistema Au@PEG-INU/Doxo non

presenta un andamento propriamente dose dipendente, sia dopo 48 h che dopo 72 h di incubazione. La variazione di citotossicità osservata a differenti concentrazioni rientra infatti nel range della deviazione standard. In particolare il sistema Au@PEG-INU/Doxo possiede un effetto citotossico più accentuato nei confronti delle *Hela cells* rispetto alle cellule del cancro polmonare A549 specialmente dopo 48 h di incubazione e per concentrazioni di Doxo comprese tra 5 e 1,6  $\mu\text{g/ml}$ . Infatti ad esempio dopo 48 h di incubazione e alla concentrazione di 5  $\mu\text{g/ml}$ , la vitalità cellulare delle Hela e delle A549 risultata essere rispettivamente del 44% e del 72%. Pertanto, dopo 48 h di incubazione, le *Hela cells* presentano una maggiore sensibilità nei confronti del sistema testato rispetto alle A549. Degno di nota è il fatto che la tossicità del sistema dopo 72 h è più alta rispetto a quella dopo 48 h, suggerendo che le nanoparticelle cariche di farmaco sono efficientemente internalizzate nel citosol dove formano una sorta di *reservoir* intracellulare di farmaco che è gradualmente rilasciato ed internalizzato nel nucleo dove la doxorubicina può esplicare il suo meccanismo d'azione.

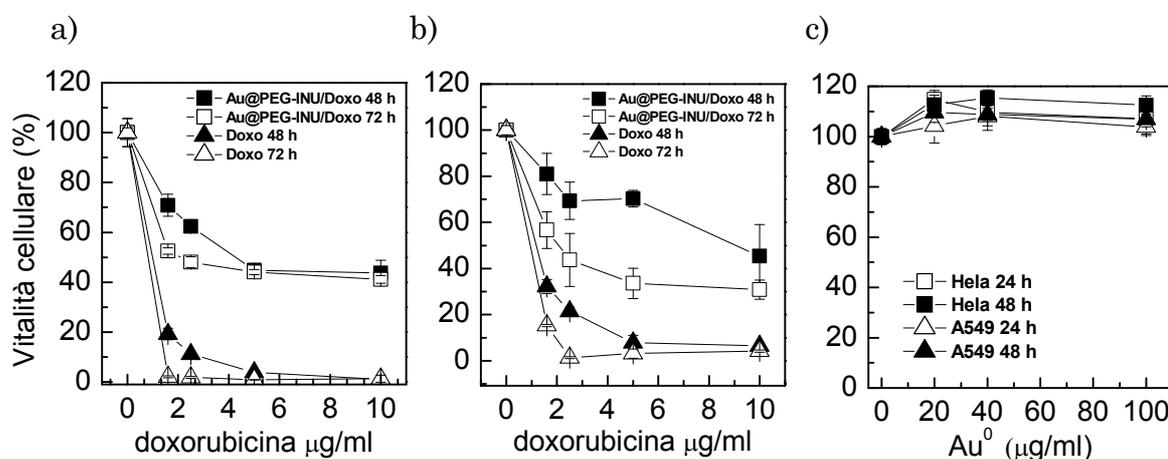


Figura 5. Citotossicità (saggio MTT) su cellule del cancro della cervice uterina (Hela) a) e su cellule del cancro polmonare umano (A549) b) di doxorubicina da sola utilizzata come controllo positivo e Au@PEG-INU/Doxo. Il grafico c) mostra il profilo di citocompatibilità del sistema vuoto Au@PEG-INU su entrambe le linee cellulari. Tempo di incubazione 48 e 72 h.

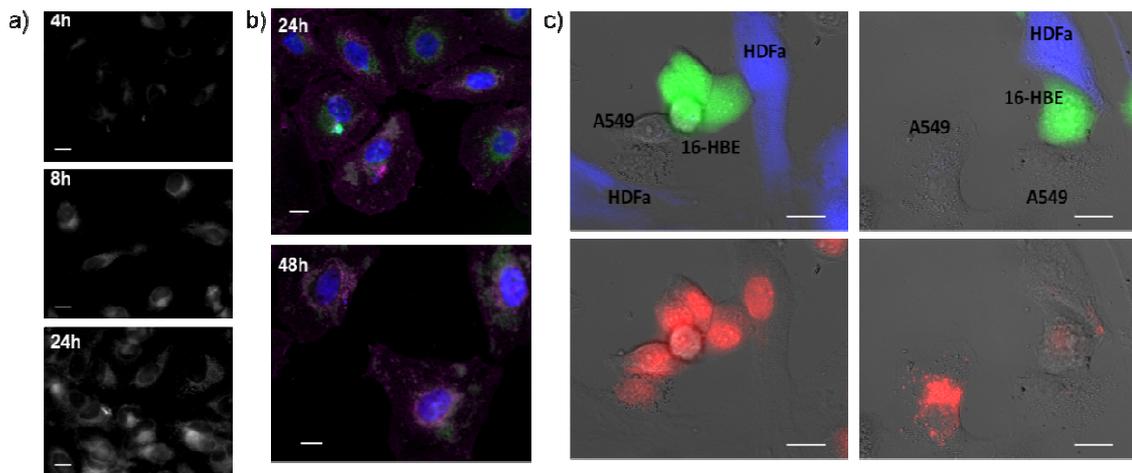
Tabella 2. IC50 dopo 48 h e 72 h di incubazione di doxorubicina libera e Au@PEGINU Doxo con cellule A549 ed HeLa

Campione	IC <sub>50</sub> <sup>48h</sup> (μM)	IC <sub>50</sub> <sup>72h</sup> (μM)	IC <sub>50</sub> <sup>48h</sup> (μM)	IC <sub>50</sub> <sup>72h</sup> (μM)
	A549	A549	HeLa	HeLa
doxorubicina libera	0,88	0,4	0,97	1,12
Au@PEG-INU/Doxo	3,8	1,9	8,08	2,08

Sebbene i valori di IC50 dopo 48 e 72 h sulle linee cellulari A549 e HeLa riportati in tabella 2 mostrino chiaramente una maggiore tossicità della doxorubicina libera rispetto al sistema Au@PEG-INU/Doxo, quest'ultimo è caratterizzato dalla capacità di essere internalizzato preferenzialmente dalle cellule tumorali come dimostrato qualitativamente tramite un microscopio a fluorescenza. In particolare questo comportamento selettivo è stato studiato incubando cellule A549 (Fig 6 sezione I) e cellule MCF7 (Fig 6 sezione II) del cancro della mammella umano con Au@PEG-INU/Doxo alla concentrazione di 4 μg/ml di doxorubicina. Le immagini ottenute dopo 4 h di incubazione con doxorubicina mostrano che il farmaco libero è rapidamente accumulato nel nucleo di entrambe le linee cellulari già dopo 4 ore di incubazione (Fig 6a). Invece nel caso di Au@PEG-INU/Doxo, dopo 4 h di incubazione, l'intensità di fluorescenza maggiore si nota nel citoplasma cellulare (immagini non riportate) senza sostanziali differenze dopo 24 e 48 h di incubazione (Fig 6b) mostrando chiaramente la differenza nel rilascio della doxorubicina dal sistema colloidale rispetto al farmaco libero. Questi dati biologici dimostrano che Au@PEG-INU/Doxo è efficientemente internalizzato da entrambe le linee cellulari, creando un *reservoir* di farmaco dentro le cellule che viene lentamente rilasciato nella sua forma biologicamente attiva al nucleo. Inoltre è stata studiata la capacità di Au@PEG-INU/Doxo di accumularsi preferenzialmente in cellule tumorali piuttosto che nelle cellule sane non tumorali (ovvero 16HBE e HDFa),

ottenendo pertanto un accumulo selettivo nelle cellule maligne ed evitando di danneggiare le cellule ed i tessuti sani, come spesso accade per i farmaci chemioterapici convenzionali (Nie et al. 2007). Al fine di studiare l'accumulo selettivo sono stati messi a punto due modelli di co-coltura costituiti da cellule tumorali e/o cellule epiteliali e fibroblasti. Dopo 90 minuti di incubazione con il sistema Au@PEG-INU/Doxo e doxorubicina libera, le cellule sono state lavate e visualizzate al microscopio. In figura 6c (immagine di destra) è mostrato l'uptake preferenziale della doxorubicina nella tripla co-coltura A549/16HBE/HDFa (sezione I) e nella doppia co-coltura MCF7/HDFa. In particolare la doxorubicina quando è veicolata tramite il sistema nanoparticellare si accumula nelle cellule tumorali (A549 o MCF7) in misura maggiore rispetto alle cellule epiteliali e ai fibroblasti, supportando la ben nota aumentata attività metabolica e di fagocitosi delle cellule tumorali rispetto a quelle sane (Y. Zhao, Butler, and Tan 2013). Invece, la doxorubicina libera diffonde indistintamente senza alcuna discriminazione sia nelle cellule tumorali che sane (figura 6c immagine di sinistra), spiegando la ben nota tossicità di questo farmaco nei confronti delle cellule e dei tessuti sani.

I)



II)

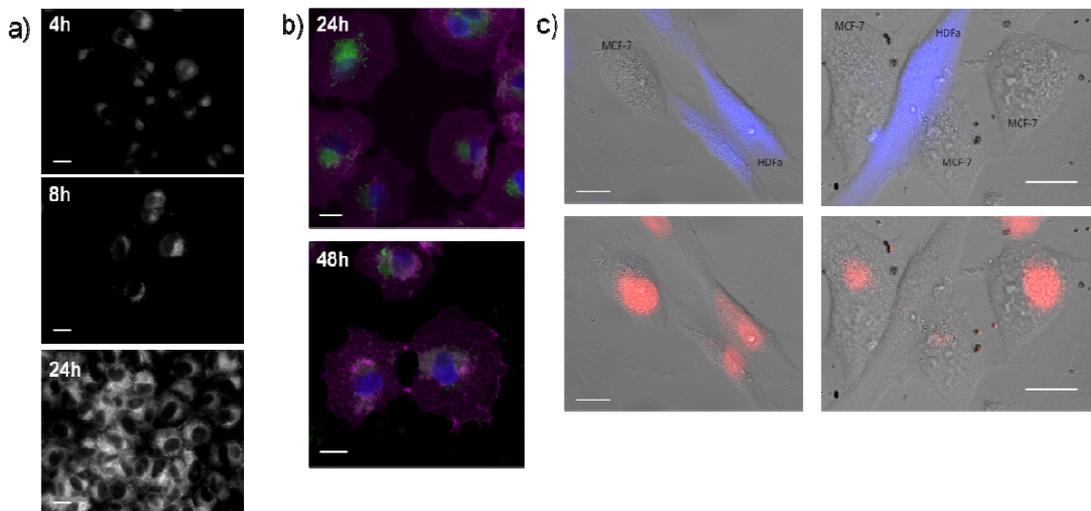


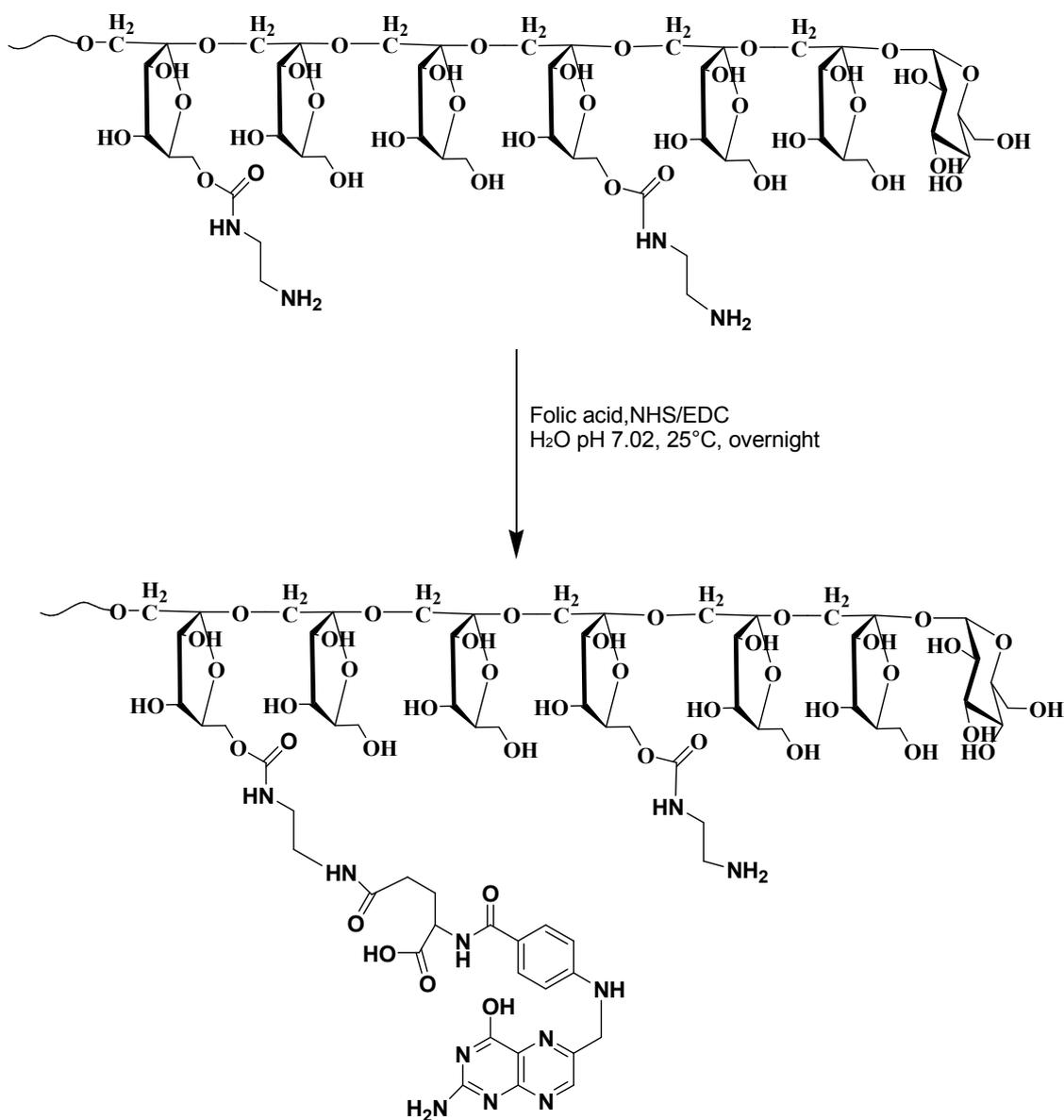
Figura 6. Immagini del microscopio a fluorescenza di cellule A549 (sezione I) e MCF7 (sezione II) incubate con doxorubicina libera (a) e Au@PEG-INU/Doxo (b) dopo 4, 8 e 24 e 48 h di incubazione. La doxorubicina è visualizzata in verde; il nucleo cellulare in blu (DAPI) e la membrana cellulare in rosa (WGA647). (c) co-coltura di cellule A549 del cancro polmonare umano, cellule epiteliali bronchiali umane (16HBE) e fibroblasti umani (HDFa). 16HBE e HDFa sono state preventivamente marcate con i coloranti di membrana CMFDA (verde) e CMF2HC (blu) rispettivamente. La doxorubicina libera diffonde in egual misura in tutte e tre le linee cellulari (immagini di sinistra) mentre si osserva un uptake preferenziale di

Au@PEG-INU/Doxo da parte delle cellule tumorali A549 ed MCF7 (immagini di destra). Per chiarezza lo *staining* con la sonda fluorescente colorante di membrana è mostrato in alto e la doxorubicina in basso. Scale bar: 20  $\mu\text{m}$ .

#### 4.2 PREPARAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI NANOSFERE DI ORO RIVESTITE CON UN DERIVATO DELL'INULINA CONIUGATO CON ACIDO FOLICO PER IL RILASCIO DIREZIONATO DI DOXORUBICINA ALLE CELLULE DEL CANCRO DELLA MAMMELLA.

*Sintesi del copolimero INU-FA.* La proliferazione incontrollata delle cellule tumorali maligne richiede un elevato consumo di folato per la replicazione del DNA, portando ad una sovraespressione del recettore per il folato (FRs) in tumori quali cancro al seno, ovarico, all'utero, colon, polmone e rene ecc. Nei tessuti sani, i FRs sono presenti in basse concentrazioni o in zone non accessibili al flusso sanguigno. Queste caratteristiche hanno incoraggiato la sintesi di un nuovo derivato folato-coniugato dell'inulina, INU-FA, proposto in questo lavoro come polimero di rivestimento per nanosfere di oro di 40 nm, al fine di favorire l'endocitosi mediata dai recettori per il folato del nanosistema antitumorale proposto e ottenere pertanto un effetto citotossico selettivo nei confronti delle cellule maligne. In un primo step sintetico, utilizzando condizioni sperimentali precedentemente standardizzate (M. Licciardi et al. 2014), l'inulina è stata parzialmente funzionalizzata con etilendiammina, EDA, ( $DD_{\text{EDA}}$  del 25 mol % rispetto alle unità ripetitive di inulina) in modo da introdurre gruppi amminici primari pendenti che possono essere sfruttati per eseguire funzionalizzazioni successive del *backbon* polimerico principale. Il secondo step sintetico ha previsto la funzionalizzazione del derivato amminico ottenuto nel primo step, INU-EDA, con acido folico (FA), utilizzando EDC ed NHS come agenti attivanti del gruppo carbossilico in posizione  $\gamma$  dell'acido folico (Cavallaro et al. 2006), come mostrato nello schema 1, portando in tal modo alla formazione di un legame ammidico. Le condizioni stechiometriche impiegate sono state: moli

di FA/moli di gruppi amminici in INU-EDA = 0,3; moli di EDC-HCl/moli di FA = 1,5; moli di NHS/moli di FA = 1,5.



Schema 1. Sintesi del copolimero INU-FA

La quantità di acido folico legata al copolimero INU-EDA è stata determinata tramite due metodi spettroscopici:  $^1\text{H}$  NMR e UV. La risonanza magnetica nucleare del protone ha permesso una facile quantificazione delle molecole di FA legate covalentemente all'INU-EDA (Figura 2), confrontando gli integrali dei picchi a  $\delta$  7,52– 6,69, attribuibili ai protoni degli anelli aromatici del FA, con quelli a  $\delta$  3,55–4,19 appartenenti ai protoni del

*bakbone* di inulina. Il grado di derivatizzazione in FA ( $DD_{FA}$  mol%) è stato determinato anche tramite spettroscopia UV, misurando l'assorbanza di una quantità esattamente pesata del copolimero INU-FA in acqua Milli-Q a pH 8 per NaOH 1N a  $\lambda$  364 nm, e confrontando questo valore con quello di una curva di calibrazione ottenuta da soluzioni standard di acido folico nello stesso solvente.

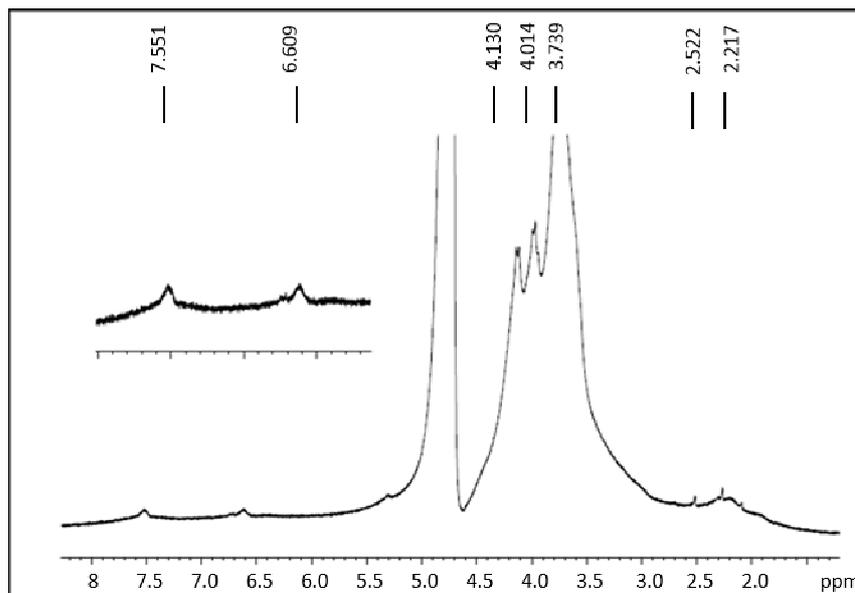


Figura 2. Spettro  $^1\text{H}$  NMR (300MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) del copolimero INU-FA. I dati spettroscopici sono in accordo con la struttura attribuita:  $\delta$  2,72-3,17 (4H EDA,  $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ ), 3,611–3,704 (5H INU,  $-\text{CH}_2-\text{OH}$ ;  $-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{OH}$ ;  $-\text{C}-\text{CH}_2-\text{O}-$ ), 3,99–4,12 (2H INU,  $-\text{C}-\text{CH}-\text{OH}$ ;  $-\text{CH}-\text{OH}$ ), 6,68–7,5 (H FA, anelli aromatici).

La derivatizzazione in FA ( $DD_{FA}$  %) calcolata tramite spettroscopia  $^1\text{H}$  NMR e UV è risultata essere in media pari al 5,45 mol% rispetto alle unità ripetitive di inulina. Il copolimero INU-FA così ottenuto possiede ancora numerosi gruppi amminici liberi, necessari per il successivo rivestimento delle GNPs. Il peso molecolare medio pesato ( $M_w$ ) e la polidispersità dei copolimeri sintetizzati sono stati determinati tramite analisi SEC e i risultati ottenuti sono stati riportati in tabella 1. L'incremento del peso

molecolare medio pesato di INU-EDA ed INU-FA rispetto al polimero di partenza è un'ulteriore conferma dell'avvenuta derivatizzazione dell'inulina rispettivamente con EDA e con FA, e dimostra che non è avvenuta nessuna significativa frammentazione del *backbone* polimerico principale durante le procedure sintetiche.

Tabella 1. Peso molecolare ( $M_w$ ) e polidispersità dell' inulina e dei copolimeri suoi derivati

Copolimeri	$M_w$ (KDa)	$(M_w/M_n)$
inulina	6,31	1,27
INU-EDA	6,5	1,31
INU-FA	6,7	1,24

*Preparazione e caratterizzazione di GNPs rivestite con INU-FA (Au@INU-FA).* Nanosfere di oro di 40 nm di diametro sono state rivestite con il copolimero INU-FA tramite l'adsorbimento chimico del derivato foltoconiugato dell'inulina sulla superficie delle GNPs sfruttando l'elevata affinità dell'oro per i gruppi amminici primari liberi del coniugato polimerico. È stato ottenuto in tal modo un rivestimento polimerico in grado di conferire stabilità in mezzo acquoso alle GNPs. La funzionalizzazione della superficie delle GNPs è stata eseguita utilizzando una base organica, la trietilammina (TEA), in modo da deprotonare completamente i gruppi amminici pendenti presenti in INU-FA, ed evitando pertanto fenomeni di aggregazione causati da interazioni elettrostatiche tra il copolimero carico positivamente e le GNPs aventi carica negativa (Griffiths et al. 2013).

Questa semplice accortezza dell'impiego di una base organica nella procedura di coating ha permesso di superare processi di rivestimento più complessi che fanno uso ad esempio di agenti prestabilizzanti quali il PEG per prevenire l'aggregazione indesiderata delle GNPs (Li Volsi et al. 2016).

Le funzioni di questo rivestimento polimerico sono molteplici: in primo luogo INU-FA agisce da colloide protettore idrofilo stabilizzando in tal modo la dispersione delle GNPs in mezzo acquoso; inoltre il copolimero di rivestimento INU-FA si comporta da agente direzionante per realizzare una terapia direzionata al tessuto tumorale che sovraesprime i FRs. Infine, tale rivestimento polimerico può aumentare la % di caricamento del farmaco antiitumorale per mezzo di interazioni fisiche. La presenza del rivestimento polimerico sulla superficie delle GNPs è stata dimostrata qualitativamente tramite analisi a dispersione di raggi X (Figura 3). Questa ha mostrato i caratteristici picchi di carbonio, ossigeno e azoto presenti nel rivestimento polimerico delle GNPs.

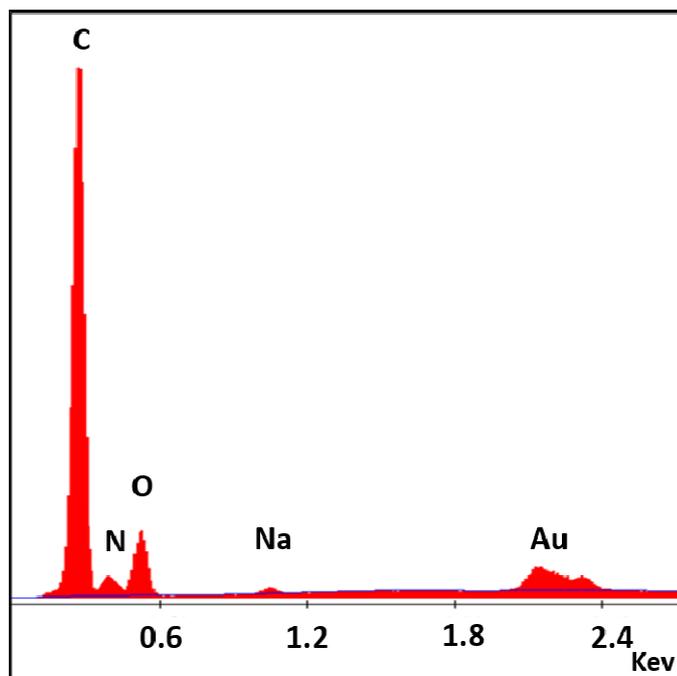


Figura 3. Analisi chimica a dispersione di energia di raggi X della superficie di Au@INU-FA.

La stabilità del nanosistema in differenti mezzi acquosi è stata studiata tramite spettroscopia UV-VIS. In Figura 4 si può osservare un lieve *redshift* della banda SPR (~530 nm) di Au@INU-FA senza nessun allargamento o appiattimento di quest'ultima (Figura 4a), dimostrando pertanto l'assenza

di fenomeni di aggregazione delle particelle Au@citrato di partenza osservate nelle immagini TEM (Figura 4b), in tutti i mezzi testati.

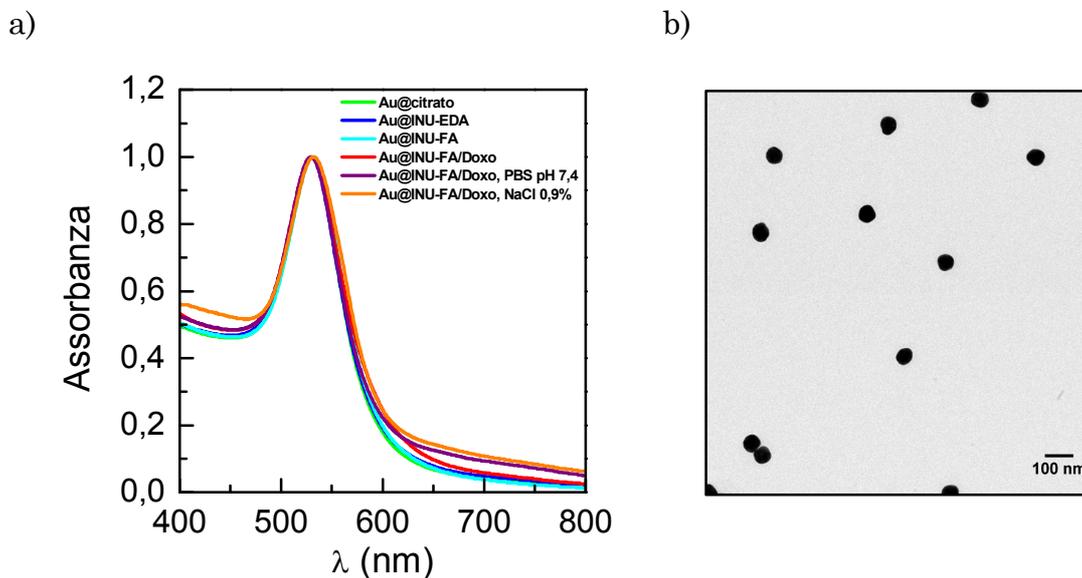


Figura 4. Spettri UV-VIS dei nanosistemi Au@citrato, Au@INU-EDA, Au@INU-FA, and Au@INU-FA/Doxo (a), mostrandoti un stretta banda SPR a circa 530 nm e la stabilit  del sistema carico di doxorubicina Au@INU-FA/Doxo in diversi mezzi:

PBS pH 7,4, NaCl 0,9% p/v, e acqua Milli-Q. Immagini TEM delle particelle Au@citrato di partenza (b).

Inoltre, anche il profilo UV del sistema carico di farmaco non ha mostrato nessun segno di appiattimento della banda SPR, dimostrando anche in questo caso l'assenza di aggregazione in seguito al processo di caricamento di doxorubicina nel sistema. Le misure di dynamic light scattering hanno supportato i risultati ottenuti tramite spettroscopia UV-Vis, mostrando uno Z average del diametro idrodiamico di tutti i sistemi compreso fra 40 e 45 nm (tabella 2).

Tabella 2. Misure di DLS, valori di potenziale Z, di drug loading % e di efficienza di incapsulazione % di Au@citrato, Au@INU-FA e Au@INU-FA/Doxo in acqua Milli-Q (0,1 mg Au<sup>0</sup>/ ml)

Campione	Z-average (nm)	PDI	Potenziale Z (mV)	Drug loading % p/p*	Efficienza di incapsulazione % p/p
Au@citrato	42,1	0,12	-29,1	-	-
Au@INU-FA	45,05	0,14	-11,2	-	-
Au@INU-FA/Doxo	40,7	0,21	-10,7	18±2	93

\**misurata tramite analisi HPLC*

Le nanoparticelle Au@INU-FA stabilizzate dal derivato folato-coniugato dell'inulina INU-FA, si sono rivelate in grado di caricare un'adeguata quantità di farmaco anticancro doxorubicina. Quest'ultima è stata scelta come farmaco anticancro in quanto è ampiamente impiegata nella pratica clinica nel trattamento della leucemia, del linfoma di Hodgkins e altri tumori maligni quali ad esempio il cancro della vescica, della mammella, dello stomaco, del polmone e delle ovaie e ancora per altre tipologie di tumori (Alison Brayfield 2013). Il caricamento del farmaco è stato eseguito aggiungendo una soluzione acquosa di INU-FA e doxorubicina idrocloruro, preventivamente trattata con un eccesso in moli di base organica TEA, ad una dispersione di nanosfere Au@citrato. Le forze trainanti che hanno permesso il caricamento di doxorubicina nel sistema Au@INU-FA per ottenere così il sistema carico Au@INU-FA/Doxo sono sia interazioni di tipo chimico che fisico. In particolare la componente più debole delle interazioni doxorubicina-GNPs è attribuibile alla formazione di complessi elettrostatici che si formano tra i gruppi amminici della doxorubicina e gli ioni AuCl<sub>4</sub><sup>-</sup>/AuCl<sub>2</sub><sup>-</sup> presenti sulla superficie delle GNPs. Invece, la componente più forte delle interazioni in questione è da ricercare nella formazione di un specie che presenta legami di tipo covalente [AuCl(NH<sub>2</sub>R)] (Kumar et al. 2003).

Inoltre la doxorubicina potrebbe interagire anche con il backbone principale di inulina del polimero di rivestimento e con gli anelli aromatici dei residui di acido folico presenti nel copolimero INU-FA. La quantità di farmaco caricato nel sistema è stata valutata tramite analisi HPLC ed è risultata pari al 18% p/p con un'efficienza di incapsulazione vicina al 90% (tabella 2). Le misure di DLS eseguite sul sistema carico Au@INU-FA/Doxo non hanno mostrato variazioni significative né in dimensioni né in potenziale Zeta rispetto al sistema Au@INU-FA non carico di farmaco (tabella 2).

*Studi di rilascio della doxorubicina.* Per valutare la capacità di Au@INU-FA/Doxo di rilasciare la doxorubicina caricata, sono stati condotti studi di rilascio in due mezzi simulanti diversi compartimenti del corpo umano. In particolare, sono state utilizzate una soluzione di tampone fosfato (PBS) a pH 7,4 che mima il mezzo fisiologico ed una di PBS a pH 5,5 che simula gli ambienti endosomiali e lisosomiali. Gli esperimenti di rilascio hanno permesso di determinare la quantità di doxorubicina rilasciata in ciascun mezzo di rilascio, ad intervalli di tempo prestabiliti, utilizzando come controllo la forma basica della doxorubicina (-NH<sub>2</sub>), ovvero la forma impiegata nella procedura di caricamento. In figura 5 è mostrato il rilascio cumulativo % di doxorubicina rispetto alla quantità totale di doxorubicina caricata nel sistema, in funzione del tempo di incubazione. Il sistema Au@INU-FA/Doxo si è dimostrato in grado di rilasciare doxorubicina per un periodo di tempo prolungato, senza “burst effect” iniziale, per entrambi i valori di pH. Ad esempio, dopo 48 h, è stata rilasciata lentamente circa il 18% ed il 23% della doxorubicina caricata, rispettivamente in PBS pH 7,4 e pH 5,5, indicando pertanto la capacità del sistema di rilasciare lentamente farmaco dopo essersi accumulato nella massa tumorale (Davis, Chen, and Shin 2008).

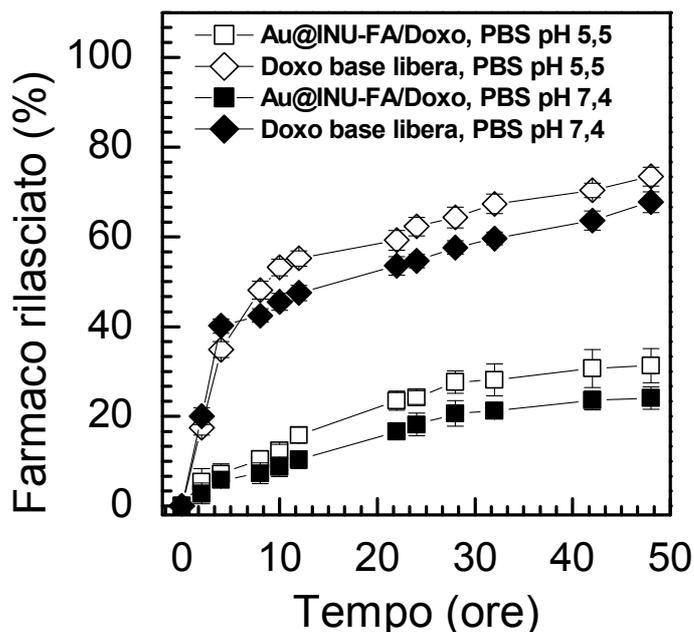


Figura 5. Percentuale di doxorubicina rilasciata da Au@INU-FA/Doxo in funzione del tempo, in PBS pH 7,4 e pH 5,5. La doxorubicina nella forma di base libera (-NH<sub>2</sub>), non caricata nel sistema nanoparticellare, è stata utilizzata per determinare la diffusione di quest'ultima dalla membrana da dialisi.

*Studi biologici in vitro.* L'effetto citotossico del sistema Au@INU-FA/Doxo è stato studiato tramite saggio MTS su cellule del cancro della mammella (MCF7) e su cellule dell'epitelio bronchiale umano (16HBE), quest'ultime scelte come modello di cellule non tumorali. Le cellule sono state incubate con Au@INU-FA, con Au@INU-FA/Doxo e con doxorubicina libera per 4h, 24h e 48h, alle concentrazioni di 330, 165, 82,5, 41,2, e 20,62 µg/ml di Au<sup>0</sup> corrispondenti a concentrazioni di doxorubicina pari a 100, 50, 25, 12,5, e 6,125 µM per pozzetto. Il sistema non carico di farmaco Au@INU-FA non ha mostrato alcun effetto citotossico in nessuna delle due linee cellulari, con differenze di tossicità trascurabili dopo 4, 24 e 48 h di incubazione e per tutto il range di concentrazioni testate, indicando una buona citocompatibilità del sistema vuoto anche alla concentrazione più alta testata (dati non mostrati). Invece, la doxorubicina libera utilizzata come controllo positivo si è dimostrata altamente citotossica per entrambe le linee

cellulari anche alla concentrazione più bassa testata (Figura 6a), non essendo in grado di discriminare fra cellule tumorali e sane. D'altra parte, è interessante notare in figura 6b che le cellule tumorali MCF7 si sono mostrate significativamente più sensibili all'effetto citotossico di Au@INU-FA/Doxo rispetto alle cellule non tumorali 16HBE, per tutti e tre i tempi di incubazione testati, come confermato dai valori di IC50 a 24 h e 48 h riportati in tabella 3.

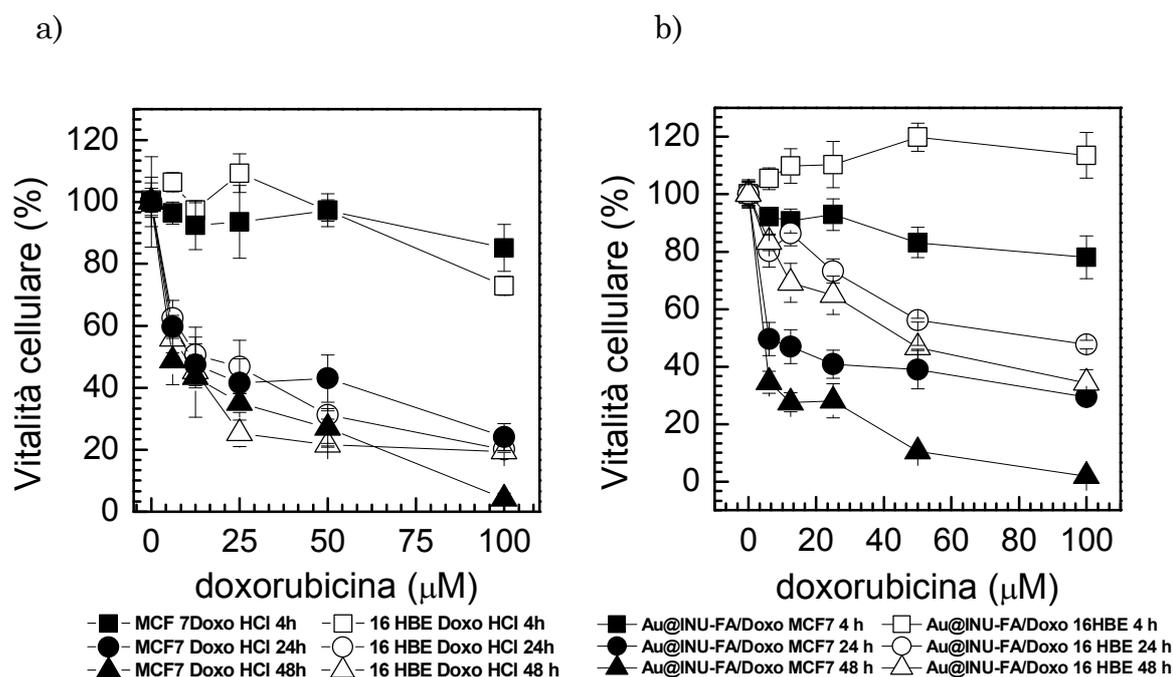


Figura 6. Efficacia della doxorubicina (Doxo) libera (a) e Au@INU-FA/Doxo (b) su cellule MCF7 e 16HBE, dopo 4, 24 e 48 h di incubazione.

Questi promettenti risultati di citossicità possono essere giustificati tramite la capacità del sistema direzionato con acido folico di essere internalizzato in maniera preferenziale nelle cellule tumorali MCF7, che sovresprimono i FRs, piuttosto che nelle cellule non tumorali 16HBE, suggerendo così un meccanismo di internalizzazione basato sull'endocitosi mediata da recettori per il folato, che si traduce in un effetto citotossico selettivo verso le cellule cancerose.

Tabella 3. Valori di IC50 di Au@INU-FA/Doxo dopo 24 h e 48 h di incubazione con cellule MCF7 e 16HBE.

Campione	IC50 <sup>24h</sup> ( $\mu$ M)	IC50 <sup>48h</sup> ( $\mu$ M)
Au@INU-FA/Doxo on MCF7	8,08	7,42
Au@INU-FA/Doxo on 16HBE	72,68	47,14
Au@INU-FA/Doxo onMCF7+FRs blocked	36,75	13,86
FreeDoxo onMCF7	15,79	9,41
FreeDoxoon16HBE	22,89	9,60

Per validare l'ipotesi sostenuta finora che il meccanismo di internalizzazione predominante del sistema Au@INU-FA/Doxo sia l'endocitosi mediata dai recettori per il folato (FRs), sono stati condotti esperimenti di blocco recettoriale dei FRs su cellule MCF7, seguiti dal saggio di citotossicità MTS. In particolare, in una prima fase dell'esperimento, le cellule MCF7 sono state esposte ad un'elevata concentrazione di acido folico (10 nM) per saturare i FRs (Tang et al. 2014), e successivamente sono state incubate con il sistema Au@INU-FA/Doxo alle stesse concentrazioni testate in precedenza e per gli stessi tempi di incubazione. È interessante notare come l'effetto citotossico osservato sulle MCF7 con i FRs saturati si sia rivelato significativamente inferiore rispetto a quello mostrato dalle MCF7 con i FRs non saturati osservato nel saggio MTS precedentemente condotto senza pretrattamento con l'alta concentrazione di acido folico, come mostrato in figura 7 e facilmente deducibile dai valori di IC50 riportati in tabella 3.

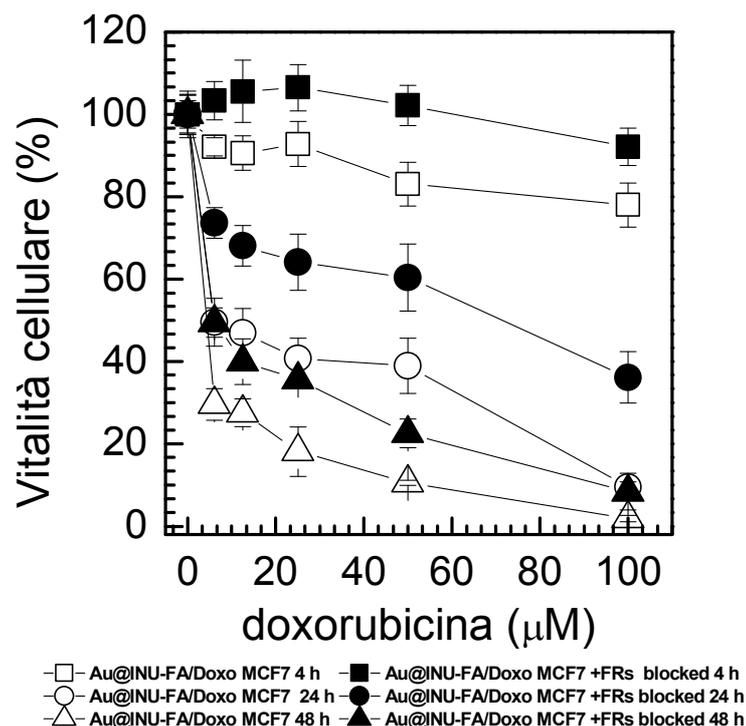


Figura 7. Citotossicità di Au@INU-FA/Doxo su cellule MCF7 prima (MCF7) e dopo blocco recettoriale dei FRs (MCF7+FRs blocked). Tempi di incubazione: 4, 24 e 48 h.

I dati sperimentali ottenuti possono essere spiegati solo da un significativo aumento della quantità di sistema Au@INU-FA/Doxo internalizzato in presenza di FRs liberi, non saturati, che in questo modo sono in grado di riconoscere e legare il folato presente nel polimero di rivestimento sulla superficie del nanosistema, dando luogo così ad un'endocitosi mediata da recettori che risulta in un effetto citotossico maggiore. La selettività del sistema direzionato con acido folico nei confronti delle cellule MCF7 è stata ulteriormente confermata da studi di uptake quantitativi, condotti misurando l'intensità di fluorescenza della doxorubicina nei lisati cellulari delle cellule MCF7 e 16HBE in seguito al trattamento di queste ultime con Au@INU-FA/Doxo e con doxorubicina libera come controllo positivo. Come predetto dal saggio di tossicità cellulare, il sistema Au@INU-FA/Doxo, sfruttando l'endocitosi mediata da recettori FRs è stata internalizzata in maniera preferenziale nelle cellule tumorali MCF7, già dopo due ore di

incubazione, come dimostrato dalla quantità di doxorubicina significativamente maggiore nel lisato delle cellule MCF7 rispetto a quello delle 16HBE (Figura 8b), causando così un maggior effetto citotossico sulle cellule tumorali, e dimostrandosi così selettivo nei confronti di queste ultime. Invece, la doxorubicina libera, non veicolata dal sistema nanoparticellare direzionato, diffonde in entrambe le linee cellulari in maniera paragonabile, non essendo in grado di discriminare tra cellule tumorali e non. Inoltre, la doxorubicina libera è internalizzata in misura simile dalle cellule MCF7 avente recettori saturati e liberi, mentre quando è veicolata tramite il carrier nanostrutturato Au@INU-FA/Doxo, questa si accumula in maggiore quantità nelle cellule MCF7 aventi i FRs non saturati, confermando ulteriormente il meccanismo di endocitosi mediato da FRs.

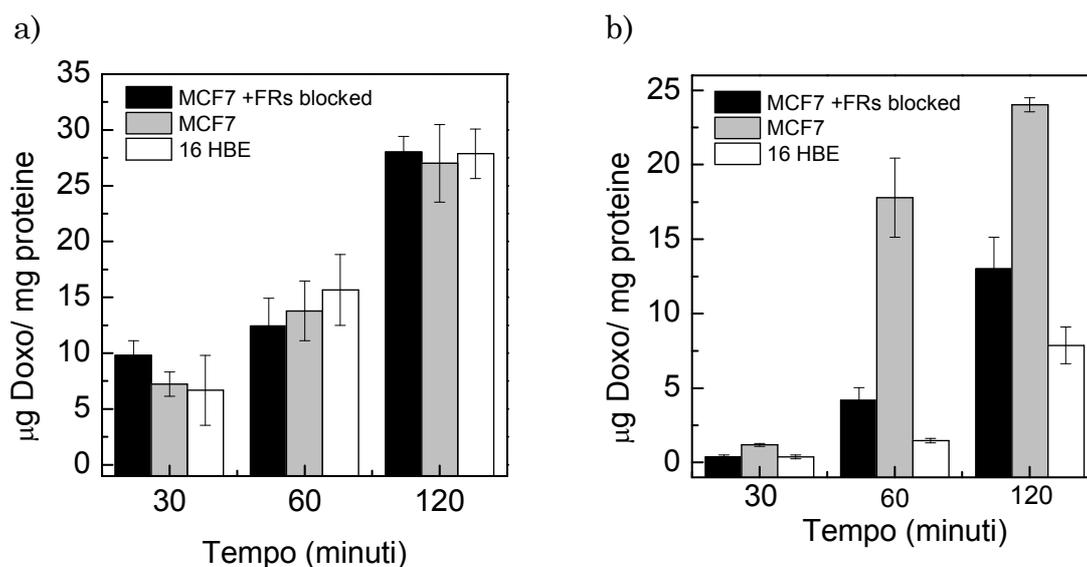


Figura 8. Uptake quantitativo di Doxo HCl libera (a) e di Au@INU-FA/Doxo (b) in cellule MCF7 e 16HBE, prima (MCF7) e dopo (MCF7+FRs blocked) blocco dei recettori FRs. Tempi di incubazione: 30, 60 e 120 minuti.

La mancanza di selettività della doxorubicina libera, non veicolata tramite un carrier nanoparticellare direzionato, può spiegare la tossicità di tale farmaco nei confronti dei tessuti e cellule sane. L'internalizzazione del

sistema Au@INU-FA/Doxo nelle cellule tumorali è stata valutata anche qualitativamente tramite analisi di microscopia a fluorescenza su cellule MCF7 (Figura 9). Le immagini ottenute dopo incubazione delle cellule con il sistema Au@INU-FA/Doxo per 30 minuti, 1 h e 2 h hanno mostrato un accumulo tempo dipendente della doxorubicina nel citoplasma cellulare, come conseguenza dell'internalizzazione del sistema.

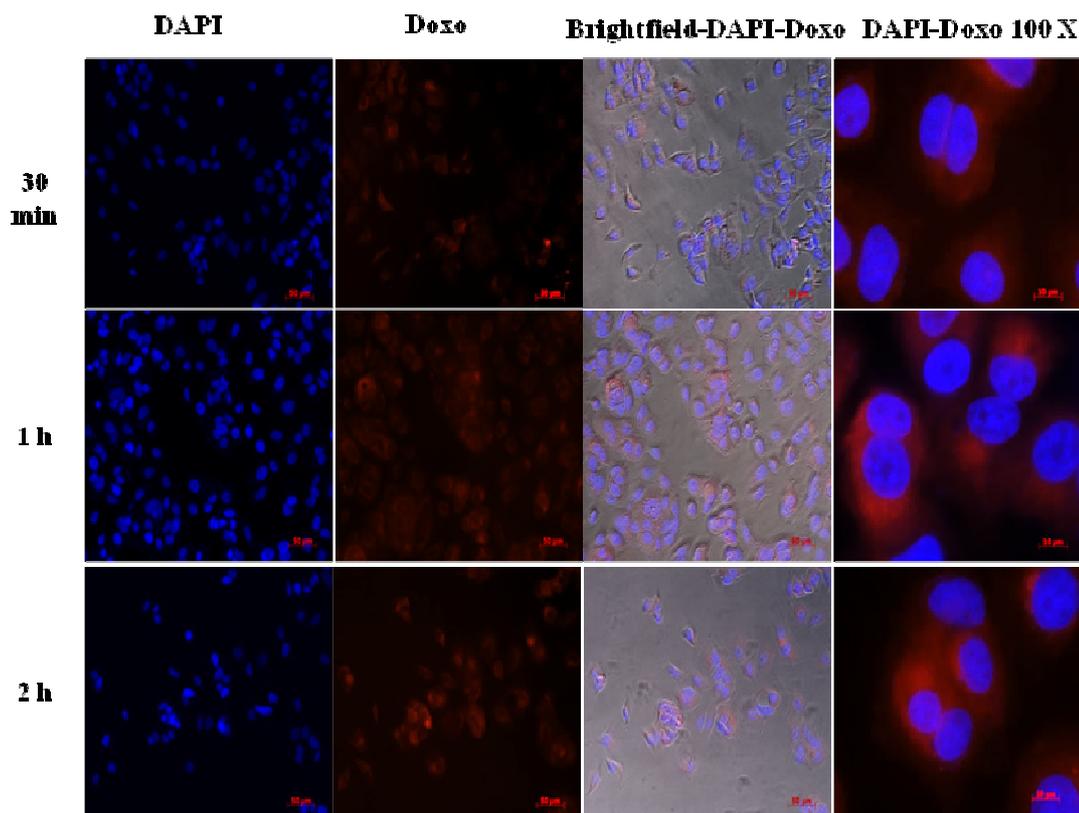
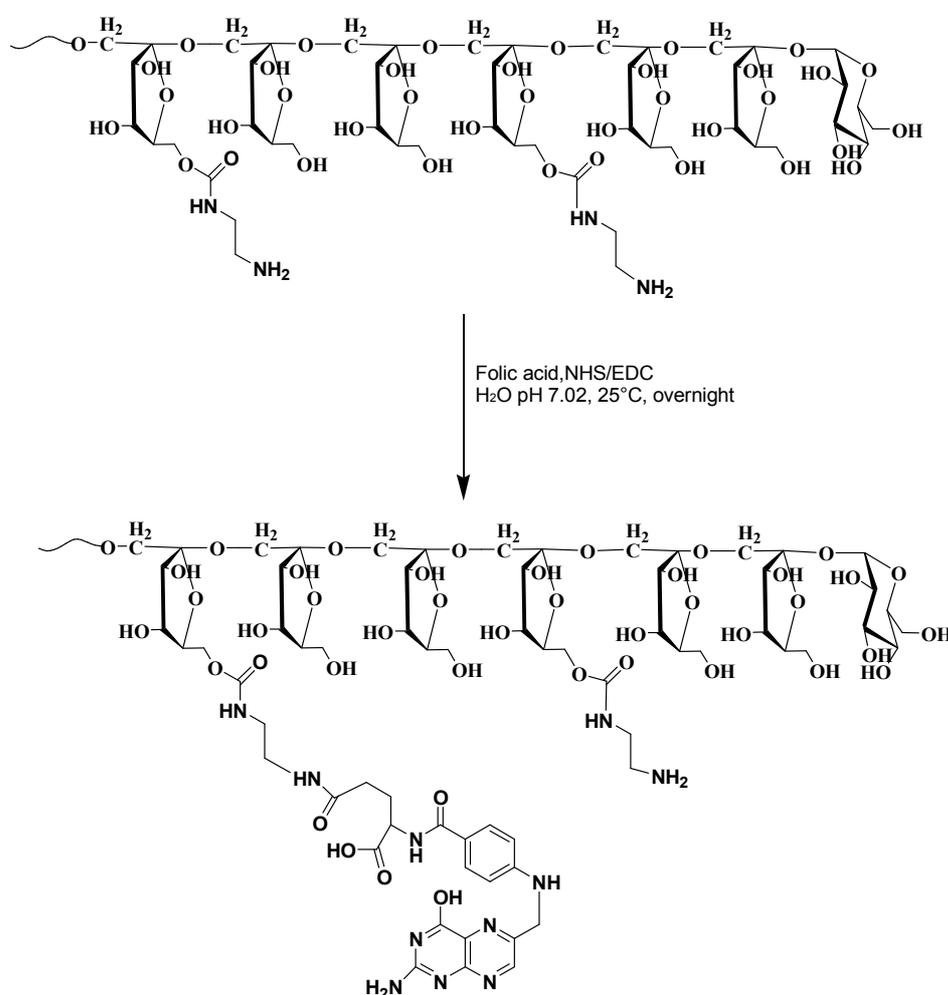


Figura 9. Immagini al microscopio a fluorescenza di cellule MCF7 incubate con Au@INU-FA/Doxo per 30 minuti, 1 h e 2 h. La doxorubicina è visualizzata in rosso; i nuclei cellulari sono marcati con DAPI e visualizzati in blu. Magnification 20x.

#### 4.3 TERMOABLAZIONE DI CELLULE TUMORALI MEDIANTE COMPOSITI NANOSTRUTTURATI GRAFENE OSSIDO/ORO DIREZIONATI CON ACIDO FOLICO

*Sintesi del copolimero INU-FA.* L'acido folico (FA) è stato ampiamente impiegato come agente direzionante nella bioconiugazione con polimeri per le sue piccole dimensioni (Peso molecolare 441.4 Da), elevata affinità per i FRs, elevata stabilità e bassa immunogenicità (Chen et al. 2013). In questo lavoro è stato sintetizzato un nuovo derivato dell'inulina folato-coniugato, INU-FA, in grado di agire come agente di rivestimento dei nanocompositi grafene/oro e potenzialmente in grado di conferire selettività ai tumori che sovraesprimono i recettori per il folato. L'inulina, un polisaccaride lineare costituito da unità ripetitive di fruttosio terminante con un residuo di glucorpiranosio, è stata impiegata come principale *backbone* polimerico biocompatibile, in quanto è stato impiegato con successo come biomateriale di partenza in molti sistemi di rilascio nanostrutturati (Li Volsi et al. 2016; M. Licciardi et al. 2014; Mariano Licciardi et al. 2015; Mauro et al. 2015; Scialabba et al. 2014). Prima di tutto è stata funzionalizzata con etilendiammina (EDA) in modo tale da introdurre gruppi amminici primari pendenti che possono essere utilizzati per ulteriori derivatizzazioni (grado di derivatizzazione in EDA pari al 24% rispetto alle unità ripetitive di inulina) (M. Licciardi et al. 2014). In un secondo step sintetico, INU-EDA è stata funzionalizzata con acido folico (FA) impiegando EDC ed NHS come agenti attivanti del gruppo carbossilico dell'acido folico (Schema 1). Le condizioni stechiometriche impiegate sono state: moli di FA/ moli di  $-NH_2$  di INU-EDA = 0,5; moli di EDC/NHS/ moli di FA = 1,5). La caratterizzazione  $^1H$  NMR ha permesso una facile quantificazione dell'acido folico legato all'inulina (Figura 1), confrontando gli integrali dei picchi a  $\delta$  7,52 – 6,69, relativi ai protoni dell'anello aromatico del FA, con quelli a  $\delta$  3,55 – 4,19, appartenenti ai protoni del backbone di inulina. La percentuale in moli dell'acido folico legato all'inulina ( $DD_{FA}$  %) è stata pari al 6,7 mol% rispetto alle unità ripetitive di quest'ultima. Il copolimero INU-FA presenta ancora

un gran numero di gruppi amminici primari disponibili per il successivo rivestimento dei nanocompositi grafene/oro attraverso la formazione di legami covalenti e di coordinazione con la superficie dell'oro. Il peso molecolare medio pesato (Mw) e la polidispersità dei copolimeri sintetizzati sono stati determinati tramite analisi SEC e i risultati sono riportati in tabella 1. L'incremento del peso molecolare di INU-EDA e di INU-FA rispetto a polimero di partenza ha confermato la derivatizzazione in EDA ed in FA dei due derivati dell'inulina, supportando l'assenza di frammentazione del backbone polimerico.



Schema 1. Sintesi del copolimero INU-FA

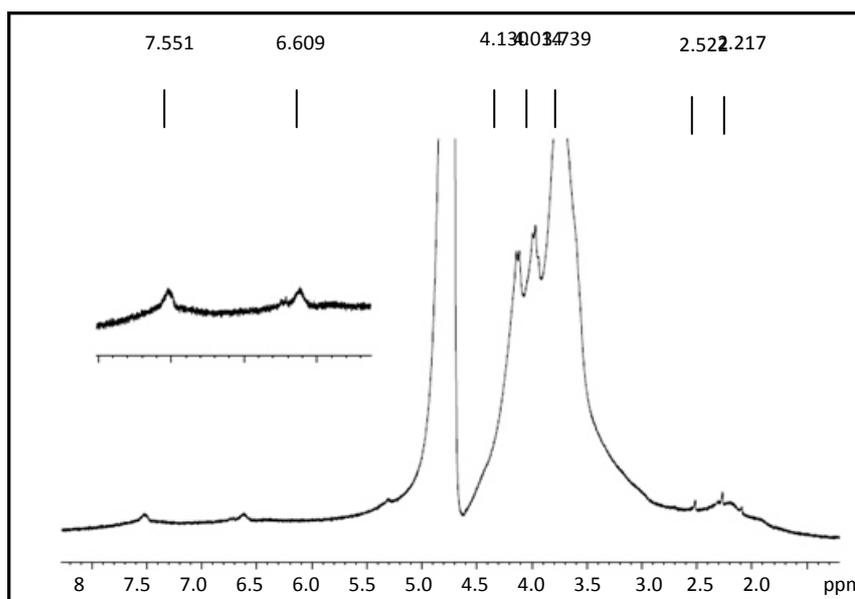


Figura 1. spettro  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) del copolimero INU-FA. I dati spettroscopici sono in accordo con la struttura attribuita:  $\delta$  2,72-3,17 ( $4\text{H}_{\text{EDA}}$ ,  $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ ), 3,611- 3,704 ( $5 \text{H}_{\text{INU}}$ ,  $-\text{CH}_2-\text{OH}$ ;  $-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{OH}$ ;  $-\text{C}-\text{CH}_2-\text{O}-$ ), 3,99-4,12 ( $2\text{H}_{\text{INU}}$ ,  $-\text{C}-\text{CH}-\text{OH}$ ;  $-\text{CH}-\text{OH}$ ), 6,68-7,5 ( $\text{H}_{\text{FA}}$ , anello aromatico)

Tabella 1. Peso molecolare ( $M_w$ ) e polidispersità dell' inulina e dei copolimeri suoi derivati

Copolimeri	$M_w$ (KDa)	$(M_w/M_n)$
inulina	6,319	1.27
INU-EDA	6,504	1.31
INU-FA	6,784	1.24

*Preparazione e caratterizzazione dei nanocompositi GO/Au@INU-FA.* I nanocompositi grafene ossido/oro rivestiti con INU-FA (GO/Au@INU-FA) sono stati ottenuti attraverso un *self-assembly* di GNPs con i fogli di dimensioni nanometriche (circa 600-700 nm) di grafene ossido (GO) seguito dall'adsorbimento del coniugato polimerico sulla superficie delle

GNPs. L'elevata superficie specifica di GO implica un'eccellente capacità di caricamento delle nanosfere di oro tramite interazioni idrofobiche superficiali. L'adsorbimento di GNPs sul GO è stato condotto impiegando un rapporto di superficie tra GO e GNPs ( $S_{GO}/S_{GNPs}$ ,  $\text{nm}^2/\text{nm}^2$ ) pari a 11, in modo tale che le GNPs non ricoprono totalmente la superficie dei fogli di grafene ossido, mantenendo pertanto una vasta superficie per l'adsorbimento successivo di agenti terapeutici. Questo semplice metodo permette di superare lunghi e complessi processi normalmente utilizzati per la crescita in situ sui fogli di grafene di nanoparticelle di oro (Yin et al. 2015). L'ibrido oro/grafene ottenuto è stato quindi rivestito con INU-FA aggiungendo una soluzione acquosa di tale copolimero alla dispersione del nanocomposito grafene ossido/oro (GO/Au). I motivi di questo processo di rivestimento sono molteplici: da un lato INU-FA può agire da rivestimento colloidale idrofilico fornendo crioprotezione a stabilizzando la dispersione del nanosistema in mezzo acquoso; inoltre, esso può potenzialmente comportarsi come agente direzionante per l'*imaging* e la terapia direzionata al tessuto tumorale. Grazie all'elevata affinità dell'oro per i gruppi amminici, il chemo-adsorbimento di INU-FA sulla superficie delle nanosfere di oro direttamente adsorbite sulla superficie del grafene coinvolge l'interazione tra i gruppi amminici primari delle ammine disponibili nel backbone polimerico e la superficie dell'oro, ma interazioni tra il copolimero INU-FA e il GO non possono essere escluse. L'avvenuto rivestimento polimerico sulla superficie delle GNPs è stato confermato tramite analisi chimica elementare (figura 2) che ha mostrato i picchi caratteristici di carbonio, ossigeno e azoto, in accordo con la presenza di uno *shell* polimerico sulla superficie del nanosistema. La presenza dell'elemento di oro ( $\text{Au}^0$ ) rilevata da tale analisi suggerisce anche l'efficiente adsorbimento delle GNPs sul GO.

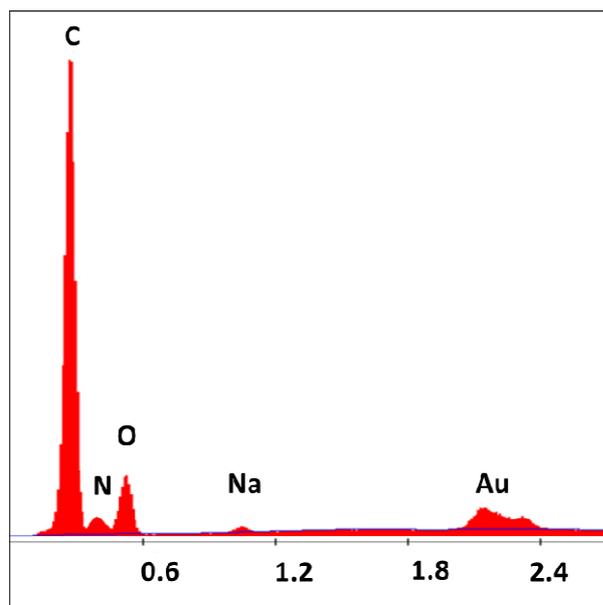


Figura 2. Analisi chimica elementare a dispersione di energia di raggi X della superficie di GO/Au@INU-FA.

La morfologia del nanosistema è stata studiata tramite analisi SEM del campione liofilizzato depositato su un apposito *stub*. Tale analisi ha mostrato una complessa struttura consistente in fogli di grafene sui quali sono adsorbiti *clusters* di GNPs di circa 150 nm (figura 3). L'analisi AFM ha supportato il risultato ottenuto tramite SEM, evidenziando GNPs di 30 nm adsorbite su foglietti di grafene di circa 700 nm (figura 4). Questo risultato suggerisce che i *clusters* di GNPs visibili nelle immagini SEM sono formati solo allo stato secco in seguito al processo di liofilizzazione.

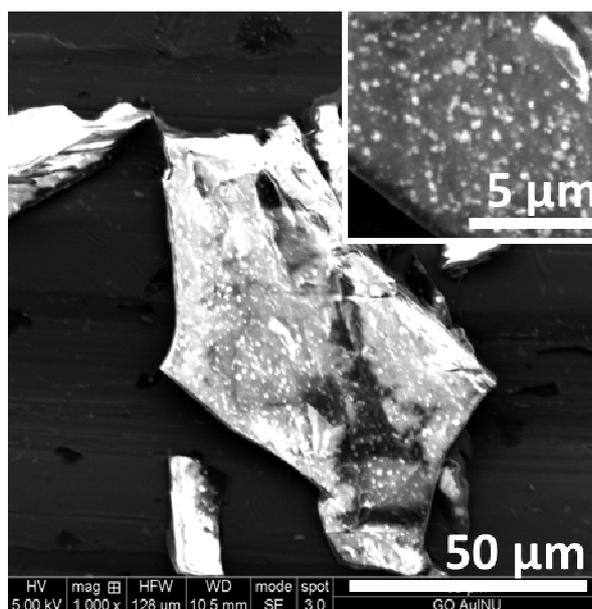


Figura 3. immagini SEM dei nanocompositi di GO/Au@INU-FA

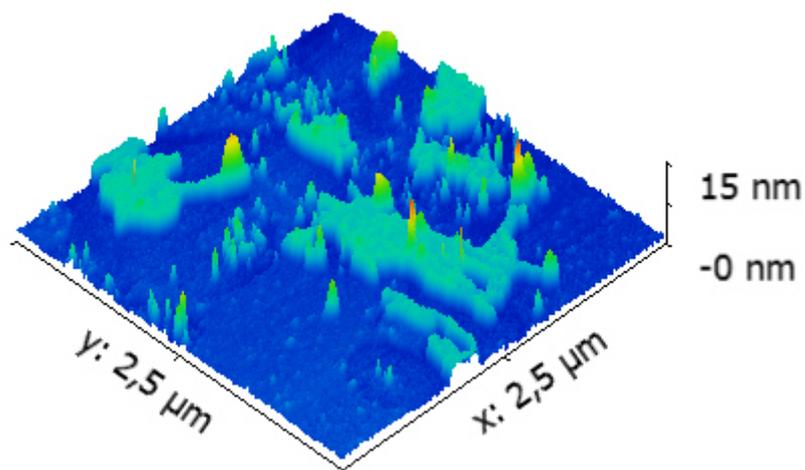


Figura 4. Imamgine AFM dei nanocompositi GO/Au@INU-FA

L'organizzazione sopramolecolare dell'intero sistema in mezzo acquoso è stata studiata tramite spettroscopia UV-Vis. Normalmente, sia un marcato *redshift* sia un allargamento della banda di risonanza plasmonica di superficie (SPR) delle GNPs sono una misura dello stato di aggregazione del campione e di conseguenza un parametro efficace per valutare la stabilità di tali sistemi.

Come mostrato in figura 5, si può osservare un lieve *redshift* della banda SPR ( $\sim 530$  nm) delle GNPs senza alcun allargamento di quest'ultima, indicando pertanto l'assenza di fenomeni di aggregazione del sistema. Inoltre, le tipiche bande di assorbimento di INU-FA osservate a 300-400 nm confermano la presenza del rivestimento polimerico.

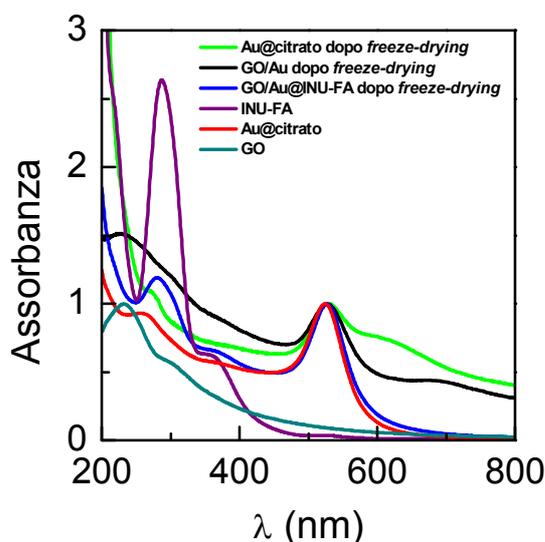


Figura 5. Spettri UV-Vis dei campioni Au@citrato, GO/Au e GO/Au@INU-FA ricostituiti dopo *freeze drying*, confrontati con i materiali di partenza GO, Au@citrato (GNPs) e INU-FA.

È interessante notare che, come dimostrato dall'analisi UV-Vis dei campioni ricostituiti, il nanocomposito rivestito con INU-FA non ha mostrato alcun segno di aggregazione in seguito al processo di *freeze-drying* e successiva dispersione in mezzo acquoso (Figura 5). Invece, in assenza del rivestimento polimerico si sono verificati un *redshift* e un allargamento significativo della banda SPR delle GNPs e un chiaro appiattimento della banda del grafene a circa 250 nm, evidenziando pertanto che il rivestimento polimerico è necessario per garantire un'opportuna ridisperdibilità del nanosistema dopo la conservazione allo stato secco. Sono stati condotti studi di calorimetria a scansione differenziale (DSC) per studiare le interazioni tra il polimero INU-FA e la superficie delle nanoparticelle di oro presenti nei nanocompositi. Il termogramma dell'analisi DSC e le curve in derivata

prima (dHf) sono riportate in figura 6. L'ossido di grafene presenta un'ampia transizione esotermica a 203,5 ° C insieme con un'altra transizione a 289,2 °C, relative ad una graduale decomposizione termica della sua struttura carboniosa. Il copolimero INU-FA presenta una netta transizione esotermica a 227,4°C che può essere spiegata da fenomeni di decomposizione, mentre le GNPs non mostrano transizioni significative nell'intero range di temperature considerato. Pertanto, il picco di decomposizione osservato a 186,8°C nel termogramma del nanocomposito GO/GNPs, spostato di -17°C rispetto al GO di partenza, evidenzia una forte interazione tra il GO e le GNPs. Inoltre, la formazione di un materiale strutturato è suggerita dalla ridotta entalpia di questa transizione (da -971 a -82 J/g rispettivamente per GO di partenza e GO/GNPs), dimostrando un'aumentata stabilità termica del GO adsorbito (tabella 2).

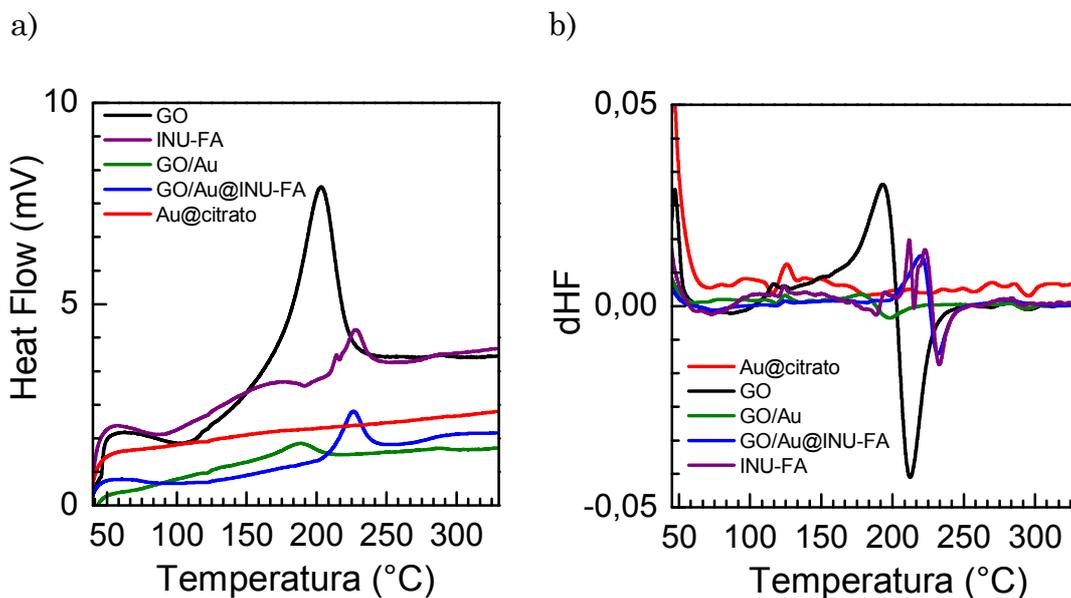


Figura 6. Termogrammi DSC (a) e derivata prima delle curve (b) di GNPs, GO, INU-FA, GO/Au e GO/Au@INU-FA

Tabella 2. DSC: entalpia e temperature delle transizioni osservate per tutti i campioni

Campione	$\Delta H$ (J/g)	T (°C)
GO	-971	203,5
	-4,4	289,2
GNPs	-	-
GO/GNPs	-82,0	186,8
GO/GNPs@INU-FA	-128,9	226,2
INU-FA	-129,01	227,3

L'analisi del termogramma riportato per GO/Au@INU-FA non è fuorviante. Se si osserva l'entalpia e alla temperatura delle transizioni osservate per il copolimero di partenza e per il nanosistema finale, può sembrare che non si verifichi nessuna interazione (Figura 6, tabella 2). In realtà, la derivata prima dell'*heatflow* (dHf) mostra chiaramente un andamento differente per i due campioni. In particolare, mentre il termogramma del copolimero di partenza è caratterizzato da due picchi esotermici a 220 e 227 °C, quello del nanosistema consiste in un unico picco alla più elevata temperatura di 227°C. Nel complesso, sembra che l'agente di rivestimento sia più stabile dopo l'adsorbimento sul nanocomposito GO/Au nonostante mantenga la sua instabilità termica. Questo comportamento è in accordo con un modello in cui le modalità di legame del copolimero con le nanoparticelle di oro sono reversibili. La reversibilità del legame è attribuita alla formazione di un complesso elettrostatico che si forma fra le molecole di ammina protonata e la superficie delle nanosfere di oro che presenta ioni complessi del tipo  $\text{AuCl}_4^-/\text{AuCl}_2^-$ . Invece alle specie legate più fortemente può essere attribuito il complesso  $[\text{AuCl}(\text{NH}_2\text{R})]$  (Ashavani Kumar et al. 2003).

L'ibrido nanostrutturato ottenuto presenta un gran numero di domini liberi di grafene accessibili per l'adsorbimento di molecole idrofobiche come ad

esempio il paclitaxel (PTX) che possiede gruppi fenilici che possono essere coinvolti in interazioni del tipo  $\pi$ - $\pi$  *stacking* con il grafene. È stato scelto il paclitaxel come farmaco anticancro in quanto esso è ampiamente utilizzato in clinica in varie tipologie di cancro come quello ovarico, polmonare, alla mammella, alla prostata ecc (Stebbing et al. 2003). Il caricamento di tale farmaco è stato effettuato aggiungendo paclitaxel in polvere ad una dispersione acquosa di GO/Au e, in seguito ad una sonicazione prolungata, è stato depositato il rivestimento polimerico. La quantità di farmaco caricato, valutata tramite analisi HPLC, è stata del 1,7% p/p per unità di massa del nanocomposito. In figura 7 è riportato il profilo UV-Vis del sistema carico di farmaco. Il leggero *redshift* della banda SPR delle GNPs senza allargamento della banda conferma l'assenza di aggregazione anche dopo il processo di *drug loading*, suggerendo che il paclitaxel è stato efficacemente adsorbito sulla superficie del nanosistema.

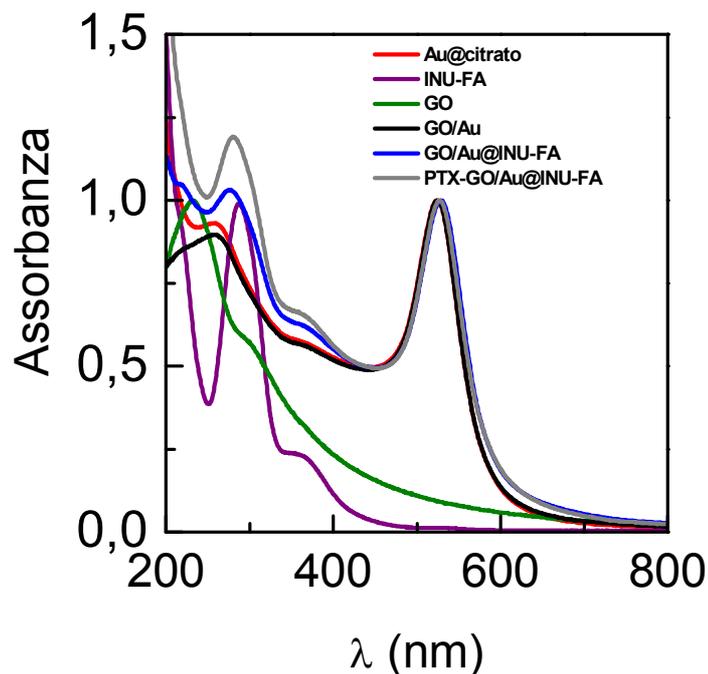


Figura 7. Spettri Uv-Vis di Au@citrato, ossido di grafene (GO), GO/Au, GO/Au@INU-FA e PTX-GO/Au@INU-FA

Tutti questi risultati hanno dimostrato l'avvenuta preparazione dei nanocompositi grafene/oro stabilizzati con un derivato folato-coniugato

dell'inulina che è in grado di caricare una discreta quantità di un farmaco estremamente idrofobico comunemente impiegato nel trattamento di tumori solidi e pertanto potenzialmente in grado di agire come un nuovo sistema teranostico per un trattamento “intelligente” del cancro.

*Valutazione del rilascio di farmaco ed ipertermia.* C'è un crescente interesse nello sviluppo di una terapia combinata basata sull'impiego di un laser infrarosso in grado di provocare ipertermia e della chemioterapia, per migliorare l'effetto terapeutico di quest'ultima. Le cellule cancerose possono essere selettivamente uccise nel range di temperatura compreso tra i 41 ed i 43°C con effetti di tossicità trascurabili sulle cellule sane circostanti (Krystofiak et al. 2012). L'ipertermia inoltre permette di sensibilizzare le cellule cancerose verso gli effetti degli agenti antineoplastici, per esempio aumentando la permeabilità della membrana cellulare (Y. Kim, Ebara, and Aoyagi 2013). Pertanto, sono state studiate la capacità del sistema proposto PTX-GO/Au@INU-FA di rilasciare il farmaco anticancro caricato e la capacità di agire come agente in grado di provocare di ipertermia localizzata. Per valutare la capacità di PTX-GO/Au@INU-FA di rilasciare paclitaxel, sono stati eseguiti studi di rilascio in tre mezzi simulanti differenti compartimenti del corpo. In particolare sono stati utilizzati il tampone fosfato a pH 7,4 (PBS pH 7,4) arricchito con il 10% di siero bovino fetale (FBS) che mima il mezzo fisiologico e a pH 5,5/FBS 10% che mima le condizioni endosomiali e lisosomiali. Inoltre gli esperimenti di rilascio sono stati condotti anche in plasma umano per mimare la condizione di somministrazione endovenosa del nanosistema. Gli studi di rilascio hanno permesso di quantificare la quantità di paclitaxel rilasciato in ogni mezzo a tempi determinati utilizzando paclitaxel libero come controllo. In figura 8 è mostrato il rilascio cumulativo di paclitaxel riferito alla quantità totale di paclitaxel caricato nei nanocompositi, in funzione del tempo di incubazione. In plasma umano il sistema proposto ha rilasciato in un giorno il 30 % del farmaco caricato, garantendo pertanto una dose di attacco prima di accumularsi nella massa tumorale dove si verifica un massivo rilascio di PTX. Infatti, in condizioni che simulano i compartimenti extracellulari e

fisiologici ovvero in PBS pH 7,4/FBS 10%, è stato osservato un elevato rilascio di farmaco (oltre l'80% dopo 48 h di incubazione). È interessante notare che in PBS a pH 5,5/FBS 10% non si osserva alcun rilascio di PTX, suggerendo che in vivo potrebbe essere ottenuta una protezione del farmaco dalle condizioni acide lisosomiali, evitando perciò la degradazione e la disattivazione del farmaco stesso. Questo rilascio pH dipendente può essere spiegato con il profilo di ionizzazione dell'ossido di grafene. Quest'ultimo possiede numerosi gruppi carbossilici e fenolici (rispettivamente aventi pKa ~ 4,8 e 6,9), che vengono protonati in ambiente acido, provocando cambiamenti nell'affinità per il solvente. Pertanto, una differente strutturazione porta a un minor rilascio di farmaco. Non è stato possibile misurare le curve di dissoluzione del PTX libero in PBS pH 5,5/FBS10% e PBS pH 7,4 /FBS 10% a causa della bassissima solubilità del PTX in questi mezzi.

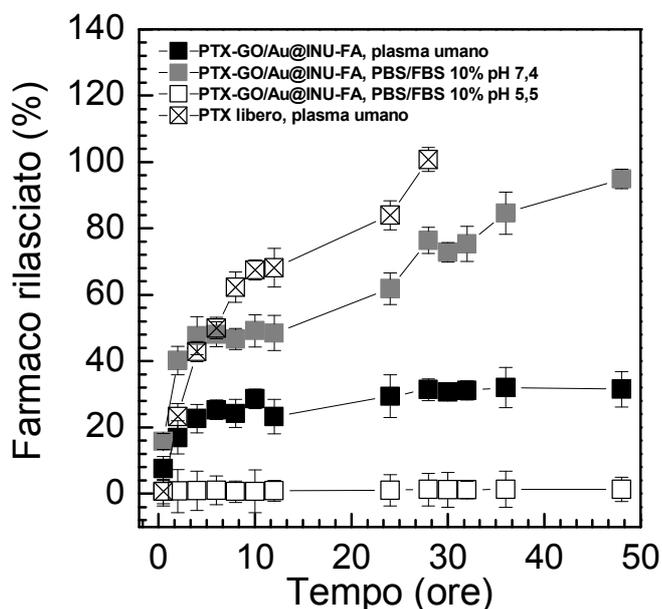


Figura 8. Profilo di rilascio di PTX-GO/Au@INU-FA e PTX libero in plasma, PBS pH 7,4 e 5,5 supplementati con il 10% di FBS.

Sono stati condotti diversi studi per valutare la capacità del nanosistema ibrido di trasformare la luce laser di 810 nm in calore sufficiente per provocare ipertermia o ablazione termica *in vitro*. A tal proposito, dispersioni acquose di PTX-GO/Au@INU-FA e il rispettivo sistema non carico di farmaco sono stati esposti ad un laser di 810 nm alla potenza fissa di  $2,8 \times 10^{-3}$  W/ mm<sup>3</sup> per 5 minuti. Dopo 5 minuti di esposizione al laser, la temperatura della dispersione acquosa contenente i nanocompositi ha raggiunto temperature maggiori di 45°C. Tale temperatura è ben al di sopra della temperatura limite di tolleranza delle cellule tumorali, suggerendo che questo nanocomposito ibrido può essere potenzialmente sfruttato come strumento efficace per i trattamenti di ipertermia localizzati e l'ablazione termica di tumori solidi. È interessante notare che dispersioni acquose di PTX-GO/Au@INU-FA a diverse concentrazioni in DMEM, esposte a un laser di 810 nm ad una potenza più elevata di  $7 \times 10^{-2}$  W/mm<sup>3</sup> hanno mostrato un effetto ipertemico più marcato, portando la temperatura del mezzo cellulare a valori più alti di 47°C dopo 300 secondi di esposizione alla concentrazione di 15 µg/ml di sistema (figura 9b). Questi risultati incoraggiano l'impiego di basse concentrazioni di sistema per studiare l'effetto ipertemico del nanocomposito PTX-GO/Au@INU-FA.

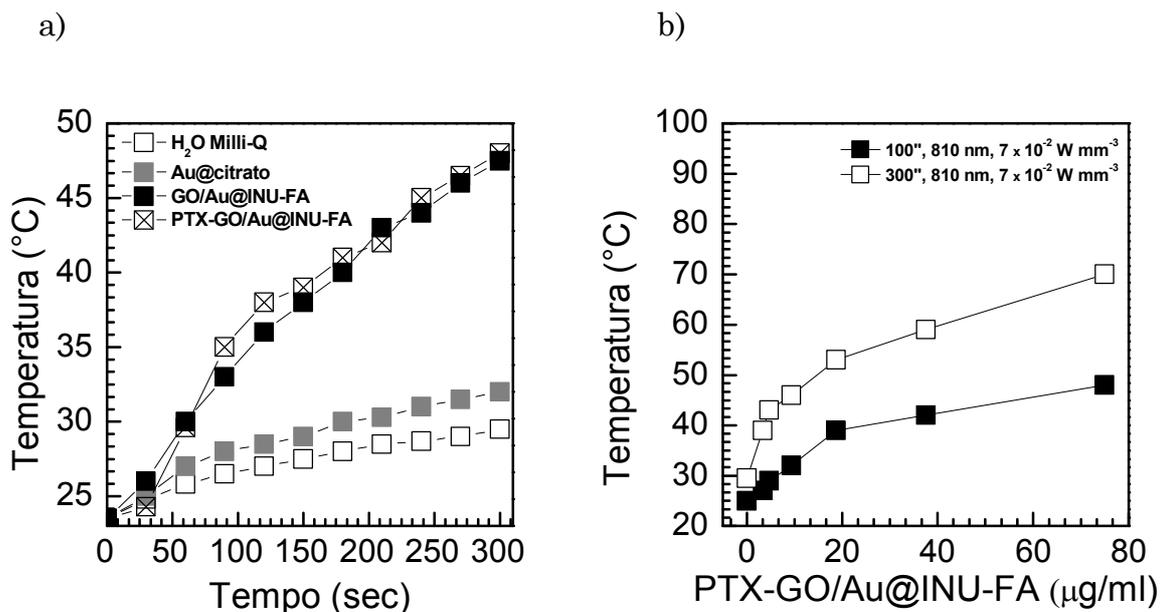


Figura 9. a) curve di rialzo termico tempo dipendente di dispersioni acquose di GO/Au@INU-FA e PTX-GO/Au@INU-FA (1 mg/ml), esposte a una sorgente laser di 810 nm,  $2,8 \times 10^{-3}$  W/mm<sup>3</sup> di potenza e osservate per una durata di 5 minuti. Au@citrato di partenza e acqua Milli-Q sono stati usati come controllo. b) effetto ipertermico di PTX-GO/Au@INU-FA in mezzo cellulare (DMEM) riportando la temperatura in funzione della concentrazione di nanosistema, esposto per 100 e 300 secondi ad un laser di 810 nm di lunghezza d'onda e una potenza di  $7 \times 10^{-2}$  W/mm<sup>3</sup>

*Caratterizzazione biologica del nanosistema: valutazione in vitro dell'effetto citotossico.* In un esperimento preliminare, è stata valutata la citocompatibilità del nanocomposito GO/Au@INU-FA tramite saggio di vitalità MTS su cellule del cancro della mammella (MCF7) e su cellule dell'epitelio bronchiale umano (16HBE). Il saggio MTS è basato sull'abilità delle deidrogenasi mitocondriali delle cellule metabolicamente attive di convertire il sale MTS in un sale di formazano colorato, la cui assorbanza può essere misurata con uno spettrofotometro alla  $\lambda_{max}$  di 490 nm. L'assorbanza ottenuta sarà direttamente proporzionale al numero di cellule vive in coltura. In figura 10 è riportato il profilo di citocompatibilità di GO/Au@INU-FA dopo 24 e 48 h di incubazione ad una concentrazione nel range 1-0,0625

mg/ml<sup>1</sup> . Un trascurabile effetto citotossico e nessuna significativa differenza dopo 24 e 48ore di incubazione sono stati rilevati rispetto al controllo di sole cellule, anche alle più alte concentrazioni testate.

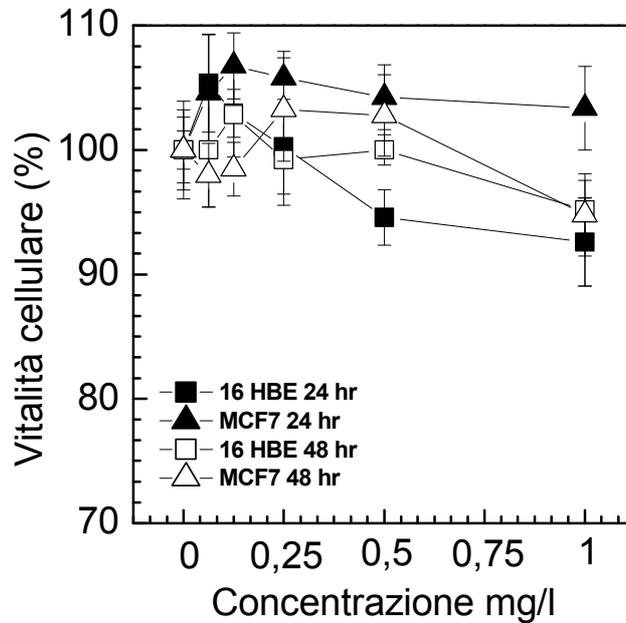


Figura 10. Vitalità cellulare (%) di cellule del cancro della mammella (MCF7) e cellule dell'epitelio bronchiale umano (16HBE) incubate con il nanocomposito GO/Au@INU-FA per 24 e 48 ore.

L'effetto citotossico in vitro di PTX-GO/Au@INU-FA utilizzando paclitaxel libero come controllo su cellule MCF7 è stato valutato tramite saggio MTS dopo 4, 24 e 48 ore di incubazione. La figura 11 mostra la vitalità cellulare di cellule MCF7 trattate con differenti quantità di PTX-GO/Au@INU-FA (75, 37,5, 18,75, 9,37, 4,68, 3,34 µg/ml) corrispondenti a concentrazioni di paclitaxel pari a 1,5, 0,85, 0,425, 0,212, 0,106 µg/ml e paclitaxel libero alle stesse concentrazioni. È stata osservata un'efficacia tempo dipendente per tutti i campioni senza alcun effetto citotossico rilevato dopo 4 ore di incubazione. Alcune differenze significative meritano ulteriori commenti. In particolare dopo 24 ore di incubazione, alle più basse concentrazioni testate,

PTX-GO/Au@INU-FA si è mostrato sempre più attivo del paclitaxel libero, mostrando invece una citotossicità paragonabile alle concentrazioni più alte. Dopo 48 ore di incubazione, questo andamento risulta più apprezzabile, sottolineando il ruolo fondamentale del direccionamento folato-mediato per esplicare un buon effetto anticancro, fornendo alla concentrazione più alta, una vitalità cellulare del 25%. Degno di nota è che l'IC<sub>50</sub> (tabella 3) mostra una potenza significativamente più alta del nanocomposito folato direccionato rispetto al farmaco libero, soprattutto dopo 48 ore di incubazione (IC<sub>50</sub> PTX-GO/Au@INU-FA<sup>48h</sup>: 83 ng/ml, IC<sub>50</sub> PTX<sup>48h</sup> 190 ng/ml ). Nel complesso questi risultati hanno mostrato un'evidente incrementata citotossicità di PTX-GO/Au@INU-FA, in quanto questo nanocomposito ha dimostrato di migliorare l'efficacia anticancro del paclitaxel. Questo può essere spiegato con un'aumentata internalizzazione del sistema direccionato con folato rispetto al farmaco libero non veicolato (Intracellular uptake and intracavitary targeting of folate-conjugated liposomes in a mouse lymphoma model with up-regulated folate receptors 2006) insieme ad una maggiore biodisponibilità del paclitaxel quando caricato nel nanocomposito.

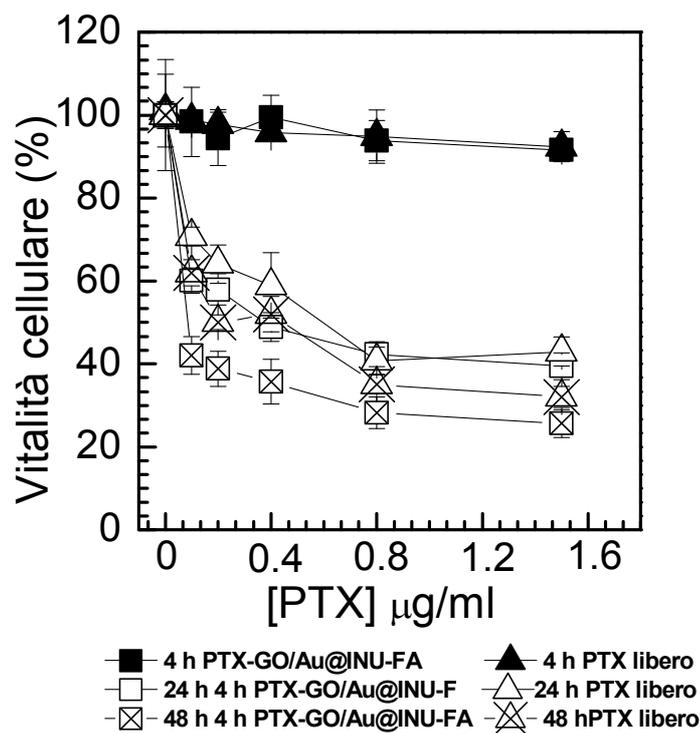


Figura 11. Saggio di citotossicità sulle cellule MCF7 incubate con PTX-GO/Au@INU-FA e paclitaxel libero (PTX) dopo 4, 24 e 48 ore di incubazione.

Tabella 3. IC50 per PTX-GO/Au@INU-FA e paclitaxel libero dopo 24 e 48 ore di incubazione.

campione	IC50 <sup>24h</sup> ng/ml	IC50 <sup>48h</sup> ng/ml
paclitaxel libero (PTX)	311	190
PTX-GO/Au@INU-FA	293,4	83

*Effetto ipertermico in vitro di PTX-GO/Au@INU-FA su cellule MCF7.* La notevole efficienza di conversione fototermica del sistema PTX-GO/Au@INU-FA descritta in precedenza e la sua capacità di fornire un buon effetto citotossico hanno incoraggiato successivi esperimenti di ipertermia e

termoablazione in vitro per il trattamento localizzato del cancro. Il trattamento di ipertermia è stato condotto su cellule MCF7 irradiando tali cellule preventivamente trattate con GO/Au@INU-FA e PTX-GO/Au@INU-FA con un laser chirurgico di 810 nm di lunghezza d'onda alla potenza fissa di  $7 \times 10^{-2}$  W/mm<sup>3</sup>. In particolare, l'effetto ipertermico misurato direttamente come riduzione della vitalità cellulare, è stato valutato simulando l'effetto acuto mediato dalla termoablazione (eradicatione fisica delle cellule cancerose a causa dell'alta temperatura). Il laser utilizzato è biocompatibile, in quanto come ampiamente riportato (Effects of 810-nm laser on murine bone-marrow-derived dendritic cells 2011), dopo l'esposizione del controllo di cellule non trattate con i nanosistemi, la vitalità cellulare delle cellule era anche più alta del 100% (figura 12). La termoablazione è stata dimostrata trattando le cellule MCF7 precedentemente incubate con sistema direzionato con folato per 4 h, con un raggio laser di 810 nm (spot fissato ad un mm di diametro e alla potenza di  $7 \times 10^{-2}$  W/mm<sup>3</sup>). Al fine di studiare i benefici del trattamento ipertermico, le MCF7 sono state trattate con il nanosistema carico di paclitaxel ad una concentrazione tale da fornire meno dell'1% dell'effetto citotossico dopo 4 ore di incubazione (0,3 µg/ml di paclitaxel, 15 µg/ml di sistema; 99,4 % vitalità cellulare) e quindi esposto a un raggio laser di 810 nm alla potenza di  $7 \times 10^{-2}$  W/mm<sup>3</sup> per 100 e 300 secondi. Per valutare se PTX-GO/Au@INU-FA mostrasse ancora un effetto anticancro dopo il trattamento di ipertermia, in modo da impedire la crescita cellulare dovuta alla persistenza di alcune cellule cancerose, è stata valutata la vitalità cellulare anche dopo 24 ore di post incubazione seguenti l'esposizione laser. Tutti i dati sono riportati in figura 12 e sono stati confrontati con il sistema vuoto GO/Au@INU-FA e paclitaxel libero trattati con lo stesso laser chirurgico, alla stessa potenza e per lo stesso tempo di irraggiamento. È evidente che l'effetto anticancro indotto dall'effetto ipertermico in acuto (termoablazione) è significativamente più elevato per PTX-GO/Au@INU-FA rispetto al paclitaxel libero, raggiungendo un massimo dell'effetto dopo l'esposizione per 300 secondi (18% di vitalità cellulare). Sebbene si possa notare solo una piccola differenza tra il sistema

vuoto e carico nel trattamento in acuto, l'esperimento condotto dopo 24 ore di post incubazione dopo il trattamento di ipertermia (effetto a lungo termine del nanosistema), ha evidenziato che il sistema carico PTX-GO/Au@INU-FA è in grado di fornire un'intensa diminuzione della vitalità cellulare rispetto al sistema vuoto, sia dopo 100 che dopo 300 secondi di irraggiamento (figura 12b). Degno di nota è che l'effetto a lungo termine indotto dall'ipertermia è stato più rilevante dopo 100 secondi di esposizione, fornendo una decisa diminuzione della vitalità cellulare dal 90% al 16% dopo 24 ore di post incubazione. Questi risultati dimostrano che il nanocomposito caricato con paclitaxel non solo è in grado di mantenere il suo effetto anticancro ma anche di causare una morte addizionale delle cellule. Questi dati suggeriscono che il nanosistema fornisce vari meccanismi, in acuto ed in cronico, che portano ad un effetto anticancro sinergico utile per evitare recidive. Pertanto, da una parte la capacità del GO di trasdurre l'energia in calore uccide localmente le cellule semplicemente applicando un raggio laser che può indurre la termoablazione in combinazione con la chemo-sensibilizzazione nei confronti del paclitaxel. Dall'altra parte, il rilascio di farmaco indotto dall'ipertermia permette di mantenere una concentrazione di farmaco utile, bloccando pertanto l'evasione cellulare e la proliferazione cronica (Mauro et al. 2015).

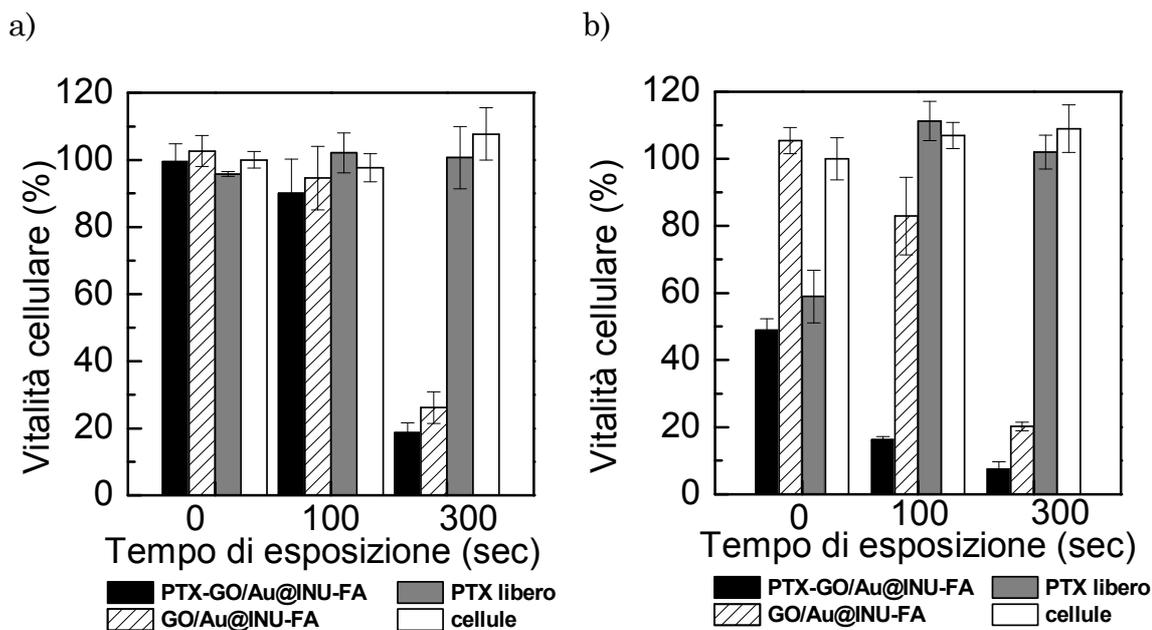


Figura 12. Saggio di citotossicità sulle MCF7 alla concentrazione equivalente di paclitaxel di 0,3  $\mu\text{g/ml}$  e di 15  $\mu\text{g/ml}$  di sistema, dopo 4 ore di incubazione, seguito da trattamento laser a) e dopo 4 ore di incubazione seguito da trattamento laser e 24 ore di postincubazione b). Cellule e paclitaxel libero sono stati usati come controlli.

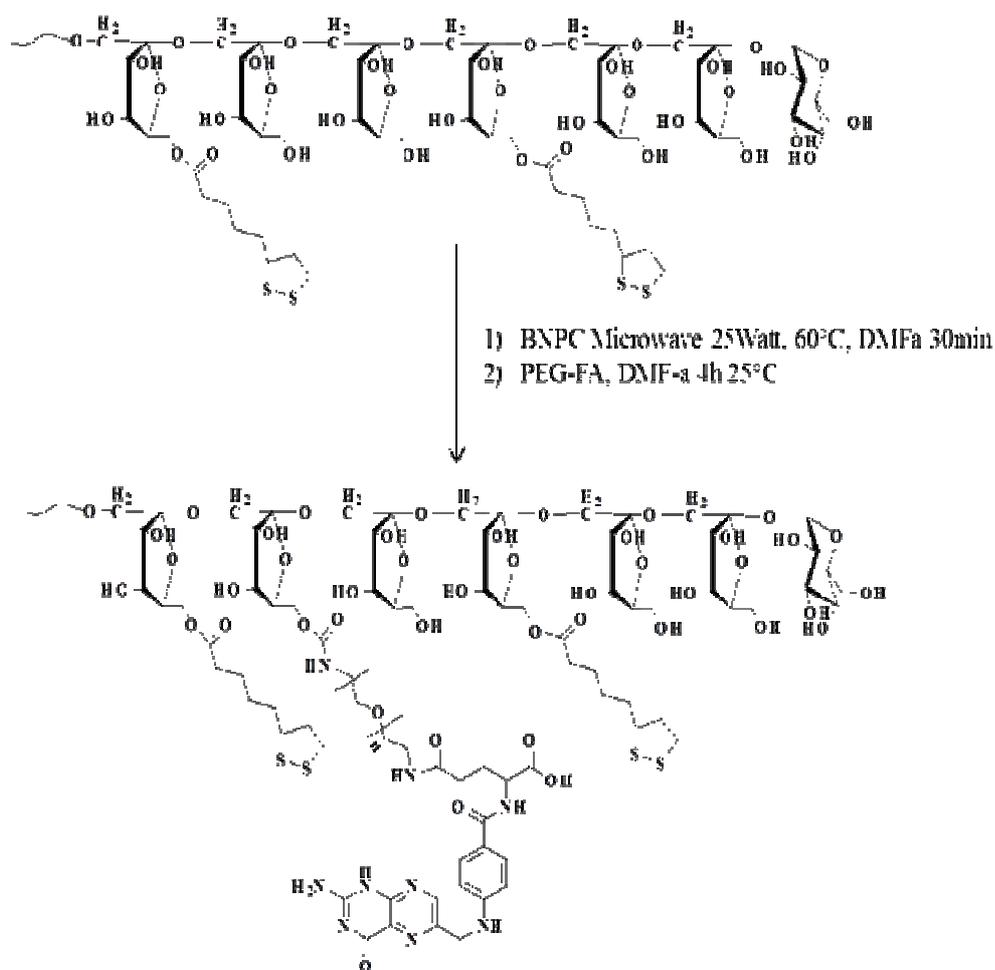
#### 4.4 GOLD NANORODS FUNZIONALIZZATI CON ACIDO FOLICO SENSIBILI AD UN LASER INFRAROSSO PER LA DIAGNOSI E LA TERAPIA DELL'OSTEOSARCOMA

##### *Sintesi e caratterizzazione dei copolimeri INU-LA-PEG-FA e PHEA-EDA-FA.*

Da una decina d'anni, l'interesse nel funzionalizzare nanoparticelle di oro (GNPs) e in particolare gold nanorods (GNRs) con materiali polimerici per svariate applicazioni biomediche, come ad esempio il rilascio di agenti chemioterapici ai tessuti tumorali, è in continua crescita. In generale, le GNPs hanno la tendenza ad aggregare, soprattutto nel caso di nanoparticelle non sferiche a causa della loro natura anisotropica. Per tale motivo la preparazione di un sistema colloidale stabile a base di GNRs è ancora oggi una sfida che limita le applicazioni di questa tipologia di GNPs

in campo biomedico. Il problema dell'instabilità delle GNRs dovuta all'aggregazione può essere superato funzionalizzando la superficie di quest'ultime con polimeri idrofilici o anfifilici aventi gruppi funzionali tiolici (-SH) o amminici (-NH<sub>2</sub>) nella loro struttura, per i quali le GNRs presentano un'elevata affinità che permette la formazione di legami Au—S o Au—N. La modifica superficiale dei GNRs con materiali polimerici aumenta l'emivita plasmatica del sistema colloidale, aumenta la stabilità del nanosistema e riduce i fenomeni di tossicità causati da alcuni agenti stabilizzanti utilizzati durante la sintesi dei GNRs, come ad esempio il cetil trietil ammonio bromuro (CTAB). Il rivestimento polimerico, oltre a garantire stabilità al sistema in mezzo acquoso, se opportunamente derivatizzato con agenti direzionanti, è in grado di riconoscere specifici recettori sovraespressi nelle cellule cancerose, conferendo così ai GNRs una certa specificità verso la massa tumorale e rendendo possibile un direzionamento attivo del nanosistema verso quest'ultima. Queste considerazioni hanno incoraggiato la sintesi di due nuovi copolimeri coniugati con acido folico in grado di rivestire i GNRs. Un copolimero è un derivato polisaccaridico anfifilico, chiamato INU-LA-PEG-FA, e l'altro è un derivato amminico della  $\alpha,\beta$ -poli(N-2-idrossietil)-D,L-aspartammide (PHEA), funzionalizzato con acido folico, chiamato PHEA-EDA-FA. Per quanto riguarda la sintesi di INU-LA-PEG-FA, l'inulina ( $\alpha$ -D-glucopiranosil- $[\beta$ -D-fruttofuranosil] $_{(n-1)}$ -D-fruttofuranoside), un polisaccaride lineare costituito da unità monomeriche di fruttosio ( $\beta$ -1,2), è stata utilizzata come *backbone* polimerico principale. Prima di tutto, l'inulina è stata parzialmente funzionalizzata con acido lipoico (LA) in modo da introdurre porzioni idrofobiche terminanti con gruppi disolfuro che in seguito a riduzione formano gruppi -SH altamente affini alla superficie dei GNRs. In particolare, il gruppo carbossilico dell' LA è stato attivato con la coppia attivate DCC/DMAP e fatto reagire con i gruppi ossidrilici dell'inulina per formare legame esterei. La quantità di LA e di attivanti dei gruppi carbossilici utilizzati sono stati: moli di LA/moli di unità ripetitive di inulina= 0,5; moli di DCC/moli di LA=1,2 e moli DMAP/moli di LA=1,2. La spettroscopia <sup>1</sup>H NMR ha reso possibile la quantificazione dell'LA legato

all'inulina tramite il confronto dell'integrale dei picchi compresi tra  $\delta$  2,5-1,4, attribuibili ai protoni dell'LA, con i protoni dell'inulina a  $\delta$  compreso tra 3,6 e 4,3. Il grado di derivatizzazione % molare di LA legato covalentemente all'inulina ( $DD_{LA}\%$ ) è risultato pari al 23% rispetto alle unità ripetitive di inulina, conferendo così proprietà anfifiliche al copolimero ottenuto, INU-LA. Quest'ultimo presenta ancora un elevato numero di gruppi ossidrilici disponibili per successive funzionalizzazioni per esempio con catene di PEG per aumentarne l'idrodispersibilità, caratteristica necessaria per garantire una buona stabilità fisica ai GNRs in mezzo acquoso. Pertanto, il passo successivo è stato quello di peghilare il derivato anfifilico dell'inulina INU-LA, utilizzando un derivato bis-amminico del PEG Mw di 2000 Da, preventivamente funzionalizzato ad un'estremità con acido folico, chiamato PEG-FA. Per coniugare l'acido folico al bis-ammino PEG, è stata sfruttata la formazione di un legame ammidico utilizzando EDC ed NHS come agenti attivanti del gruppo  $\gamma$ -carbossilico dell'acido folico, e lasciando reagire a pH controllato (pH 6,8) con i gruppi amminici del bis-ammino PEG. Le condizioni stechiometriche utilizzate sono state scelte al fine di funzionalizzare preferenzialmente solo uno dei due gruppi amminici presenti in ogni catena del bis-ammino PEG, in modo da consentire il successivo *grafting* del prodotto PEG-FA ottenuto sul *backbone* di INU-LA: moli di FA/moli di PEG= 0,75; moli di EDC HCl/moli di FA= 1,5 e moli di NHS/moli di FA= 1,5.



Schema 1. Sintesi del copolimero INU-LA-PEG-FA

Confrontando gli integrali dei picchi a  $\delta$  compreso tra 7,52 e 6,69 registrati tramite spettroscopia  $^1\text{H}$  NMR, attribuibili ai protoni degli anelli aromatici dell'acido folico, con quello a  $\delta$  3,7 appartenente ai protoni del PEG, è stata determinata una % molare di FA legato al PEG ( $\text{DD}_{\text{FA}}\%$ ) pari al 44 mol%. Quindi il derivato folato coniugato del PEG-bis ammino così ottenuto, PEG-FA, avente ancora un gruppo amminico libero per catena polimerica, è stato legato covalentemente ai gruppi ossidrilici liberi del derivato anfifilico INU-LA precedentemente ottenuto, tramite formazione di un legame uretanico. In particolare, i gruppi ossidrilici del copolimero INU-LA sono stati attivati con bis-nitro fenil carbonato (BNPC) tramite un reattore a microonde e lasciati reagire con i gruppi amminici liberi del PEG-FA in modo da ottenere

il prodotto finale INU-LA-PEG-FA. Le condizioni stechiometriche utilizzate sono state: moli BNPC/moli di unità ripetitive di inulina= 0,1; moli PEG-FA/moli unità ripetitive di inulina=0,1. Il copolimero ottenuto è stato caratterizzato tramite spettroscopia  $^1\text{H}$  NMR, che ha confermato l'avvenuta funzionalizzazione dell'INU-LA con PEG-FA e ha permesso la quantificazione del grado di derivatizzazione molare in PEG-FA ( $\text{DD}_{\text{PEG-FA}}$  %). Il  $\text{DD}_{\text{PEG-FA}}$  %, ovvero la % in moli di catene di PEG-FA relative alle moli di unità ripetitive di inulina, è stato calcolato confrontando l'integrale del picco relativo ai protoni del PEG a  $\delta$  3,7 con quello dei picchi relativi ai protoni del backbone di inulina compresi tra  $\delta$  3,6 e 4,2, ed è risultato pari al  $4\pm 0.5$  mol% rispetto alle unità ripetitive di inulina (Figura 1).

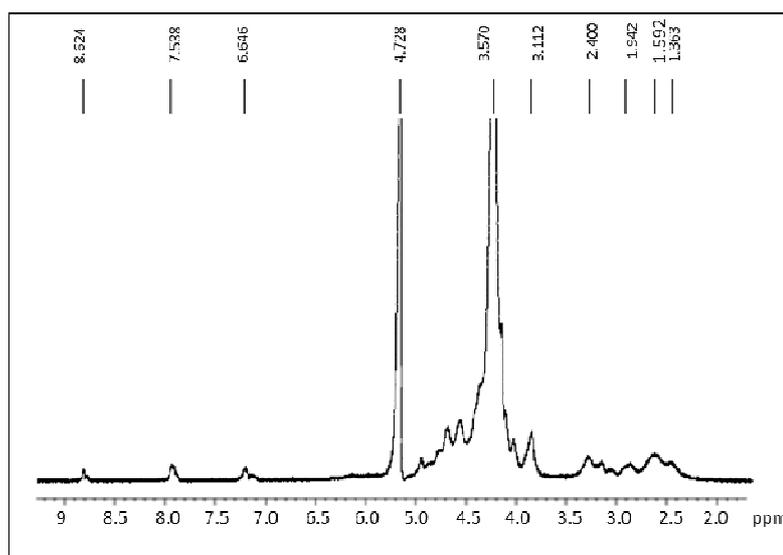
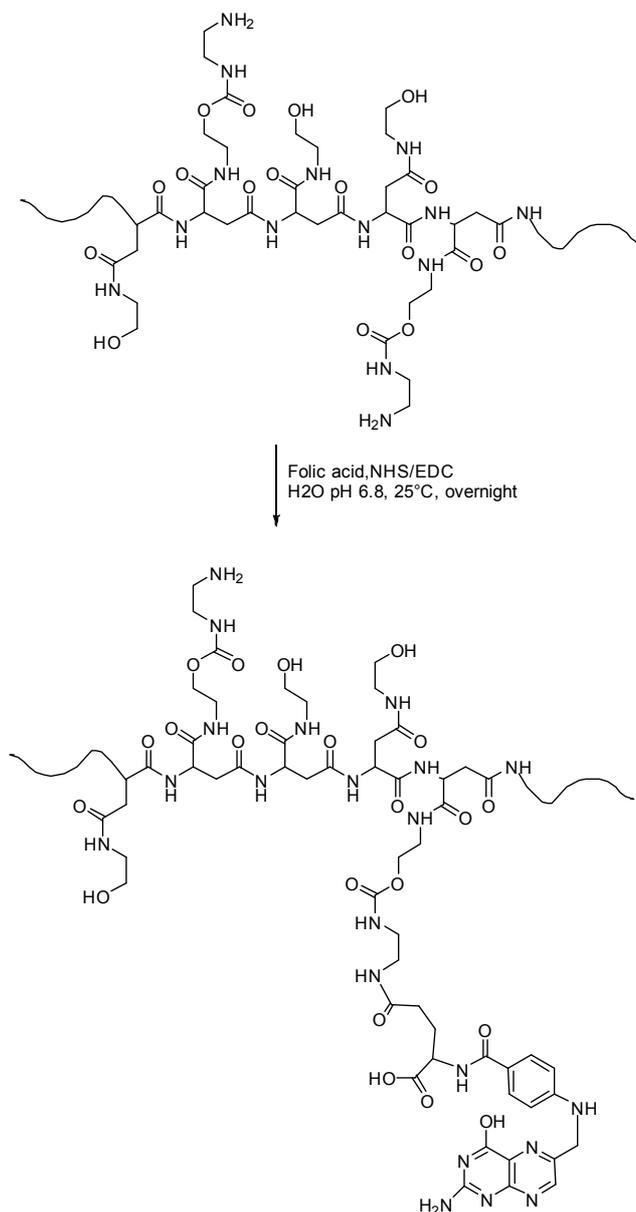


Figura 1. Spettro  $^1\text{H}$  NMR di INU-LA-PEG-FA

In merito alla sintesi del copolimero PHEA-EDA-FA, la reazione di attivazione dei gruppi ossidrilici presenti nella struttura del PHEA con BNPC, seguita dalla reazione con EDA, ha permesso la derivatizzazione delle catene polimeriche del PHEA con gruppi amminici primari, ottenendo così il derivato poliamminico chiamato PHEA-EDA, come riportato in precedenza (Mariano Licciardi et al. 2006), con un grado di derivatizzazione

in EDA pari al 25 mol% rispetto alle unità ripetitive di PHEA. I gruppi amminici primari del PHEA-EDA hanno reagito facilmente con il gruppo  $\gamma$ -carbossilico dell'acido folico, precedentemente attivato con EDC ed NHS, portando pertanto al copolimero folato-coniugato PHEA-EDA-FA (schema 1).



Scheme 2. Sintesi del copolimero PHEA-EDA-FA

In seguito alla procedura di purificazione, il copolimero PHEA-EDA-FA ottenuto, è stato caratterizzato tramite analisi <sup>1</sup>H NMR che ha confermato l'avvenuta funzionalizzazione quantitativa dei gruppi amminici con acido

folico, confrontando gli integrali dei picchi a  $\delta$  7,52 – 6,69 dei protoni degli anelli aromatici del FA con l'integrale dei picchi relativi ai protoni a  $\delta$  2,85 attribuibili al  $-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-$  del *backbone* di PHEA (Figura 2). Il  $\text{DD}_{\text{FA}}\%$  è risultato pari al 4.5 mol% rispetto alle unità ripetitive di PHEA

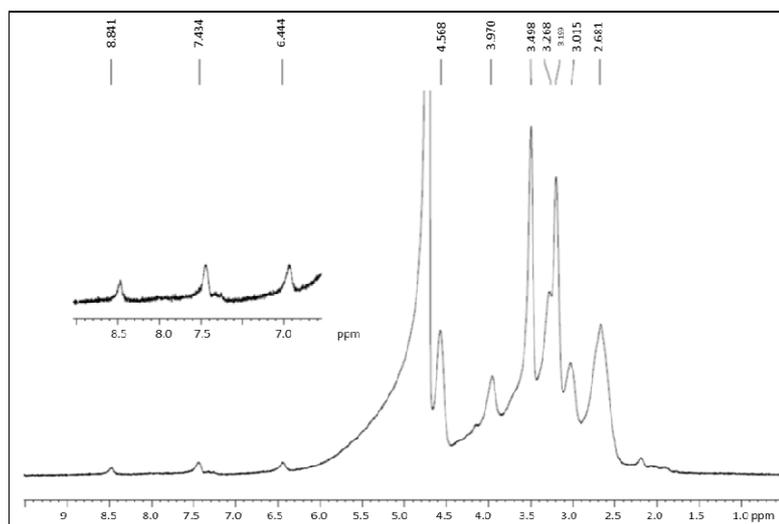


Figura 2. Spettro  $^1\text{H}$  NMR del copolimero PHEA-EDA-FA

La quantità di FA legato covalentemente al PHEA-EDA in PHEA-EDA-FA e ad INU-LA in INU-LA-PEG-FA è stata determinata anche tramite spettroscopia UV, misurando l'assorbanza a  $\lambda$  364 nm di una quantità pesata di copolimeri in acqua Milli-Q a pH 8 per NaOH 1N, e confrontando questo valore con quelli di una curva di calibrazione ottenuta da soluzioni standard di acido folico nello stesso solvente. Il  $\text{DD}_{\text{FA}}\%$  calcolato tramite spettroscopia UV è risultato essere pari al 6,2%. Pertanto, la derivatizzazione media in acido folico calcolata tramite le due tecniche spettroscopiche ( $^1\text{H}$  NMR ed UV) è stata pari al 5,35 mol%. Il peso molecolare medio pesato ( $M_w$ ) e la polidispersità dei copolimeri sintetizzati sono stati determinati tramite analisi SEC e i risultati sono riportati in tabella 1. L'incremento dell' $M_w$  dell'INU-LA e di INU-LA-PEG-FA rispetto all'inulina di partenza ha confermato l'avvenuta derivatizzazione del

backbone di inulina con LA, in un primo momento, e successivamente con PEG-FA.

Tabella 1. Grado di derivatizzazione molare di LA e FA legati all'inulina, e di EDA ed FA legati al PHEA. Peso molecolare medio pesato ( $M_w$ ) e polidispersità dei copolimeri e dei rispettivi polimeri di partenza.

Campione	$M_w$ (KDa)	$M_w/M_n$	composizione chimica		
			$DD_{EDA}^a$ (mol%)	$DD_{LA}^a$ (mol%)	$DD_{FA}^b$ (mol%)
inulina	5,6	1,06	-	-	-
INU-LA	10,06	1,54	-	23	-
INU-LA-PEG-FA	8,96	1,23	-	23	4
PHEA	36,4	1,31	-	-	-
PHEA-EDA	26	1,57	25	-	-
PHEA-EDA-FA	26,8	1,44	25	-	5

<sup>a</sup>Calcolato tramite spettroscopia  $^1H$  NMR. <sup>b</sup>Calcolato combinando le spettroscopie  $^1H$  NMR e UV

*Preparazione e caratterizzazione di GNRs rivestiti con INU-LA-PEG-FA e PHEA-EDA-FA (AuNRs@INU-LA-PEG-FA, AuNRs@PHEA-EDA-FA).* I GNRs sono stati funzionalizzati con i copolimeri INU-LA-PEG-FA e PHEA-EDA-FA (Au NRs@INU-LA-PEG-FA, Au NRs@PHEA-EDA-FA) sfruttando l'elevata affinità dell'oro per i gruppi tiolici ed amminici, presenti rispettivamente nei due polimeri di rivestimento. È ben noto in letteratura che la coppia redox tiolo/disolfuro può coesistere sulla superficie delle GNP, ma essendo favorita la formazione di ponti disolfuro per alte densità di polimero di rivestimento sulla superficie delle GNP (Zhou et al. 2014). D'altra parte, i gruppi amminici protonati del PHEA-EDA-FA sono in grado di formare un complesso elettrostatico con la superficie carica negativamente delle GNP per la presenza di ioni complesso quali  $AuCl_4^-/AuCl_2^-$  (Ashavani Kumar et al. 2003). Entrambi i rivestimenti polimerici svolgono molteplici funzioni: agiscono da colloidali protettori stabilizzando la dispersione di GNRs

in mezzi acquosi; si comportano da agenti direzionanti, presentando molecole di acido folico nella loro struttura e consentendo così di realizzare una terapia direzionata al tessuto tumorale. Inoltre, consentono di caricare farmaci anticancro grazie ad interazioni di tipo fisico. L'avvenuto rivestimento polimerico dei GNRs è stato studiato tramite analisi elementare a dispersione di energia di raggi X (Figura 3), che ha rivelato i picchi caratteristici di carbonio, ossigeno ed azoto presenti in entrambi i rivestimenti polimerici.

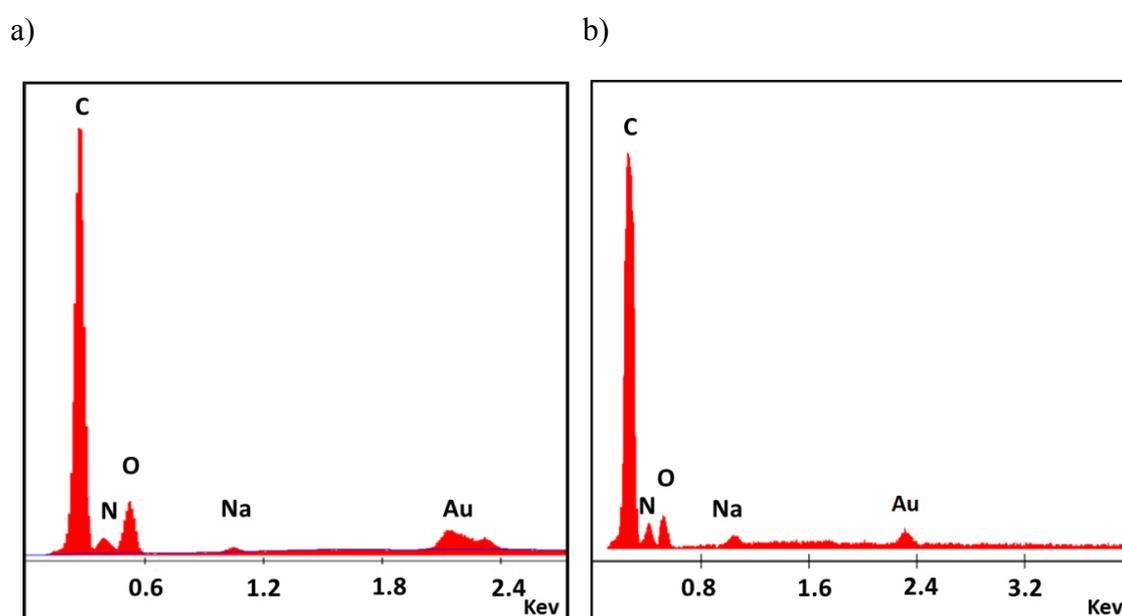


Figura 3. Analisi chimica elementare a dispersione di energia raggi X (EDAX) di AuNRs@PHEA-EDA-FA (a) e AuNRs@INU-LA-PEG-FA.

La stabilità del nanosistema in mezzo acquoso è stata studiata tramite spettroscopia VIS-NIR. Come mostrato in figura 4a, è possibile osservare un lieve redshift della banda SPR presente a circa 810 nm, per i sistemi AuNRs@INU-LA-PEG-FA e AuNRs@PHEA-EDA-FA, senza nessun allargamento o appiattimento di quest'ultima, indicando l'assenza di aggregazione dei GNRs (AuNRs@CTAB) di partenza osservati nell'immagine TEM (Figura 4b).

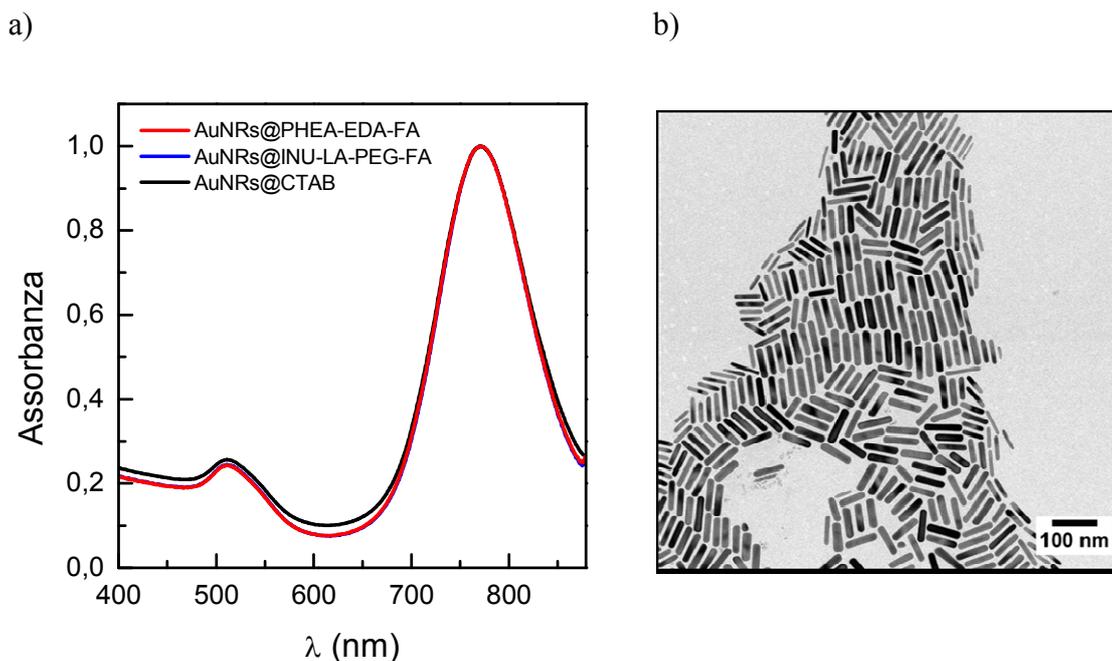


Figura 4. Spettri VIS-NIR di AuNRs@CTAB, AuNRs@INU-LA-PEG-FA e Au@PHEA-EDA-FA (a), che mostrano una banda SPR stretta a circa 800 nm senza segni di aggregazione, in acqua milli-Q. Immagini TEM dei GRs AuNRs@CTAB di partenza (b).

Per rimarcare la necessità di introdurre molecole di LA, e quindi gruppi tiolici, nel polimero di rivestimento INU-LA-PEG-FA, i sistemi AuNRs@INU-LA-PEG ed il suo analogo Au@INU-PEG-FA non funzionalizzato con catene di LA sono stati confrontati in termini di stabilità in mezzo acquoso. Quest'ultimo è stato preparato utilizzando la stessa procedura descritta nella parte sperimentale ma senza la coniugazione dell'acido lipoico. In particolare è stata studiata la stabilità dei due sistemi in PBS pH 7,4 e PBS pH 5,5. Questi studi hanno mostrato che il copolimero INU-LA-PEG-FA migliorava notevolmente la stabilità a 37°C dei GNRs nei due tamponi simulanti distretti fisiologici. Infatti, dalla spettroscopia VIS-NIR (Figura 5) è possibile notare un marcato appiattimento e allargamento della banda SPR longitudinale del sistema che non presenta LA nel polimero di rivestimento, sottolineando pertanto il ruolo fondamentale dei gruppi tiolici nello stabilizzare le GNPs.

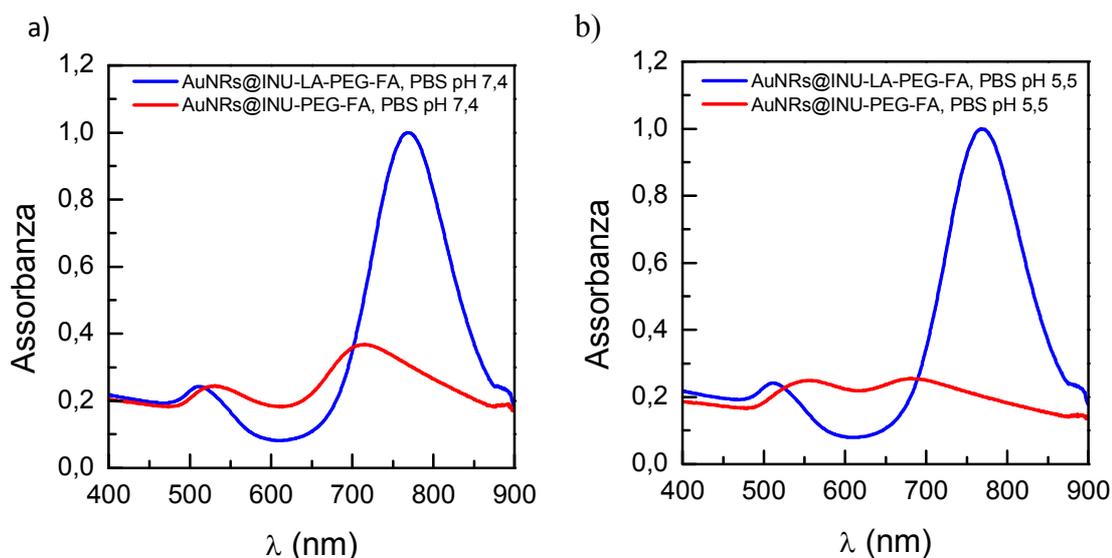


Figura 5. Studi di stabilità di AuNRs@INU-LA-PEG-FA e AuNRs@INU-PEG-FA in PBS pH 7,4 (a) e pH 5,5 (b), a 37°C.

È stata osservata una differenza tra i GNRs rivestiti con INU-LA-PEG-FA e PHEA-EDA-FA. In particolare, il rapporto delle molecole di INU-LA-PEG-FA/ nm<sup>2</sup> di Au<sup>0</sup> richiesto per garantire al sistema una buona stabilità in mezzo acquoso è risultato essere maggiore (R=5) di quello utilizzato per stabilizzare i GNRs con il copolimero PHEA-EDA-FA (R=2) (tabella 2).

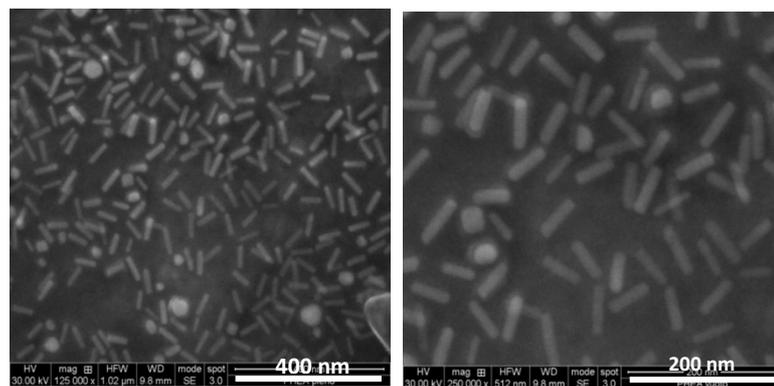
Tabella 2. Confronto tra i sistemi AuNRs@INU-LA-PEG-FA/Nut e AuNRs@PHEA-EDA-FA/Nut in termini di rapporto molecole di polimero/ nm<sup>2</sup> di Au<sup>0</sup> richiesto per garantire stabilità in acqua ai GNRs, efficienza di incapsulazione e potenziale Zeta.

Campione	R*	Drug loading <sup>a</sup> % (w/w)	Efficienza di incapsulazione %	Potenziale Z (mV)
AuNRs@INU-LA-PEG-FA/Nutlin	5	12.00 ±1.5	40.95	9.2
AuNRs@PHEA-EDA-FA/Nutlin	2	13.9 ±1.5	50.02	31.3
AuNRs@CTAB	-	-	-	14.6

<sup>a</sup>Calcolati combinando analisi HPLC e spettroscopia UV.

Questo può essere spiegato considerando la grande differenza in peso molecolare e nella natura dei due copolimeri utilizzati. Infatti, INU-LA-PEG-FA presenta un  $M_w$  di 8,9 KDa che è molto inferiore al  $M_w$  del PHEA-EDA-FA pari a circa 30 KDa. Inoltre, il PHEA-EDA-FA, a differenza delle spiccate caratteristiche anfifiliche del derivato dell' inulina, è caratterizzato da un *backbone* polimerico nettamente più idrofilico che è in grado di creare un significativo *shell* di idratazione attorno ai GNRs. La microscopia SEM ha confermato l'assenza di aggregazione dei GNRs in entrambi i sistemi, mostrando particelle di forma quasi-cilindrica ben separate fra loro aventi un diametro maggiore di circa 70 nm e circondati da un rivestimento di natura organica (Figura 6).

a)



b)

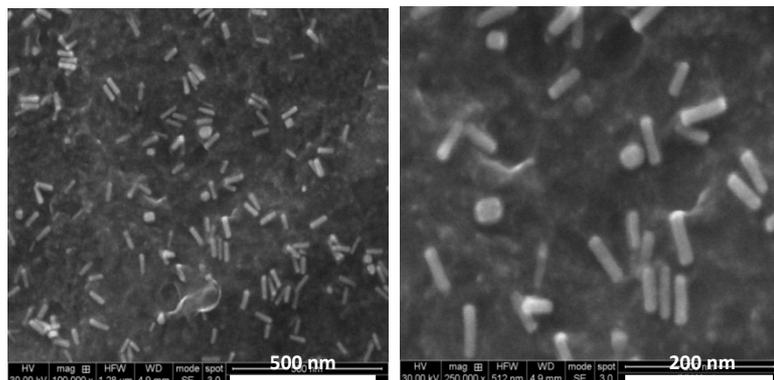


Figura 6. Immagini SEM di AuNRs@PHEA-EDA-FA(a) e AuNRs@INU-LA-PEG-FA (b)

I GNRs rivestiti con i due copolimeri si sono mostrati capaci di caricare efficientemente il farmaco anticancro nutlin-3, attualmente in fase clinica I per la cura di tumori p53 *wild type*. Questa molecola è stata scelta come farmaco anticancro in quanto ha dato finora risultati promettenti in fase clinica I per la cura di tumori come ad esempio il retinoblastoma e l'osteosarcoma. Il nutlin-3 impedisce l'interazione p53-MDM2, inibendo pertanto la degradazione della proteina p53 mediata da MDM2 e determinando così un accumulo di p53 che induce apoptosi cellulare (B. Wang et al. 2012). Le forze che hanno permesso il caricamento di nutlin-3 in Au@INU-LA-PEG-FA e Au NRs@PHEA-EDA-FA sono molto probabilmente differenti. Nel primo caso il meccanismo di *drug loading* più accreditato è l'incapsulazione del farmaco idrofobico all'interno della porzione idrofobica del rivestimento polimerico che è costituito dai residui di acido lipoico. In merito al sistema AuNRs@PHEA-EDA-FA/Nut, invece, le forze trainanti coinvolte nel caricamento del farmaco sono per lo più interazioni fisiche di vario genere inclusi legami ad idrogeno con il *backbone* di PHEA-EDA-FA e presumibilmente anche interazioni idrofobiche tra nutlin-3 e il core di oro metallico e con i gruppi aromatici del FA presenti nel rivestimento. La quantità di farmaco caricato in nei GNRs rivestiti con INU-LA-PEG-FA e PHEA-EDA-FA è stata determinata tramite analisi HPLC ed è risultata pari rispettivamente al 12,00 ±1,5 % e 13,9% p/p, con un'efficienza di incapsulazione approssimativamente pari a 40% e al 50% per i GNRs rivestiti col derivato dell'inulina e del PHEA rispettivamente (tabella 2). La microscopia SEM (immagini non mostrate) e la spettroscopia VIS-NIR dei GNRs caricati con nutlin-3 non hanno mostrato differenze significative rispetto ai sistemi vuoti, senza farmaco, anche dopo essere stati conservati per un mese in dispersione acquosa a temperatura ambiente, dimostrando una buona stabilità chimico-fisica di entrambi i sistemi (Figura 7).

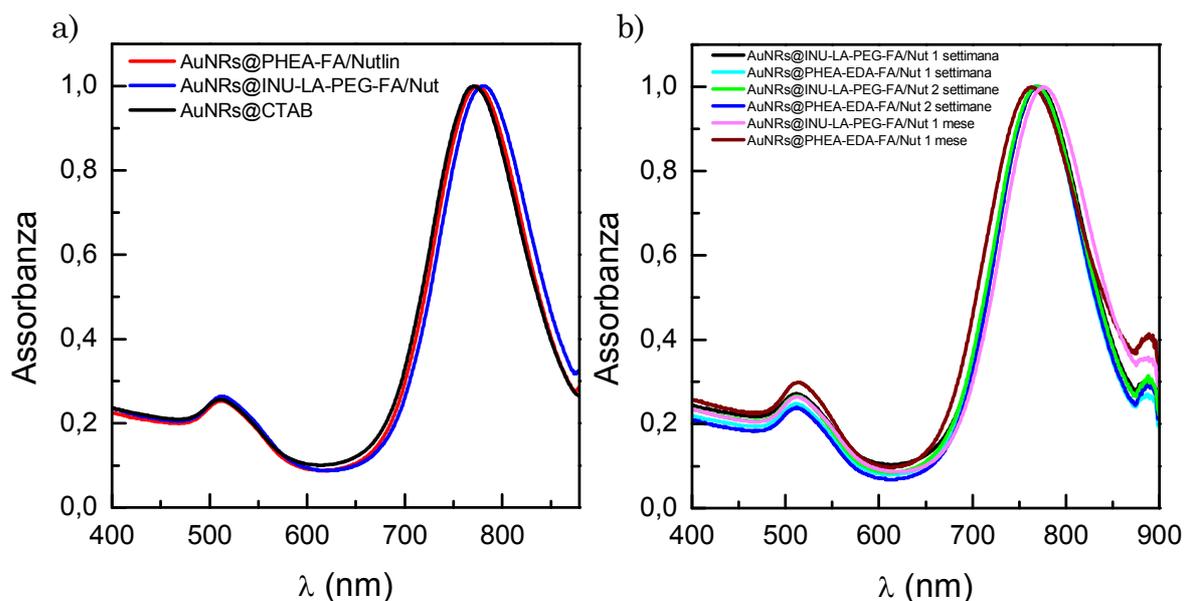


Figura 7. Spettri VIS-NIR di AuNRs@CTAB, AuNRs@INU-LA-PEG-FA/Nut e Au@PHEA-EDA-FA/Nut in acqua Milli-Q appena preparati (a) e dopo conservazione in dispersione acquosa per un periodo di tempo pari ad un mese (b).

Quindi, la modifica superficiale dei GNRs con i due derivati polimerici e il caricamento di nutlin-3 non hanno modificato le caratteristiche spettrali dei GNRs, anzi ne hanno migliorato la stabilità chimico-fisica, garantendo la stabilità dei sistemi in dispersione acquosa fino ad almeno un mese a temperature ambiente. Le misure di potenziale Z hanno mostrato valori di +9,2 mV per Au NRs@INU-LA-PEG-FA/Nut e di +31,3 mV per Au NRs@PHEA-EDA-FA/Nut, mentre i GNRs di partenza (AuNRs@CTAB) presentano un valore di potenziale Z pari a +14,6 mV. Queste variazioni nella carica superficiale sono un'ulteriore conferma della avvenuta modifica superficiale dei GNRs (tabella 2).

È stata valutata la capacità di questi sistemi di rilasciare il farmaco caricato in tre diversi mezzi di rilascio simulanti differenti compartimenti dell'organismo umano. In particolare, gli studi di rilascio sono stati effettuati in PBS pH 7,4 che mima i fluidi extracellulari e citoplasmatici, in PBS pH 5,5 che mima invece il pH leggermente acido intratumorale e dei lisosomi, entrambi arricchiti con siero bovino fetale al 10% in volume per

mimare ancora meglio le condizioni fisiologiche, e in plasma umano per simulare la somministrazione endovenosa dei sistemi. Ad intervalli di tempo prestabiliti è stata quantificata la quantità di nutlin-3 rilasciata in ogni mezzo di rilascio. In figura 8 è riportato il rilascio cumulativo % di nutlin-3 riferito alla quantità totale di farmaco caricata nei sistemi, in funzione del tempo di incubazione. È interessante notare che entrambi i sistemi in plasma umano rilasciano solo una piccolissima quantità del farmaco caricato in un giorno (il 7% per il sistema rivestito con inulina ed il 12 % per quello rivestito con il derivato del PHEA, dopo 24 h), garantendo pertanto una buona stabilità in plasma umano e limitando così fenomeni di tossicità sistemica prima di accumularsi al tumore, nel quale potrà avvenire un rilascio maggiore del farmaco. Questo comportamento è risultato più evidente per I GNRs rivestiti con PHEA-EDA-FA. Infatti per AuNRs@PHEA-EDA-FA/Nut, a pH 5,5, simulante l'ambiente intratumorale, è stato osservato un rilascio di farmaco pari al 36% contro il 18% osservato a pH 7,4 simulante fluidi extracellulari di tessuti sani, e contro il 16% osservato in plasma umano dopo 48 h. I GNRs rivestiti con INU-LA-PEG-FA, invece, hanno mostrato una velocità di rilascio di farmaco inferiore e non hanno mostrato una netta differenza nel rilascio di farmaco nei tre mezzi, assestandosi dopo 48 h tra il 15 ed il 20% di farmaco rilasciato in tutti e tre i mezzi di rilascio.

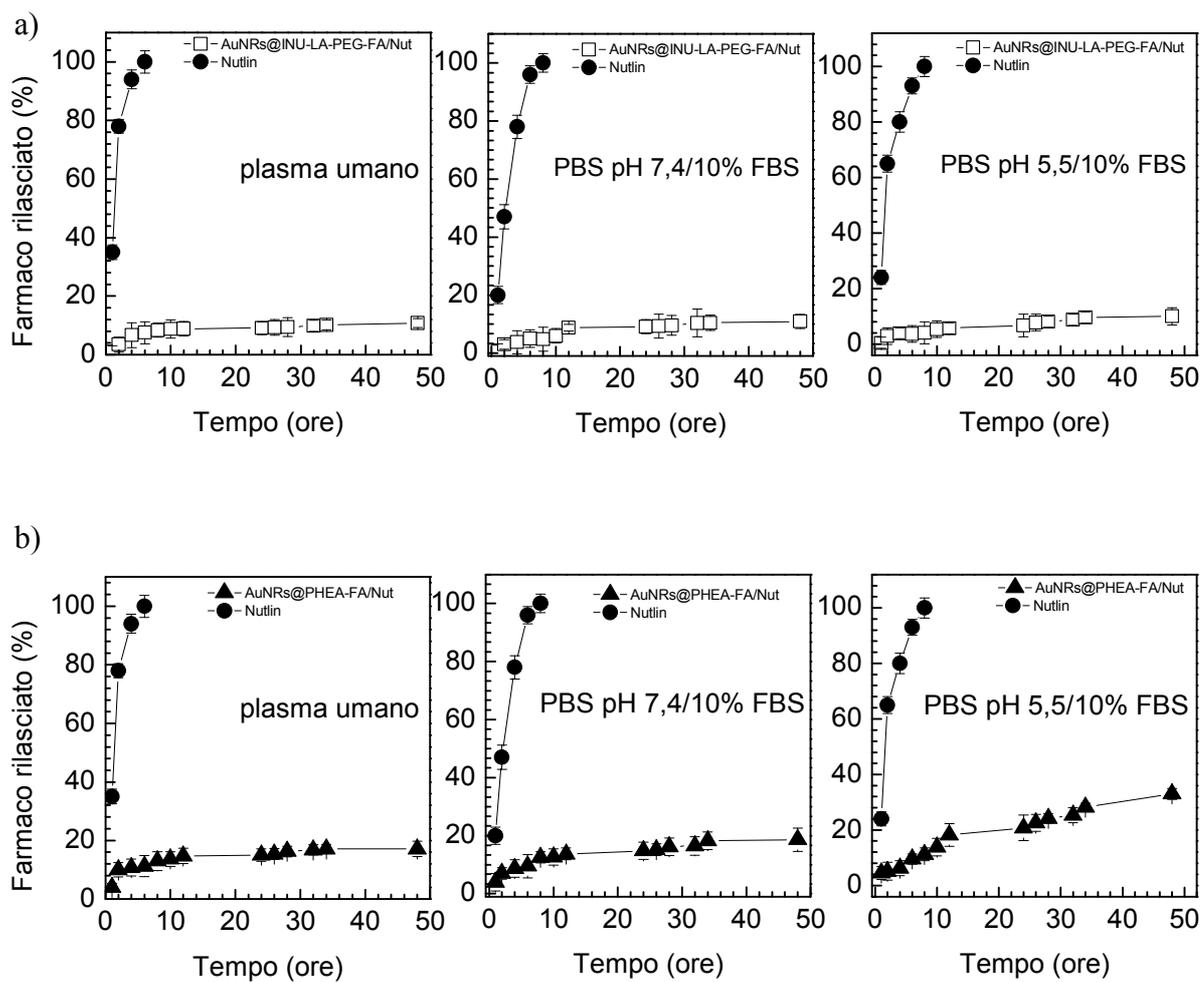


Figura 8. Curve di rilascio di AuNRs@INU-LA-PEG-FA/Nut (a) e AuNRs@PHEA-EDA-FA/Nut (b) ottenute da sinistra verso destra in plasma umano, in PBS pH 7,4/FBS 10% e in PBS pH 5,5/FBS 10%.

Il rilascio di farmaco pH dipendente di AuNRs@PHEA-EDA-FA/Nut può essere spiegato con il profilo di ionizzazione delle ammine primarie del copolimero di rivestimento. Infatti, a pH acido 5,5 queste vengono protonate cambiando così l'affinità del polimero per il mezzo disperdente e quindi determinando un cambio nella strutturazione del polimero di rivestimento sulla superficie dei GNRs che porta ad un maggior rilascio di farmaco. Parallelamente al rilascio pH sensibile, è possibile controllare il rilascio di farmaco dai GNRs tramite l'applicazione di una luce laser nel vicino infrarosso (NIR). Pertanto questa tecnica è stata proposta per aumentare la selettività del trattamento e ridurre contestualmente effetti collaterali indesiderati, controllando in maniera precisa la velocità del rilascio del farmaco incapsulato nei GNRs sensibili ad una sorgente di luce laser nel NIR (Dickerson et al. 2008a).

Sfruttando la ben nota capacità dei GNRs di convertire una luce laser NIR in calore (effetto ipertermico) (Wei 2008) è stato studiato il rilascio di farmaco indotto dall'ipertermia, semplicemente irradiando una dispersione di Au NRs@INU-LA-PEG-FA/Nut o AuNRs@PHEA-EDA-FA/Nut con un raggio laser di lunghezza d'onda vicina alla banda SPR dei GNRs oggetto di studio (810 nm), per 30, 60 90 e 120 secondi e incubando la dispersione risultante a 37°C per 1, 2 e 4 h in modo da determinare la quantità di nutlin-3 rilasciata all'equilibrio. È interessante notare che dopo 120 secondi di esposizione laser e 4 h di incubazione a 37°C a pH 5,5, per il sistema rivestito con INU-LA-PEG-FA, la quantità di nutlin-3 rilasciata è stata più del doppio (dal 3,8% al 10%) di quella rilasciata dallo stesso sistema, nelle stesse condizioni ma senza trattamento laser, e fino a quattro volte maggiore (dal 6 al 24% di farmaco rilasciato) per i GNRs rivestiti con PHEA-EDA-FA (figura 9), sottolineando l'efficiente conversione da parte dei GNRs della luce laser NIR in calore, caratteristica, quest'ultima, estremamente utile nel trattamento localizzato del cancro.

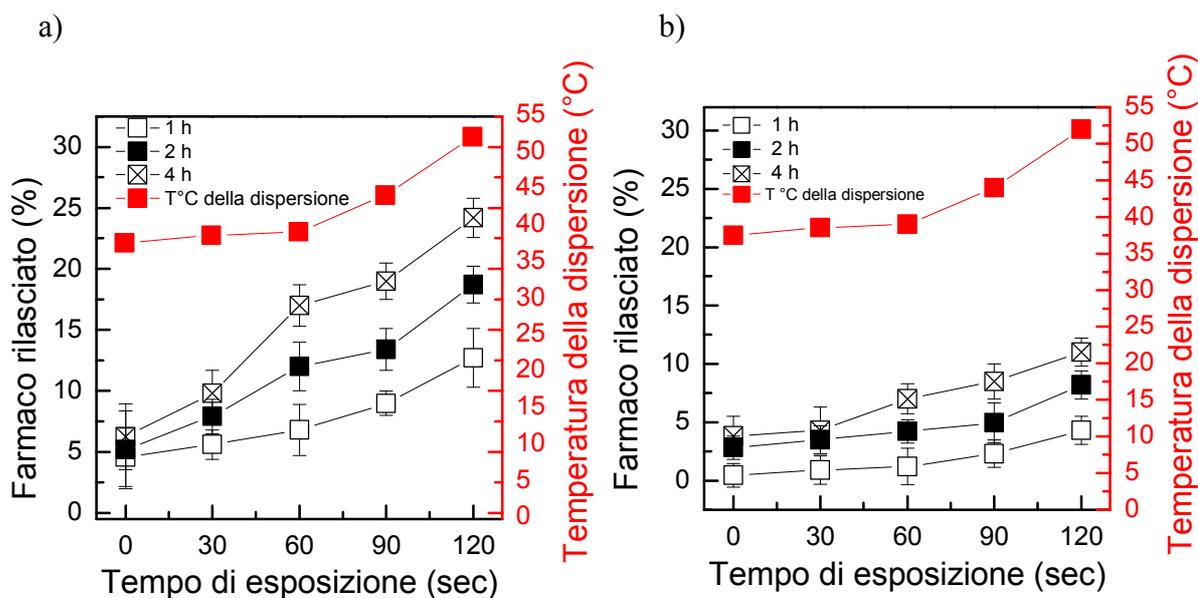


Figura 9. Rilascio di nutlin-3 indotto da un laser NIR, dai sistemi AuNRs@PHEA-EDA-FA/Nut (a) e AuNRs@INU-LA-PEG-FA/Nut (b), in PBS pH 5,5/FBS 10% simulante il pH intratumorale, dopo esposizione laser (30-120 secondi), seguiti da 1, 2 e 4 h di incubazione a 37°C. La linea rossa indica la temperatura del mezzo di rilascio.

*Valutazioni biologiche in vitro.* Il profilo di citotossicità dei sistemi a base di GNRs senza farmaco e caricati con nutlin-3, oggetto di questo studio, è stato valutato prima su classiche colture bidimensionali (2-D) di cellule di osteosarcoma umano U2OS, fibroblasti del derma umano HDFa e su cellule dell'epitelio bronchiale umano 16HBE e, successivamente, su modelli tumorali di osteosarcoma umano tridimensionali (3-D) che mimano meglio le caratteristiche morfologiche e funzionali del microambiente tumorale. Come screening iniziale, è stata studiata l'efficacia dei sistemi sul colture 2-D tradizionali delle linee cellulari sopracitate, tramite saggio MTS, dopo 24 e 48 h di incubazione, utilizzando nutlin-3 non veicolato come controllo positivo. I sistemi vuoti, senza farmaco sono risultati entrambi citocompatibili, nell'intero range di concentrazioni testate e per entrambi i tempi di incubazione, su tutte e tre le linee cellulari, dimostrando che lo stabilizzante cationico citotossico CTAB è stato sostituito con successo dal rivestimento polimerico in entrambi i sistemi (figura 10).

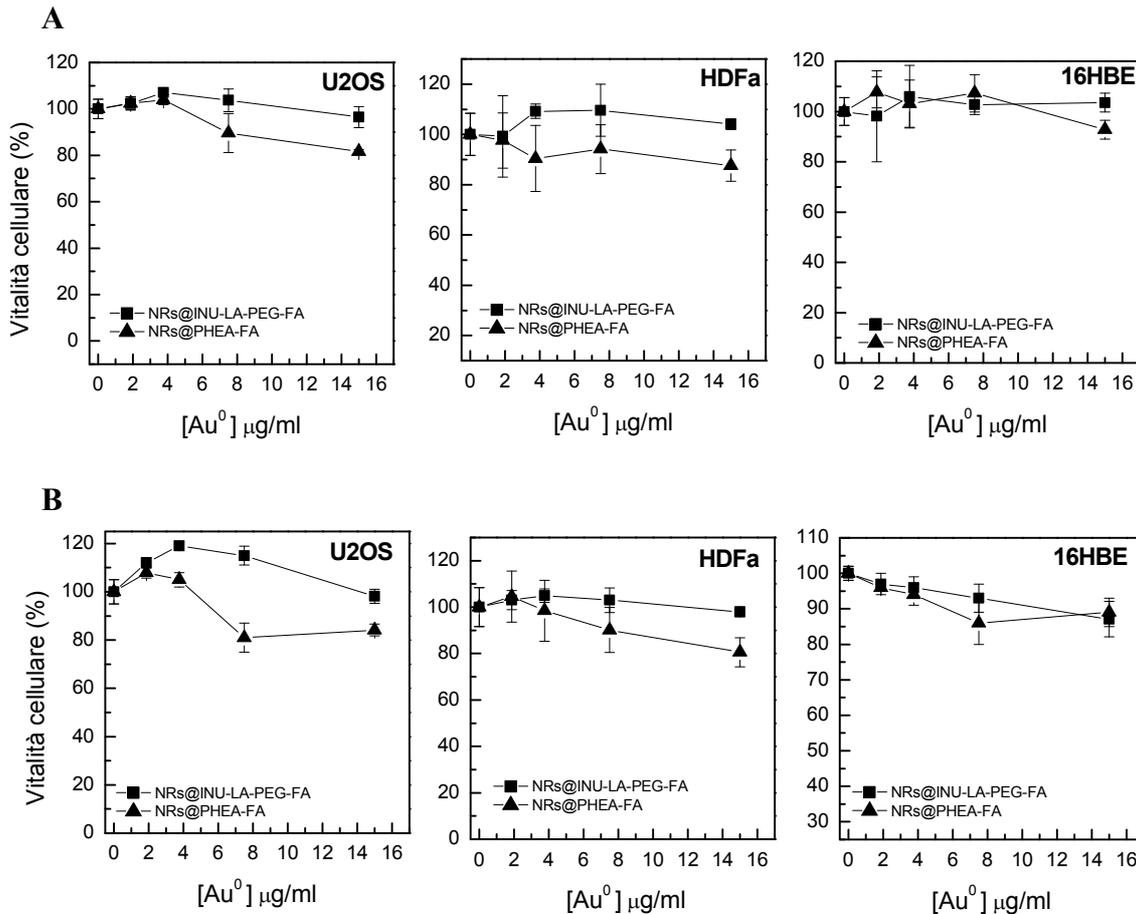


Figura 10. Citocompatibilità dei sistemi senza farmaco AuNRs@INU-LA-PEG-FA e AuNRs@PHEA-EDA-FA sulle linee cellulari U2OS, HDFa e 16HBE (da sinistra a destra). Tempi di incubazione: 24 h (A) e 48 h (B).

In figura 11 è mostrata la vitalità cellulare di AuNRs@INU-LA-PEG-FA/Nut e AuNRs@PHEA-EDA-FA/Nut sulle linee cellulari U2OS, HDFa e 16HBE. Au NRs@INU-LA-PEG-FA/Nut e Au NRs@PHEA-EDA-FA/Nut hanno esercitato un significativo effetto citotossico su tutte e tre le linee cellulari testate, mostrando un'efficacia tempo e dose dipendente, come si può evincere dalla diminuzione della vitalità cellulare in funzione del tempo di incubazione e della concentrazione di nutlin-3. Uno sguardo più attento rivela alcune differenze interessanti tra le cellule tumorali di osteosarcoma (U2OS) e quelle non tumorali, ovvero HDFa e 16HBE. In particolare, quando il nutlin-3 è caricato in Au NRs@INU-LA-PEG-FA/Nut e AuNRs@PHEA-EDA-FA/Nut, questo si rivela sempre più efficace sulle

cellule tumorali U2OS rispetto alle non tumorali, mentre il farmaco libero usato come controllo positivo non fa alcuna distinzione tra le linee cellulari.

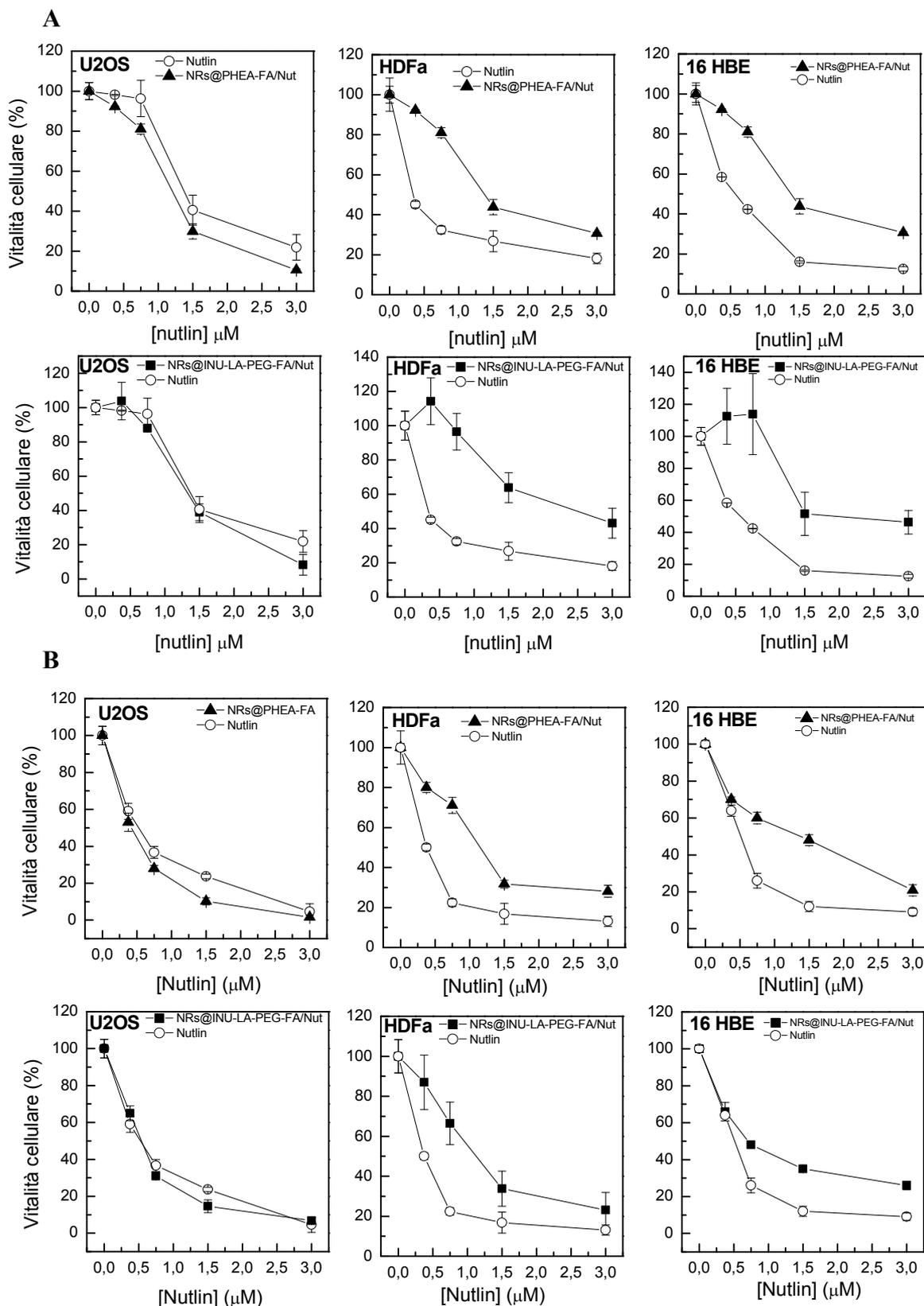


Figura 11. Vitalità cellulare in funzione della concentrazione di nutlin-3 ( $\mu\text{M}$ ) su cellule U2OS, HDFa e 16HBE, dopo 24 h (A) e 48 h (B) di

incubazione con AuNRs@INU-LA-PEG-FA/Nut e AuNRs@PHEA-EDA-FA/Nut.

Ad esempio, alla concentrazione intermedia di 1,5  $\mu\text{M}$ , dopo 24 h di incubazione, la vitalità cellulare delle cellule U2OS incubate con Au NRs@INU-LA-PEG-FA/Nut e Au NRs@PHEA-EDA-FA/Nut è ridotta a circa il 38% e 29% rispettivamente, invece, la vitalità cellulare dei fibroblasti alla stessa concestrazione di farmaco risulta essere del 64% per i GNRs rivestiti con il derivato dell'inulina e del 45% per quelli rivestiti con il derivato del PHEA. I valori di  $\text{IC}_{50}^{24\text{h}}$  e  $\text{IC}_{50}^{48\text{h}}$  calcolati dale curva dose-risposta mostrano più chiaramente la maggiore potenza dei sistemi direzionati con acido folico sulle cellule tumorali U2OS rispetto al farmaco non veicolato (tabella 3).

Tabella 3. Valori di  $\text{IC}_{50}$  per AuNRs@INU-LA-PEG FA/Nut, AuNRs@PHEA-EDA-FA/Nut e nutlin-3 dopo 24h e 48 h di incubazione con cellule U2OS, HDFa e 16HBE.

Campione	$\text{IC}_{50}^{24\text{h}}$	$\text{IC}_{50}^{48\text{h}}$	$\text{IC}_{50}^{24\text{h}}$	$\text{IC}_{50}^{48\text{h}}$	$\text{IC}_{50}^{24\text{h}}$	$\text{IC}_{50}^{48\text{h}}$
	( $\mu\text{M}$ ) U2OS	( $\mu\text{M}$ ) U2OS	( $\mu\text{M}$ ) HDFa	( $\mu\text{M}$ ) HDFa	( $\mu\text{M}$ ) 16HBE	( $\mu\text{M}$ ) 16HBE
AuNRs@INU-LA-PEG FA/Nut	1,6	0,63	2,22	1,27	1,82	0,84
AuNRs@PHEA-EDA-FA/Nut	1,1	0,35	3,42	1,17	2,16	1,15
Nutlin	1,7	0,46	0,44	0,36	0,68	0,51

Questi risultati sono in accordo con la letteratura e mostrano un evidente miglioramento della tossicità selettiva del farmaco quando questo è veicolato tramite sistemi direzionati con acido folico, rispetto al farmaco libero non veicolato. Questi promettenti risultati possono essere giustificati dalla

capacità dei sistemi che presentano residui di acido folico nei polimeri di rivestimento di essere internalizzati in maniera preferenziale dalle cellule U2OS che sovraesprimono i recettori per l'acido folico (FRs), piuttosto che dalle cellule non tumorali, suggerendo un meccanismo di internalizzazione basato sull'endocitosi mediata dai recettori per il folato che risulta in un effetto citotossico selettivo nei confronti delle cellule tumorali. Inoltre, è interessante notare che i GNRs rivestiti con PHEA-EDA-FA si sono rivelati più efficaci nel provocare la morte cellulare delle cellule tumorali rispetto al sistema analogo rivestito con il derivato dell'inulina, come mostrato dai valori di IC<sub>50</sub> a 24 e 48 h (IC<sub>50</sub>24h AuNRs@INU-1A-PEG-FA/Nut: 1,6 μM, IC<sub>50</sub>24h AuNRs@PHEA-EDA-FA/Nut: 1,1 μM, IC<sub>50</sub> 48h AuNRs@INU-1A-PEG-FA/Nut: 0,65 μM, IC<sub>50</sub>48h AuNRs@PHEA-EDA-FA/Nut: 0,35 μM). Ciò può essere dovuto a due motivi principali: una velocità di rilascio di nutlin-3 maggiore per il sistema rivestito con PHEA-EDA-FA, sia a pH 7,4 che 5,5, e una maggiore quantità di sistema internalizzato nelle cellule tumorali. La tecnica di *imaging* di fluorescenza a due fotoni (TFL) si è dimostrata estremamente utile per la determinazione dell'uptake cellulare dei GNRs, sfruttando la proprietà di questi ultimi di emettere un'intensa fluorescenza se irradiati con un laser multifotone. La figura 12 mostra un'internalizzazione tempo dipendente dei GNRs direzionati con acido folico, come dimostrato dal segnale di fluorescenza emesso dai GNRs all'interno del citoplasma cellulare che diventa più intenso all'aumentare del tempo di incubazione; in particolare, la figura 12 mostra che i GNRs rivestiti con PHEA-EDA-FA sono presenti in misura maggiore nel citoplasma cellulare e nella regione perinucleare rispetto ai GNRs rivestiti con INU-LA-PEG-FA. Quindi, l'internalizzazione di AuNRs@PHEA-EDA-FA sembra avvenire più efficientemente rispetto al sistema rivestito con il derivato anfifilico dell'inulina, come dimostrato anche dalla ricostruzione 3-D dell'uptake cellulare in cellule U2OS (figura 13). Questa evidenza sperimentale, insieme con una velocità di rilascio di farmaco maggiore supportano e giustificano il maggiore effetto citotossico osservato per il sistema

funzionalizzato con il derivato del PHEA rispetto a quello rivestito con INU-LA-PEG-FA.

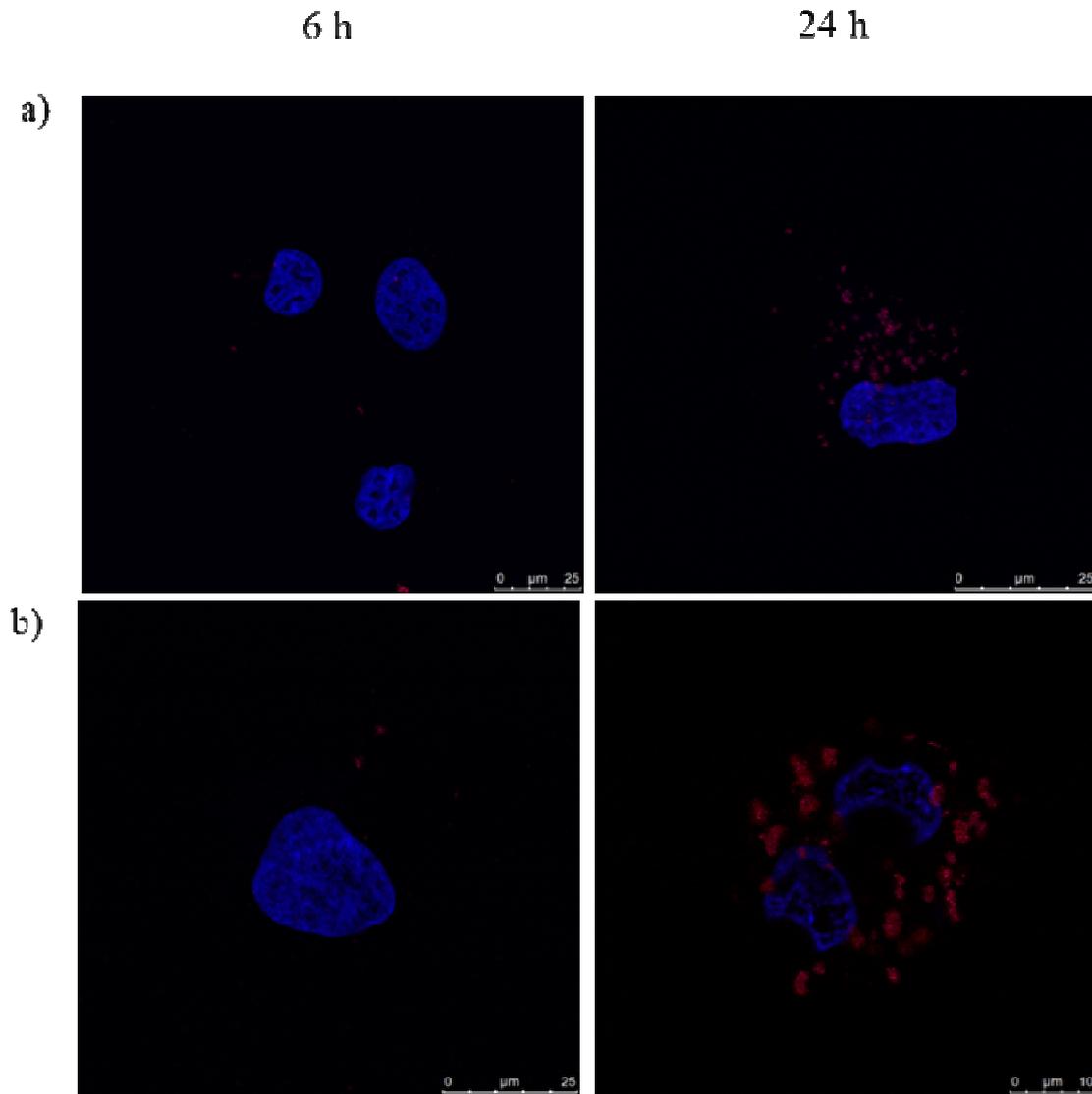


Figure 12. Immagini rappresentative 1024x1024 di cellule di osteosarcoma U2OS vive dopo 6 h e 24 h di incubazione con AuNRs@INU-LA-PEG-FA (a) e AuNRs@PHEA-EDA-FA (b). GNRS signal red channel, DAPI fluorescence (nuclear stain) blue channel. Intensity pseudo-scale is adapted in order to better visualize the signal. I GNRS sono mostrati in rosso ed in nuclei in blu.

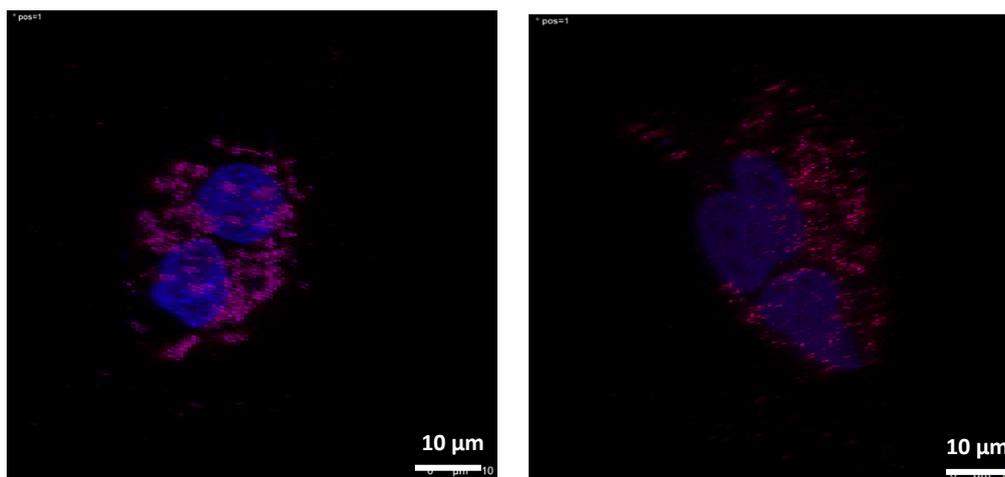


Figura 13. Immagini tridimensionali acquisite al microscopio confocale di AuNRs@PHEA-EDA-FA internalizzate in cellule U2OS, dopo 24 ore di incubazione. I GNRs sono mostrati in rosso ed in nuclei in blu.

Sebbene siano state estrapolate importanti informazioni circa l'attività dei due nanosistemi a base di GNRs, dagli studi in vitro condotti su colture cellulari 2-D tradizionali, queste condizioni di coltura non rispecchiano le caratteristiche essenziali di un tessuto tumorale. Pertanto, al fine di studiare in maniera più completa le proprietà biologiche dei sistemi proposti, è stata valutata l'attività anticancro dei GNRs oggetto di studio su colture tridimensionali di osteosarcoma che mimano in maniera più realistica rispetto ad una semplice coltura 2-D l'organizzazione del microambiente tumorale, nel quale cellule maligne, componenti della matrice extracellulare e segnali biochimici e biofisici sono perfettamente integrati tra loro. In figura 14 si notano alcune differenze nella risposta biologica tra i modelli 3-D di microtumori e la coltura 2-D di osteosarcoma. Infatti, i microtumori sono caratterizzati da una certa resistenza all'attività del farmaco e risultano quindi meno sensibili all'effetto tossico del nutlin-3. Perciò, sono state necessarie concentrazioni più alte di farmaco (da 1 a 50  $\mu\text{M}$  di nutlin-3) e tempi di incubazione più lunghi per poter apprezzare un

effetto biologico significativo. Dopo 72 h di incubazione, la vitalità dei microtumori di OS è stata valutata tramite saggio MTS e sono state acquisite alcune immagini tramite microscopio ottico a campi chiari, che mostrano gli organoidi di OS prima e dopo il trattamento con i nanosistemi carichi di farmaco e vuoti (Figura 15). È interessante notare che anche su modelli di coltura 3-D, il sistema AuNRs@PHEA-EDA-FA/Nut si è mostrato il più efficace nel causare la morte cellulare e ridurre la superficie del microtumore.

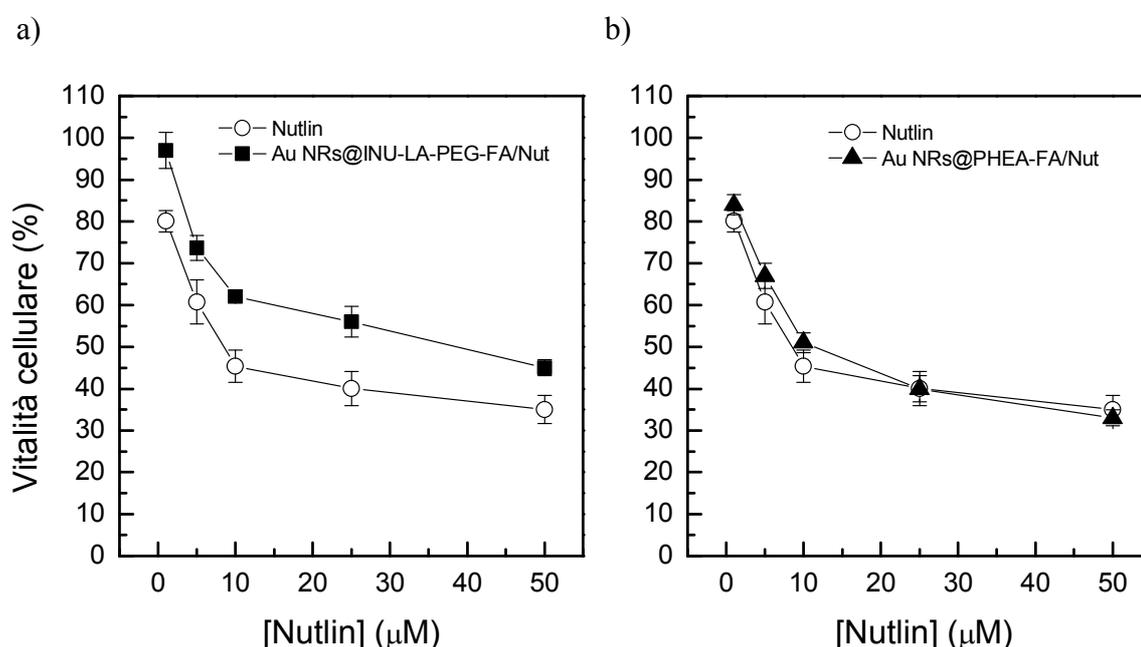


Figura 14. Saggio di citotossicità MTS condotto su organoidi 3-D di U2OS incubati per 72 h con AuNRs@INU-LA-PEG-FA/Nut (a) e AuNRs@PHEA-EDA-FA/Nut (b) in funzione della concentrazione di nutlin-3.

In particolare, alla concentrazione di farmaco più alta (50 μM), la vitalità degli sferoidi di OS è stata ridotta fino al 33%, rispetto agli organoidi controllo, quando trattati con il sistema AuNRs@PHEA-EDA-FA/Nut e fino al 47% quando incubati con il sistema analogo rivestito dal derivato dell'inulina. Parallelamente, alla stessa concentrazione testata, l'area superficiale dei microtumori (calcolata tramite il software di un microscopio Zeiss) è stata ridotta rispettivamente del 78 e del 65% (figura 15a). I valori

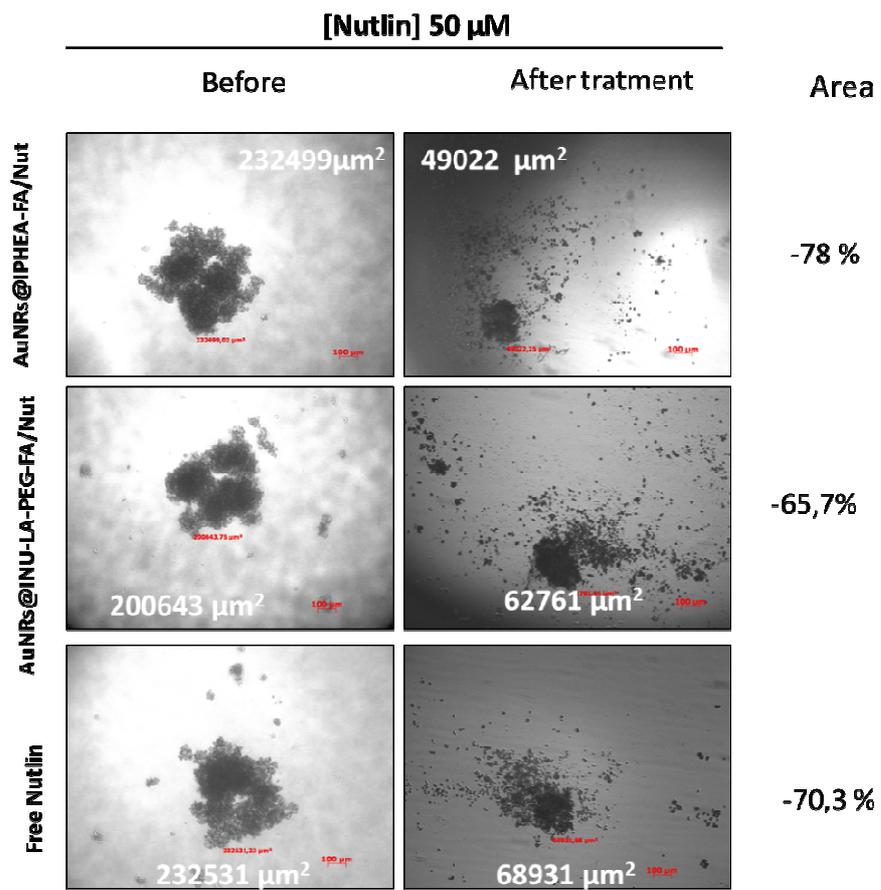
di IC<sub>50</sub><sup>72h</sup> sottolineano la potenza maggiore del sistema AuNRs@PHEA-EDA-FA/Nut rispetto a AuNRs@INU-LA-PEG-FA/Nut sulla coltura 3-D, ed evidenziano una potenza simile del farmaco libero e del farmaco veicolato dal sistema rivestito dal derivato del PHEA (tabella 4).

Tabella 4. Valori di IC<sub>50</sub> per AuNRs@INU-LA-PEG FA/Nut, AuNRs@PHEA-EDA-FA/Nut e nutlin-3 dopo 72 h di incubazione con organoidi di U2OS arricchiti con Matrigel 2,5% v/v

Campione	IC <sub>50</sub> <sup>72 h</sup> (μM) 3D U2OS + Matrigel 2,5% v/v
nutlin-3	8,38
Au NRs@INU-LA-PEG-FA/Nut	23,7
Au NRs@PHEA-FA/Nut	10,2

Gli organoidi incubati con i sistemi vuoti, AuNRs@INU-LA-PEG-FA e AuNRs@PHEA-EDA-FA, e gli organoidi non trattati (controllo) hanno mostrato un'elevata progressione tumorale, aumentando la loro superficie dopo 72 h di incubazione (figura 15b).

a)



b)

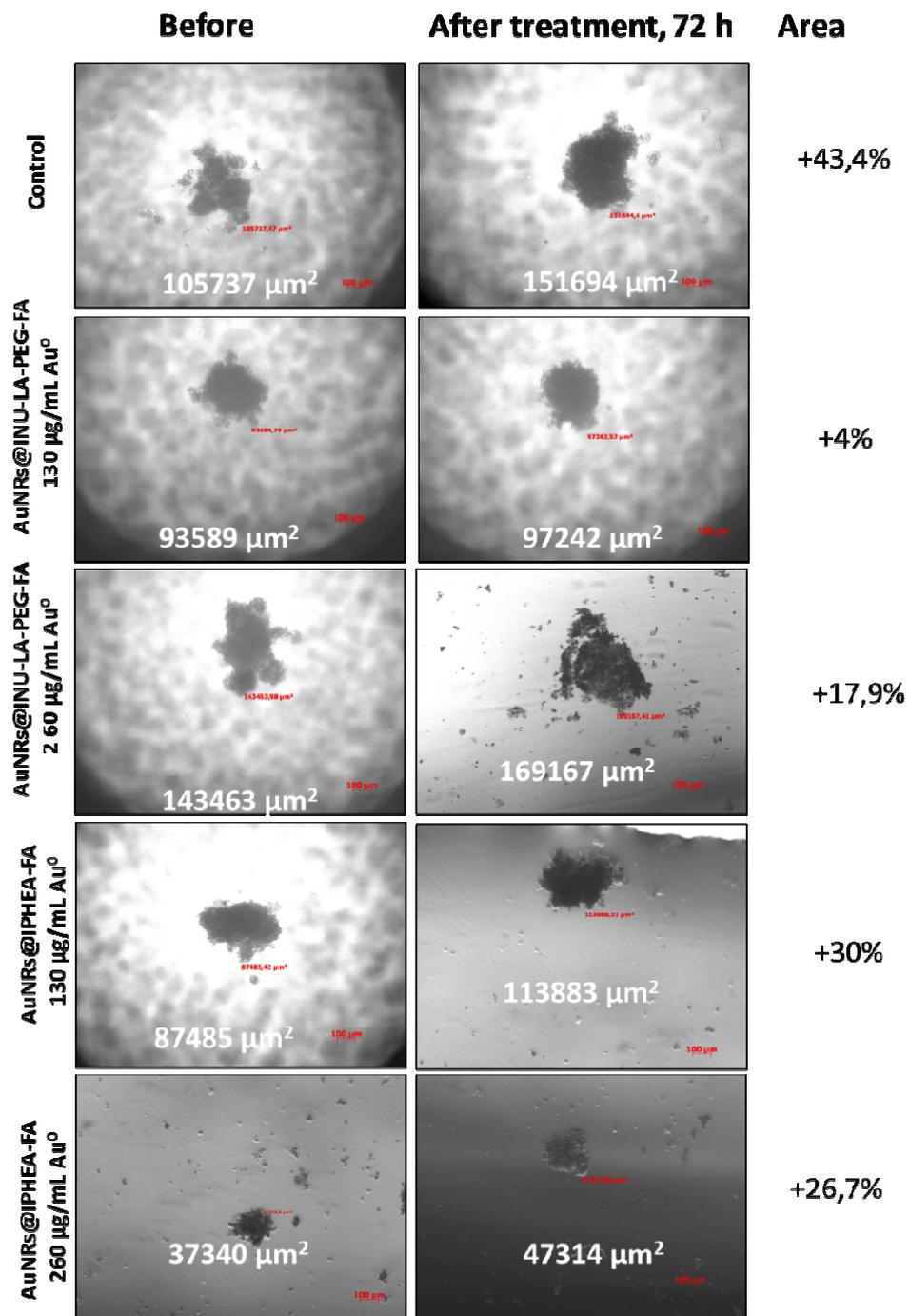


Figura 15. a) Immagini acquisite tramite un microscopio a campi chiari di organoidi di osteosarcoma (U2OS) incubati con AuNRs@INU-LA-PEG-FA/Nut e AuNRs@PHEA-EDA-FA/Nut alla concentrazione di nutlin-3 pari a 50  $\mu\text{M}$ , prima e dopo 72 h di incubazione. Le immagini mostrano una riduzione significativa della superficie dei microtumori dopo il trattamento

con nutlin-3 veicolato e libero. b) Immagini a campi chiari di organoidi di U2OS incubati con i sistemi senza farmaco AuNRs@INU-LA-PEG-FA e AuNRs@PHEA-EDA-FA, alla concentrazione di 130 e 260  $\mu\text{g/ml}$  di Au<sup>0</sup>, e organoidi controllo trattati con solo mezzo di coltura, prima e dopo 72 di incubazione. Le immagini mostrano un incremento della superficie degli organoidi dopo 72 h di incubazione.

*Effetto ipertermico in vitro di AuNRs@PHEA-EDA-FA/Nut e Au NRs@INU-LA-PEG-FA/Nut.* Sfruttando la capacità dei GNRs di agire da efficienti agenti di ipertermia, sono stati condotti esperimenti di termoablazione su colture cellulari 2-D e su modelli tridimensionali di U2OS. Gli studi condotti sulle colture 2-D sono stati utili per dimostrare l'elevata e selettiva efficienza di riscaldamento dei GNRs nei confronti di cellule U2OS e di fibroblasti non tumorali quando esposti ad una luce laser NIR. Al fine di sottolineare i vantaggi legati al trattamento di ipertermia, cellule U2OS e HDFa sono stati incubate per sole 4 h con i sistemi a base di GNRs rivestiti, con e senza farmaco così come anche con nutlin-3 non veicolato, ad una concentrazione alla quale si osserva solo un basso effetto citotossico dopo 4 h di incubazione (0,75  $\mu\text{M}$ ) e, successivamente irradiate per 120 secondi con un laser avente 810 nm di lunghezza d'onda e una potenza di  $3.5 \times 10^{-2}$  W/mm<sup>3</sup>. L'efficacia del trattamento di ipertermia è stata valutata tramite saggio MTS dopo 24 h di post-incubazione seguenti il trattamento laser.

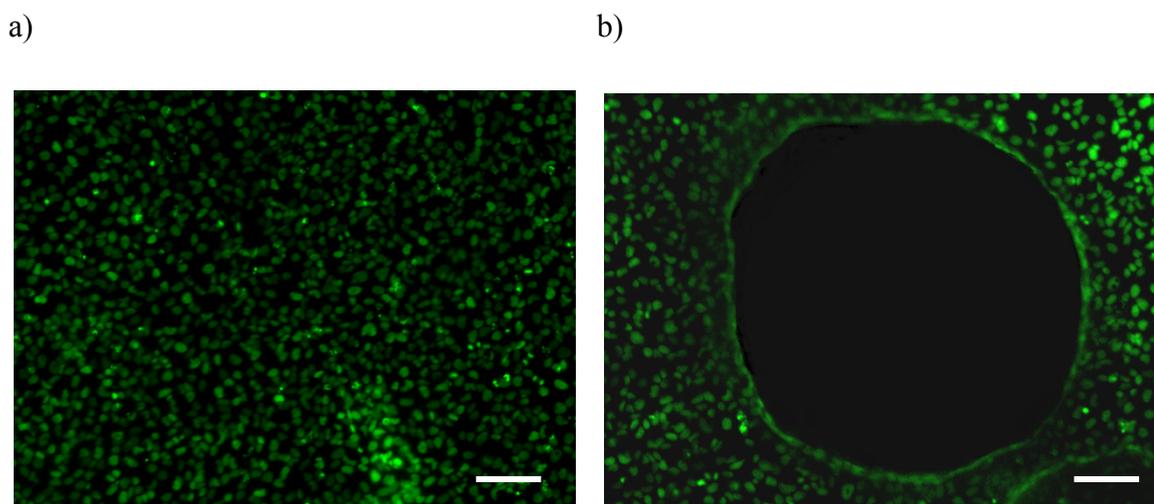
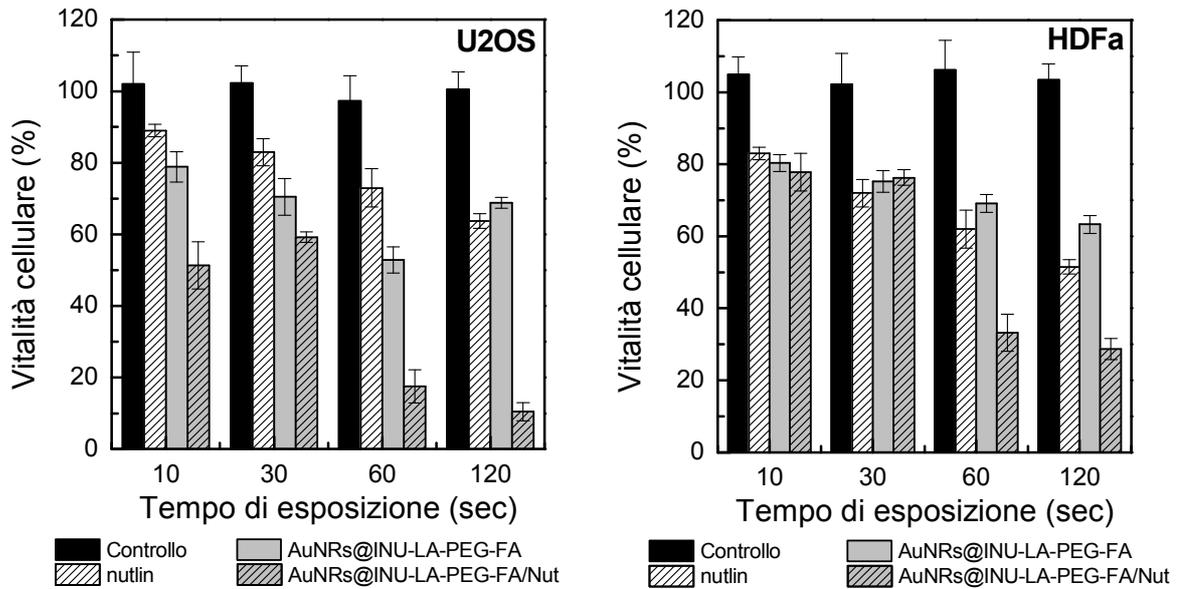


Figura 16. Termoablazione di cellule U2OS incubate con AuNRs@PHEA-EDA-FA 3,75  $\mu\text{g}/\text{ml}$  e marcate con la sonda fluorescente verde Calceina, prima (a) e dopo (b) 60" di esposizione ad un NIR laser avente  $3.5 \times 10^{-2}$  W/mm<sup>3</sup> di potenza. Scale bar 100  $\mu\text{m}$ . Magnification 5X.

In maniera non inaspettata, i GNRs caricati con nutlin-3 hanno mostrato un effetto citotossico maggiore rispetto agli analoghi sistemi senza farmaco per entrambe le linee cellulari. Infatti, oltre agli effetti tossici come la denaturazione proteica e l'eradicazione fisica delle cellule dovuta alle alte temperature raggiunte che hanno portato alla formazione di un vero e proprio buco nel pozzetto (Figura 16), si aggiunge un aumentato rilascio di farmaco e un'aumentata sensibilizzazione all'effetto del farmaco indotti dall'ipertermia. Pertanto è stato possibile notare un effetto citotossico maggiore rispetto ai sistemi vuoti che, nel caso del sistema Au NRs@PHEA-EDA-FA/Nut, ha ridotto la vitalità cellulare delle U2OS fino al 5% e fino al 31% quella dei fibroblasti, dopo 120" di esposizione laser e 24 h di post-incubazione (Figura 17). È interessante notare che entrambi i sistemi a base di GNRs hanno mostrato una tossicità inferiore sulle cellule non tumorali rispetto alle cellule tumorali di osteosarcoma U2OS e questa tossicità selettiva risulta più evidente per il sistema rivestito con PHEA-EDA-FA. Questo comportamento selettivo può essere spiegato sia con l'aumentata internalizzazione del sistema da parte delle cellule tumorali che

si verifica già dopo 4 h di incubazione, a causa dell'affinità tra la superficie dei GNRs funzionalizzati con acido folico e i recettori FRs sovraespressi nelle cellule U2OS, sia con la ben nota maggiore resistenza delle cellule non tumorali ai danni indotti dalle alte temperature rispetto alle cellule tumorali (Dickerson et al. 2008b).

a)



b)

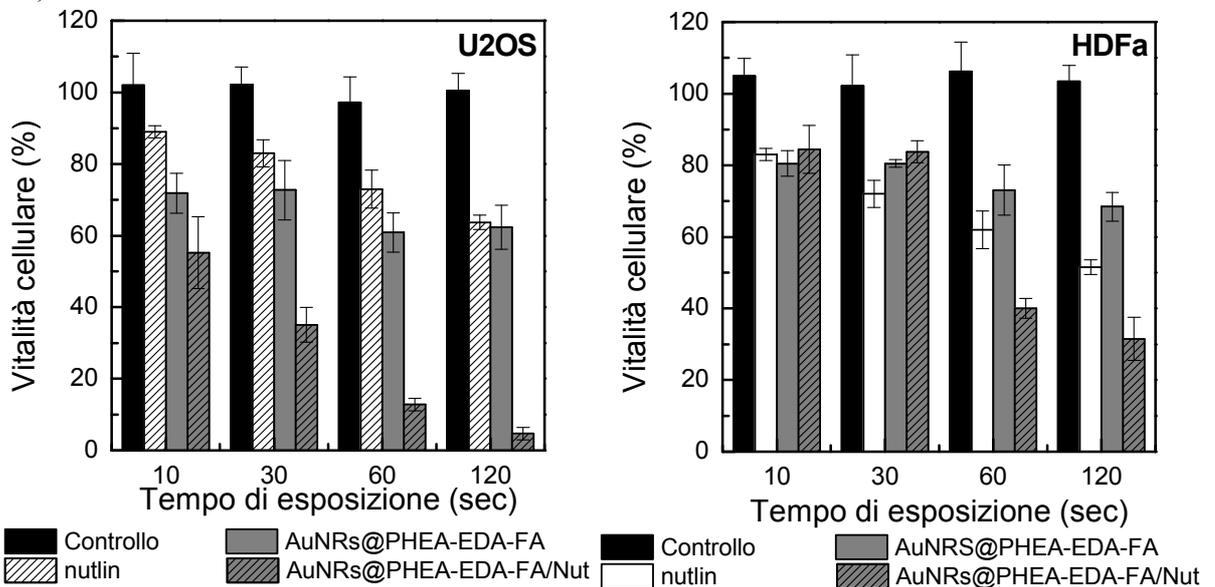


Figura 17. Saggio di citotossicità dopo trattamento di ipertermia, su cellule U2OS e HDFa incubate con i sistemi AuNRs@INU-LA-PEG-FA/Nut (a) e AuNRs@PHEA-EDA-FA/Nut (b) e gli analoghi senza farmaco, alla concentrazione di nutlin-3 pari a 0,75  $\mu\text{M}$  e di Au<sup>0</sup> pari a 3,75  $\mu\text{g/ml}$  dopo 4

h di incubazione, seguiti da trattamento laser e 24 h di post-incubazione. Cellule non trattate e nutlin-3 non veicolato sono stati utilizzati come controlli.

L'uptake intracellulare di nutlin-3, valutato tramite analisi HPLC del lisato cellulare di cellule U2OS e HDFa incubate con AuNRs@INU-LA-PEG-FA/Nut, Au NRs@PHEA-EDA-FA/Nut e nutlin-3 non veicolato (alla concentrazione di 3  $\mu$ M nutlin-3) per 4 h a 37°C, ha mostrato per entrambi i sistemi a base di GNRs, una quantità di farmaco significativamente maggiore nelle cellule tumorali, giustificando così l'effetto citotossico selettivo precedentemente osservato (figura 18).

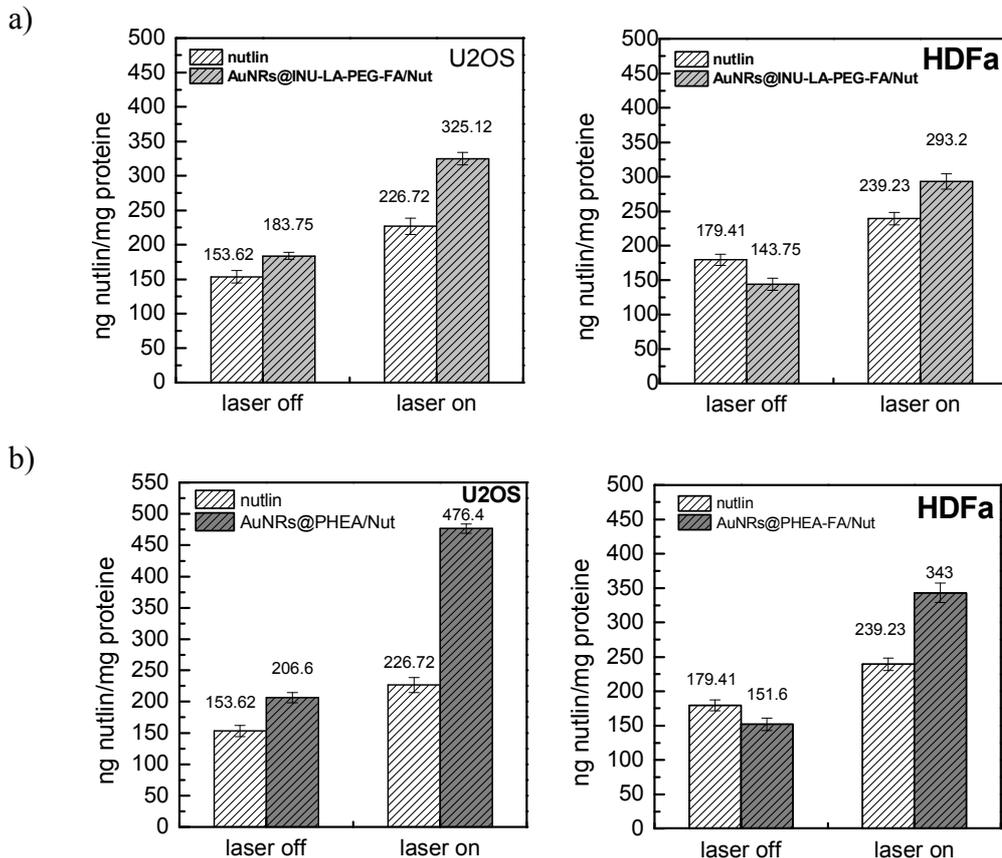


Figura 18. Uptake quantitativo di nutlin-3 veicolato tramite AuNRs@INU-LA-PEG-FA/Nut (a) e AuNRs@PHEA-EDA-FA/Nut (b) in cellule tumorali U2OS (grafici di sinistra) e in cellule non tumorali HDFa (grafici di destra).

Inoltre, è degno di nota il fatto che l'effetto di accumulo selettivo del farmaco osservato nelle cellule U2OS è aumentato notevolmente dall'applicazione di un NIR laser per 120" prima di incubare le cellule esposte ai sistemi per 4 h a 37°C. infatti, come mostrato in figura 18, il nutlin-3 è stato internalizzato più efficientemente nelle cellule U2OS, soprattutto in seguito al trattamento laser e in particolar modo quando veicolato tramite il sistema rivestito con il derivato del PHEA che ancora una volta si è dimostrato più efficace di quello funzionalizzato col derivato dell'inulina. La maggiore internalizzazione del farmaco indotta dal laser è dovuta principalmente a due fattori: l'aumento della permeabilità della membrane cellulari e l'aumento della velocità di rilascio del farmaco, come riportato in precedenza (Figura 9), determinando pertanto un maggiore effetto citotossico selettivo nei confronti delle cellule tumorali.

Al fine di valutare la capacità dei sistemi in studio di agire come agenti di ipertermia per realizzare l'ablazione fototermica di tumori solidi, sono stati condotti esperimenti di ipertermia su organoidi 3-D di U2OS. Sono state utilizzate concentrazioni maggiori di GNRs rispetto agli esperimenti condotti su colture 2-D (52 µg/ml Au<sup>0</sup>, Nutlin: 10 µM) e il saggio MTS è stato eseguito dopo un tempo di incubazione seguente al trattamento laser maggiore (48 h). Dai precedenti dati di tossicità sugli organoidi 3-D di osteosarcoma, si può supporre che i sistemi carichi di farmaco non riescano a penetrare in profondità nella micromassa tumorale, e come conseguenza di ciò, la vitalità cellulare degli organoidi non è mai scesa al di sotto del 30% e del 50% rispettivamente per il GNRs rivestiti col derivato del PHEA e dell'inulina alla concentrazione più alta testata (50 µM). L'effetto tossico dei sistemi può essere aumentato drasticamente tramite il trattamento di ipertermia. Infatti, come mostrato in figura 19, sia i GNRs carichi di farmaco sia quelli senza farmaco possiedono un effetto citotossico maggiore nei confronti degli organoidi in seguito al trattamento laser, raggiungendo il massimo dell'effetto dopo un tempo di esposizione laser di 200" che corrisponde alla quasi totale assenza di cellule vive (vitalità cellulare prossima all'1%).

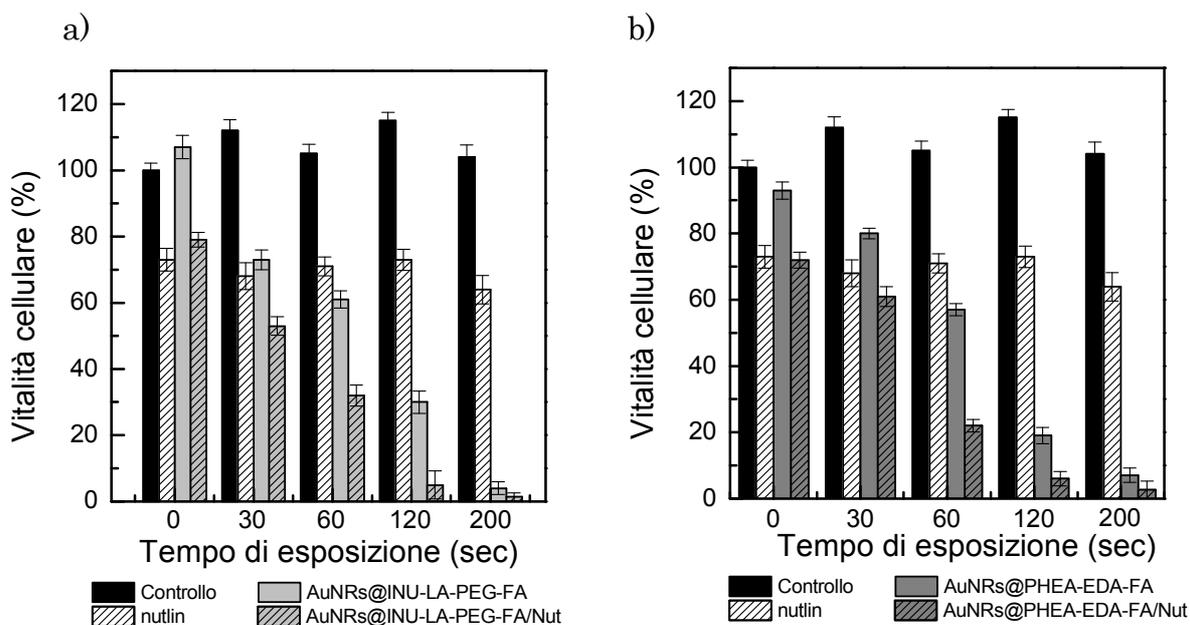
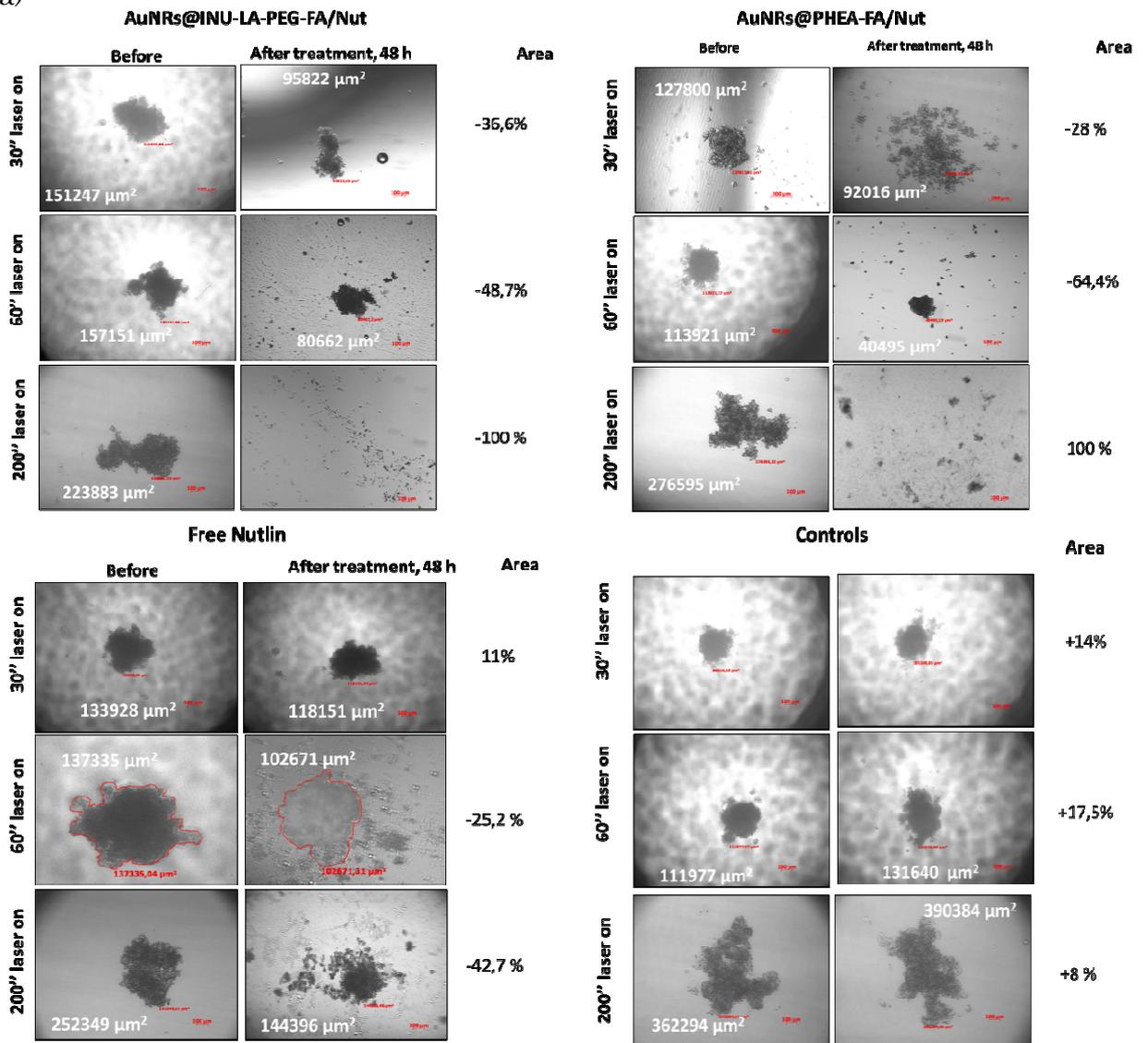


Figura 19. Saggio di citotossicità MTS in seguito al trattamento di ipertermia su organoidi 3-D di U2OS incubati con AuNRs@INU-LA-PEG-FA/Nut (a) e AuNRs@PHEA-EDA-FA/Nut (b) e gli analoghi sistemi senza farmaco, alla concentrazione di nutlin-3 pari a 10  $\mu\text{M}$  e di Au<sup>0</sup> pari a 52  $\mu\text{g/ml}$ , dopo 24 h di incubazione, seguite dal trattamento laser e 48 h di post incubazione successive. Organoidi non trattati e nutlin-3 libero sono stati utilizzati come controlli.

In figura 20 si nota come la maggior parte della struttura organizzata e compatta degli organoidi sia disgregata e appaia “bruciata” dopo il trattamento laser e le dimensioni degli organoidi siano visibilmente ridotte, fino alla totale disgregazione dopo 200” di trattamento laser. Questo effetto è evidente sia per i GNRs veicolanti nutlin-3 sia per quelli senza farmaco (Figura 20 b). Invece, gli organoidi trattati con nutlin-3 non veicolato, ovvero libero, hanno mostrato una riduzione della loro superficie solo del 45% rispetto a quella iniziale, sottolineando che il trattamento laser è in grado di aumentare notevolmente l’attività antitumorale di questo farmaco e pertanto può essere proposto come un validissimo strumento di trattamento localizzato del cancro avente sensibilità micrometrica, utile anche per eliminare eventuali focolai metastatici. I gruppi controllo, ovvero gli

organoidi trattati solo con DMEM ed esposti allo stesso NIR laser, hanno continuato ad aumentare in dimensioni, indicando una buona citocompatibilità della sorgente laser utilizzata.

a)



b)

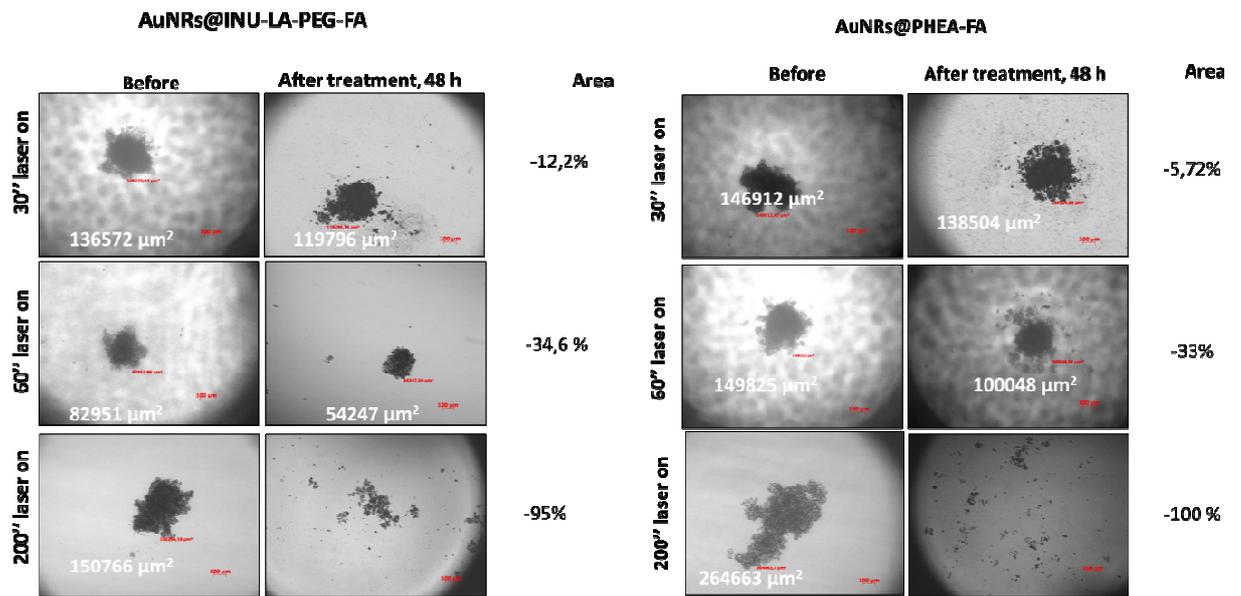


Figura 20. Immagini a campi chiari di organoidi di U2OS incubati con AuNRs@INU-LA-PEG-FA/Nut, AuNRs@PHEA-EDA-FA/Nut nutlin-3 libero (a) e i relativi sistemi senza farmaco (b), alla concentrazione di farmaco per i sistemi carichi pari a  $10 \mu\text{M}$  e di  $\text{Au}^0$  pari a  $52 \mu\text{g/ml}$ , acquisite prima e dopo 30,60 e 200 secondi di esposizione ad un laser NIR settato a  $7 \times 10^{-2} \text{ W/mm}^3$  di potenza.

# Conclusioni

---

Il concetto di teranostica nel trattamento dei tumori solidi, ovvero di simultaneo *imaging* diagnostico e trattamento terapeutico per mezzo di nanoparticelle di oro colloidale, trae beneficio dal fatto che la nanotecnologia ha raggiunto uno sviluppo tale da rendere possibile non solo la produzione di nanoparticelle di oro con proprietà ottiche e chimico-fisiche finemente regolabili, ma anche di modificare la superficie di queste particelle, in modo da veicolare farmaci in siti specifici dell'organismo. Pertanto, allo scopo di ottenere sistemi a base di oro di dimensione nanometrica in grado di veicolare farmaci antineoplastici, sono state sintetizzate nanoparticelle di oro aventi forme e dimensioni differenti rivestite con diversi copolimeri a struttura poliasaccaridica e poliamminocacidica, in grado di garantire una buona stabilità in mezzi simulanti fluidi fisiologici, una discreta capacità di caricamento di farmaci antineoplastici comunemente utilizzati in pratica clinica o in fase di sperimentazione clinica, nonché cinetiche di rilascio utili per realizzare una efficace terapia antitumorale direzionata alle cellule neoplastiche. Inoltre i nanosistemi oggetto di studio di questo progetto di dottorato hanno mostrato un accumulo preferenziale nelle cellule tumorali piuttosto che nelle cellule sane non tumorali. Questo comportamento è risultato più evidente per i sistemi direzionati attivamente alle cellule tumorali con acido folico, supportando il razionale dei sistemi di *targeting* attivo che sta per l'appunto nell'incrementare le interazioni specifiche tra cellule bersaglio e carriers, favorendo il rilascio selettivo di farmaci solo a livello delle cellule cancerose.

## 5.1 NANOSFERE DI ORO RIVESTITE CON UN DERIVATO AMMINICO DELL'INULINA PER IL TRATTAMENTO TUMORE-SPECIFICO DEL CANCRO

In questo studio è riportata la sintesi di nanoparticelle di oro di 40 nm e l'impiego del derivato amminico dell'inulina, INU-EDA, e di un derivato tiolico del PEG come agenti di rivestimento. Le nanoparticelle di oro sono state ottenute tramite riduzione dello ione aurico  $\text{Au}^{\text{III}}$  ad  $\text{Au}^0$  ad opera del citrato, regolando attentamente i parametri cinetici della reazione quali pH, temperatura e concentrazione degli ioni  $\text{Au}^{\text{III}}$  in soluzione al fine di controllare forma, dimensioni e distribuzione dimensionale delle particelle sintetizzate. Sfruttando l'elevata affinità dell'oro verso gruppi tiolici ed amminici, sono stati utilizzati due differenti polimeri di rivestimento PEG-SH e INU-EDA che hanno permesso di ottenere un sistema dotato di eccellente stabilità in mezzo acquoso simulante i fluidi fisiologici e avente proprietà chimico fisiche ottimali che ne consentono l'impiego come *nanocarrier* per il rilascio di doxorubicina alle cellule del cancro della cervice uterina umano e alle cellule del cancro polmonare umano. Questo nanosistema mostra effetti terapeutici vantaggiosi rispetto alla doxorubicina da sola. Infatti, sebbene il rilascio di doxorubicina nelle condizioni fisiologiche sia lento e sembra che la doxorubicina da sola sia più efficace rispetto a  $\text{Au@PEG-INU/Doxo}$ , quest'ultimo è in grado di accumularsi preferenzialmente nelle cellule tumorali dell'adenocarcinoma polmonare e nelle cellule del cancro della mammella umano, limitando pertanto gli effetti di tossicità acuta come la depressione midollare e la cardiotossicità, quest'ultima prima causa di morte dei pazienti in cura con tale farmaco e che determina pertanto un basso indice terapeutico e scarsa maneggevolezza della doxorubicina. Inoltre il sistema proposto è in grado di rilasciare doxorubicina nella sua forma biologicamente attiva, in maniera sostenuta per un periodo di tempo prolungato e rappresenta pertanto un candidato ideale per lo sviluppo di nuovi sistemi nanostrutturati per la terapia anticancro, essendo potenzialmente in grado di aumentare l'efficacia

terapeutica e diminuire gli effetti collaterali tipici dei convenzionali approcci della terapia antitumorale.

## 5.2 PREPARAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI NANOSFERE DI ORO RIVESTITE CON UN DERIVATO DELL'INULINA CONIUGATO CON ACIDO FOLICO PER IL RILASCIO DIREZIONATO DI DOXORUBICINA ALLE CELLULE DEL CANCRO DELLA MAMMELLA.

In questo lavoro è riportata la preparazione e caratterizzazione di un nuovo nanosistema a base di oro colloidale direzionato con acido folico, chiamato Au@INU-FA, caratterizzato da un' eccellente stabilità chimico-fisica ed in grado di caricare facilmente doxorubicina. L'impiego di un derivato folato-coniugato dell'inulina, citocompatibile e biodegradabile come polimero di rivestimento conferisce al sistema due importanti vantaggi: un miglioramento della stabilità fisica del sistema in mezzi simulanti i compartimenti fisiologici, come dimostrato dalla spettroscopia UV-Vis, e un'aumentata attività anticancro nei confronti delle cellule del cancro della mammella umano MCF7, grazie ad un'internalizzazione mediata folato-mediata. Au@INU-FA/Doxo ha presentato una capacità di *drug loading* in doxorubicina pari al 18% p/p, ed è in grado di garantire un rilascio prolungato di tale farmaco anticancro in diversi mezzi simulanti differenti distretti dell'organismo umano. Infine, il sistema proposto in questo lavoro è caratterizzato da un un effetto tossico ed un accumulo selettivi nelle cellule tumorali MCF7 piuttosto che nelle non tumorali 16HBE. I nostri risultati sperimentali offrono pertanto effetti terapeutici potenzialmente vantaggiosi in quanto dimostrano che il sistema Au@INU-FA/Doxo è in grado di aumentare l'efficacia anticancro della doxorubicina nelle cellule maligne, riducendo in tal modo la tossicità di tale farmaco sui tessuti sani. I dati preliminari in vitro raccolti finora supportano la possibile selezione di Au@INU-FA/Doxo per futuri studi in vivo su modelli animali.

### 5.3 TERMOABLAZIONE DI CELLULE TUMORALI MEDIANTE COMPOSITI NANOSTRUTTURATI GRAFENE OSSIDO/ORO DIREZIONATI CON ACIDO FOLICO

In questo lavoro, è stato studiato e proposto come strumento teranostico un nuovo composito nanostrutturato grafene/oro direzionato con folato, PTX-GO/Au@INU-FA. Per la sua produzione è stato messo a punto un metodo semplice di deposizione di nanosfere di oro su fogli di grafene ed un processo di rivestimento con un nuovo derivato dell'inulina coniugato con acido folico. La presenza di gruppi amminici nel rivestimento polimerico ha permesso l'interazione tra il copolimero e la superficie delle GNPs, portando ad un nanosistema stabile come supportato dalla spettroscopia UV-Vis e dagli studi DSC. Il nanosistema è in grado di caricare paclitaxel mostrando un'eccellente stabilità chimico fisica e un adeguato effetto ipertermico indotto dal laser. PTX-GO/Au@INU-FA ha dimostrato di avere una capacità di caricamento del paclitaxel del 1.7% garantendo un rilascio intelligente di farmaco in mezzi differenti. È stato dimostrato che PTX-GO/Au@INU-FA grazie al suo notevole effetto ipertermico è in grado di bruciare fisicamente le cellule cancerose MCF7 in seguito ad irraggiamento laser e al tempo stesso di rilasciare efficacemente paclitaxel garantendo una citotossicità locale sostenuta in seguito al trattamento di ipertermia. Questi risultati supportano ampiamente la tesi che l'effetto ipertermico del sistema proposto combinato con la capacità di rilasciare paclitaxel, può essere sfruttato per una distruzione direzionata della massa tumorale monitorando simultaneamente l'efficienza del trattamento grazie alla presenza di GNPs come agenti di contrasto. Questi risultati aprono la strada a futuri studi in vivo necessari per supportare la sua efficacia come nuovo agente teranostico per un efficace trattamento del cancro.

#### 5.4 GOLD NANORODS FUNZIONALIZZATI CON ACIDO FOLICO SENSIBILI AD UN LASER INFRAROSSO PER LA DIAGNOSI E LA TERAPIA DELL'OSTEOSARCOMA

In questo lavoro sono stati sviluppati due diversi sistemi a base di GNRs rivestiti con due derivati polimerici e direzionati entrambi con acido folico potenzialmente utilizzabili per la diagnosi e terapia dell'osteosarcoma. Entrambi i rivestimenti polimerici, INU-LA-PEG-FA e PHEA-EDA-FA, hanno dotato i GNRs di un'eccellente stabilità chimico-fisica in mezzo acquoso e hanno permesso di caricare discrete quantità di farmaco anticancro nutlin-3. Degno di nota è che entrambi i sistemi si sono rivelati in grado di proteggere in maniera efficiente il farmaco in plasma umano e di rilasciare quest'ultimo in mezzi diversi simulanti l'ambiente extracellulare e citoplasmatico e il micromambiente tumorale. In particolare, i GNRs rivestiti con il derivato del PHEA (AuNRs@PHEA-EDA-FA/Nut) hanno dato luogo ad un rilascio pH sensibile del farmaco caricato, aumentando la velocità di rilascio di nutlin-3 a pH 5.5 che simula le condizioni intratumorali. Entrambi i sistemi hanno mostrato un accumulo selettivo nelle cellule tumorali di osteosarcoma e sono stati in grado di esercitare il loro effetto citotossico in maniera preferenziale sulle cellule tumorali, come dimostrato dagli studi di uptake quantitativo e supportati dalle immagini di luminescenza a due fotoni acquisite tramite un microscopio confocale nonché dai dati di tossicità cellulare acquisiti tramite saggio MTS. Oltre ad essere degli efficaci agenti chemoterapici e diagnostici, i sistemi proposti si sono rivelati degli efficienti agenti di ipertermia, garantendo in questo modo la termoablazione selettiva delle cellule maligne e dell'intera massa tumorale insieme ad un'aumentato rilascio e sensibilizzazione al farmaco indotti dall'ipertermia. Nel complesso, i sistemi AuNRs@INU-LA-PEG-FA/Nut e AuNRs@PHEA-EDA-FA/Nut hanno mostrato una notevole attività anticancro sia su colture cellulari bidimensionali sia su modelli tumorali di osteosarcoma tridimensionali, agendo sia da efficaci sistemi di rilascio di farmaco sia da agenti di ipertemia e mezzi di contrasto. Quindi, i sistemi a base di GNRs oggetto di studio hanno dimostrato di essere promettenti agenti teranostici per

migliorare *l'outcome* di una patologia altamente invalidante e diffusa soprattutto in età pediatrica ed adolescenziale, quale è l'osteosarcoma.

## BIBLIOGRAFIA

- Ahmad, Mohammad Zaki et al. 2010. "Metallic Nanoparticles: Technology Overview & Drug Delivery Applications in Oncology." *Expert Opinion on Drug Delivery* 7(8): 927–42.  
<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/17425247.2010.498473>  
(September 13, 2016).
- Akhavan, Omid et al. 2012. "The Use of a Glucose-Reduced Graphene Oxide Suspension for Photothermal Cancer Therapy." *Journal of Materials Chemistry* 22(27): 13773. <http://xlink.rsc.org/?DOI=c2jm31396k> (July 25, 2016).
- Albanese, Alexandre, Peter S. Tang, and Warren C.W. Chan. 2012. "The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems." *Annual Review of Biomedical Engineering* 14(1): 1–16.  
<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-bioeng-071811-150124> (October 6, 2016).
- Alison Brayfield. 2013. "Pharmaceutical Press - Martindale: The Complete Drug Reference Thirty-Eighth Edition." In Pharmaceutical Press.  
<http://www.pharmpress.com/product/9780857111395/martindale38>.
- Allen, T M. 1994. "Long-Circulating (Sterically Stabilized) Liposomes for Targeted Drug Delivery." *Trends in pharmacological sciences* 15(7): 215–20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7940982> (June 1, 2016).
- Allen, Theresa M, and Pieter R Cullis. 2004. "Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream." *Science (New York, N.Y.)* 303(5665): 1818–22. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15031496> (July 20, 2016).
- Anderson, P M et al. 2014. "Mifamurtide in Metastatic and Recurrent Osteosarcoma: A Patient Access Study with Pharmacokinetic, Pharmacodynamic, and Safety Assessments." *Pediatric blood & cancer*

61(2): 238–44. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23997016>  
(September 13, 2016).

Ashavani Kumar et al. 2003. “Investigation into the Interaction between Surface-Bound Alkylamines and Gold Nanoparticles.”

Bastús, Neus G., Joan Comenge, and Víctor Puentes. 2011. “Kinetically Controlled Seeded Growth Synthesis of Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles of up to 200 Nm: Size Focusing versus Ostwald Ripening.”

Bönnemann, Helmut, and Ryan M. Richards. 2001. “Nanoscope Metal Particles – Synthetic Methods and Potential Applications.” *European Journal of Inorganic Chemistry* 2001(10): 2455–80.  
<http://doi.wiley.com/10.1002/1099-0682%28200109%292001%3A10%3C2455%3A%3AAID-EJIC2455%3E3.0.CO%3B2-Z> (June 1, 2016).

Brown, J M, and A J Giaccia. 1998. “The Unique Physiology of Solid Tumors: Opportunities (and Problems) for Cancer Therapy.” *Cancer research* 58(7): 1408–16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9537241>  
(June 1, 2016).

Brust, M, M Walker, D Bethell, and DJ Schiffrin. 1994. “Synthesis of Thiol-Derivatized Gold Nanoparticles in a Two-Phase Liquid–liquid System.” *Journal of the Chemical Society*.  
<http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/1994/c3/c39940000801> (July 25, 2016).

Bueno, Raphael et al. 2001. “The  $\alpha$  Folate Receptor Is Highly Activated in Malignant Pleural Mesothelioma.” *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 121(2): 225–33.

Carter, P. 2001. “Improving the Efficacy of Antibody-Based Cancer Therapies.” *Nature reviews. Cancer* 1(2): 118–29.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11905803> (June 1, 2016).

- Cavallaro, Gennara et al. 2006. "Folate-Mediated Targeting of Polymeric Conjugates of Gemcitabine." *International journal of pharmaceutics* 307(2): 258–69. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16298091> (June 3, 2016).
- Chen, Chen et al. 2013. "Structural Basis for Molecular Recognition of Folic Acid by Folate Receptors." *Nature* 500(7463): 486–89. <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature12327> (July 19, 2016).
- Chithrani, Devika B. et al. 2010. "Cellular Uptake and Transport of Gold Nanoparticles Incorporated in a Liposomal Carrier." *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 6(1): 161–69.
- Cho, Kwangjae et al. 2008. "Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer." *Clinical cancer research* □: an official journal of the American Association for Cancer Research 14(5): 1310–16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18316549> (June 1, 2016).
- Cho, Sang Hyun. 2005. "Estimation of Tumour Dose Enhancement due to Gold Nanoparticles during Typical Radiation Treatments: A Preliminary Monte Carlo Study." *Physics in medicine and biology* 50(15): N163–73. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16030374> (July 25, 2016).
- Cho, Wan-Seob et al. 2010. "Size-Dependent Tissue Kinetics of PEG-Coated Gold Nanoparticles." *Toxicology and Applied Pharmacology* 245(1): 116–23.
- Connor, Ellen E et al. 2005. "Gold Nanoparticles Are Taken up by Human Cells but Do Not Cause Acute Cytotoxicity." *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 1(3): 325–27. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17193451> (July 25, 2016).
- Conti, Matteo et al. 2006. "Anticancer Drug Delivery with Nanoparticles." *In vivo (Athens, Greece)* 20(6A): 697–701. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17203748> (June 1, 2016).

- Crawley, Niall, Michael Thompson, and Alexander Romaschin. 2014. "Theranostics in the Growing Field of Personalized Medicine: An Analytical Chemistry Perspective." *Analytical chemistry* 86(1): 130–60. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24313751> (September 13, 2016).
- Davis, Mark E, Zhuo Georgia Chen, and Dong M Shin. 2008. "Nanoparticle Therapeutics: An Emerging Treatment Modality for Cancer." *Nature reviews. Drug discovery* 7(9): 771–82. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18758474> (September 14, 2016).
- Dhanasekar, Naresh Niranjana et al. 2015. "Green Chemistry Approach for the Synthesis of Gold Nanoparticles Using the Fungus *Alternaria* Sp." *Journal of microbiology and biotechnology* 25(7): 1129–35. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25737119> (July 25, 2016).
- Dickerson, Erin B. et al. 2008a. "Gold Nanorod Assisted near-Infrared Plasmonic Photothermal Therapy (PPTT) of Squamous Cell Carcinoma in Mice." *Cancer Letters* 269(1): 57–66.
- 2008b. "Gold Nanorod Assisted near-Infrared Plasmonic Photothermal Therapy (PPTT) of Squamous Cell Carcinoma in Mice." *Cancer Letters* 269(1): 57–66.
- Duncan, Bradley, Chaekyu Kim, and Vincent M Rotello. 2010. "Gold Nanoparticle Platforms as Drug and Biomacromolecule Delivery Systems." *Journal of controlled release*: official journal of the *Controlled Release Society* 148(1): 122–27. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20547192> (July 25, 2016).
- Duncan, Ruth. 2006. "Polymer Conjugates as Anticancer Nanomedicines." *Nature Reviews Cancer* 6(9): 688–701. <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrc1958> (July 20, 2016).
- "Effects of 810-Nm Laser on Murine Bone-Marrow-Derived Dendritic Cells." 2011. *and laser surgery*. <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/pho.2010.2837> (September

14, 2016).

Elghanian, R et al. 1997. “Selective Colorimetric Detection of Polynucleotides Based on the Distance-Dependent Optical Properties of Gold Nanoparticles.” *Science (New York, N.Y.)* 277(5329): 1078–81. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9262471> (July 25, 2016).

Elnakat, Hala, and Manohar Ratnam. 2004. “Distribution, Functionality and Gene Regulation of Folate Receptor Isoforms: Implications in Targeted Therapy.” *Advanced drug delivery reviews* 56(8): 1067–84. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15094207> (June 3, 2016).

El-Sayed, Ivan H., Xiaohua Huang, and Mostafa A. El-Sayed. 2006. “Selective Laser Photo-Thermal Therapy of Epithelial Carcinoma Using Anti-EGFR Antibody Conjugated Gold Nanoparticles.” *Cancer Letters* 239(1): 129–35.

Eunkeu Oh, † et al. 2005. “Inhibition Assay of Biomolecules Based on Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) between Quantum Dots and Gold Nanoparticles.”

Furuya, Mitsuko et al. 2005. “Pathophysiology of Tumor Neovascularization.” *Vascular health and risk management* 1(4): 277–90. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17315600> (June 1, 2016).

Galper, Merav Weill et al. 2012. “Effect of Computed Tomography Scanning Parameters on Gold Nanoparticle and Iodine Contrast.” *Investigative radiology* 47(8): 475–81. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22766909> (July 25, 2016).

Gao, Zhong-Gao, Heidi D Fain, and Natalya Rapoport. 2005. “Controlled and Targeted Tumor Chemotherapy by Micellar-Encapsulated Drug and Ultrasound.” *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society* 102(1): 203–22. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15653146> (June 1, 2016).

- Giammona, Gaetano, Bianca Carlisi, and Salvatore Palazzo. 1987. "Reaction of  $\alpha,\beta$ -poly(N-Hydroxyethyl)-DL-Aspartamide with Derivatives of Carboxylic Acids." *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 25(10): 2813–18.  
<http://doi.wiley.com/10.1002/pola.1987.080251016> (October 5, 2016).
- Gindy, Marian E, and Robert K Prud'homme. 2009. "Multifunctional Nanoparticles for Imaging, Delivery and Targeting in Cancer Therapy." *Expert opinion on drug delivery* 6(8): 865–78.
- Giner-Casares, Juan J, Malou Henriksen-Lacey, Marc Coronado-Puchau, and Luis M Liz-Marza N. 2016. "Inorganic Nanoparticles for Biomedicine: Where Materials Scientists Meet Medical Research." *Materials Today* 19(1).
- Griffiths, Peter C. et al. 2013. "Self-Assembled PAA-Based Nanoparticles as Potential Gene and Protein Delivery Systems." *Macromolecular Bioscience* 13(5): 641–49. <http://doi.wiley.com/10.1002/mabi.201200462> (September 14, 2016).
- Gullotti, Emily, and Yoon Yeo. "Extracellularly Activated Nanocarriers: A New Paradigm of Tumor Targeted Drug Delivery." *Molecular pharmaceutics* 6(4): 1041–51.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19366234> (June 3, 2016).
- Guo, Rui et al. 2010. "Multifunctional Nanocarriers for Cell Imaging, Drug Delivery, and near-IR Photothermal Therapy." *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids* 26(8): 5428–34.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20095619> (July 25, 2016).
- Guo, Shaojun, and Erkang Wang. 2007. "Synthesis and Electrochemical Applications of Gold Nanoparticles." *Analytica Chimica Acta* 598(2): 181–92.
- Hainfeld, James F, F Avraham Dilmanian, Daniel N Slatkin, and Henry M Smilowitz. 2008. "Radiotherapy Enhancement with Gold

- Nanoparticles.” *The Journal of pharmacy and pharmacology* 60(8): 977–85. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18644191> (July 25, 2016).
- Heo, Dong Nyoung et al. 2012. “Gold Nanoparticles Surface-Functionalized with Paclitaxel Drug and Biotin Receptor as Theranostic Agents for Cancer Therapy.” *Biomaterials* 33(3): 856–66.
- Herbst, R. S. et al. 2006. “Clinical Cancer Advances 2005: Major Research Advances in Cancer Treatment, Prevention, and Screening--A Report From the American Society of Clinical Oncology.” *Journal of Clinical Oncology* 24(1): 190–205. <http://www.jco.org/cgi/doi/10.1200/JCO.2005.04.8678> (June 1, 2016).
- Howard, Melissa D., Michael Jay, Thomas D. Dziubla, and Xiuling Lu. “PEGylation of Nanocarrier Drug Delivery Systems: State of the Art.”
- Huang, Xiaohua, Ivan H El-Sayed, Wei Qian, and Mostafa A El-Sayed. 2006. “Cancer Cell Imaging and Photothermal Therapy in the near-Infrared Region by Using Gold Nanorods.” *Journal of the American Chemical Society* 128(6): 2115–20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16464114> (July 25, 2016).
- “Intracellular Uptake and Intracavitary Targeting of Folate-Conjugated Liposomes in a Mouse Lymphoma Model with up-Regulated Folate Receptors.” 2006. *cancer therapeutics*. <http://mct.aacrjournals.org/content/5/4/818.short> (September 14, 2016).
- Ivan H. El-Sayed, \*, †, ‡ and Xiaohua Huang, and ‡ Mostafa A. El-Sayed\*. 2005. “Surface Plasmon Resonance Scattering and Absorption of Anti-EGFR Antibody Conjugated Gold Nanoparticles in Cancer Diagnostics: Applications in Oral Cancer.”
- Jain, Prashant K, Xiaohua Huang, Ivan H El-Sayed, and Mostafa A El-Sayed. 2007. “Noble Metals on the Nanoscale: Optical and Photothermal Properties and Some Applications in Imaging, Sensing, Biology, and Medicine.”

- Jain, Prashant K, Kyeong Seok Lee, Ivan H El-Sayed, and Mostafa A El-Sayed. 2006. "Calculated Absorption and Scattering Properties of Gold Nanoparticles of Different Size, Shape, and Composition: Applications in Biological Imaging and Biomedicine." *The journal of physical chemistry. B* 110(14): 7238–48.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16599493> (July 25, 2016).
- Karpanen, Terhi, and Kari Alitalo. 2008. "Molecular Biology and Pathology of Lymphangiogenesis." *Annual review of pathology* 3: 367–97.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18039141> (June 1, 2016).
- Kharlamov, Alexander N. et al. 2015. "Silica–gold Nanoparticles for Atheroprotective Management of Plaques: Results of the NANOM-FIM Trial." *Nanoscale* 7(17): 8003–15.  
<http://xlink.rsc.org/?DOI=C5NR01050K> (July 25, 2016).
- Kim, Jung Eun et al. 2016. "Gold-Based Hybrid Nanomaterials for Biosensing and Molecular Diagnostic Applications." *Biosensors and Bioelectronics* 80: 543–59.
- Kim, YJ, M Ebara, and T Aoyagi. 2013. "A Smart Hyperthermia Nanofiber with Switchable Drug Release for Inducing Cancer Apoptosis." *Advanced Functional Materials*.  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/adfm.201300746/full>  
 (September 14, 2016).
- Krystofiak, Evan S. et al. 2012. "Elimination of Tumor Cells Using Folate Receptor Targeting by Antibody-Conjugated, Gold-Coated Magnetite Nanoparticles in a Murine Breast Cancer Model." *Journal of Nanomaterials* 2012: 1–9.  
<http://www.hindawi.com/journals/jnm/2012/431012/> (September 14, 2016).
- Kumar, Ashavani et al. 2003. "Investigation into the Interaction between Surface-Bound Alkylamines and Gold Nanoparticles." *Langmuir* 19(15):

- 6277–82. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la034209c> (September 14, 2016).
- Langer, R. 1998. “Drug Delivery and Targeting.” *Nature* 392(6679 Suppl): 5–10. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9579855> (June 1, 2016).
- Laurent, Sophie, Silvio Dutz, Urs O. Häfeli, and Morteza Mahmoudi. 2011. “Magnetic Fluid Hyperthermia: Focus on Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles.” *Advances in Colloid and Interface Science* 166(1): 8–23.
- Lavasanifar, Afsaneh, John Samuel, and Glen S Kwon. 2002. “Poly(ethylene Oxide)-Block-poly(L-Amino Acid) Micelles for Drug Delivery.” *Advanced drug delivery reviews* 54(2): 169–90. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11897144> (June 3, 2016).
- Lee, Hyukjin, Kyuri Lee, In Kyoung Kim, and Tae Gwan Park. 2008. “Synthesis, Characterization, and in Vivo Diagnostic Applications of Hyaluronic Acid Immobilized Gold Nanoparticles.” *Biomaterials* 29(35): 4709–18.
- Lee, Kyuri, Hyukjin Lee, Ki Hyun Bae, and Tae Gwan Park. 2010. “Heparin Immobilized Gold Nanoparticles for Targeted Detection and Apoptotic Death of Metastatic Cancer Cells.” *Biomaterials* 31(25): 6530–36.
- Lee, Somin Eunice et al. 2009. “Biologically Functional Cationic Phospholipid-Gold Nanoplasmonic Carriers of RNA.” *Journal of the American Chemical Society* 131(39): 14066–74. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19746908> (July 25, 2016).
- Li Volsi, Anna et al. 2016. “Inulin Coated Plasmonic Gold Nanoparticles as a Tumor-Selective Tool for Cancer Therapy.” *J. Mater. Chem. B* 4(6): 1150–55. <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5TB01810B> (May 17, 2016).
- Li, Jing-Liang, and Min Gu. 2010. “Surface Plasmonic Gold Nanorods for Enhanced Two-Photon Microscopic Imaging and Apoptosis Induction of

- Cancer Cells.” *Biomaterials* 31(36): 9492–98.
- Libutti, Steven K et al. 2010. “Phase I and Pharmacokinetic Studies of CYT-6091, a Novel PEGylated Colloidal Gold-rhTNF Nanomedicine.” *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 16(24): 6139–49.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20876255> (July 25, 2016).
- Licciardi, M. et al. 2014. “Amphiphilic Inulin Graft Co-Polymers as Self-Assembling Micelles for Doxorubicin Delivery.” *Journal of Materials Chemistry B* 2(27): 4262. <http://xlink.rsc.org/?DOI=c4tb00235k> (June 22, 2016).
- Licciardi, Mariano et al. 2006. “Synthesis and Characterization of Polyaminoacidic Polycations for Gene Delivery.” *Biomaterials* 27(9): 2066–75. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16233912> (June 22, 2016).
- “*In Vitro* Biological Evaluation of Folate-Functionalized Block Copolymer Micelles for Selective Anti-Cancer Drug Delivery.” *Macromolecular Bioscience* 8(7): 615–26. <http://doi.wiley.com/10.1002/mabi.200800009> (June 3, 2016).
2010. “Folate-Targeted Supramolecular Vesicular Aggregates Based on Polyaspartyl-Hydrazide Copolymers for the Selective Delivery of Antitumoral Drugs.” *Biomaterials* 31(28): 7340–54.
- “PHEA-Graft-Polybutylmethacrylate Copolymer Microparticles for Delivery of Hydrophobic Drugs.” *International journal of pharmaceutics* 433(1-2): 16–24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22575755> (September 13, 2016).
- “Inulin-Ethylenediamine Coated SPIONs Magnetoplexes: A Promising Tool for Improving siRNA Delivery.” *Pharmaceutical Research* 32(11): 3674–87. <http://link.springer.com/10.1007/s11095-015-1726-y> (July 26, 2016).

- Lin, Fong-Sian et al. 2013. "Radiotherapy of the Excretable Radioactive Gold Nanocomposite with Intratumoral Injection." *International Journal of Materials, Mechanics and Manufacturing*: 265–68.  
<http://www.ijmmm.org/index.php?m=content&c=index&a=show&catid=24&id=68> (July 25, 2016).
- Liong, Monty et al. 2008. "Multifunctional Inorganic Nanoparticles for Imaging, Targeting, and Drug Delivery."
- Liu, Juewen, and Yi Lu. 2006. "Preparation of Aptamer-Linked Gold Nanoparticle Purple Aggregates for Colorimetric Sensing of Analytes." *Nature Protocols* 1(1): 246–52.  
<http://www.nature.com/doi/10.1038/nprot.2006.38> (July 25, 2016).
- Longmire, Michelle, Peter L Choyke, and Hisataka Kobayashi. 2008. "Clearance Properties of Nano-Sized Particles and Molecules as Imaging Agents: Considerations and Caveats." *Nanomedicine (London, England)* 3(5): 703–17. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18817471> (July 25, 2016).
- Lowery, Amanda R et al. 2006. "Immunonanoshells for Targeted Photothermal Ablation of Tumor Cells." *International journal of nanomedicine* 1(2): 149–54.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17722530> (July 25, 2016).
- Maeda H. "The Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect in Tumor Vasculature: The Key Role of Tumor-Selective Macromolecular Drug Targeting."
- Maestro, Laura M. et al. 2014. "Quantum Dot Thermometry Evaluation of Geometry Dependent Heating Efficiency in Gold Nanoparticles." *Langmuir* 30(6): 1650–58.
- Manohar, Srirang, Constantin Ungureanu, and Ton G Van Leeuwen. "Gold Nanorods as Molecular Contrast Agents in Photoacoustic Imaging: The Promises and the Caveats." *Contrast media & molecular imaging* 6(5):

- 389–400. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22025339> (July 25, 2016).
- Marradi, Marco et al. 2011. “Gold Nanoparticles Coated with Oligomannosides of HIV-1 Glycoprotein gp120 Mimic the Carbohydrate Epitope of Antibody 2G12.” *Journal of Molecular Biology* 410(5): 798–810.
- Matsumura, Y, and H Maeda. 1986. “A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumoritropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs.” *Cancer research* 46(12 Pt 1): 6387–92.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2946403> (July 20, 2016).
- Mauro, Nicolò et al. 2015. “Biotin-Containing Reduced Graphene Oxide-Based Nanosystem as a Multieffect Anticancer Agent: Combining Hyperthermia with Targeted Chemotherapy.” *Biomacromolecules* 16(9): 2766–75. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26204419> (July 26, 2016).
- McDonald, Donald M, and Peter L Choyke. 2003. “Imaging of Angiogenesis: From Microscope to Clinic.” *Nature medicine* 9(6): 713–25.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12778170> (June 1, 2016).
- Menon, Jyothi U. et al. 2013. “Nanomaterials for Photo-Based Diagnostic and Therapeutic Applications.” *Theranostics* 3(3): 152–66.
- Moghimi, S Moein. 2006. “Recent Developments in Polymeric Nanoparticle Engineering and Their Applications in Experimental and Clinical Oncology.” *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* 6(6): 553–61.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17100563> (June 1, 2016).
- Nakashima-Matsushita, N et al. 1999. “Selective Expression of Folate Receptor Beta and Its Possible Role in Methotrexate Transport in Synovial Macrophages from Patients with Rheumatoid Arthritis.” *Arthritis and rheumatism* 42(8): 1609–16.

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10446858> (June 3, 2016).
- Narayanan, Sreeja et al. 2011. “Biocompatible Magnetite/Gold Nanohybrid Contrast Agents via Green Chemistry for MRI and CT Bioimaging.”
- Nehl, Colleen L, Hongwei Liao, and Jason H Hafner. 2006. “Optical Properties of Star-Shaped Gold Nanoparticles.” *Nano letters* 6(4): 683–88. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16608264> (July 25, 2016).
- Nicholas J. Durr, † et al. 2007. “Two-Photon Luminescence Imaging of Cancer Cells Using Molecularly Targeted Gold Nanorods.”
- Nie, Shuming, Yun Xing, Gloria J Kim, and Jonathan W Simons. 2007. “Nanotechnology Applications in Cancer.” *Annual review of biomedical engineering* 9: 257–88. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17439359> (June 1, 2016).
- Nobile, Lucio, and Stefano Nobile. 2016. “Recent Advances of Nanotechnology in Medicine and Engineering.” In AIP Publishing, 020058. <http://scitation.aip.org/content/aip/proceeding/aipcp/10.1063/1.4949633> (May 31, 2016).
- Paciotti, Giulio F., David G.I. Kingston, and Lawrence Tamarkin. 2006. “Colloidal Gold Nanoparticles: A Novel Nanoparticle Platform for Developing Multifunctional Tumor-Targeted Drug Delivery Vectors.” *Drug Development Research* 67(1): 47–54. <http://doi.wiley.com/10.1002/ddr.20066> (July 25, 2016).
- Pan, Yu et al. 2007. “Size-Dependent Cytotoxicity of Gold Nanoparticles.” *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 3(11): 1941–49. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17963284> (July 25, 2016).
- Panda, T, and K Deepa. 2011. “Biosynthesis of Gold Nanoparticles.” *Journal of nanoscience and nanotechnology* 11(12): 10279–94. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22408900> (July 25, 2016).

- “Pilot Study of AuroLase(tm) Therapy in Refractory And/or Recurrent Tumors of the Head and Neck.”
- Pugh, Christopher W, and Peter J Ratcliffe. 2003. “Regulation of Angiogenesis by Hypoxia: Role of the HIF System.” *Nature medicine* 9(6): 677–84. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12778166> (June 1, 2016).
- Rayavarapu, Raja G et al. 2010. “*In Vitro* Toxicity Studies of Polymer-Coated Gold Nanorods.” *Nanotechnology* 21(14): 145101. <http://stacks.iop.org/0957-4484/21/i=14/a=145101?key=crossref.7bb9d61a5c10c7e75ff9dc6e1dace93d> (July 25, 2016).
- Riehemann, Kristina et al. 2009. “Nanomedicine - Challenge and Perspectives.” *Angewandte Chemie - International Edition* 48(5): 872–97.
- Roco, Mihail C. 2003. “Nanotechnology: Convergence with Modern Biology and Medicine.” *Current Opinion in Biotechnology* 14(3): 337–46.
- Roco, Mihail C. 2011. “The Long View of Nanotechnology Development: The National Nanotechnology Initiative at 10 Years.” *Journal of Nanoparticle Research* 13(2): 427–45. <http://link.springer.com/10.1007/s11051-010-0192-z> (September 13, 2016).
- Scarabelli, Leonardo, Marek Grzelczak, and Luis M. Liz-Marzán. 2013. “Tuning Gold Nanorod Synthesis through Prereduction with Salicylic Acid.”
- Scarabelli, Leonardo, Ana Sánchez-Iglesias, Jorge Pérez-Juste, and Luis M. Liz-Marzán. 2015. “A ‘Tips and Tricks’ Practical Guide to the Synthesis of Gold Nanorods.”
- Scialabba, C. et al. 2014. “Inulin-Based Polymer Coated SPIONs as

- Potential Drug Delivery Systems for Targeted Cancer Therapy.” *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 88(3): 695–705.
- Scott H. Brewer, † et al. 2005. “Probing BSA Binding to Citrate-Coated Gold Nanoparticles and Surfaces.”
- Sepúlveda, Borja, Paula C. Angelomé, Laura M. Lechuga, and Luis M. Liz-Marzán. 2009. “LSPR-Based Nanobiosensors.” *Nano Today* 4(3): 244–51.
- Shen, F, J F Ross, X Wang, and M Ratnam. 1994. “Identification of a Novel Folate Receptor, a Truncated Receptor, and Receptor Type Beta in Hematopoietic Cells: cDNA Cloning, Expression, Immunoreactivity, and Tissue Specificity.” *Biochemistry* 33(5): 1209–15.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8110752> (June 3, 2016).
- Shi, Fan et al. 2016. “Application of Three-Dimensional Reduced Graphene Oxide-Gold Composite Modified Electrode for Direct Electrochemistry and Electrocatalysis of Myoglobin.” *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 58: 450–57.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26478332> (September 13, 2016).
- Shi, Sixiang et al. 2013. “Tumor Vasculature Targeting and Imaging in Living Mice with Reduced Graphene Oxide.” *Biomaterials* 34(12): 3002–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23374706> (September 13, 2016).
- Siclari, Valerie A, and Ling Qin. 2010. “Targeting the Osteosarcoma Cancer Stem Cell.” *Journal of orthopaedic surgery and research* 5: 78.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20979639> (September 13, 2016).
- Singh, Yashveer, Matthew Palombo, and Patrick J Sinko. 2008. “Recent Trends in Targeted Anticancer Prodrug and Conjugate Design.” *Current medicinal chemistry* 15(18): 1802–26.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18691040> (June 1, 2016).

- Song, Jibin, Jiajing Zhou, and Hongwei Duan. 2012. "Self-Assembled Plasmonic Vesicles of SERS-Encoded Amphiphilic Gold Nanoparticles for Cancer Cell Targeting and Traceable Intracellular Drug Delivery." *Journal of the American Chemical Society* 134(32): 13458–69.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22831389> (September 13, 2016).
- Sriraman, Shravan Kumar, Bhawani Aryasomayajula, and Vladimir P Torchilin. 2014. "Barriers to Drug Delivery in Solid Tumors." *Tissue Barriers* 2(3): e29528.  
<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/tisb.29528> (June 1, 2016).
- Stebbing, J et al. 2003. "Paclitaxel for Anthracycline-Resistant AIDS-Related Kaposi's Sarcoma: Clinical and Angiogenic Correlations." *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 14(11): 1660–66.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14581275> (September 14, 2016).
- Supriya Shukla, † et al. 2002. "Synthesis and Biological Evaluation of Folate Receptor-Targeted Boronated PAMAM Dendrimers as Potential Agents for Neutron Capture Therapy."
- Tang, Zhaomin et al. 2014. "Quantitative Control of Active Targeting of Nanocarriers to Tumor Cells through Optimization of Folate Ligand Density." *Biomaterials* 35(27): 8015–27.  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961214006711> (September 14, 2016).
- Terentyuk, Georgy S et al. 2009. "Circulation and Distribution of Gold Nanoparticles and Induced Alterations of Tissue Morphology at Intravenous Particle Delivery." *Journal of biophotonics* 2(5): 292–302.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19434616> (July 25, 2016).
- Tian, Jiangwei et al. 2014. "A Multifunctional Nanomicelle for Real-Time Targeted Imaging and Precise near-Infrared Cancer Therapy." *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 53(36): 9544–49.

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25045069> (September 13, 2016).
- Turkevich, John, Peter Cooper Stevenson, and James Hillier. 1951a. "A Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold." *Discussions of the Faraday Society* 11(0): 55.  
<http://xlink.rsc.org/?DOI=df9511100055> (July 25, 2016).
- 1951b. "A Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold." *Discussions of the Faraday Society* 11(0): 55.  
<http://xlink.rsc.org/?DOI=df9511100055> (July 26, 2016).
- Ungureanu, Constantin et al. 2011. "Light Interactions with Gold Nanorods and Cells: Implications for Photothermal Nanotherapeutics." *Nano letters* 11(5): 1887–94. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21491868> (July 25, 2016).
- Urruticoechea, A et al. 2010. "Recent Advances in Cancer Therapy: An Overview." *Current pharmaceutical design* 16(1): 3–10.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20214614> (June 1, 2016).
- van Vlerken, Lilian E., Tushar K. Vyas, and Mansoor M. Amiji. 2007. "Poly(ethylene Glycol)-Modified Nanocarriers for Tumor-Targeted and Intracellular Delivery." *Pharmaceutical Research* 24(8): 1405–14.  
<http://link.springer.com/10.1007/s11095-007-9284-6> (June 1, 2016).
- Wang, Bo et al. 2012. "MDM2 Inhibitor Nutlin-3a Suppresses Proliferation and Promotes Apoptosis in Osteosarcoma Cells." *Acta biochimica et biophysica Sinica* 44(8): 685–91.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22843172> (June 22, 2016).
- Wang, Yusong, Lakshminarayana Polavarapu, and Luis M Liz-Marzán. 2014. "Reduced Graphene Oxide-Supported Gold Nanostars for Improved SERS Sensing and Drug Delivery." *ACS applied materials & interfaces* 6(24): 21798–805.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24827538> (September 13, 2016).

- Wei, Alexander. 2008. "Hyperthermic Effects of Gold Nanrods on Tumour Cells." *Natioanl Institute of Health Public Access* 2(1): 125–32.
- Wu, Chien-Chen, and Dong-Hwang Chen. 2010. "Facile Green Synthesis of Gold Nanoparticles with Gum Arabic as a Stabilizing Agent and Reducing Agent." *Gold Bulletin* 43(4): 234–40.  
<http://link.springer.com/10.1007/BF03214993> (July 25, 2016).
- Xiaohua Huang, †, ‡ Ivan H. El-Sayed, † and Wei Qian, and † Mostafa A. El-Sayed\*. 2006. "Cancer Cell Imaging and Photothermal Therapy in the Near-Infrared Region by Using Gold Nanorods."
- Yan, Lu, and Liyan Qiu. 2015. "Indocyanine Green Targeted Micelles with Improved Stability for near-Infrared Image-Guided Photothermal Tumor Therapy." <http://dx.doi.org/10.2217/nnm.14.118>.
- Ye, Jian et al. 2009. "Fabrication, Characterization, and Optical Properties of Gold Nanobowl Submonolayer Structures." *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 25(3): 1822–27.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19125593> (July 25, 2016).
- Ye, Xingchen et al. 2012. "Improved Size-Tunable Synthesis of Monodisperse Gold Nanorods through the Use of Aromatic Additives."
- Yih, T.C., and M. Al-Fandi. 2006. "Engineered Nanoparticles as Precise Drug Delivery Systems." *Journal of Cellular Biochemistry* 97(6): 1184–90. <http://doi.wiley.com/10.1002/jcb.20796> (May 31, 2016).
- Yin, PT, S Shah, M Chhowalla, and KB Lee. 2015. "Design, Synthesis, and Characterization of Graphene–nanoparticle Hybrid Materials for Bioapplications." *Chemical reviews*.  
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr500537t> (September 14, 2016).
- Zhang, Yinan, Jun Yu, David J S Birch, and Yu Chen. "Gold Nanorods for Fluorescence Lifetime Imaging in Biology." *Journal of biomedical optics* 15(2): 020504. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20459218> (July 25,

2016).

Zhang, Zhenyuan, Ryan D. Ross, and Ryan K. Roeder. 2010. "Preparation of Functionalized Gold Nanoparticles as a Targeted X-Ray Contrast Agent for Damaged Bone Tissue." *Nanoscale* 2(4): 582.

<http://xlink.rsc.org/?DOI=b9nr00317g> (July 25, 2016).

Zhao, Haizheng, and Lin Yue Lanry Yung. 2008. "Selectivity of Folate Conjugated Polymer Micelles against Different Tumor Cells."

*International Journal of Pharmaceutics* 349(1): 256–68.

Zhao, Y, E B Butler, and M Tan. 2013. "Targeting Cellular Metabolism to Improve Cancer Therapeutics." *Cell death & disease* 4: e532.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23470539> (September 14, 2016).

Zhou, Xiao et al. 2014. "Nano-Enabled Drug Delivery: A Research Profile."

*Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 10(5): e889–96.