



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato di Ricerca in Biologia Cellulare E Scienze Tecnologiche Del Farmaco
Indirizzo “Tecnologia Delle Sostanze Biologicamente Attive”
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche (STEBICEF)
Dipartimento di Farmacia-Scienze del Farmaco dell’Università degli Studi di Bari “Aldo Moro”
Settore Scientifico Disciplinare CHIM/09.

STRATEGIE DI DIREZIONAMENTO ALL’EPATOCARCINOMA DI FARMACI ANTITUMORALI MEDIANTE SISTEMI NANOPARTICELLARI E DI VISUALIZZAZIONE IN CELLULE TUMORALI DELLA PROTEINA DI TRASLOCAZIONE MITOCONDRIALE TSPO.

IL DOTTORE

Dott.ssa Rosa Maria Iacobazzi

IL COORDINATORE

Ch.ma Prof.ssa Patrizia Diana

IL TUTOR

Ch.mo Prof. Massimo Franco

IL REFERENTE DELL’INDIRIZZO

Ch.mo Prof. Gaetano Giammona

**CICLO XXVI
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO: 2017**

INDICE

Capitolo 1

1. Introduzione	p.5
1.1 Il fegato e le patologie associate	p.5
1.2 Il carcinoma epatocellulare (HCC)	p.6
1.3 Il recettore per le asialoglicoproteine ASGP-R	p.10
1.4 La proteina di Traslocazione Mitocondriale TSPO	p.12
1.5 La nanotecnologia applicata al delivery di farmaci e/o agenti diagnostici	p.15
1.6 I dendrimeri	p.17
1.6.1 Struttura dei dendrimeri	p.19
1.6.2 Sintesi dei dendrimeri	p.20
1.6.3 Caratteristiche ed applicazioni dei dendrimeri	p.22
1.7 Le nanoparticelle colloidali (NP)	p.24
1.7.1 I nanocristalli (NC)	p.27
1.7.2 Strategie di sintesi di NC	p.31
1.7.3 Funzionalizzazione superficiale di NC per applicazioni biologiche	p.33
2. Finalità della ricerca	p.44
Bibliografia	p.47

Capitolo 2

Direzionamento a cellule umane di carcinoma epatico attraverso un dendrimero G(4)-PAMAM-FITC funzionalizzato con acido lattobionico e carico di sorafenib.

2.1 Introduzione	p.53
2.2 Materiali e metodi	p.58
2.2.1 <i>Materiali</i>	p.58
2.2.2 <i>Sintesi dei dendrimeri G(4)-PAMAM-FITC e Ac-La-G(4)-PAMAM-FITC</i>	p.58
2.2.3 <i>Caricamento del dendrimero Ac-La-G(4)-PAMAM-FITC con sorafenib</i>	p.60
2.2.4 <i>Drug loading ed efficienza di incapsulamento</i>	p.60
2.2.5 <i>Tecniche di caratterizzazione</i>	p.61
2.2.6 <i>Studi di rilascio in vitro</i>	p.62
2.2.7 <i>Colture cellulari</i>	p.62
2.2.8 <i>Saggi di citotossicità</i>	p.63
2.2.9 <i>Studi di internalizzazione in vitro</i>	p.63
2.2.10 <i>Microscopia confocale</i>	p.65
2.2.11 <i>Valutazione dell'efficacia antitumorale: esperimenti di recovery e saggio dell'annessina V</i>	p.66
2.2.12 <i>Analisi statistica dei dati</i>	p.67
2.3 Risultati e discussioni	p.67
2.3.1 <i>Sintesi e caratterizzazione dei dendrimeri 2,3,e 4</i>	p.67

2.3.2 <i>Incorporazione di sorafenib nel dendrimero Ac-La-G(4)-PAMAM-FITC 4, e caratterizzazione</i>	p.72
2.3.3 <i>Studi di rilascio in vitro</i>	p.73
2.3.4 <i>Saggi di citotossicità</i>	p.74
2.3.5 <i>Esperimenti di internalizzazione cellulare in vitro</i>	p.75
2.3.6 <i>Valutazione dell'efficacia antitumorale</i>	p.81
2.4 Conclusioni	p.82
Bibliografia	p.84

Capitolo 3

Nanopiattaforme costituite da sorafenib e nanoparticelle superparamagnetiche di ossido di ferro utilizzabili per la terapia dell'epatocarcinoma con targeting magnetico

3.1 Introduzione	p.86
3.2 Materiali e metodi	p.89
3.2.1 <i>Materiali</i>	p.89
3.2.2 <i>Sintesi delle SPIONs con rivestimento organico</i>	p.90
3.2.3 <i>Preparazione di SPION/sorafenib/micelle</i>	p.90
3.2.4 <i>Sistema di flusso capillare in vitro</i>	p.91
3.2.5 <i>Colture cellulari</i>	p.92
3.2.6 <i>Saggi di citotossicità</i>	p.92
3.2.7 <i>Studi di internalizzazione cellulare</i>	p.93
3.2.8 <i>Esperimenti cellulari di recovery</i>	p.94
3.2.9 <i>Dimensione delle particelle, distribuzione dimensionale e carica superficiale</i>	p.94
3.2.10 <i>Microscopia a Trasmissione Elettronica (TEM)</i>	p.95
3.2.11 <i>Misure magnetiche</i>	p.96
3.2.12 <i>Analisi HPLC ed UV</i>	p.96
3.3 Risultati e discussioni	p.96
3.3.1 <i>Sintesi e caratterizzazione delle SPION con rivestimento organico</i>	p.97
3.3.2 <i>Preparazione e caratterizzazione di SPION/micelle</i>	p.99
3.3.3 <i>Simulazioni di targeting magnetico in un sistema a flusso capillare in vitro</i>	p.103
3.3.4 <i>Preparazione e caratterizzazione di SPION/sorafenib/micelle</i>	p.107
3.3.5 <i>Esperimenti di citotossicità in vitro</i>	p.108
3.3.6 <i>Effetto del targeting magnetico sull'uptake cellulare delle SPION/micelle</i>	p.110
3.3.7 <i>Targeting magnetico ed efficacia antitumorale di SPION/sorafenib/micelle</i>	p.114
3.4 Conclusioni	p.118
Bibliografia	p.120

Capitolo 4

Sintesi e caratterizzazione di un dendrimero fluorescente PAMAM di quarta generazione opportunamente funzionalizzato per l'imaging ed il targeting mitocondriale.

4.1 Introduzione	p.124
4.2 Materiali e metodi	p.128
4.2.1 <i>Materiali</i>	p.128
4.2.2 <i>Sintesi dei ligandi TSPO 1 e 2</i>	p.129
4.2.3 <i>Sintesi dei dendrimeri 4-7</i>	p.131
4.2.4 <i>Determinazione del contenuto di ligando TSPO 1 e di FITC nei dendrimeri 5-7</i>	p.133
4.2.5 <i>Caratterizzazione morfologica dei dendrimeri 4-7</i>	p.134
4.2.6 <i>Saggi di binding recettoriale</i>	p.134
4.2.7 <i>Valutazione della citotossicità e stabilità dei dendrimeri 4-7</i>	p.134
4.2.8 <i>Uptake cellulare in presenza ed assenza di inibitori di endocitosi, studi di binding extracellulare, di esocitosi e di competizione dei dendrimeri 6 e 7</i>	p.135
4.2.9 <i>Frazionamento cellulare</i>	p.137
4.2.10 <i>Microscopia in fluorescenza di cellule vitali</i>	p.138
4.2.11 <i>Microscopia Confocale-AFM-TIRF(CAT)</i>	p.139
4.2.12 <i>Imaging confocale</i>	p.139
4.2.13 <i>Analisi di co-localizzazione</i>	p.140
4.3 Risultati e discussioni	p.140
4.3.1 <i>Sintesi dei ligandi TSPO 1 e 2</i>	p.140
4.3.2 <i>Affinità e selettività dei composti 1 e 2 verso il TSPO</i>	p.143
4.3.3 <i>Sintesi e caratterizzazione strutturale dei dendrimeri 4, 5, 6 e 7</i>	p.144
4.3.4 <i>Caratterizzazione chimico-fisica e morfologica dei dendrimeri 4-7</i>	p.151
4.3.5 <i>Citotossicità e stabilità dei dendrimeri sulle cellule C6 di glioma</i>	p.158
4.3.6 <i>Uptake per endocitosi, binding extracellulare ed esocitosi dei dendrimeri 6 e 7 in cellule C6 di glioma.</i>	p.159
4.3.7 <i>Uptake cellulare in presenza di inibitori di endocitosi e studi di competizione dei dendrimeri 6 e 7</i>	p.161
4.3.8 <i>Destino intracellulare e studi di co-localizzazione dei dendrimeri 6 e 7 in cellule C6 di glioma.</i>	p.164
4.4 Conclusioni	p.172
Bibliografia	p.174

Capitolo 5

Nanostrutture luminiscenti altamente selettive per l'imaging ed il targeting mitocondriale

5.1 Introduzione	p.179
5.2 Materiali e metodi	p.184
5.2.1 <i>Materiali</i>	p.184

5.2.2 Sintesi di QD@SiO ₂ NPs e funzionalizzazione con il ligando TSPO	p.185
5.2.3 Microscopia a scansione elettronica	p.187
5.2.4 Caratterizzazione spettroscopica	p.188
5.2.5 Dimensione delle particelle, distribuzione dei size e carica superficiale	p.189
5.2.6 Colture cellulari e saggi di citotossicità	p.189
5.2.7 Esperimenti di frazionamento cellulare	p.190
5.2.8 Imaging confocale in cellule vitali	p.191
5.2.9 Analisi di co-localizzazione	p.192
5.2.10 Analisi statistica dei dati	p.193
5.3 Risultati e discussioni	p.193
5.3.1 Sintesi di QD@SiO ₂ NPs e funzionalizzazione con il ligando TSPO	p.193
5.3.2 Caratterizzazione morfologica ed ottica delle nanoparticelle TSPO-QD@SiO ₂ NPs	p.195
5.3.3 Studi in vitro di citotossicità, destino intracellulare e colocalizzazione di NH ₂ -QD@SiO ₂ e TSPO-QD@SiO ₂ NPs in cellule C6 di glioma di ratto.	p.206
5.4 Conclusioni	p.214
Bibliografia	p.216
Capitolo 6	
Osservazioni conclusive generali	p.219

Strategie di direzionamento all'epatocarcinoma di farmaci antitumorali mediante sistemi nanoparticellari e di visualizzazione in cellule tumorali della proteina di traslocazione mitocondriale TSPO.

Capitolo 1

1.1 Introduzione

1.1.1 Il fegato e le patologie associate

Come è noto l'unità strutturale e funzionale del fegato è rappresentata dal lobulo epatico. Ogni lobulo è organizzato intorno ad una vena centrale ed alla periferia di ogni lobulo, il sangue proveniente sia dall'arteria epatica che dalla vena Porta entra nei sinusoidi e vi scorre in direzione centripeta a diretto contatto con lamine di epatociti. Poiché tra le cellule endoteliali che rivestono i sinusoidi sono presenti larghe fenestrazioni, gli epatociti risultano essere a diretto contatto con il sangue sinusoidale e ciò contribuisce significativamente alla capacità che il fegato ha di depurare efficacemente il sangue da numerose sostanze. I canalicoli biliari sono situati tra epatociti adiacenti ed alla periferia di un lobulo drenano la bile nei dotti biliari.

Il fegato svolge numerose funzioni vitali, per esempio è essenziale nella regolazione del metabolismo dei carboidrati, dei lipidi e delle proteine.

In particolare, il fegato contribuisce a mantenere costanti i livelli di glucosio ematici attraverso i processi di glicogenolisi, glicogeno sintesi e gluconeogenesi.

I lipidi assorbiti dall'intestino sotto forma di chilomicroni vengono in parte captati e degradati nei loro costituenti da parte degli epatociti; inoltre gli epatociti

sintetizzano le lipoproteine a densità molto bassa (VLDL) successivamente convertite in lipoproteine a bassa densità (LDL) e ad alta densità (HDL). A livello epatico avviene la sintesi del colesterolo nonché la sua escrezione mediante la bile, di conseguenza gli epatociti svolgono un ruolo fondamentale nella regolazione dei livelli sierici di colesterolo.

Il fegato ha anche un ruolo importante nel metabolismo delle proteine, infatti a questo livello vengono sintetizzati tutti gli amminoacidi non essenziali e molte delle proteine plasmatiche (lipoproteine, albumina, globuline, fibrinogeno); infine, l'ammoniaca proveniente dal catabolismo delle proteine viene dissipata nel fegato prevalentemente per conversione in urea.

Il fegato costituisce inoltre un deposito per molti metaboliti, ferro, vitamine A, D, B₁₂ ed è deputato alla detossificazione dell'organismo da farmaci e tossine.

Questa breve e sommaria digressione anatomo-funzionale sul fegato mira ad evidenziare i notevoli disagi alla salute umana che deriverebbero da una patologia epatica e quindi l'importanza di una diagnosi e terapia efficaci per la prevenzione e cura delle diverse patologie epatiche.

Fibrosi epatica, cirrosi, infezioni microbiche e carcinoma epatocellulare sono le maggiori fonti di patologie epatiche responsabili di una rilevante mortalità in tutto il mondo; la loro prevalenza è in aumento nonostante la disponibilità di terapie standard e/o vaccini. Uno svantaggio rilevante della terapia standard risiede nell'incapacità di rilasciare sufficienti concentrazioni di agenti terapeutici in combinazione agli effetti indesiderati ad essi molto spesso associati [1,2].

1.1.2 Il carcinoma epatocellulare (HCC)

È il più comune tumore maligno primario del fegato negli adulti e la sesta causa di morte per cancro nel mondo, dopo stomaco e polmone. L'HCC può riconoscere diverse cause, tra queste la prevalenza dell'infezione da virus dell'epatite B e C,

consumo di alcool e altre cause di cirrosi epatica. Il trattamento è complesso a causa del concorrere di diverse patologie e nonostante la disponibilità di diverse opzioni, quali trapianto di fegato, resezione chirurgica, ablazione con radiofrequenza e chemoembolizzazione transarteriosa [3].

Uno dei limiti principali della chemioterapia nell'HCC deriva dal fatto che il fegato è l'organo maggiormente responsabile dei processi di assorbimento, disintossicazione, trasformazione metabolica ed escrezione di xenobiotici nella bile, pertanto, anche se la maggior parte dei farmaci raggiunge concentrazioni elevate nel fegato, essi sono rapidamente eliminati dal sangue e sono sottoposti a un elevato metabolismo di primo passaggio epatico.

Gli epatociti sono le cellule maggiormente responsabili della captazione epatica, le cellule di Kupfer della captazione epatica di materiale in particelle, per questo motivo, i farmaci che riescono a entrare nel fegato, non sono sempre in grado di raggiungere efficacemente lo specifico tipo di cellula bersaglio. Inoltre, il tempo di permanenza dei farmaci nel fegato dipende dall'interazione con i macrofagi e da considerazioni di natura farmacocinetica.

Come appena detto, un obiettivo importante da raggiungere è non solo l'accumulo preferenziale di un farmaco in un determinato tipo di cellule, ma anche un aumento del suo tempo di permanenza all'interno di tale cellula [4]. Poiché gli epatociti rappresentano le unità funzionali deputate maggiormente alle funzioni secretorie e metaboliche del fegato, essi possono essere considerati un target interessante.

In particolare, il recettore per le asialoglicoproteine (recettore del galattosio o ASGP-R), è un recettore di superficie del fegato, presente ad alta densità (500,000 recettori per cellula), solo sugli epatociti [5] e conservato ed over-espresso in forme ben differenziate di carcinoma epatocellulare [6,7]. Pertanto, la progettazione di sistemi di drug delivery in grado di attuare una endocitosi

mediata dal recettore per il galattosio, sarebbe utile per il direccionamento specifico verso gli epatociti, ed in particolare per il targeting di agenti chemioterapici alle cellule di carcinoma epatocellulare.

Un'altra strategia originale ed innovativa per realizzare un targeting specifico per un determinato tipo cellulare, è basata sull'identificazione di un interessante biomarker localizzato sulla membrana mitocondriale esterna (OMM), ossia la proteina di traslocazione mitocondriale 18 kDa (TSPO) il cui ruolo biologico è associato con le funzioni mitocondriali di steroidogenesi, proliferazione cellulare ed apoptosi [8-11]. È interessante notare che livelli aberranti di TSPO sono stati osservati in diverse malattie, compresi cancro (tumori del fegato, alcuni tumori del cervello, cancro ovarico, carcinoma della mammella, cancro del colon, ecc) e malattie neurodegenerative. Per tutte queste ragioni il TSPO è considerato un bersaglio subcellulare estremamente attraente, utile per tracciare la sua distribuzione negli stati patologici over esprimenti tale proteina e per la realizzazione di un targeting selettivo di farmaci a livello mitocondriale.

Il primo farmaco approvato per il trattamento di pazienti con carcinoma epatocellulare avanzato, che ha dimostrato un aumento della sopravvivenza in questi pazienti, è l'inibitore multi target della tirosina chinasi, il sorafenib. Tuttavia, come la maggior parte dei farmaci antitumorali, ha spesso dei limiti relativi alla non specificità e anche alla bassa solubilità in acqua [12].

Negli ultimi anni, una vasta gamma di sistemi di trasporto polimerici sono stati oggetto di studi approfonditi per superare questi problemi, con gli obiettivi di migliorare le proprietà farmacocinetiche e la solubilità in acqua dei suddetti farmaci.

In particolare tra i nanovettori, i sistemi nanoparticellari, i dendrimeri, i liposomi, le micelle, sono sistemi di somministrazione dei farmaci utili, perché in grado di fornire il farmaco a targets sito specifici, ossia ad organi, cellule e/o organelli

subcellulari [13-16]. Tali nanovettori devono essere progettati in maniera tale da essere non solo internalizzati nelle cellule, ma anche da poter attuare la fuga endo-lisosomiale e quindi rilasciare il loro contenuto (ad es. peptidi, farmaci o nanoparticelle) all'interno del citoplasma [17]. Attraverso questi sistemi, i farmaci possono accumularsi in modo efficace nel tumore mediante targeting, sia passivo per effetto dell'aumentata permeabilità e ritenzione (effetto EPR), [18,19], sia attivo utilizzando ligandi specifici o anticorpi [20,21].

Un esempio di nano-formulazione è rappresentato dal DOXIL (approvato dalla FDA nel 1995), la prima formulazione ad essere stata immessa sul mercato, costituito da liposomi pegilati contenenti doxorubicina [22]. Micelle pegilate di acido polilattico contenenti Paclitaxel (Genexol-PM), sono state lanciate sul mercato coreano per la cura del cancro al seno e per il tumore del polmone a cellule non-piccole nel 2007 e sono entrate in fase II di sperimentazione clinica negli Stati Uniti per il trattamento del carcinoma pancreatico avanzato [23]. Molti farmaci polimerici a base di poli (N-(2-idrossipropil) metacrilammide) (pHPMA) sono entrati in studi clinici (ad esempio il PK1, o il coniugato pHPMA doxorubicina) [24] Inoltre, alcuni nanovettori lipidici contenenti sorafenib hanno mostrato un'attività antitumorale maggiore rispetto a quella del farmaco libero[25].

Per il trattamento del tumore epatico sono stati tentati anche altri metodi più innovativi, come l'ipertermia fluido magnetica (riscaldamento di nanoparticelle utilizzando un campo magnetico alternato applicato dall'esterno) associato a farmacoterapia attraverso l'impiego di nanoparticelle di magnetite con rivestimento polimerico contenente il farmaco. Nello specifico, il carboplatino è stato incapsulato all'interno del chitosano in maniera non covalente e in seguito adeso su nanoparticelle magnetiche. Queste nanoparticelle iniettate per via intraarteriosa sono state guidate al tumore del fegato trapiantato nei topi, il quale era soggetto ad ipertermia ed è stata osservata una maggiore efficacia antitumorale

rispetto a quella in assenza di ipertermia [26]. Si è tentato anche il rilascio del gene per il trattamento dei tumori epatici. Ad esempio, bcl-2 antiumano e siRNA complessati con liposomi cationici (formati da 2-O-(2-dietilaminoetil)-carbamoil-1,3-O-dioloilglicerolo e fosfatidilcolina) ha determinato una significativa riduzione dei noduli tumorali del fegato dopo iniezione per via endovenosa in modello murino, al contrario di siRNA libero [27].

Per quanto concerne i sistemi di imaging epatica per la diagnosi di patologie epatiche in genere e nello specifico di HCC, accanto alla tomografia computerizzata e la risonanza magnetica dinamica intensa/non intensa (MRI) va considerata la SPION-ENHANCED-MRI (risonanza magnetica a base di nanoparticelle superparamagnetiche di ossido di ferro), la quale ha un ruolo importante sia per il trattamento che per la diagnosi di differenti tipi di HCC. Dopo iniezione endovenosa, SPIONs aventi diametro medio di 150 nm sono rapidamente captate dalle cellule di Kupferr epatiche e ciò determina un aumento del contrasto nel tumore epatico, dal momento che questo non contiene le cellule di Kupferr [28]. Inoltre, queste nanoparticelle a base di ossido di ferro, facilitano la differenziazione tra lesioni epatocellulari benigne e HCC perché si accumulano preferenzialmente nel primo caso ma non nel secondo [29]. Le due tipologie di SPION clinicamente approvate per l'imaging del cancro epatico sono Ferumoxide (SPION associate a destrano, Endorem, Ferridex) e Ferucarbotran (SPION associate a carbossi-destrano, Resovist). E' stato recentemente impiegato l'UltraSPION per la realizzazione di un sistema teranostico (associazione tra proprietà anticancro e di imaging), incorporando nanoparticelle associate a squalene [30].

1.1.3 Il recettore per le asialoglicoproteine ASGP-R

Il recettore per le asialoglicoproteine (recettore del galattosio o ASGP-R), è una sorta di lectina di tipo C (Ca²⁺ dipendente), localizzato sulla superficie del fegato,

presente ad alta densità (500,000 recettori per cellula) solo sugli epatociti [5] e conservato ed over-espresso in forme di carcinoma epatocellulare ben differenziate [6,7].

L'ASGP-R è fisiologicamente coinvolto nella clearance di glicoproteine dal circolo per endocitosi mediata da recettore in seguito a riconoscimento di residui di galattosio o acetilgalattosamina [4]. Inoltre, una volta che un ligando si lega alla ASGP-R, il complesso ligando-recettore viene internalizzato rapidamente e il recettore ricicla verso la superficie [6], e ciò comporta una elevata capacità di legame ed un efficace uptake di ligandi galattosilati (Fig.1). È costituito da due subunità, vale a dire ASGP-R1 e ASGP-R2 (denominate anche lectine epatiche umane HHL-1 e HHL-2). Ogni subunità è composta da quattro domini, un dominio N-terminale citoplasmatico, un dominio transmembrana a singola catena, un segmento extracellulare ed un dominio di riconoscimento per i carboidrati. L'ASGP-R con i due tipi di subunità è solitamente richiesto per legare ad alta affinità i ligandi. Il complesso attivo, consistente di una molecola di ASGP-R2 e due molecole di ASGP-R1, mostra un'elevata forza di associazione con i ligandi[31].

Pertanto, la progettazione di sistemi di drug delivery in grado di attuare una endocitosi mediata dal recettore per il galattosio, sarebbe utile per il direccionamento specifico verso gli epatociti, ed in particolare per il targeting di agenti chemioterapici alle cellule di carcinoma epatocellulare. In realtà il recettore ASGP-R è già stato utilizzato come target per il delivery di vari farmaci, tra cui farmaci antitumorali o agenti per immagini, attraverso l'uso di nanovettori opportunamente funzionalizzati con residui di galattosio, lattosio o acido lattobionico [32]. La dimensione massima per i sistemi colloidali affinché possano essere internalizzati dagli epatociti mediante il meccanismo di endocitosi mediata dal recettore, è stimata di circa 90 nm, quindi è necessario scegliere il sistema più adeguato anche considerando che le vescicole endocitiche sono dirette ai lisosomi,

dove saranno sottoposte ad un aumento delle condizioni di acidità e di stress ossidativo [33].

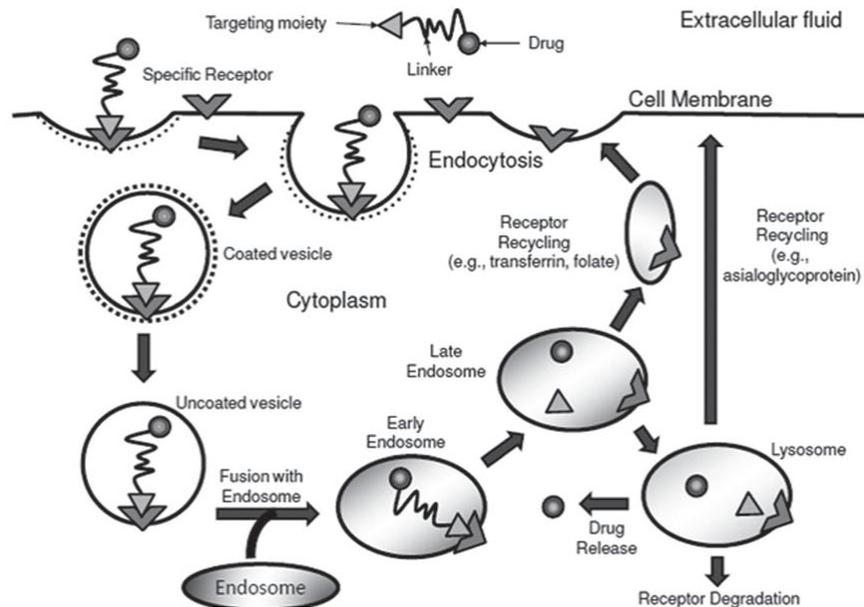


Fig.1. Rappresentazione schematica del meccanismo di endocitosi mediata da recettore. [Trapani G., Denora N., Trapani A., and Laquintana . *Recent advances in ligand targeted therapy. J. Drug Target.* 2012;20:1-22].

1.1.4 La proteina di Traslocazione Mitochondriale TSPO

Il TSPO è stato identificato nel 1977 durante ricerche di siti di legame per le benzodiazepine nei tessuti periferici, che ne avevano attestato l'elevata distribuzione al di fuori del cervello, da cui l'idea di chiamarlo inizialmente "Recettore periferico per le Benzodiazepine" (PBR) per distinguerlo dal "Recettore Centrale per le Benzodiazepine" (CBR), il quale media i classici effetti sedativi, ansiolitici, anticonvulsivanti e miorilassanti delle benzodiazepine e da cui si differenzia anatomicamente, strutturalmente e farmacologicamente. L'attuale denominazione "Translocator Protein 18kDa" (TSPO), appare tuttavia

più indicata per evidenziare la diversa natura dei ligandi non necessariamente a struttura benzodiazepinica, per descrivere il ruolo subcellulare del recettore e la sua localizzazione non solo a livello periferico ma anche a livello del SNC, ed in particolare attraverso l'indicazione "mitochondrial TSPO" o "nuclear TSPO" non solo a livello mitocondriale ma anche a livello nucleare e perinucleare [33].

Il TSPO è largamente distribuito in tutto l'organismo, come confermato da saggi di binding di radioligandi, in particolar modo nei tessuti dove avviene la steroidogenesi quali testicoli, ovaie, ghiandole surrenali e placenta, in cui sembra svolgere un ruolo cruciale di trasporto del colesterolo, ma anche nel SNC e in altri organi periferici come polmoni, fegato e cuore [8-11].

A livello subcellulare il TSPO è localizzato nella membrana mitocondriale esterna (OMM), nei siti di contatto con la membrana mitocondriale interna (IMM), ma lo si ritrova anche nei globuli rossi del sangue privi di mitocondri, e nella regione nucleare e perinucleare delle cellule umane di carcinoma della mammella, di glioma umano e delle cellule tumorali epatiche.

Strutturalmente il TSPO è una proteina transmembrana, con massa molecolare di 18 kDa, costituita da 169 aminoacidi organizzati a costituire 5 α -eliche che attraversano la membrana mitocondriale, con l'estremità C-terminale rivolta verso il citoplasma e quella amminica rivolta verso lo spazio intermembranale (Fig. 2).

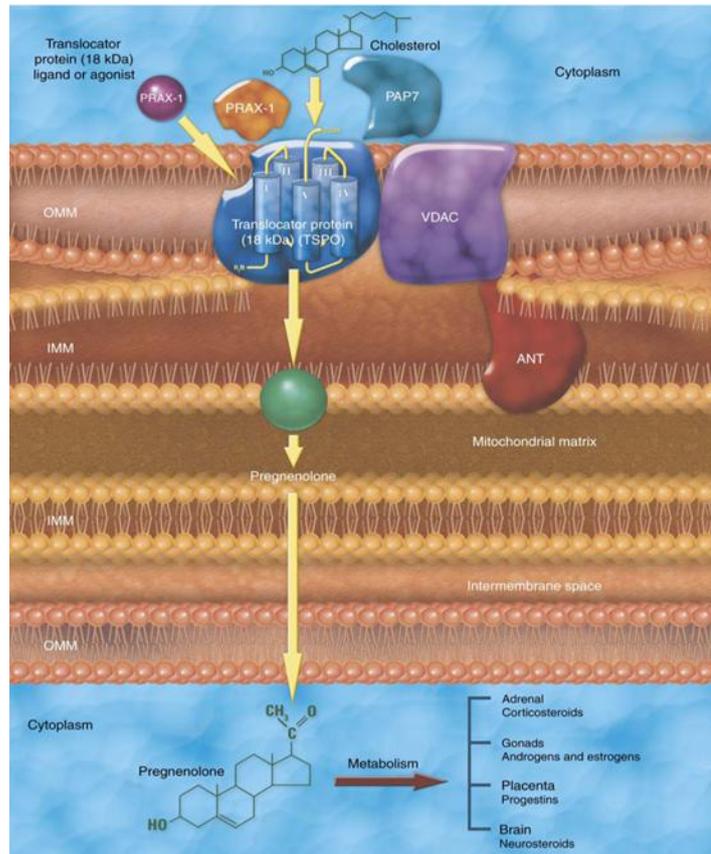


Fig. 2: Struttura del recettore TSPO [34].

E' un componente del complesso multi proteico noto come "Mitochondrial Permeability Transition Pore" (MPTP) di cui sono state identificate anche altre due subunità proteiche e proteine di associazione, rispettivamente:

- un canale anionico voltaggio-dipendente (VDCA) localizzato a livello della OMM, contenente il sito di legame per le benzodiazepine;
- il trasportatore Adenina Nucleotide Translocasi (ANT) localizzato nella IMM e capace anch'esso di legare le benzodiazepine;
- le proteine PAP7 e STAR (Steroidogenic Acute Regulatory Protein) che partecipano alla sintesi degli steroidi, promuovendo l'ingresso del colesterolo nei mitocondri;

- la proteina PRAX-1, localizzata nel citoplasma, che determina la dimerizzazione del TSPO tramite interazione con l'estremità C-terminale di quest'ultimo;
- la proteina M11L, fattore di virulenza del Myxoma Poxvirus, localizzata nel mitocondrio. Essa è una proteina antiapoptotica che può regolare il complesso MPTP attraverso la modulazione diretta del TSPO, prevenendo così la ripolarizzazione della membrana mitocondriale e il rilascio del citocromo mitocondriale Cit. C, che si verifica in risposta all'induzione apoptotica [34].

Il complesso proteico MPTP gioca un ruolo fondamentale nei processi di apoptosi. Infatti i ligandi selettivi del TSPO inducono apoptosi e arresto del ciclo cellulare in cellule cancerose come confermato da dati sperimentali [35].

Ulteriori studi hanno mostrato che l'espressione del TSPO aumenta selettivamente in diversi tipi di tumore e che tale incremento è legato al relativo grado di malignità. In particolare è stata riscontrata una overespressione del TSPO nel tumore cerebrale, nel carcinoma colon-rettale, nell'epatocarcinoma, nel glioma e nel carcinoma mammario. Per le neoplasie a carico di cervello e colon inoltre è stata rilevata, oltre alla overespressione, anche un'anormale distribuzione del TSPO con un aumento della densità recettoriale a livello di regioni nucleari e perinucleari piuttosto che mitocondriale [34].

Per tutte le ragioni menzionate, il TSPO rappresenta un interessante target subcellulare non solo per l'imaging di stati patologici in cui tale proteina è overespressa, ma anche per il direccionamento selettivo di farmaci a livello mitocondriale [36,37].

1.1.5 La nanotecnologia applicata al delivery di farmaci e/o agenti diagnostici

Oggi un grande contributo alla terapia e alla diagnosi delle patologie tumorali sta derivando dall'applicazione delle nanotecnologie nella formulazione di nuovi sistemi terapeutici e diagnostici. In particolare questi sistemi denominati

genericamente “Nanovettori” date le dimensioni colloidali che li caratterizzano (10-1000 nm) e tra i quali citiamo liposomi, nanoparticelle, coniugati polimerici, micelle, dendrimeri, e nanoparticelle, sono sistemi iniettabili che necessitano di:

- un materiale di partenza, nella maggior parte dei casi di natura polimerica;
- una molecola dotata di attività farmacologica caricata nel materiale per incapsulamento, dispersione, adsorbimento o coniugazione;
- un elemento aggiuntivo che migliori la biodisponibilità e la selettività del prodotto [19].

Così concepiti questi nano sistemi sono in grado di ovviare a tutte quelle problematiche di natura chimico-fisica, farmacocinetica o metabolica che comportano una ridotta biodisponibilità del farmaco classico ma soprattutto di conseguire un rilascio direzionato del farmaco.

Il concetto di drug targeting fu inizialmente suggerito da Paul Ehrlich con la teoria del “magic bullet”. Ehrlich descrisse un ipotetico “magic bullet” in grado di agire selettivamente sul bersaglio farmacologico. Questo concetto è stato sviluppato in diversi modi. Da un punto di vista strettamente chimico-farmaceutico, il concetto di Ehrlich ha portato allo studio e allo sviluppo di nuovi agenti terapeutici ad attività selettiva in grado di riconoscere i bersagli farmacologici su cui agire e non agire sulle strutture o sulle funzioni non coinvolte nella patologia.

L’obiettivo di un rilascio selettivo di farmaco può essere conseguito o passivamente, ottimizzando le proprietà chimico fisiche del complesso farmaco nanovettore, come ad esempio dimensione e proprietà di superficie, o attivamente, inserendo sul nanocarrier un gruppo o una molecola direzionante che interagendo specificamente su target cellulari o subcellulari riesca a veicolare selettivamente il farmaco nel sito d’azione [33], o mediante targeting attivo chimico-fisico con sistemi intelligenti che rispondono ad anormali valori di pH e/o temperatura del tessuto tumorale, o fisicamente, mediante applicazione di un campo magnetico

esterno, in grado di attirare, nel sito di applicazione del magnete, sistemi nanoparticellari opportunamente progettati per spostarsi sotto l'azione di un campo magnetico [38].

1.1.6 I dendrimeri

Tra i nanovettori, i dendrimeri rappresentano una categoria emergente di nanomateriali che in condizioni non tossiche, potrebbe essere utilizzata per scopi biomedici.

Il termine dendrimero deriva dal greco "dendron" che significa albero. Della classe dei polimeri dendritici fanno parte: i dendrimeri, i polimeri iper-ramificati, i polimeri "dendrigraft", e i polimeri dendronizzati, ma tra tutti, i più studiati ed importanti sono i dendrimeri [39]. Queste macromolecole sono derivanti da sintesi che raggiungono elevati livelli di controllo; si utilizzano infatti delle accurate strategie sintetiche che consentono di ottenere delle strutture tridimensionali altamente regolari. Nel 1978 Tomalia sintetizzò e caratterizzò la macromolecola che egli chiamò "dendrimero" per descrivere l'oligomero altamente funzionalizzato conosciuto oggi con il nome di poliammidoamina (PAMAM) (Fig.4) [39].

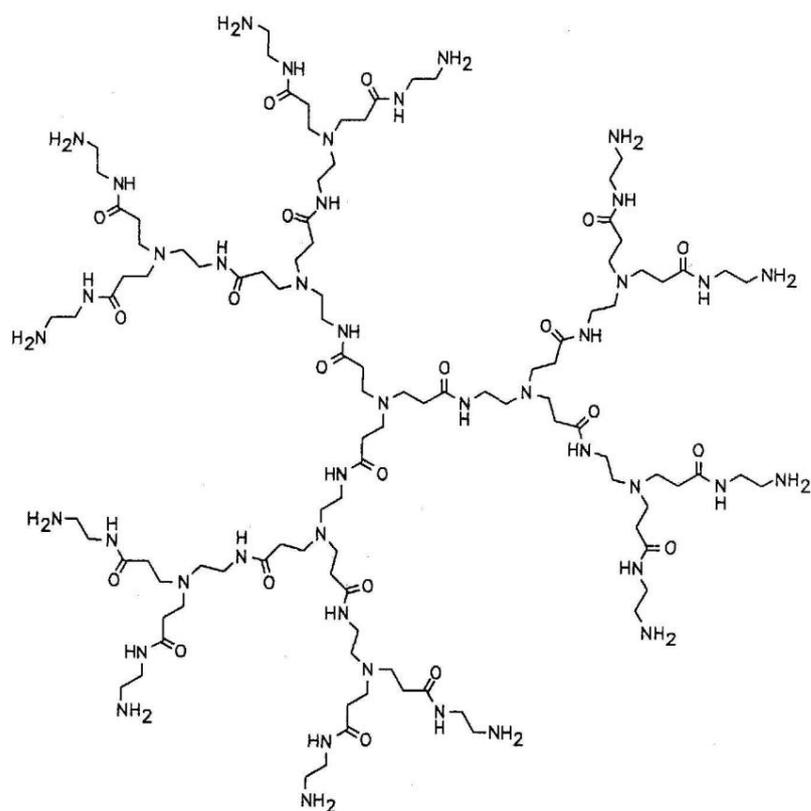


Fig.4. Struttura di un dendrimero PAMAM

Nello stesso anno Vögtle propose una strategia di sintesi che venne chiamata “sintesi a cascata” per mezzo della quale, egli ottenne una macromolecola a struttura altamente controllata ripetendo ciclicamente due reazioni: addizione di Michael tra acrilonitrile e un gruppo amminico, e la successiva riduzione del gruppo nitrile in ammina [40]. Nel 1985 Newkome riprese il lavoro di Vögtle abbandonato a causa dell’incapacità di realizzare una completa trasformazione dei gruppi funzionali, realizzando così delle molecole ramificate a cui diede il nome di arboroli caratterizzati da un notevole numero di gruppi terminali ossidrilici[41].

1.1.6.1 Struttura dei dendrimeri

Nella struttura di un dendrimero si possono distinguere tre componenti fondamentali:

- il *core*, ovvero un nocciolo polifunzionale interno;
- degli strati interni costituiti da unità monomeriche chiamati generazioni
- uno strato esterno o superficiale, contenente funzionalità terminali.

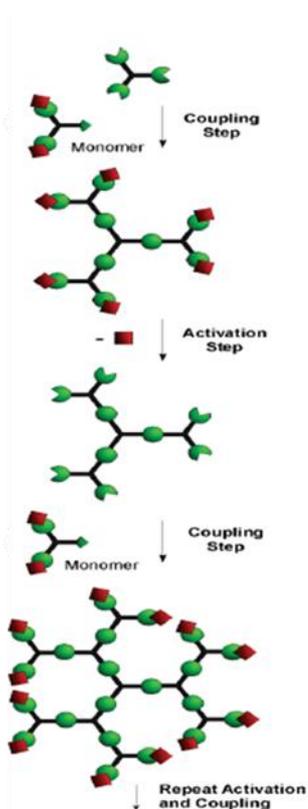
Le caratteristiche chimico-fisiche saranno notevolmente influenzate dalle caratteristiche di tali componenti strutturali. Il *core* deve possedere due o più gruppi funzionali da cui si estende il dendrimero la cui forma dipenderà dalla struttura del *core* stesso. Può essere una molecola piccola e rigida o una molecola più flessibile avente quindi degli spaziatori che servono a diminuire l'ingombro sterico attorno ai siti di reazione. Il *core* può essere di varia natura: metallo, un cromoforo, un oligomero, a seconda dell'impiego del dendrimero [39].

A seconda dell'unità ripetente scelta, il dendrimero può raggiungere generazioni con struttura tridimensionale differente; se il monomero è di un solo tipo si otterrà un dendrimero altamente ordinato e simmetrico, nel caso invece si utilizzi più di un'unità ripetente, il dendrimero risulterà asimmetrico [39]. I gruppi terminali presenti sulla superficie esterna sono fondamentali per le caratteristiche e le possibili applicazioni del dendrimero. Infatti, soprattutto nelle generazioni elevate, un dendrimero possiede un elevato numero di gruppi terminali che sono responsabili di molte proprietà come la solubilità e la reattività [40]. I gruppi terminali possono essere appropriatamente funzionalizzati con qualsiasi tipo di molecola a seconda delle applicazioni, ad esempio con biomolecole, cromofori o complessi metallici.

1.1.6.2 Sintesi dei dendrimeri

La sintesi dei dendrimeri deve condurre all'ottenimento di strutture molecolari ordinate. Tale fine può essere perseguito mediante un approccio divergente (come proposto da Tomalia e da Vögtle) ovvero una sintesi in cui si parte dal centro e si prosegue verso l'esterno, o viceversa mediante un approccio convergente proposto da Frechet nel 1990 [42]. In generale, tutte le sintesi dei dendrimeri sono costituite da una serie di reazioni ripetute e controllate al fine di evitare conversioni non quantitative e collaterali e di ottenere dendrimeri altamente puri. La purezza dendrimerica rappresenta la percentuale di materiale dendrimerico privo di difetti nel prodotto finale.

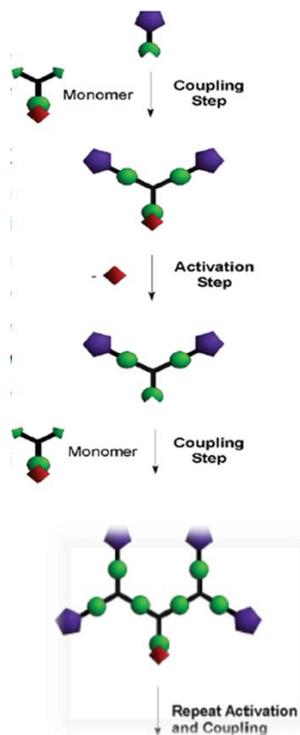
Sintesi divergente



Nella sintesi divergente il nocciolo con funzionalità n viene fatto reagire (coupling step) con un monomero polifunzionale di tipo AB_x (nella figura a sinistra $x = 2$) che possiede un solo gruppo funzionale (A: ) in grado di reagire con il nocciolo, mentre gli altri gruppi (B: ) sono protetti o non reattivi sia nei confronti del nocciolo sia del gruppo (A) al fine di non generare sottoprodotti. Avvenuta la completa funzionalizzazione del nocciolo, i gruppi periferici (B) vengono attivati in modo da renderli reattivi nei confronti del gruppo (A) di altri monomeri (activation step). La ripetizione della reazione di accoppiamento e

attivazione porta alla formazione delle generazioni successive. Raggiunta la generazione desiderata i gruppi periferici vengono funzionalizzati adeguatamente in base all'applicazione desiderata del dendrimero. Uno dei punti deboli della sintesi divergente è l'aumento esponenziale del numero dei siti periferici di reazione al crescere delle generazioni; ciò comporta l'uso di eccessi sempre maggiori di reagenti per avere conversioni totali ed evitare imperfezioni strutturali. Fortunatamente, però, i reagenti in eccesso sono facilmente rimovibili dal dendrimero in crescita poiché hanno un peso molecolare molto inferiore e possono essere eliminati con semplici tecniche di purificazione come la cristallizzazione, la cromatografia o per evaporazione con evaporatore rotante. La metodologia divergente è ideale per sintetizzare dendrimeri di grandi dimensioni in quanto ad ogni passaggio di accoppiamento/attivazione si raddoppia, circa, la massa del dendrimero. A causa però dell'elevato numero di siti di reazione è difficile ottenere dendrimeri di generazioni elevate con una buona purezza dendrimerica in quanto una macromolecola imperfetta non può essere separata dalle altre perché troppo simile per forma, peso e proprietà chimico-fisiche [43].

- *Sintesi convergente*



La sintesi convergente, ideata da Fréchet, prevede che la sintesi inizi da quella che diventerà la parte esterna della molecola. Il monomero polifunzionale di tipo AB_x (nella figura a sinistra, $x = 2$) in questo caso possiede una funzionalità protetta (A: ) , chiamata punto focale, mentre gli altri gruppi funzionali (B: ) vengono fatti reagire con la molecola che diventerà il gruppo superficiale desiderato. Dopo questo accoppiamento, il punto focale (A) viene attivato (activation step) e fatto reagire (coupling step) con i gruppi funzionali (B) di

un altro monomero formando un dendrone di generazione maggiore. Proseguendo con l'alternanza di reazioni di attivazione/accoppiamento si raggiunge la generazione desiderata ed a questo punto il gruppo focale (A) del dendrone viene fatto accoppiare con il nocciolo per dare il dendrimero. A differenza della sintesi divergente, con questa strategia i siti reattivi sono in numero limitato e più facilmente controllabili e, quindi, sono necessari solo piccoli eccessi di reagenti. Un altro vantaggio della metodologia convergente è che la differenza tra il peso molecolare di un dendrone perfetto ed uno irregolare è sufficientemente elevato da permettere una purificazione relativamente facile dei prodotti e quindi ottenere dendrimeri con un'elevata purezza. I limiti della sintesi convergente derivano, invece, dall'ingombro sterico che si crea attorno al punto focale al crescere del dendrone e che impedisce l'accoppiamento con il nocciolo. Per questo motivo, generalmente, con la sintesi convergente non è possibile ottenere dendrimeri oltre la sesta generazione [44].

1.1.6.3 Caratteristiche ed applicazioni dei dendrimeri

Diversamente da molti polimeri lineari, i dendrimeri rappresentano una classe di macromolecole la cui sintesi raggiunge elevati livelli di controllo. Le caratteristiche peculiari che portano i dendrimeri a differenziarsi dai tradizionali polimeri lineari sono essenzialmente tre:

- un dendrimero può essere isolato come singolo composto monodisperso a differenza della maggior parte dei polimeri lineari la cui sintesi fornisce sistemi eterodispersi di specie molecolari che differiscono nel peso molecolare;
- le proprietà dei dendrimeri (solubilità, reattività chimica, temperatura di transizione vetrosa) sono determinate dalla natura e dal numero dei gruppi presenti sulla superficie del dendrimero che sono in relazione, a loro volta,

al numero di generazioni. Nei polimeri lineari, invece, il numero di gruppi terminali è sempre due, indipendentemente dal peso molecolare del polimero;

- nei dendrimeri la crescita è limitata dall'ingombro sterico; a causa di tale limitazione le molecole sviluppano una conformazione globulare, al contrario nei polimeri la crescita può continuare all'infinito.

Queste caratteristiche hanno portato ad un aumento dell'interesse scientifico nei confronti di questi sistemi e delle loro potenziali applicazioni in vari ambiti. Alcune delle applicazioni più affascinanti dei dendrimeri sono state nel campo della chimica supramolecolare: i dendrimeri possono, infatti, incapsulare altri substrati all'interno della loro struttura, o alla periferia, attraverso interazioni supramolecolari come legame a idrogeno, legame ionico o interazioni idrofobiche[45].

Le interazioni supramolecolari sulla superficie includono anche importanti interazioni tra peptidi e proteine per la produzione di anticorpi e vaccini sintetici[46] e interazioni carboidrati-proteine per il riconoscimento cellulare [47]. Un'altra applicazione dei dendrimeri, correlata alla chimica supramolecolare, riguarda il loro uso come supporti per sistemi a rilascio controllato di farmaci (Drug Delivery Systems, DDS). A differenza dei polimeri lineari, generalmente utilizzati nei dispositivi DDS, la struttura tridimensionale dei dendrimeri è maggiormente controllata e riproducibile, hanno un'alta densità di gruppi funzionali e quindi una maggiore concentrazione di farmaci veicolabili inoltre, è possibile migliorare l'assorbimento cellulare del farmaco aumentando la penetrazione e la ritenzione nelle cellule con dendrimeri funzionalizzati con polietilenglicole (PEG), gruppi folato o altro [48]. Inoltre la presenza di un gran numero di gruppi funzionali in periferia, rende i dendrimeri potenzialmente utili per successive coniugazioni. Rappresentano, pertanto, uno strumento ideale per studiare l'influenza di alcuni parametri chimico fisici come dimensioni del

polimero, carica superficiale, natura chimica, sulla citotossicità, sul processo di internalizzazione recettoriale e sulle interazioni cellulari e subcellulari.

La maggior parte degli studi condotti con finalità terapeutiche e diagnostiche sono stati sviluppati con dendrimeri a struttura poli amidoamminica, noti anche come PAMAM, in quanto sono relativamente facili da sintetizzare a partire dalla prima generazione sino alla generazione 10 (G1-G10) o sono disponibili commercialmente, inoltre, hanno un numero elevato di gruppi funzionali periferici (da 4 a 4096), di diversa natura (es. ammine, acidi carbossilici, ossidrilici) e pesi molecolari (da 657 a 935.000 g/mol) con indice di polidispersività prossimo a 1[39].

1.1.7 Le nanoparticelle colloidali (NP)

Come già detto, un notevole miglioramento nella terapia del cancro si potrebbe ottenere sviluppando innovative strategie di veicolazione e rilascio controllato di farmaci, in grado di mirare e penetrare specificatamente le cellule tumorali, superandone la resistenza. Inoltre sviluppando sistemi di veicolazione capaci di agire sia da dispositivi diagnostici per l'individuazione non invasiva delle aree malate, sia da sistemi terapeutici, l'azione fisica di tali sistemi in combinazione con l'azione chimica del farmaco permetterebbe di aumentare le probabilità di successo terapeutico.

In tale prospettiva, l'utilizzo di nanovettori a base di nanoparticelle (NP) colloidali offre la potenzialità di un nuovo ed innovativo approccio per il trasporto mirato di farmaci antitumorali alle cellule cancerose e una più precisa individuazione delle aree colpite, superando la MRD (resistenza multipla ai farmaci), favorendone l'accumulo intracellulare e riducendone gli effetti collaterali avversi dovuti alla somministrazione di elevate dosi.

In particolare, le NP inorganiche colloidali risultano essere particolarmente interessanti per le loro singolari proprietà chimico-fisiche (optoelettroniche, magnetiche, termodinamiche, ossidoriduttive, ecc.) dipendenti principalmente dalla loro composizione, struttura, dimensione e forma. I progressi nella sintesi colloidale hanno permesso la realizzazione e il controllo della dimensione e della geometria di nanostrutture tale da poter oggi realizzare strutture complesse quali rod, tubi, tetrapod, ecc. aventi diversa composizione e proprietà [49,50]. Nanocristalli (NC) di tipo “multi-arms” o eterostrutture costituite da domini magnetici, metallici o fluorescenti, sono esempi di complesse strutture inorganiche ideali per la realizzazione di sistemi teranostici [51,52].

Generalmente le NP sono stabilizzate da uno strato di molecole organiche contraddistinte dalla presenza di catene alifatiche, che le rendono insolubili in acqua. Esse però sono caratterizzate da un'estrema versatilità della loro chimica superficiale e quindi offrono il vantaggio di essere altamente processabili mediante strategie post sintetiche. È possibile, dunque, in virtù delle loro peculiari caratteristiche chimiche superficiali, realizzare nuove e innovative formulazioni farmacologiche mediante opportuna funzionalizzazione delle NP con svariate tipologie di farmaci. Inoltre, grazie all'elevato rapporto superficie/volume, la superficie delle NP consente di legare chimicamente specifici sistemi molecolari capaci di interagire con determinati recettori e indirizzarle in modo mirato verso cellule o tessuti-bersaglio. In questo modo è possibile ottenere NP altamente multifunzionali che possono trovare impiego nella realizzazione di nanosistemi teranostici, in grado di combinare simultaneamente abilità diagnostiche e terapeutiche.

In questo contesto, ad esempio, le NP magnetiche descritte nel capitolo 3, rappresentano dei nanosistemi per applicazioni in teranostica perché grazie alle loro specifiche caratteristiche fisiche e chimiche possono agire sia da mezzo di contrasto utile per la diagnosi che da mezzo terapeutico per il trattamento del

cancro. Infatti, esse, opportunamente funzionalizzate, consentono di trasportare, in modo mirato e controllato, specifici agenti chemioterapici, in quanto possono essere orientate verso siti specifici dell'organismo applicando un opportuno campo magnetico. Inoltre, l'applicazione di un campo magnetico esterno può generare sviluppo di calore, indurre la morte cellulare, consentendo di aumentare l'efficacia del trattamento chemioterapico (ipertermia magnetica). Infine, la possibilità di utilizzare le NP magnetiche come agenti di contrasto nell'imaging a risonanza magnetica (MRI) permette di effettuare una più accurata identificazione delle aree interessate dalla malattia, una valutazione non invasiva della biodistribuzione del farmaco, ed un monitoraggio in tempo reale delle risposte terapeutiche.

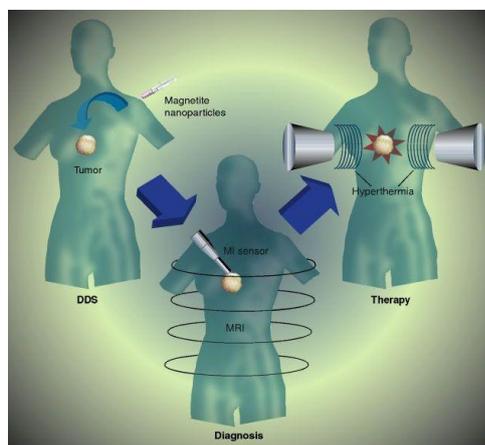


Fig.5. Strategie teranostiche mediante l'uso di NP magnetiche: NP magnetiche funzionalizzate accumulate nei tessuti tumorali via DDS (drug delivery system); NP magnetiche utilizzate per la diagnosi del cancro mediante MRI; ipertemia indotta da campo magnetico alternato.

Un altro esempio è rappresentato dai nanocristalli (NC) di semiconduttori luminescenti (QD di CdSe@ZnS inglobati in una shell di silice) descritti nel capitolo 5, i quali rappresentano un materiale particolarmente attraente per applicazioni nel campo del bio-sensing ed imaging. Rispetto ai coloranti organici

impiegati quali probe luminescenti, i NC presentano un ampio spettro di eccitazione e una banda di emissione stretta e simmetrica, il cui massimo è modulabile con le dimensioni. La resistenza al photobleaching, unita alla luminosità di tali materiali rappresentano caratteristiche importanti quando si vogliono condurre analisi a lungo termine e a elevata sensibilità [53,54].

1.1.7.1 I nanocristalli (NC)

Si possono definire solidi nanostrutturati o, più in generale, sistemi nanostrutturati tutti quegli oggetti che hanno almeno una delle dimensioni comprese tra 1 e 100 nm. L'interesse scientifico e tecnologico verso questa nuova classe di materiali è legata alle peculiari caratteristiche intrinseche quali gli effetti quantistici che si aggiungono alle comuni proprietà di bulk quali la conducibilità, la durezza e il punto di fusione. Infatti passando da un cristallo di dimensioni macroscopiche ad un NC tutte le proprietà termodinamiche, ottiche, elettriche e magnetiche variano enormemente secondo delle vere e proprie leggi di scala, pur mantenendo la composizione del materiale costante[55,56].

Nei NC, gli elettroni hanno a disposizione una regione di spazio limitata e questo porta ad una discretizzazione dei livelli energetici e della densità degli stati elettronici (Fig.6a). Un NC dal punto di vista quantistico si trova in una situazione intermedia fra una molecola che ha degli stati energetici discreti ed un cristallo con bande di energia continue. Per ogni materiale esiste una dimensione critica al di sotto della quale gli effetti del confinamento quantico diventano apprezzabili, in quanto la discretizzazione dei bordi delle bande e l'aumento del band gap si traducono in una sostanziale differenziazione delle proprietà elettriche ed ottiche del NC rispetto al corrispondente bulk[56].

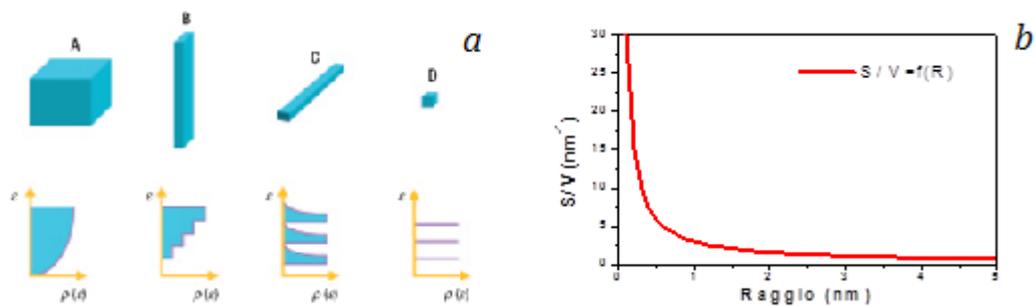


Fig.6. Densità degli stati e confinamento quantico per diverse tipologie di nanostrutture: A) strutture 3-D tipo bulk; B) pozzi quantici (2-D); C) fili quantici (1-D); D) punti quantici (0-D) (Pannello a); Dipendenza della dispersione (frazione di atomi alla superficie) dal numero di atomi costituente l'aggregato, ipotizzato di forma cubica (Pannello b).

Inoltre al diminuire delle dimensioni il rapporto fra gli atomi presenti sulla superficie e quelli nel core del cristallo aumenta a favore dei primi. Il contributo degli atomi superficiali all'energia libera di un cristallo è diverso da quello degli atomi di core per cui molte proprietà termodinamiche dipenderanno proprio dal rapporto tra il numero degli atomi di superficie e quello degli atomi di core. Se si considera un NC sferico è possibile vedere facilmente come varia il rapporto tra superficie e volume in funzione del raggio (Fig.6b). Se si registra uno spettro di assorbimento di un semiconduttore nanocristallino si possono facilmente osservare gli effetti del confinamento quantico. Infatti all'aumentare delle dimensioni del NC diminuisce il gap energetico tra la banda di valenza e la banda di conduzione per cui le bande di assorbimento si spostano verso lunghezze d'onda più grandi, e quindi verso energie più basse, diventando meno risolte a causa del ridotto confinamento quantico [57] (Fig.7a). Inoltre gli effetti del confinamento quantico possono essere valutati con gli spettri di fluorescenza che mostrano uno spostamento delle bande di emissione verso lunghezze d'onda maggiori all'aumentare delle dimensioni del NC e quindi alla diminuzione del band gap (Fig.7b).

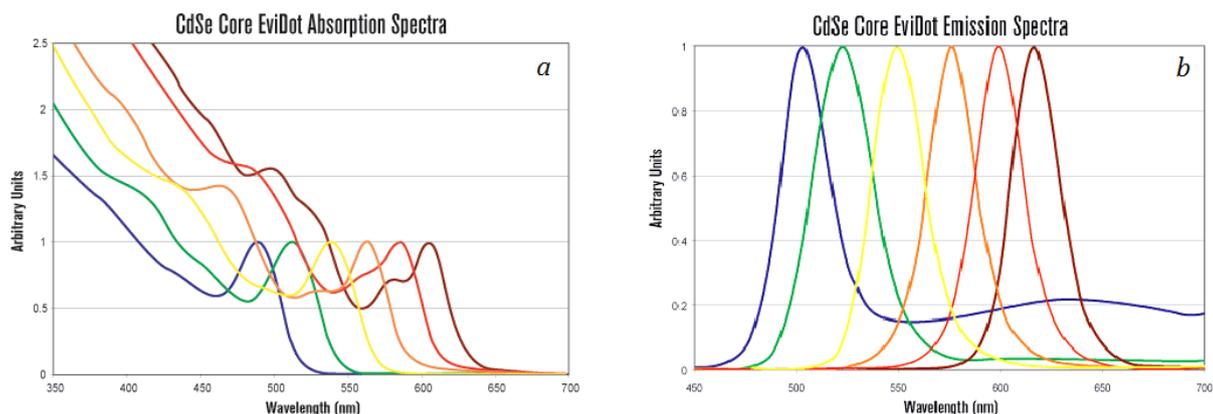


Fig.7. Spettri di assorbimento di nanocristalli di CdSe di diverse dimensioni (Pannello a); Spettri di emissioni di nanocristalli di CdSe di diverse dimensioni (Pannello b).

Per quanto riguarda le proprietà magnetiche ricordiamo che il magnetismo dei materiali è causato dallo spin degli elettroni e dal loro moto intorno ai nuclei. Un campo magnetico esterno, che agisce sugli atomi di un materiale, sbilancia leggermente l'orbita dei suoi elettroni e crea piccoli dipoli magnetici che interagiscono con il campo magnetico applicato. In funzione di tale interazione si possono avere materiali diamagnetici, paramagnetici, ferromagnetici, antiferromagnetici e ferrimagnetici.

L'ossido di ferro, oggetto d'interesse in questo lavoro di tesi (capitolo 3), è un materiale ferromagnetico le cui peculiari proprietà sono dovute al fatto che, a temperatura ambiente, gli elettroni spaiati degli orbitali 3d di atomi adiacenti si allineano in direzione parallela e in regioni microscopiche dette domini magnetici, per un fenomeno detto di magnetizzazione spontanea. Per tali materiali è possibile costruire una tipica curva di isteresi in cui l'area interna è una misura dell'energia persa o del lavoro compiuto dal ciclo di magnetizzazione o smagnetizzazione[58].

Nei materiali ferromagnetici nanostrutturati le proprietà magnetiche dei corrispondenti bulk cambiano. In particolare al diminuire delle dimensioni si

verifica che la magnetizzazione di saturazione diminuisce in quanto diminuisce il numero totale degli spin che si sommano e che la coercitività diminuisce e di conseguenza la magnetizzazione residua tende a zero più velocemente ovvero diminuisce il tempo di rilassamento (Fig.8a).

Al di sotto di una dimensione critica (D_c), i NC si comportano come singoli domini magnetici, mentre al di sotto della cosiddetta dimensione di bloccaggio (blocking size), i NC si comportano da sostanze superparamagnetiche, mostrando coercitività nulla e un valore di magnetizzazione di saturazione che, a volte, risulta essere anche maggiore del corrispondente valore relativo al materiale bulk. Il comportamento superparamagnetico appare praticamente uguale al comportamento paramagnetico, pur avvenendo al di sotto della temperatura di Curie (Fig.8b). Inoltre, mentre il paramagnetismo è una proprietà intrinseca della materia, prodotta dall'allineamento dei momenti dei singoli dipoli magnetici di atomi o molecole immersi in un campo magnetico esterno, il superparamagnetismo dipende da condizioni esterne come dimensione, forma, temperatura, concentrazione e capping [58-59].

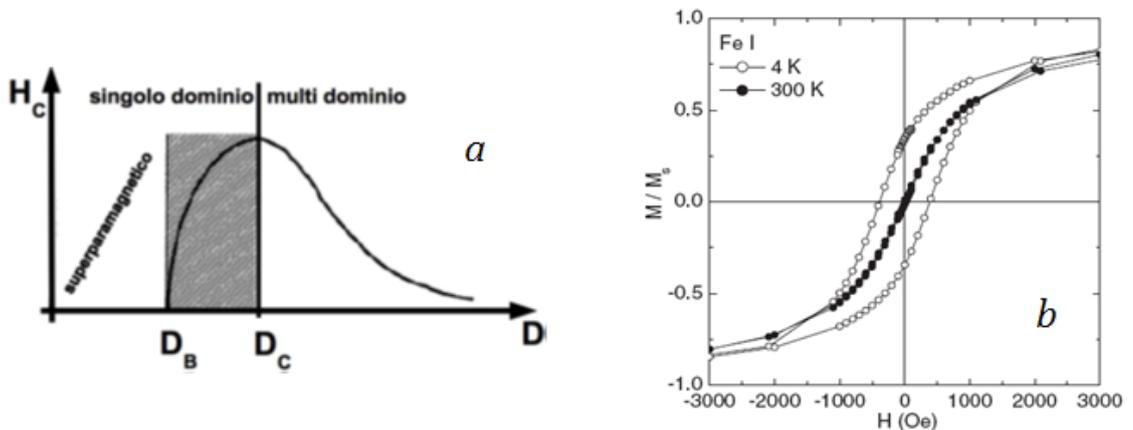


Fig.8. Andamento qualitativo della coercitività in funzione della dimensione delle nanoparticelle (Pannello a); Curve di isteresi a due temperature per nanocristalli di ferro di 6.7 nm. A 300 K la curva mostra comportamento superparamagnetico (Pannello b).

La temperatura alla quale i NC acquistano un comportamento superparamagnetico è nota come temperatura di bloccaggio (T_b) (blocking temperature). Solitamente tale temperatura diminuisce al diminuire delle dimensioni e viene determinata mediante l'uso di tecniche zero-field cooling (ZFC) e field cooling (FC). Attraverso tali tecniche è possibile valutare la dipendenza della temperatura di bloccaggio dai vari fattori sopraelencati in modo tale da modulare il comportamento magnetico delle NP per le varie applicazioni.

1.1.7.2 Strategie di sintesi di NC

Un NC colloidale è un oggetto composto da un core inorganico cristallino e una shell di tensioattivi che, coordinando gli atomi superficiali insaturi, regola la solubilità del core e lo protegge da fenomeni di aggregazione. Tale configurazione permette di ottenere dispersioni di NC colloidali otticamente trasparenti, permettendo così lo studio delle loro proprietà optoelettroniche e catalitiche con le spettroscopie convenzionali. Inoltre, dopo la sintesi, possono essere agevolmente funzionalizzati e manipolati per una varietà di applicazioni tecnologiche come ad esempio modificazioni superficiali, funzionalizzazione con molecole biologiche o inorganiche, incorporazione in matrici polimeriche, immobilizzazione su superfici, al fine di consentirne una pronta integrazione in sistemi e dispositivi da utilizzare in specifici ambiti applicativi.

La preparazione di NC può essere condotta sia con metodi fisici che con metodi chimici. L'approccio fisico è solitamente un approccio "top-down" che vede l'ottenimento di NC a partire da materiali di bulk. L'approccio chimico è invece di tipo "bottom-up" e vede la sintesi di NC a partire da precursori molecolari. Tra i metodi chimici particolare interesse hanno assunto quelli che si basano su reazioni che hanno luogo in soluzione e che non richiedono alto vuoto ed elevate temperature. Tra questi si distinguono due classi principali di approcci [60]:

- metodi che utilizzano template statici, come ad esempio setacci molecolari, zeoliti, membrane porose, nanotubi di carbonio. In tali sistemi i nanopori dei materiali ospiti fungono sia da camera di reazione che da strutture rigide in grado di modellare la forma e le dimensioni delle particelle;
- metodi colloidali che utilizzano molecole organiche per controllare la crescita delle nanostrutture.

Tra le tecniche colloidali, molto utilizzate sono le tecniche che fanno uso di molecole che funzionano da agenti stabilizzanti (che sono molto spesso anche i solventi della reazione stessa), in grado di dirigere la crescita delle nanostrutture, coordinandosi alla loro superficie. Tali molecole devono interagire con la superficie dei NC con una energia che non deve essere né troppo bassa, perché ciò favorirebbe fenomeni di aggregazione dei NC[61], né troppo alta perché in questo caso sia la nucleazione che la crescita potrebbero essere inibite. Queste specie chimiche devono essere stabili alle elevate temperature richieste per la crescita e sono di solito composte da lunghe catene alifatiche legate a gruppi funzionali contenenti atomi di fosforo, azoto, ossigeno; composti con queste caratteristiche sono chiamati tensioattivi e sono rappresentati da fosfine, fosfinossidi, ammine, ammidi e acidi carbossilici. Le molecole di tensioattivo coordinano la superficie dei NC attraverso i loro gruppi funzionali ed espongono all'ambiente circostante le catene alifatiche, rendendo i cristalli solubili in una vasta gamma di solventi organici.

In particolare, nel presente lavoro di tesi si effettuerà la sintesi per decomposizione termica di un precursore in solventi coordinanti. Questa tecnica prevede l'iniezione rapida di una soluzione "fredda" di precursori molecolari in un pallone dove un solvente o una miscela di solventi coordinanti sono riscaldati ad alta temperatura (100-300 °C). I precursori sono introdotti o in forma elementare o come complessi organometallici. Questi sono solitamente disciolti in un

solvente ad elevato punto di ebollizione. La soluzione contenente i precursori è quindi iniettata nella miscela di reazione. Nell'ambiente di reazione i precursori si decompongono formando i NC; contemporaneamente le molecole di tensioattivo si adsorbono e si deadsorbono dinamicamente dalla superficie dei NC limitando i fenomeni di aggregazione.

La crescita dei cristalli in soluzione consta di due fasi principali, che sono la nucleazione e l'accrescimento. Le procedure di sintesi devono essere in grado di controllare entrambe le fasi e teoricamente separarle tra loro. Infatti il procedere del fenomeno della nucleazione durante la fase di crescita dei cristalli genera una distribuzione abbastanza ampia delle dimensioni dei cristalli. La rapida iniezione, seguita da un repentino abbassamento della temperatura e della concentrazione di monomero, arresta idealmente o limita la fase di nucleazione.

Successivamente le NP sintetizzate sono precipitate dalla soluzione colloidale mediante solventi con polarità sensibilmente diversa dalla miscela di reazione in cui i NC sono sintetizzati. Le interazioni fra le particelle diventano predominanti rispetto alle interazioni particelle-solvente, dando così luogo a fenomeni di aggregazione ed infine di precipitazione. Il fenomeno di aggregazione è in genere reversibile perché la superficie dei NC è passivata dalle molecole coordinanti di tensioattivo, per cui il precipitato può essere facilmente solubilizzato.

1.1.7.3 Funzionalizzazione superficiale di NC per applicazioni biologiche

I NC colloidali, sintetizzati in ambiente non acquoso, richiedono trattamenti post-sintesi per renderli biocompatibili e disperdibili in ambiente acquoso. Tali trattamenti devono in ogni caso preservare le peculiari caratteristiche delle NP. Una possibile classificazione dei metodi di funzionalizzazione si basa sulla tipologia delle interazioni coinvolte nel processo di funzionalizzazione, e in particolare,

- scambio del capping superficiale,
- interazioni idrofobiche,
- crescita di una shell di materiale maggiormente biocompatibile.(Fig.9)

In questo lavoro di tesi, l'attenzione è stata focalizzata sulle tecniche che vedono l'incorporazione di SPION che sfruttano le interazioni idrofobiche (capitolo 3) e su quelle che prevedono la crescita di una shell di materiale maggiormente biocompatibile (capitolo 5).

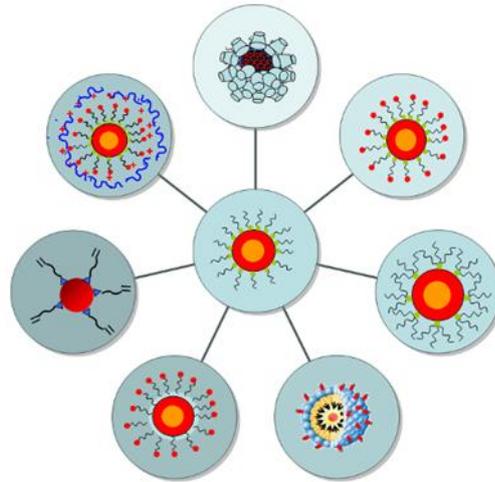


Fig. 9. Schematizzazione dei vari tipi di funzionalizzazione superficiale dei nanocristalli.

- *Incorporazione in fosfolipidi e micelle di fosfolipidi*

Questa classe di lipidi contengono fosforo come gruppi dell'acido ortofosforico e costituiscono la frazione di lipidi più abbondante presente nelle membrane cellulari di cui rappresentano gli elementi strutturali. I fosfolipidi sono costituiti anche da una parte idrofobica rappresentata da catene alifatiche e pertanto sono classificate come molecole anfipatiche o anfifiliche.

Dall'osservazione di quello che accade in una soluzione acquosa diluita, si può dedurre che i fosfolipidi, come qualsiasi altro tensioattivo, sono presenti generalmente in forma monomericata ed hanno un comportamento analogo a quello degli elettroliti forti, sono cioè completamente dissociati e le loro proprietà chimico-fisiche sono vicine all'idealità a diluizione infinita.

Man mano che la concentrazione dei monomeri aumenta si ha la formazione di sistemi supramolecolari di differente complessità per la doppia natura idrofilica-idrofobica della specie. Tale fenomeno è noto come "effetto solvatofobico" e deriva dall'associazione di molecole apolari in acqua tramite interazioni di natura idrofobica.

La successiva organizzazione dei monomeri a dare dimeri o aggregati contenenti un piccolo numero di molecole, determina zone di contatto e di interazione fra le catene apolari, provocando così la distruzione del guscio di idratazione ed il ripristino dell'originaria struttura meno ordinata del solvente. Tale processo comporta un aumento dell'entropia del sistema e fa sì che l'aggregazione avvenga spontaneamente.

Continuando ad aumentare la concentrazione dei fosfolipidi, quando si oltrepassa un valore limite detto concentrazione micellare critica (c.m.c.), si osserva la formazione di aggregati micellari come possiamo vedere in figura 10, ovvero supramolecole costituite da 50-200 unità, dalla forma approssimativamente sferica e il cui raggio è circa uguale alla lunghezza della catena alchilica .

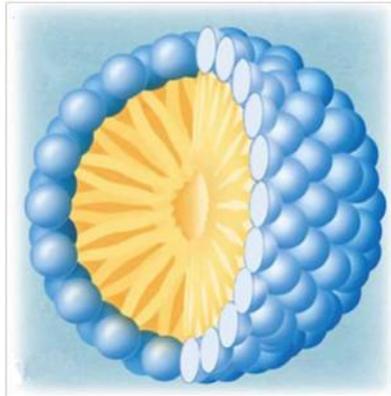


Fig.10. Micella di fosfolipidi.

Se la concentrazione supera di gran lunga la concentrazione micellare critica è possibile osservare la formazione di aggregati ellissoidali e poi cilindrici fino ad arrivare a strutture di tipo multi-layer o liquido-cristallino, che derivano dalla disposizione parallela, secondo un reticolo esagonale delle micelle cilindriche, con l'acqua localizzata sulle superfici e nelle intercapedini.

Altri tipi di strutture supramolecolari formate dai tensioattivi sono i monolayer, o bilayer. Se vengono eseguiti trattamenti particolari, come la sonicazione o l'iniezione di una soluzione organica di tensioattivo in acqua, i bilayer subiscono un riarrangiamento in strutture chiuse come possiamo vedere in figura 11, caratterizzate dalla presenza di una cavità polare e chiamate vescicole o liposomi, se costituite da lipidi.

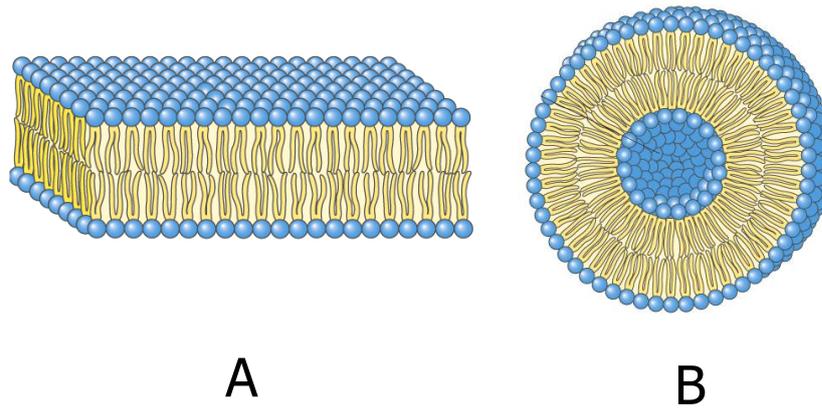


Fig.11. Possibili strutture di aggregati supramolecolari (A: bilayer; B: vescicole o liposomi)

La forma degli aggregati, che può essere sferica prima e cilindrica poi, oppure lamellare, dipenderà dalla geometria (conica, troncoconica, cilindrica) dei fosfolipidi e dalla temperatura.

L'ingombro della testa polare dipende dalla sua carica, dal grado di idrofilia e dalle repulsioni o attrazioni elettrostatiche con le teste delle molecole adiacenti. Nel caso delle code, la lunghezza ed il grado di insaturazione delle catene alifatiche determinano il volume occupato dalla parte idrofobica. La temperatura ha un'influenza relevantissima, poiché essa determina il grado di agitazione termica delle catene alifatiche e, quindi, modifica fortemente il volume occupato dalle code[62]. In questo senso il parametro di impaccamento tiene conto delle caratteristiche geometriche dei fosfolipidi e grazie ad esso è possibile prevedere in quale sistema complesso si organizzeranno i singoli fosfolipidi[63].

$$N=V/\sigma L$$

con V volume della catena idrocarburica, L lunghezza efficace e σ area efficace della testa polare.

Il termine “efficace” indica semplicemente che i vari termini dipendono, non solo dalla geometria del fosfolipide, ma sono anche correlate all’ambiente in cui esso è solubilizzato, per cui in una microemulsione fattori, quali la temperatura, modificano il parametro di impaccamento, modulando di conseguenza la dimensione e la forma delle micelle.

In accordo con questo semplice modello geometrico è possibile stabilire che una particolare molecola anfifilica potrà formare dei bilayer flessibili, curvi o planari o delle vescicole se il valore del suo parametro di impaccamento è compreso tra 0.5 e 1. Se osserviamo più da vicino il sistema micellare notiamo che i costituenti delle micelle sono sottoposti ad un rapido equilibrio dinamico regolato dalla diffusione. Tale equilibrio è il risultato di due processi paralleli: il primo e più rapido, dell’ordine dei microsecondi, consiste nell’associazione e dissociazione di un monomero dall’aggregato, mentre il secondo e più lento, dell’ordine dei millisecondi, consiste nella formazione e disgregazione dell’intera struttura. La formazione di micelle richiede che la molecola di tensioattivo che le costituisce deve possedere:

- una catena idrocarburica costituita da un numero minimo di 8-10 gruppi metilenici (-CH₂-), in modo tale da ridurre la solubilità in acqua;
- un gruppo polare (gruppo fosfato) sufficientemente attivo da promuovere la solubilità della molecola stessa, altrimenti lipofila.

La micellizzazione dipende dal bilancio di due tendenze opposte. Da un lato essa è guidata dalla minimizzazione del contatto delle code idrocarburiche con le molecole polari acquose; per questo motivo le catene lipofile dei monomeri si “impaccano” mediante interazioni di tipo specifico (forze di Wan der Waals e interazioni idrofobiche). Dall’altro lato, esiste una repulsione fra i gruppi di testa

polari o ionici dei tensioattivi; tale effetto destabilizzante viene in parte attenuato dall'associazione di controioni sulla superficie micellare.

I parametri necessari per caratterizzare una micella sono:

- il numero di aggregazione n , ovvero il numero medio di molecole di tensioattivo per aggregato il cui valore varia tra 50-200; tale valore è influenzato da vari fattori, come la lunghezza della catena idrocarburica, le caratteristiche del gruppo di testa, il tipo di controione e la presenza di additivi;
- la frazione di controioni associati alla micella (β), ovvero il grado di neutralizzazione della micella stessa, il cui valore varia teoricamente fra 0 ed 1, ma tali valori limite non vengono mai raggiunti. In realtà, sperimentalmente si misura il grado di ionizzazione micellare (α), cioè la frazione di controioni fornita dalla fase micellare alla fase acquosa e correlato al parametro β dalla relazione:

$$\beta=1-\alpha$$

- il raggio idrodinamico, ovvero il raggio dell'aggregato micellare assimilato ad una sfera comprendente anche l'idratazione secondaria. Questo parametro si misura con la tecnica del Dynamic Light Scattering;
- la concentrazione micellare critica.

Micelle polimeriche sono state ampiamente utilizzate per migliorare l'efficacia della distribuzione del farmaco e ridurre la tossicità[64,65]. Le micelle polimeriche possono essere concentrate nel tessuto tumorale grazie alla maggiore permeabilità e all'effetto ritenzione che consentono una buona penetrazione nel tessuto tumorale[66]. In particolare, l'impiego di micelle a base di fosfolipidi modificati con il polietilenglicole (PEG), utilizzate in questo lavoro di tesi, oltre a

migliorare il profilo di sicurezza ed efficacia del sorafenib, riducendone la tossicità, dovrebbero essere caratterizzate da un tempo di emivita più elevato nella circolazione sanguigna ed essere, quindi, disponibili il più possibile per svolgere il trasporto efficace del farmaco.

L'utilizzo del PEG, come rivestimento esterno, permetterebbe alle micelle di eludere le proteine di plasma (opsine) presenti nel sangue ritardando così l'attacco dei macrofagi (proprietà stealth) i quali porterebbero a una precoce degradazione con una perdita sostanziale di concentrazione di farmaco nei tessuti tumorali.

Il PEG è un polimero neutro, biocompatibile, non biodegradabile, atossico, non immunogenico. Solo lo 0.2% della popolazione sviluppa anticorpi anti-PEG, che comunque non portano ad effetti collaterali tali da impedirne l'impiego farmaceutico. Sebbene non sia biodegradabile, esso può essere eliminato per via renale ed epatica senza subire sostanziali modifiche strutturali ma la cinetica di eliminazione dipende dal suo peso molecolare che condiziona il volume idrodinamico. In genere, il PEG fino ad un peso molecolare di 20000-Da può essere eliminato facilmente per via renale. Per queste caratteristiche e per la bassa tossicità il PEG è stato approvato dall'European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA) e dalla Food and Drug Administration (FDA) per l'impiego nella preparazione di sistemi farmaceutici da somministrare per via parenterale[67].

- *Crescita di una shell di materiale biocompatibile*

Un'altra procedura, riportata in letteratura, per trasferire nanoparticelle di materiali differenti in soluzioni acquose, prevede l'utilizzo di un polimero anfifilico[68]. Sfruttando le interazioni non-specifiche di tipo idrofobico tra le catene alchiliche del polimero e quelle dell'agente coordinante alla superficie della nanoparticella colloidale e promuovendo, successivamente, una reazione di cross-linking del polimero, si viene a creare, attorno a ciascuna particella, una

shell di polimero idrofilica. Shell inorganiche di silice [69] sono state utilizzate per ricoprire nanoparticelle di metalli [70], semiconduttori luminescenti[71], e magnetici [72] da applicare in campo biologico dove si sfruttano le proprietà della silice quale materiale inerte e altamente biocompatibile. L'impiego della sintesi di Stöber, basata sull'idrolisi in etanolo di un ortosilicato (generalmente tetraetilortosilicato: TEOS) in presenza di acqua e ammoniaca quale catalizzatore, seguita da reazione di condensazione, non è adatta quando si vogliono inglobare nella shell di silice NC di dimensione di pochi nanometri e la cui superficie è coordinata da leganti non polari e, inoltre, pone alcuni limiti quando si voglia restare in un regime dimensionale a livello submicrometrico. Un altro approccio prevede l'uso di un primer, ad esempio è riportato l'impiego di molecole di (3-Amminopropil)trietossisilano (APS), in grado di coordinare la superficie di alcuni nanoparticelle (Au) mediante i gruppi amminici, le cui funzionalità di alcossisilani, esposte all'esterno, permettono la crescita di una shell di silice secondo la strategia Stöber[73].

La sintesi descritta da Koole [71] utilizza sempre il TEOS quale precursore della shell di silice. La reazione avviene in una microemulsione costituita da cicloesano, in cui sono dispersi i NC, soluzione ammoniacale e tensioattivo. Il meccanismo prevede la formazione di micella inversa che agisce da pool per la crescita della particella: le molecole del precursore siliceo (TEOS) idrolizzato (nell'ambiente basico) e il tensioattivo scalzano l'agente coordinante alla superficie dei NC, favorendone l'inclusione nel pool acquoso, dove avviene la formazione della shell di silice[74]. Tale strategia permette di ricoprire con una shell di silice NC e nanoparticelle colloidali stabili in solventi organici, rendendole così disperdibili in solventi acquosi (Fig.12).

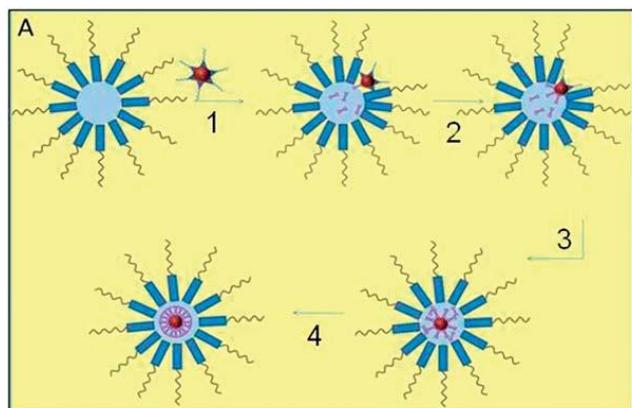


Fig.12. Schema della crescita in microemulsione di shell di silice su nanocristalli colloidali.

La stretta distribuzione dimensionale delle nanoparticelle (bead) preparate, le dimensioni sub-micrometriche e le caratteristiche proprietà spettroscopiche dei NC in esso trasferite, permettono di disporre di un materiale funzionale di notevole interesse per studi *in vitro* o *in vivo*.

La shell di silice, inoltre, offre una superficie versatile, la cui chimica superficiale può essere facilmente modulata. Reazioni di funzionalizzazione rivestono un ruolo importante non solo per introdurre specifici siti di ancoraggio utili alla coniugazione di molecole di interesse biologico, ma anche alla comprensione e identificazione di quei parametri, di natura elettrostatica, sterica e chimica, che condizionano l'interazione fra le particelle e il loro destino in cellula. Lo stadio iniziale di interazione fra le nanoparticelle e le cellule prevede l'assorbimento sulla membrana cellulare, seguito da uptake attraverso la membrana verso l'interno della cellula. Studi riportati in letteratura mostrano che il trasporto risulta fortemente influenzato dalla dimensione delle nanoparticelle e dalla funzionalizzazione superficiale. Il basso regime dimensionale, a livello submicrometrico, facilita una buona penetrazione della membrana cellulare ed è noto che la presenza di gruppi amminici o amminoacidi sulla shell di silice

conferisce alle nanoparticelle una carica superficiale positiva che consente un'internalizzazione più efficace [75].

E' importante sottolineare che nel processo di trasferimento di strutture alla nanoscala in sistemi biologici, le proprietà superficiali possono subire cambiamenti significativi: la forza ionica di mezzi fisiologici e l'insorgere di reazioni chimiche con i componenti di colture cellulari riducono in molti casi la stabilità colloidale dei sistemi, causando fenomeni di aggregazione [75]. Pertanto nella progettazione e realizzazione di nuovi sistemi alla nanoscala risulterà fondamentale elaborare strategie che consentano di ottenere nano-oggetti funzionali stabili dal punto di vista colloidale, in cui siano preservate le proprietà chimico-fisiche che si intende trasferire e sfruttare per le analisi in vitro.

1.2 Finalità della ricerca

Lo scopo del presente lavoro di tesi è stato quello di realizzare nuovi sistemi nanoparticellari per il direccionamento di farmaci o di agenti per l'imaging, potenzialmente utilizzabili per la terapia e/o per la diagnosi dell'epatocarcinoma (HCC), in particolare per quelle forme caratterizzate dall'overespressione del recettore di membrana degli epatociti ASGP-R o del recettore mitocondriale TSPO.

In particolare, nel capitolo 2 sono state descritte la sintesi, la caratterizzazione chimico fisica, la capacità di internalizzazione cellulare e l'efficacia antitumorale di un nuovo sistema nanoparticellare, costituito da un dendrimero a struttura poli-amido-aminica (PAMAM) di quarta generazione, opportunamente funzionalizzato con acido lactobionico per il riconoscimento selettivo del recettore ASGP-R e marcato con fluoresceina isotiocianato, in grado di veicolare nel *core* idrofobico, il farmaco attualmente più utilizzato nella terapia dell' HCC, il Sorafenib. Come evidenziato dai saggi di citotossicità, di recovery ed annexina V, condotti su due linee cellulari di tumore epatico umane (HepG-2 ed HLE), il sorafenib incluso nel dendrimero, non perde la sua efficacia, al contrario, è in grado di produrre un effetto più duraturo nel tempo rispetto al sorafenib somministrato tal quale. In aggiunta, come prevedibile, si è registrato un aumento della solubilità del sorafenib incluso nel dendrimero. Questi risultati consentono di considerare questo nuovo dendrimero ASGP-R-direzionato, come un vettore adatto per il rilascio selettivo di sorafenib nel citoplasma delle cellule di cancro al fegato overesprimenti tale recettore.

Nel capitolo 3 sono state descritte delle nuove nanoformulazioni rappresentate da micelle fosfolipidiche modificate con polietilenglicole e caricate con SPIONs e sorafenib. Esse sono state accuratamente preparate e caratterizzate mediante tecniche complementari, risultando dei nanovettori efficaci per il drug delivery,

con una buona stabilità in ambiente acquoso ed un opportuno carico di farmaco. È stata effettuata anche un'analisi magnetica delle strutture ottenute, che ha permesso di determinare la giusta quantità di SPIONs da incorporare nelle micelle. È stato specificamente progettato e realizzato un sistema *in vitro* per dimostrare che le micelle inglobanti le SPIONs erano efficacemente trattenute dal campo magnetico generato dal sistema nelle condizioni di flusso tipicamente presenti nel fegato umano. Gli esperimenti condotti su linee cellulari di tumore epatico (HepG-2) hanno dimostrato che questa nuova piattaforma di distribuzione del farmaco, è in grado di migliorare l'efficacia antitumorale del farmaco quando magneticamente direzionato. I suddetti nanovettori magnetici rappresentano pertanto dei candidati promettenti per il direzionamento verso specifici siti di tumore epatico, dove il rilascio selettivo di sorafenib risulta in grado di migliorare il suo profilo di efficacia e sicurezza.

Nei capitoli 4 e 5 sono invece descritti due nuovi sistemi nanoparticellari, in grado di legare selettivamente il recettore mitocondriale TSPO e potenzialmente utilizzabili per l'imaging *in vitro* di tale recettore. I mitocondri rappresentano un bersaglio subcellulare interessante date le innumerevoli funzioni svolte per garantire la vitalità cellulare, quali ad esempio il metabolismo del calcio, controllo dello stress ossidativo, e la regolazione dei processi apoptotici. Tuttavia, il targeting mitocondriale è stato un settore trascurato finora. In particolare il sistema descritto nel capitolo 4 è costituito da un dendrimero PAMAM di quarta generazione, funzionalizzato con un ligando altamente affine e selettivo per il, suddetto recettore a struttura 2-fenil-imidazo[1,2-a]piridinacetammidica sintetizzato nei nostri laboratori, e con fluoresceina isotiocianato (FITC) come fluoroforo organico. Queste nuove nano-piattaforme hanno caratteristiche uniche, infatti, vengono preparati con un livello di controllo non raggiungibile con la maggior parte dei polimeri lineari, portando a macromolecole globulari quasi monodisperse, con un gran numero di gruppi periferici. Di conseguenza,

rappresentano un candidato ideale come vettore per il delivery, e per studiare gli effetti di dimensioni del polimero, carica, composizione e architettura, sulle proprietà biologicamente rilevanti quali le interazioni con il doppio strato lipidico, citotossicità, internalizzazione cellulare e interazioni con gli scomparti e organelli subcellulari. Gli studi di uptake cellulare condotti su cellule overesprimenti il recettore TSPO (cellule C6 di glioma di ratto), anche sotto l'influenza di specifici inibitori di endocitosi, mediante esperimenti di frazionamento cellulare e analisi di co-localizzazione (mediante microscopia CAT(Confocale-AFM-TIRF)), hanno evidenziato che questo nuovo nanosistema viene rapidamente internalizzato nelle cellule e soprattutto è in grado di direzionarsi selettivamente sul target mitocondriale. Inoltre, le limitazioni ascrivibili all'utilizzo di FITC come fluoroforo organico, sono state superate con la realizzazione di una nuova nanostruttura ibrida, descritta accuratamente nel capitolo 5, basata su QDs fluorescenti opportunamente funzionalizzati per il riconoscimento del recettore TSPO, con lo stesso ligando altamente affine e selettivo utilizzato per il dendrimero descritto nel capitolo precedente. In particolare, la progettazione razionale di nanoparticelle di QDs (QD@SiO₂ NPs) rivestite di silice amminofunzionalizzata, ha permesso lo sviluppo di una nanopiattoforma versatile per la funzionalizzazione con il ligando del TSPO. La stabilità colloidale e le proprietà ottiche di questo nuovo nanomateriale sono state accuratamente valutate. Gli esperimenti di frazionamento cellulare e l'analisi di microscopia confocale condotti sulle cellule C6 overesprimenti il recettore TSPO, hanno confermato il grande potenziale di questo nanosistema multifunzionale come agente selettivo per l'imaging mitocondriale *in vitro*.

Bibliografia

- [1] Gasbarrini G., Morelli A. *Malattie del fegato delle vie biliari e del pancreas*. Piccin editore 2010.
- [2] Li F, Wang J-y. Targeted delivery of drugs for liver fibrosis. *Expert. Opin. Drug Deliv.* 2009; 6:531–541.
- [3] Thomas M.B., Jaffe D., Choti M.M., Belghiti J., Curley S., Fong Y., et al. Hepatocellular Carcinoma: consensus recommendations of the national cancer institute clinical trials planning meeting. *J Clin Oncol* 2010;28:3994–4005.
- [4] Mishra N., Yadav N. P., Rai V. K., Sinha P., Yadav K. S., Jain S., and Arora S. Efficient hepatic delivery of drugs: novel strategies and their significance. *BioMed .Research. International.* 2013; 20.
- [5] Schwartz A. L., Fridovich S. E., Knowles B.B., and Lodish H.F., Characterization of the asialoglycoprotein receptor in a continuous hepatoma line. *J. Biol. Chem.* 1981; 256: 8878.
- [6] R. Fallon J., and Schwartz A. L., Asialoglycoprotein receptor phosphorylation and receptor-mediated endocytosis in hepatoma cells. Effect of phorbol esters. *J. Biol. Chem.* 1988; 263: 13159.
- [7] Hyodo I., Mizuno M., Yamada G., and Tsuji Y., Distribution of asialoglycoprotein receptor in human hepatocellular carcinoma. *Liver.* 1993; 13: 80.
- [8] Costantini P., Jacotot E., Decaudin D., Kroemer G., Mitochondrion as a novel target of anticancer chemotherapy, *J. Natl. Cancer Inst*2000; 92: 1042–1053.
- [9] Rupprecht R., Papadopoulos V., Rammes G., Baghai T.C., Fan J., Akula N., Groyer G., Adams D, Schumacher M., Translocator protein (18 kDa) (TSPO) as a therapeutic target for neurological and psychiatric disorders, *Nat. Rev. Drug Discov.* 2010; 9: 971–988.
- [10] Venneti S., Lopresti B.J., Wiley C.A., The peripheral benzodiazepine receptor (Translocator protein 18 kDa) in microglia: from pathology to imaging, *Prog. Neurobiol.* 2006; 80: 308–322.
- [11] Bird J.L., Izquierdo-Garcia D., Davies J.R, Rudd J.H., Probst K.C., Figg N., Clark J.C., Weissberg P.L., Davenport A.P., Warburton E.A., Evaluation of translocator protein quantification as a tool for characterizing macrophage burden in human carotid atherosclerosis, *Atherosclerosis* 2010; 210: 388–391.
- [12] Azzariti A., Mancarella S., Porcelli L., Quatrone A. E., Caligiuri A., Lupo L., Dituri F., and Giannelli G. Hepatic stellate cells induce hepatocellular carcinoma cell resistance to sorafenib through the laminin-332/ $\alpha 3$ integrin axis recovery of

focal adhesion kinase ubiquitination. *Hepatology*. 2016; doi: 10.1002/hep.28835. [Epub ahead of print]

[13] Laquintana, V., Denora, N., Lopalco, A., Lopodota, A., Cutrignelli, A., Lasorsa, F. M. and Franco, M. Translocator protein ligand–PLGA conjugated nanoparticles for 5-fluorouracil delivery to glioma cancer cells. *Molecular pharmaceutics*, 2014; 11: 859-871.

[14] Lopalco, A., Ali, H., Denora, N., and Rytting, E. (). Oxcarbazepine-loaded polymeric nanoparticles: development and permeability studies across in vitro models of the blood–brain barrier and human placental trophoblast. *International journal of nanomedicine*, 2015; 10: 1985.

[15] Denora, N., Lopodota, A., Perrone, M., Laquintana, V., Iacobazzi, R. M., Milella, A., and Franco, M. (). Spray-dried mucoadhesives for intravesical drug delivery using N-acetylcysteine-and glutathione-glycol chitosan conjugates. *Acta Biomaterialia*, 2016; 43: 170-184.

[16] Lopodota, A., Cutrignelli, A., Laquintana, V., Denora, N., Iacobazzi, R. M., Perrone, M., and Depalo, N. Spray Dried Chitosan Microparticles for Intravesical Delivery of Celecoxib: Preparation and Characterization. *Pharmaceutical research*, 2016; 1-14.

[17] Chou L.Y., Ming K., and Chan W.C. Strategies for the intracellular delivery of nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* 2011; 40: 233 Epub 2010 Sep 30.

[18] Dreher M.R., Liu W., Michelich C.R., Dewhirst M.W., Yuan F., and Chilkoti A., Tumor vascular permeability, accumulation, and penetration of macromolecular drug carriers. *J. Natl.Cancer I.* 2006; 98:335.

[19] Duncan R. The dawning era of polymer therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2003; 2: 347.

[20] Neri D., and Bicknell R. Tumour vascular targeting. *Nat. Rev. Cancer.* 2005; 5: 436.

[21] Ruoslahti E., Bhatia S.N., and Sailor M. J. Targeting of drugs and nanoparticles to tumors. *J. Cell Biol.* 2010; 188: 759.

[22] Gabizon A., Catane R., Uziely B., Kaufman B., Safra T., Cohen R., Martin F. A. H., and Barenholz Y., *Cancer Res.* 1994; 54: 987.

[23] Kim T.Y., Kim D.W., Chung J.Y., Shin S.G., Kim S.C., Heo D.S., Kim N.K., Bang Y.J., Phase I and pharmacokinetic study of Genexol-PM, a cremophor free, polymeric micelle formulated paclitaxel, in patients with advanced malignancies. *Clin Cancer Res.* 2004; 10: 3708-3716.

[24] Vasey P.A., Kaye S.B., Morrison R., Twelves C., Wilson P., Duncan R., Thomson A.H., Murray L.S., Hilditch T.E., Murray T., Burtles S., Fraier D.,

Frigerio E., Cassidy, J. Phase I clinical and pharmacokinetic study of PK1 [N-(2-Hydroxypropyl) 614 methacrylamide copolymer doxorubicin]: first member of a new class of chemotherapeutic agents drug-polymer conjugates. *Clin. Cancer Res.* 1999; 5: 83–94.

[25] Bondi M. L., Botto C., Amore E., Emma M. R., Augello G., Craparo E. F., and Cervello M., Lipid nanocarriers containing sorafenib inhibit colonies formation in human hepatocarcinoma cells. *Int. J.Pharm.* 2015; 493: 75 Epub 2015 Jul 23.

[26] Li F-R, Yan W-H, Guo Y-H, Qi H, Zhou H-X. Preparation of carboplatin-Fe@C-loaded chitosan nanoparticles and study on hyperthermia combined with pharmacotherapy for liver cancer. *Int J Hyperthermia* 2009;25:383–391.

[27] Yano J, Hirabayashi K, Nakagawa S, Yamaguchi T, Nogawa M, Kashimori I, et al. Antitumor activity of small interfering RNA/cationic liposome complex in mouse models of cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:7721–7726.

[28] Digumarthy S.R., Sahani D.V., Saini S. MRI in detection of hepatocellular carcinoma (HCC). *Cancer Imaging* 2005;5:20–24.

[29] Tanimoto A., Kuribayashi S. Application of superparamagnetic iron oxide to imaging of hepatocellular carcinoma. *Eur J Radiol* 2006;58: 200–216.

[30] Arias J.L., Reddy L.H., Othman M., Gillet B., Desmaele D., Zouhiri F., et al. Squalene based nanocomposites: a new platform for the design of multifunctional pharmaceutical theragnostics. *ACS Nano* 2011;5:1513–1521.

[31] Wang Y., Du H., and Zhai G. Recent Advances in Active Hepatic Targeting Drug Delivery System. *Current Drug Targets*, 2014; 15: 573-599 573.

[32] Julyan P. J., Seymour L. W., Ferry D. R., Daryani S., Boivin C. M., Doran J., David M., Anderson D., Christodoulou C., Young A. M., Hesslewood S., and Kerr D. J. Preliminary clinical study of the distribution of HPMA copolymers bearing doxorubicin and galactosamine. *J. Control. Release.* 1999; 57: 281.

[33] Couvreur P, Vauthier C. Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease. *Pharm Res* 2006;23:1417–1450.

[34] Papadopoulos V., Baraldi M., Guilarte T. R., Knudsen T. B., Lacapère J. J., Lindemann P., Norenberg M. D., Nutt D., Weizman A., Zhang M. R., Gavish M., Translocator protein (18 kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function, *Trends Pharmacol. Sci.* 2006; 27: 402-409.

[35] Decaudina D. Peripheral benzodiazepine receptor and its clinical targeting. *Anti-Cancer Drugs* 2004, 15:737–745.

- [36] Pilkington G. J., Parker K., Murray S. A., Approaches to mitochondrially mediated therapy. *Semin. Cancer Ther.* 2008; 18: 226-235.
- [37] Galiegue S., Tinel N., Casellas P. The peripheral benzodiazepine receptors: a promising therapeutic drug target. *Curr. Med. Chem.* 2003;10: 1563-1572.
- [38] Depalo N., Iacobazzi R.M., Valente G., Arduino I., Villa S., Canepa F., Laquintana V., Fanizza E., Striccoli M., Cutrignelli A., Lopodota A., Porcelli L., Azzariti A., Franco M., Curri M.L., e Denora N. Delivery Nanoplatfoms Based on Sorafenib and Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for Magnetically Targeted Therapy of Hepatocellular Carcinoma. *Nano Research*. In press.
- [39] Tomalia D.A., Naylor M.,Goddard III W.A.,*Angew. Starburst Dendrimers: Molecular-Level Control of Size, Shape, Surface Chemistry, Topology, and Flexibility from Atoms to Macroscopic Matter*Chem. Int. Ed. Engl.1990; 29:138.
- [40] Buhleier E.W., Wehner W., Vögtle F., *Synthesis*, 1978, 155.
- [41] Newkome G.R., Yao Z., Baker G.R., Gupta V.K., *J. Org. Chem.*, 1985; 50: 2003.
- [42] Hawker C.J., Fréchet J.M.J. Preparation of polymers with controlled molecular architecture. A new convergent approach to dendritic macromolecules. *J. Am. Chem. Soc.*, 1990; 112: 7638.
- [43] Carlmark A., Hawker C., Hult A., Malkoch M. New methodologies in the construction of dendritic materials. *Chem. Soc. Rev.*, 2009; 38: 352.
- [44] Tomalia D.A. Birth of a new macromolecular architecture: dendrimers as quantized building blocks for nanoscale synthetic polymer chemistry. *Prog. Polym. Sci.* 2005; 30: 294.
- [45] Astruc D., Boisseliere E., Ornelas C. Dendrimers designed for functions: from physical, photophysical, and supramolecular properties to applications in sensing, catalysis, molecular electronics, photonics, and nanomedicine. *Chem.Rev.* 2010; 110: 1857.
- [46] Zeng F., Zimmerman S.C. Dendrimers in Supramolecular Chemistry: From Molecular Recognition to Self-Assembly. *Chem.Rev.*1997; 97: 1681.
- [47] Shao J., Tam J.P., *J.Am. Unprotected Peptides as Building Blocks for the Synthesis of Peptide Dendrimers with Oxime, Hydrazone, and Thiazolidine Linkages.* *Chem.Soc.*,1995; 117: 3893.
- [48] Lee C.C., Gillies E.R. ,Fox M.E., Guillaudeu S.J., Fréchet J.M.J., DyE.E., Szoka F.C. A single dose of doxorubicin-functionalized bow-tie dendrimer cures mice bearing C-26 colon carcinomas. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 2006; 103:16649.
- [49] Dykman, L., Khlebtsov, N. Gold nanoparticles in biomedical applications: recent advances and perspectives. *Chem. Soc. Rev.* 2012; 41: 2256-2282.

- [50] Kim, J., Piao, Y., Hyeon, T. Multifunctional nanostructured materials for multimodal imaging, and simultaneous imaging and therapy. *Chem. Soc. Rev.* 2009; 38: 372-390.
- [51] Pissuwan, D., Valenzuela S., Cortie M. B. Prospects for gold nanorod particles in diagnostic and therapeutic applications. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 2008; 25: 93-112.
- [52] Jokerst, J. V.; Gambhir, S. S. Molecular imaging with theranostic nanoparticles. *Acc. Chem. Res.* 2011; 44: 1050-1060.
- [53] Medintz, I.L., et al. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nat. Mater.* 2005; 4: 435-446
- [54] Michalet, X., et al. Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science* 2005; 307: 538-544.
- [55] Alivisatos, A.P.J. Perspectives on the Physical Chemistry of Semiconductor Nanocrystals. *J. Phys. Chem. C* 1996; 100: 13226-13239.
- [56] Rao, C.N.R.; Kulkarni, G.U.; Thomas, P. Size-Dependent Chemistry: Properties of Nanocrystals. *Chem. Eur. J.* 2002; 8: 29.
- [57] Alivisatos, A. P. Nanocrystals: Building blocks for modern materials design. *Endeavour* 1997; 21: 56-60.
- [58] Buscher, K.; Helm, C.A.; Gross, C.; et al. Nanoparticle composition of a ferrofluid and its effects on the magnetic properties. *Langmuir* 2004; 20: 2435-2444.
- [59] Vargas, M. J.; Socolovsky, L. M.; Knobel, M.; Zanchet, D. *Nanotechnology* 2005; 16: S285.
- [60] Burda, C, Chen, X., Narayanan, R., El-Sayed, M. A. Chemistry and properties of nanocrystals of different shapes. *Chem. Rev.* 2005; 105: 1025-1102.
- [61] Yin, Y., Alivisatos, A.P. Colloidal nanocrystal synthesis and the organic-inorganic interface. *Nature* 2005; 437: 664-670.
- [62] Haeng Sub, W., Kyuyong, L., Hyuk Kyu, P. Interfacial energy consideration in the organization of a quantum dot–lipid mixed system. *Journal of Physics: Condensed Matter* 2008; 20: 494211.
- [63] Lehninger: *Principi di Biochimica*. 2005.
- [64] Parka J.H., Lee S., Kim J.H., et al. Polymeric nanomedicine for cancer therapy. *Prog Polym Sci.* 2008; 33: 113–137.
- [65] Nasongkla N., Shuai X., Ai H., et al. cRGD-functionalized polymer micelles for targeted doxorubicin delivery. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2004; 43: 6323–6327.

- [66] Bhattachar J.J., Vvema G., Aswal V.K., et al. Tween 80-sodium deoxycholate mixed micelles: structural chacterization and application in doxorubicin delivery. *J Phys Chem B*. 2010;114:16414–16421.
- [67] Bhadra D., Bhadra S., Jain P. PEG: a review of PEGylated systems. *Pharmazie*. 2002; 57: 5-29
- [68] Pellegrino T., Manna L., Kudera S., Koktysh D., Rogach A.L., Natile G. and Parak W.J. Hydrophobic nanocrystals coated with an amphiphilic polymer shell: a general route to water soluble nanocrystals. *Nano Lett*. 2004; 4: 703-707.
- [69] Guerrero-Martínez A., Pérez-Juste J., Liz-Marzán LM. Recent progress on silica coating of nanoparticles and related nanomaterials. *Advanced Materials* 2010; 22: 1182.
- [70] Fanizza E., Depalo N., Clary L., Agostiano A., Striccoli M., Curri M.L. A combined size sorting strategy for monodisperse plasmonic nanostructures. *Nanoscale*. 2013; 5: 3272-82.
- [71] Rolf Koole, Matti M. van Schooneveld, Jan Hilhorst, Celso de Mello Donegá, Dannis C. 't Hart, Alfons van Blaaderen, Daniel Vanmaekelbergh, and Andries Meijerink. On the Incorporation Mechanism of Hydrophobic Quantum Dots in Silica Spheres by a Reverse Microemulsion Method. *Chem.Mater*, 2008; 20: 2503-2512.
- [72] Zhen Li, Hui Chen, Haobo Bao, and Mingyuan Gao *Chem. Mater* 2012; 24: 4572-4580;
- [73] Luis M. Liz-Marzán, Michael Giersig, and Paul Mulvaney. Synthesis of Nanosized Gold–Silica Core–Shell Particles *Langmuir* 1996; 12: 4329-4335
- [74] Vogt, C., Toprak, M.S., Muhammed, M. et al. High quality and tuneable silica shell–magnetic core nanoparticles. *J. Nanopart. Res.* 2010; 12: 1137.
- [75] Graf C., Gao Q., Schu□tz I., Noufele C.N., Ruan W., Posselt U., Korotianskiy E., Nordmeyer D., Rancan F., Hadam S., Vogt A., Lademann J., Haucke V., and Ru□hl E. Surface Functionalization of Silica Nanoparticles Supports Colloidal Stability in Physiological Media and Facilitates Internalization in Cells. *Langmuir*, 2012, 28 (20), pp 7598–7613

Capitolo 2

Direzionamento a cellule umane di carcinoma epatico attraverso un dendrimero G(4)-PAMAM-FITC funzionalizzato con acido lattobionico e carico di sorafenib.

2.1 Introduzione

Il carcinoma epatocellulare (HCC) è la sesta causa più comune di cancro e la principale causa di morte nei pazienti con cirrosi, la cui incidenza è in aumento e rappresenta un tumore resistente alle terapie disponibili[1].

Oggi il trattamento dell'HCC consiste in un intervento chirurgico (per HCC monolocale inferiore a 5 cm), trapianto di fegato (dove possibile), chemoembolizzazione, iniezione percutanea (PEI) e ablazione percutanea di etanolo, che portano alla distruzione del tumore, rispettivamente, mediante l'iniezione di alcol etilico o attraverso il calore (di limitata applicazione a causa della difficoltà di raggiungere le sedi anatomiche bersaglio in difficili posizioni) e, infine, mediante l'uso della chemioterapia antitumorale e approcci terapeutici combinati (quando il tumore è in uno stadio avanzato e una chirurgia radicale, nella maggior parte dei casi, non è più possibile). Un importante inconveniente della terapia standard deriva dal fatto che il fegato è l'organo maggiormente responsabile dei processi di assorbimento, disintossicazione, trasformazione metabolica ed escrezione di xenobiotici nella bile, pertanto, anche se la maggior parte dei farmaci raggiunge concentrazioni epatiche elevate, essi sono rapidamente eliminati dal sangue e sottoposti ad un elevato metabolismo di primo passaggio del fegato.

Gli epatociti sono le cellule responsabili della maggior parte dell'assorbimento epatico e le cellule Kupferr dell'assorbimento epatico di materiale in particelle, per questo motivo i farmaci che riescono ad entrare nel fegato, non sono sempre in grado di raggiungere l'effettiva cellula bersaglio. Inoltre, il tempo di permanenza dei farmaci nel fegato dipende dall'interazione con i macrofagi e da considerazioni di natura farmacocinetica.

Come già detto, un'importante obiettivo da raggiungere sarebbe non solo l'accumulo preferenziale di un farmaco in una specifica tipologia cellulare, ma anche un aumento del suo tempo di permanenza all'interno delle stesse cellule[2]. Considerando che gli epatociti rappresentano l'unità funzionale designata per le principali funzioni secretorie e metaboliche del fegato, possono essere considerati un target interessante.

In particolare, il recettore per le asialoglicoproteine (recettore del galattosio o ASGP-R), un recettore di superficie associato al fegato, è noto essere presente solo sugli epatociti[3] con densità elevata (500,000 recettori per cellula)[4], mantenuto e over-espresso in forme ben differenziate di carcinoma epatocellulare[5,6].

L'ASGP-R è fisiologicamente coinvolto nell'eliminazione di glicoproteine con residui di galattosio o acetilgalattosamina mediante un meccanismo di endocitosi mediata da recettore[2]. Inoltre, nel momento in cui il ligando si lega all'ASGP-R, il complesso ligando-recettore viene rapidamente internalizzato, quindi il recettore ritorna sulla superficie[7], il che permetterebbe una capacità di legame elevata ed un efficiente assorbimento cellulare dei ligandi galattosilati. Quindi, la progettazione di sistemi di somministrazione dei farmaci per endocitosi mediata dal recettore del galattosio sarebbe utile per il raggiungimento del target degli epatociti e, in particolare, del target delle cellule di epatocarcinoma da parte di agenti chemioterapici.

In realtà il recettore ASGP-R è già stato utilizzato come target per il veicolo di vari farmaci, tra cui farmaci antitumorali[8] o sistemi di imaging[9], attraverso l'uso di nanovettori opportunamente funzionalizzati con residui di galattosio, lattosio o acido lattobionico[10]. La dimensione massima dei sistemi colloidali per sfruttare l'internalizzazione mediata dal legame al recettore ASGP-R è stimata essere 90 nm, quindi è necessario scegliere il sistema più adeguato, considerando anche che le vescicole endocitiche sono dirette ai lisosomi dove saranno sottoposte ad un aumento delle condizioni acide e ossidative[2]. Inoltre, i nanovettori devono essere realizzati con meccanismi tali da sfuggire alla rete endo-lisomiale al fine di veicolare un'ampia varietà di carico come peptidi, farmaci e nanoparticelle dall'endosoma al citoplasma.

Il primo farmaco approvato per il trattamento dei pazienti con carcinoma epatocellulare avanzato e che ha mostrato un aumento della sopravvivenza, è il sorafenib, un inibitore multi-target delle tirosin chinasi.

Tuttavia, nella pratica clinica, la sopravvivenza nei pazienti trattati con il sorafenib è inferiore ad un anno, e, in alcuni casi, non vi è alcuna risposta al trattamento a causa dell'insorgenza di meccanismi di resistenza non ancora ben identificati[11,12].

Un'ulteriore limite all'uso del sorafenib è rappresentato dagli effetti collaterali che possono ridurre la qualità della vita dei pazienti, quali la reazione cutanea mani-piedi (hand-foot skin reaction) e la diarrea[13-15]. Inoltre il sorafenib ha un uso limitato nel trattamento locale, a causa della sua scarsa solubilità in ambiente acquoso.

Negli ultimi anni sono stati studiati a fondo diversi sistemi polimerici di trasporto, per cercare di superare tali problemi come riportato per altri farmaci antitumorali, riuscendo a migliorare la biodisponibilità ed il profilo di efficacia e sicurezza dei farmaci[16-19]. Attraverso questi sistemi innovativi, i farmaci possono

accumularsi efficacemente nel sito del tumore, mediante un trasporto passivo favorito dall'effetto EPR (enhanced permeability and retention effect)[20,21], o da un trasporto attivo attraverso ligandi o anticorpi[22,23].

Un nuovo tipo di polimeri, i dendrimeri a struttura poliammidoamminica (PAMAM), sono stati recentemente molto studiati per il trasporto di farmaci [24-26] in quanto possono essere realizzati in differenti forme, dimensioni e superfici, in modo da poter ottenere materiali funzionalizzati, nell'ordine dei nanometri. Le strutture di tali dendrimeri consentono di presentare il ligando che trasportano in modo da promuoverne un legame specifico ai recettori cellulari[24,27]. Rispetto a molti altri nano-vettori, le piccole dimensioni dei dendrimeri (es. il diametro della quarta generazione dei PAMAM è di 4,5 nm) consente loro di essere facilmente eliminati dal sangue attraverso i reni e di eludere la fagocitosi mediata dal sistema reticoloendoteliale (RES)[28]. I farmaci possono essere inclusi nei sistemi di trasporto dei dendrimeri PAMAM attraverso due approcci: coniugazione covalente e complessazione non covalente. In particolare, le ampie cavità interne dei dendrimeri PAMAM permettono loro di formare complessi con farmaci idrofobi, consentendo un aumento di solubilità in ambiente acquoso.

Lo scopo del progetto di ricerca descritto in questo capitolo, è stato la realizzazione di dendrimeri PAMAM in grado di incapsulare l'agente antitumorale sorafenib, aventi una superficie modificata per via di un legame chimico con l'acido lattobionico[29,30], la cui frazione galattosilica lega in maniera specifica il recettore delle asialoglicoproteine degli epatociti.

In questo lavoro sono descritti la sintesi, la caratterizzazione, l'internalizzazione cellulare e l'efficacia antitumorale *in vitro* di un dendrimero di quarta generazione [G(4)-PAMAM], avente come target il recettore ASGP-R, marcato con la fluoresceina isotiocianato quale fluoroforo organico, acetilato con anidride acetica e successivamente caricato con il sorafenib. In particolare la prima fase consta

della coniugazione del FITC con il dendrimero G(4)-PAMAM. Successivamente il G(4)-PAMAM-FITC è stato ibridato con l'acido lattobionico contenente un gruppo carbossilico, al fine di realizzare un nuovo tipo di dendrimero direzionato ASGP-R-G(4)-PAMAM-FITC, ed i gruppi amminici restanti sono stati coniugati con anidride acetica, per ridurre le interazioni aspecifiche del dendrimero con le membrane cellulari, favorendone così l'assorbimento selettivo da parte delle cellule esprimenti l'ASGP-R. Pertanto è stato analizzato *in vitro* il legame e l'internalizzazione di questo dendrimero Ac-La-G(4)-PAMAM-FITC (Ac= acetilato; La= acido lattobionico) in una linea cellulare che over-esprime il recettore ASGP-R, in particolare sulla linea cellulare umana HepG-2 di cancro ben differenziato del fegato. La specificità di *targeting* del dendrimero Ac-La-G(4)-PAMAM-FITC sulle cellule esprimenti ASGP-R, è stata ulteriormente confermata confrontando i risultati ottenuti su una linea cellulare umana HLE di cancro al fegato scarsamente differenziato, caratterizzata da un basso livello di espressione dell'ASGP-R[31]. Per confermare la selettività del sistema, è stato anche sintetizzato per confronto un dendrimero non direzionato e non acetilato. Considerando che la tossicità dei dendrimeri cationici è stata ampiamente documentata[32], anche se l'acetilazione ha ridotto notevolmente la carica positiva di questi sistemi, la citotossicità dei dendrimeri è stata determinata in primo luogo nelle cellule HepG-2 ed HLE utilizzando il saggio MTT, al fine di garantire l'uso di concentrazioni non tossiche di tali dendrimeri in tutti gli studi successivi di uptake. Infine il dendrimero Ac-La-G(4)-PAMAM-FITC è stato caricato con il sorafenib ed è stata valutata anche la cinetica di rilascio del farmaco dal complesso Ac-La-G(4)-PAMAM-FITC/sorafenib. Per valutare la capacità di direzionamento e l'efficacia di questo nuovo sistema come veicolo del sorafenib, sono stati effettuati l'analisi citofluorimetrica, l'osservazione al microscopio confocale a scansione laser, il saggio MTT, il test di recovery e quello dell'annessina, usando come composti di riferimento il dendrimero G(4)-PAMAM-FITC ed il sorafenib libero.

2.2 Materiali e metodi

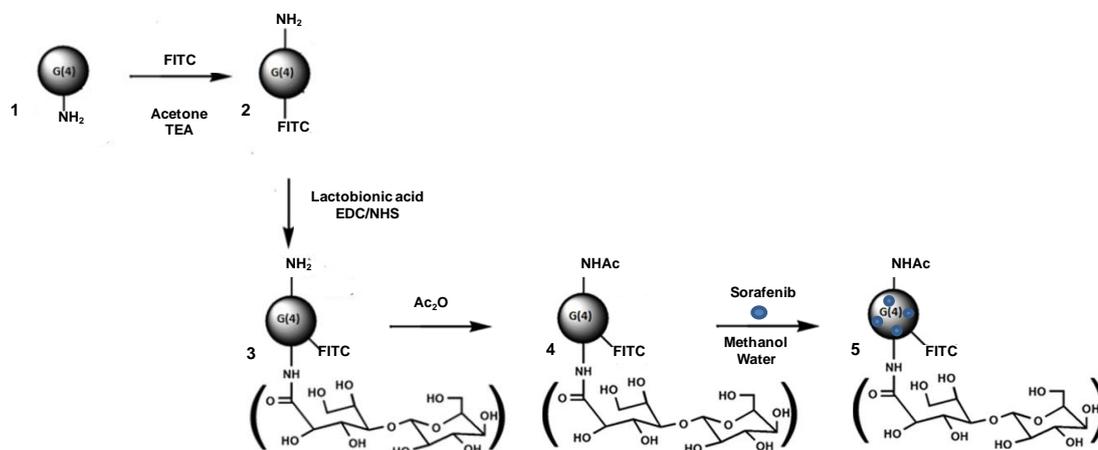
2.2.1 Materiali

I reagenti chimici commerciali, Lactobionic acid (La), fluorescein isothiocyanate isomer 1 (FITC), 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC), N-Hydroxysuccinimide (NHS), triethylamine (TEA), Acetone, Acetic anhydride, Methanol, Ethanol 96% (v/v) (EtOH), anhydrous N,N-dimethylformamide (DMF), dimethylsulfoxide (DMSO), e i solventi sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (Milano, Italia) salvo diversamente specificato, e utilizzati senza ulteriore purificazione. I dendrimeri G(4)-PAMAM sono stati preparati secondo le procedure di sintesi riportate altrove[24]. Il sorafenib tosilato è stato acquistato dalla ditta Selleck Chemicals LLC. Le fiasche di coltura monouso e le piastre Petri da Corning, Glassworks (Corning, N.Y., USA). Il 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) è stato comprato da Sigma-Aldrich (Milano, Italia). Il FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit II è stato acquistato dalla BD Pharmigen, USA.

2.2.2 Sintesi dei dendrimeri G(4)-PAMAM-FITC e Ac-La-G(4)-PAMAM-FITC

Il composto di partenza è rappresentato dal dendrimero PAMAM di quarta generazione (32 gruppi aminici terminali), sintetizzato nei nostri laboratori[24], modificando la procedura realizzata inizialmente da Tomalia et al.[33]. Il dendrimero G(4)-PAMAM-FITC è stato sintetizzato aggiungendo ad una soluzione di acqua deionizzata (5 mL) del dendrimero 1 (40 mg, 5.8 μ mol), una soluzione di FITC (9 mg, 16 μ mol) in acetone (2mL) addizionata con TEA (8 μ L, 58 μ mol). La soluzione è stata posta in agitazione per 24 h a temperatura ambiente al buio e purificata in tubi per dialisi (Spectra/Por[®] 3500 MwCO, RC), attraverso 3-5 procedure consequenziali di dialisi contro acqua distillata per rimuovere gli eccessi di FITC. Per determinare la quantità di FITC libera e legata sono stati eseguiti analisi SEC e test di spettroscopia UV-vis e NMR. L'acido lattobionico

(La) è stato legato ai gruppi amminici della superficie del dendrimero 2 secondo il seguente schema di sintesi: La (30.4 μmol) è stato solubilizzato in 2 mL di acqua deionizzata e attivata mediante la reazione con EDC (39.52 μmol) e NHS (39.52 μmol) per 15 min. L'acido Lattobionico attivato è stato aggiunto in 2 mL di una soluzione acquosa di G(4)-PAMAM-FITC (3.04 μmol) e la reazione è stata posta in agitazione per 24 h a temperatura ambiente. La soluzione ottenuta è stata purificata come descritto sopra. Il dendrimero **3** La-G(4)-PAMAM-FITC è stato completamente caratterizzato come descritto per il dendrimero **2**. Infine le restanti ammine terminali del dendrimero **3** sono state acetilate secondo il protocollo descritto da Fanfan Fu et al.[34]. In breve, ad una soluzione di dendrimero 3 (0.6 μmol) in acqua (5mL) sono stati aggiunti in sequenza, sotto agitazione magnetica, trietilammina (24 μmol) e dopo 30 min anidride acetica (2.5 μmol). La miscela è stata lasciata in agitazione per 24 h e quindi purificata, come descritto sopra, per ottenere il dendrimero **4** Ac-La-G(4)-PAMAM-FITC. Questo dendrimero è stato completamente caratterizzato come gli altri. Le vie di sintesi di questi dendrimeri sono riportati nello Schema 1.



Schema 1. Schema di sintesi di G(4)-PAMAM-FITC **2**, Ac-La-G(4)-PAMAM-FITC **4** e Ac-La-G(4)-PAMAM-FITC/Sorafenib **5**

2.2.3 Caricamento del dendrimero Ac-La-G(4)-PAMAM-FITC con Sorafenib

Il caricamento del Sorafenib all'interno del dendrimero Ac-La-G(4)-PAMAM-FITC è stato realizzato seguendo la procedura descritta da Wang et al.[35]. Ad un soluzione acquosa di dendrimero (3 mL, 10 mg) sono stati aggiunti sequenzialmente 3mL di soluzione di sorafenib in metanolo (10 mol equivalente rispetto al dendrimero). La soluzione è stata sottoposta ad agitazione magnetica per 24 h a 30 °C e successivamente, per favorire la rimozione del solvente organico, è stato utilizzato un evaporatore rotante. La miscela è stata poi centrifugata (10,000 rpm per 5 min) per rimuovere il sorafenib non inserito, e il surnatante è stato congelato e liofilizzato per ottenere il dendrimero 5 Ac-La-G(4)-PAMAM-FITC/sorafenib.

2.2.4 Drug loading ed efficienza di incapsulamento

La quantità di sorafenib caricata nel dendrimero **5**, è stato determinata come drug loading o come efficienza di incapsulamento mediante cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC) secondo quanto riportato da Yao et al.[36]. Lo strumento utilizzato è stato un Agilent 1260 Infinity Quaternary LC System dotato di un UV-VIS 1260 Infinity Multiple Wavelength Detector e un Rheodyne Manual Sample Injector Valves 7725i. Come colonna è stata utilizzata una Zorbax Eclipse Plus C18 (4.6 x 250 mm, 5 mm). La fase mobile costituita da una miscela di acqua Milli-Q e metanolo con un rapporto di 20:80 V/V e pompato con una portata di 1 mL/min a 25 °C. Il rilevatore UV è stato fissato a una lunghezza d'onda di rilevamento di 264 nm. Il sistema è stato calibrato con soluzioni standard di sorafenib in DMSO, in un range di concentrazioni 1-50 mg/mL. L'efficienza di incapsulamento del sorafenib (encapsulation efficiency (EE)) ed il drug loading (DL) sono stati calcolati mediante le seguenti formule:

$$EE = (W_t - W) / W_t \times 100\%, (1)$$

dove W è la massa del sorafenib nel precipitato raccolto ottenuto dopo centrifugazione della miscela di sorafenib e dendrimero Ac-La-G(4)PAMAM-FITC, e W_t è la quantità totale di sorafenib aggiunto,

$$DL = W_d/W_0 \times 100\%, (2)$$

dove W_d è il peso di sorafenib incapsulato e W_0 è il peso totale del sistema essiccato (sorafenib + dendrimero).

2.2.5 Tecniche di caratterizzazione

Gli spettri ^1H NMR dei dendrimeri in soluzione di acqua deuterata (D_2O) sono stati registrati usando uno spettrometro di risonanza magnetica nucleare Agilent 500. Nel caso dei dendrimeri **2** e **3**, il grado di coniugazione, che fa riferimento alla molecola fluorescente FITC, è stato determinato anche da misurazioni a lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione fissate a 485 e 535nm con un PerkinElmer 2030 reader MULTILABEL Victor TM X3. Gli spettri di emissione e di eccitazione dei dendrimeri **2** e **3**, sono stati registrati, come descritto nel nostro precedente lavoro[24], utilizzando uno spettrofluorimetro Fluorolog 3 (HORIBA Jobin-Yvon), dotato di monocromatori di eccitazione e di emissione a doppio reticolo. La spettroscopia a correlazione fotonica (PCS, Nanosizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK) è stata utilizzata per determinare il diametro idrodinamico e la distribuzione dimensionale dei dendrimeri ad ogni fase della fabbricazione, con la tecnica del dynamic light scattering (DLS) dopo dispersione in acqua demineralizzata. Le misurazioni dei potenziali zeta sono state acquisite con lo stesso strumento, mediante velocimetria laser doppler (LDV) dopo diluizione delle soluzioni dei dendrimeri in soluzione acquosa di KCl (1mM). I pesi molecolari medi dei dendrimeri **2-4** sono stati determinati mediante analisi SEC, eseguita con una pompa isocratica Waters Associates (Milford, MA) Model 1515 HPLC, una colonna Ultrahydrogel 500 (Waters, 7,8 x 300 mm, 5 μm), un UV-Vis detector Waters 2487 o RID detector

Waters2414 (Breeze Software per analizzare i dati cromatografici). Il sistema è stato calibrato con standard di destrani.

2.2.6 Studi di rilascio in vitro

Il rilascio *in vitro* del sorafenib dal dendrimero **5**, Ac-La-G(4)-PAMAM-FITC/sorafenib, è stato monitorato con un metodo di dialisi leggermente modificato e sviluppato da Yao et al.[36]. In breve, 1 mL della dispersione di Ac-La-G(4)-PAMAM-FITC/sorafenib in tampone fosfato (PBS, pH 7.4; concentrazione sorafenib: 20 µg/mL) è stato aggiunto in un sacchetto di dialisi (Spectra/Por® 3500 MWCO, RC) che è stato posto in 10 mL di PBS (pH 7,4) contenente 1% (w/v) di Tween 80 come mezzo ricevente. Il sistema è stato mantenuto in un oscillatore termostato a 37 °C per 96 h. In determinati punti temporali, è stato raccolto 1 mL di mezzo ricevente e sostituito con un volume uguale di mezzo ricevente fresco. Quindi la concentrazione di sorafenib in ciascun campione prelevato è stata analizzata mediante lo spettrofotometro UV-vis Perkin Elmer Lambda Bio20 alla lunghezza d'onda di rilevamento di 264 nm. Lo stesso esperimento è stato eseguito con il sorafenib libero, utilizzato come composto di riferimento.

2.2.7 Colture cellulari

Le cellule umane tumorali di fegato, HepG-2 e HLE, provenienti da Cell Line Collection (ICLC, Genova, Italy), sono state fatte crescere, rispettivamente in RPMI ad alte concentrazioni di glucosio e DMEM, integrati con il 10% di siero fetale bovino inattivato al calore (FBS), 100 U/mL di penicillina, 100 µg/mL di streptomina e 2 mM L-glutamina in atmosfera umidificata di CO₂ al 5% a 37 °C. Tutti i materiali per la coltura delle cellule sono stati acquistati da EuroClone, Italia.

2.2.8 Saggi di citotossicità

Le cellule umane di cancro del fegato, HepG-2 e HLE, sono state seminate in piastre da 96 pozzetti ad una densità di 5,000 cellule/pozzetto. Dopo 24 h, il mezzo di coltura è stato sostituito con terreno fresco (100 μ L) costituito da cinque diverse concentrazioni dei dendrimeri **2** e **4**, tra 0,0001-0,5 mg/mL, per valutare sia la concentrazione appropriata per gli esperimenti di uptake cellulare, sia il possibile contributo all'effetto antiproliferativo del complesso dendrimero/sorafenib **5**. La vitalità cellulare è stata valutata mediante il test MTT. Dopo 72 h, il composto MTT 0,5% w/v (10 μ L) è stato aggiunto a ciascun pozzetto e le piastre sono state incubate per ulteriori 3 h a 37 °C. Infine, le cellule sono state lisate con 100 μ L di DMSO. È stato utilizzato un PerkinElmer 2030 MULTILABEL reader Victor TM X3 per registrare l'assorbanza a 570 nm. I risultati sono stati espressi come IC₅₀ (la concentrazione inibente il 50% della popolazione cellulare) o come percentuale di vitalità cellulare alla dose più alta testata, e sono stati calcolati dalle curve dose-risposta mediante il curve fitting del programma GraphPad Prism 5.0 utilizzando una curva non lineare multiuso.

2.2.9 Studi di internalizzazione in vitro

Al fine di valutare quantitativamente l'uptake preferenziale del dendrimero direzionato **4** dalle cellule overesprimenti il recettore ASGP-R, come ad esempio le HepG-2, è stata condotta un'analisi citofluorimetrica per tracciare la fluorescenza interna delle cellule, usando un citofluorimetro FACScan equipaggiato con laser ad argon 488 nm (Becton Dickinson). I dati sono stati interpretati usando il CellQuest software fornito dal produttore, e comparati con quelli ottenuti conducendo la stessa analisi sulle cellule HLE, caratterizzate invece da bassi o nulli livelli di espressione di ASGP-R[31]. In particolare, seguendo un protocollo precedentemente descritto da Denora et al.[24], le cellule umane di tumore epatico HepG-2 ed HLE, sono state seminate in piastre da 60 mm ad una

densità di 500,000/piastra. Per gli esperimenti di uptake le cellule sono state incubate a 37 °C per tutto il tempo dell'esperimento, mentre, per determinare il binding sulla membrana cellulare esterna, le cellule sono state mantenute a 4 °C per 25 minuti prima di cominciare il trattamento con i composti. In entrambi i casi, le cellule sono state trattate con 3 mL di mezzo di coltura completo (a 37 °C o 4 °C) contenente 0,01 mg/mL dei dendrimeri PAMAM-G(4)-FITC **2** o Ac-La-G(4)-PAMAM-FITC **4**. Le cellule sono state successivamente incubate per tempi differenti compresi nell'intervallo 15-180 min, ed in seguito mantenute a 4 °C per il resto dell'esperimento. Quindi, le cellule sono state lavate due volte con PBS freddo (3 mL), staccate dalla piastra con trypsin-EDTA (500µL), lavate nuovamente con PBS freddo a 1400 rpm per 5 min ed infine il pellet di cellule risultante è stato risospeso in PBS (300µL). Infine, la fluorescenza associata alle cellule è stata misurata mediante citofluorimetria. Sono stati analizzati un totale di 10,000 eventi positivi alla fluorescenza. I dati sono stati analizzati usando la media geometrica della popolazione di cellule vitali esposte ai composti per valutare l'uptake ed il binding extracellulare. Pertanto, è stata quantificata la fluorescenza cellulare associata alla presenza dei composti all'interno della cellula o sulla membrana, sottraendo l'autofluorescenza cellulare ai valori misurati dallo strumento. Infine, la quantità di dendrimero internalizzata è stata calcolata sottraendo i valori di fluorescenza misurati a 4 °C da quelli misurati a 37 °C. I dati sono presentati come media \pm SD, n=3.

Gli studi di competizione *in vitro* sono stati condotti per quantificare l'interazione dei dendrimeri **2** e **4** con il recettore ASGP-R in presenza ed assenza del ligando agonista acido lattobionico (20 µM). Le cellule HepG-2 sono state seminate in piastre da 60 mm a densità di 500,000/piastra. Dopo 24 h, le cellule sono state pre-incubate con acido lattobionico per 45 min prima dell'aggiunta dei dendrimeri **2** e **4** (0,01mg/mL) per 15, 30 min e 1, 3 h a 37 °C. Trascorso il periodo di incubazione, le cellule sono state poste in ghiaccio e mantenute a 4 °C per il resto

dell'esperimento, che è stato condotto come descritto sopra per gli esperimenti di uptake/binding. Infine, la fluorescenza associata alle cellule è stata misurata mediante citofluorimetria come descritto sopra. Inoltre, gli esperimenti di internalizzazione, sono stati condotti anche con il dendrimero Ac-La-G(4)-PAMAM-FITC/sorafenib **5** ed il sorafenib libero, sulle cellule HepG-2 ed HLE. Le cellule sono state seminate in piastre da 60 mm ad una densità di 500,000/piastra e quindi incubate a 37 °C con il 5% di CO₂ per 30 min e 3 h con il dendrimero **5** (10 µM, in termini di sorafenib) e sorafenib libero (10 µM) usato come composto di riferimento. Dopo due lavaggi con PBS freddo, le cellule sono state lisate con DMSO e quindi analizzate mediante uno spettrofotometro UV-vis Perkin Elmer Lambda Bio20 ad una lunghezza d'onda di 264 nm per quantificare la concentrazione di sorafenib interna alle cellule.

2.2.10 Microscopia confocale

La microscopia confocale a scansione laser è stata eseguita su un microscopio confocale invertito Leica TCS SP5-II (Leica Microsystems, Germania) con una $\times 63$, 1,40 di apertura numerica della lente ad immersione in olio per l'imaging. Fasci laser con 359 nm, 488 nm e 542 nm come lunghezze d'onda di eccitazione sono stati utilizzati per l'imaging di DAPI, FITC, e falloidina-TRITC, rispettivamente[37]. Sono state acquisite immagini confocali delle cellule HepG-2, che sono di spessore circa 10 µm, 15 z-pile di fette spesse tipicamente 0.5 µm. Le singole sezioni confocali, le immagini z-stack ed i rendering delle immagini dei file dati del confocale, sono stati elaborati utilizzando il software LAS AF Lite (Leica Microsystems, Germania). Le immagini sono state acquisite su cellule fissate. Le cellule HepG-2 (3×10^4 cellule/pozzetto) sono state coltivate su camere Lab-Tek Camera Slides (8 pozzetti) per 24 h e quindi esposte al dendrimero Ac-La-G(4)-PAMAM-FITC **4** a concentrazione di 0,1 mg/mL. Dopo 15 min di incubazione, le cellule sono state lavate due volte con HBSS 1X (Balanced Salt Solution Hanks', gibco® life technologies) e poi fissate per 15 min con

paraformaldeide al 4% w/v in tampone PBS. Dopo due lavaggi con PBS, le cellule sono state permeabilizzate con 0.1% di Triton X-100 per 10 minuti, e in seguito lavate due volte con PBS. Dopo una fase di blocco con BSA (albumina sierica bovina, 5% (w/v) in PBS), le cellule sono state incubate per 1 h a 37 °C con falloidina-TRITC (1 µM, Sigma-Aldrich), utilizzata come marcatore dell' F-actina. Dopo la colorazione, le cellule sono state lavate due volte con acqua MilliQ. Infine, sul vetrino sono state poste due gocce del mezzo di montaggio per fluorescenza con DAPI, Vectashield (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA 94010) ed un vetrino copri-oggetto, e quindi le cellule sono state visualizzate con il microscopio confocale.

2.2.11 Valutazione dell'efficacia antitumorale: esperimenti di recovery e saggio dell'annessina V

Per valutare la capacità del complesso Ac-La-G(4)-PAMAM-FITC/sorafenib **5** di inibire la proliferazione delle cellule HepG-2 e confrontarla con quella del farmaco libero sorafenib, sono stati determinati preliminarmente i valori di IC₅₀, come descritto nel paragrafo 2.2.8, dopo 72 h di incubazione con il dendrimero **5** e sorafenib nel range di concentrazione 0,1-50 µM in termini di sorafenib, ed in seguito sono stati condotti esperimenti di recovery ed il saggio dell' annessina V.

Per gli esperimenti di recovery, le cellule sono state seminate ad una densità di 5,000 cellule/pozzetto in una piastra con 96 pozzetti e dopo 24 h incubate a 37 °C e con il 5% di CO₂ per 1 e 24 h con Ac-La-G(4)-PAMAM-FITC/sorafenib (10 µM in termini di sorafenib), e sorafenib libero (10 µM). Dopo il rispettivo tempo di incubazione, le cellule sono state lavate, e mantenute in coltura con mezzo fresco per altre 72 h a 37 °C. Infine la vitalità cellulare è stata valutata con il test MTT sopra descritto.

Il test per valutare l'apoptosi mediante colorazione con ioduro di propidio e annessina V[11], è stato eseguito per rilevare la capacità del complesso **5** di

indurre apoptosi e confrontarla con quella indotta dal farmaco libero. Le cellule sono state trattate secondo le istruzioni fornite dal produttore. Brevemente, dopo incubazione per 24 h a 37 °C e con 5% di CO₂ con il dendrimero **5** (10 μM in termini di sorafenib) e sorafenib (10 μM), le cellule sono state lavate con PBS, sospese in tampone legante e quindi colorate con annexin-V FITC e ioduro di propidio (PI) per 20 min. I campioni sono stati poi letti da un citofluorimetro FACScan (Becton Dickinson). I dati presentati sono stati calcolati come frazioni di cellule positive all'annexina V in 15,000 eventi totali per le cellule trattate con il dendrimero **5** e confrontati con quelli ottenuti dalle cellule trattate con sorafenib, ed espressi come variazione rispetto alle cellule non trattate.

2.2.12 Analisi statistica dei dati

La significatività statistica è stata calcolata usando l'analisi di varianza two-way (ANOVA) seguita dal Bonferroni post hoc tests (GraphPad Prism vers. 5). I dati sono stati con ** p<0.01, e *** p<0.001.

2.3 Risultati e discussioni

2.3.1 Sintesi e caratterizzazione dei dendrimeri 2,3 e 4

Al fine di sintetizzare un nuovo dendrimero direzionato al recettore ASGP-R utile per il targeting cellulare di agenti chemioterapici per il trattamento del carcinoma epatocellulare, come ad esempio il sorafenib, il primo step di questo lavoro è stato rappresentato dalla coniugazione del dendrimero di quarta generazione [G(4)-PAMAM] con il marker fluorescente fluorescein isothiocyanate isomer 1 (FITC) e successivamente con la molecola direzionante rappresentata dal ligando selettivo per l'ASGPR, l'acido lattobionico (La). Come composto di partenza, in questo studio è stato utilizzato il dendrimero G(4)-PAMAM **1**, caratterizzato da 32 gruppi amminici terminali, sintetizzato nei nostri laboratori e completamente caratterizzato come descritto nel successivo capitolo 4. In particolare, il

dendrimero **1** è stato caratterizzato in termini di peso molecolare, indice di polidispersione, e numero di gruppi ammino terminali (Tabella 1) ed i risultati ottenuti sono stati in accordo con quelli teorici. Il dendrimero G(4)-PAMAM-FITC **2**, l'agente privo della molecola direzionante, è stato sintetizzato facendo reagire il dendrimero **1** G(4)-PAMAM con il colorante organico FITC in una miscela acetone/acqua per una notte, per dare una media di 12 unità di fluoresceina per dendrimerio **2** (Schema 1, Tabella 1). L'eccesso di FITC non coniugata è stato rimosso mediante tubi da dialisi (MWCO membrane = 3,5 kDa) contro acqua deionizzata. Il dendrimerio **3**, ASGP-R direzionato, La-G(4)-PAMAM-FITC, è stato sintetizzato mediante formazione di un legame ammidico, tra il gruppo carbossilico libero dell'acido lattobionico ed i gruppi amminici liberi superficiali del dendrimerio. In particolare, La (Schema 1) è stato attivato con EDC e NHS in acqua ed aggiunto ad una soluzione in acqua di G(4)-PAMAM-FITC **2**. Come riportato nella Tabella 1, una media di 12 unità di La si sono legate facendo reagire il dendrimerio **2** con l'acido carbossilico attivato in rapporto molare 1:10. L'eccesso di La libero e degli agenti di accoppiamento, è stato rimosso mediante dialisi contro acqua deionizzata (MWCO membrane = 3,5 kDa). La purezza del coniugato **3** è stata confermata mediante spettrometria NMR e analisi SEC. Infine, abbiamo coniugato i restanti gruppi amminici del dendrimerio **3** con anidride acetica, in modo da ridurre le interazioni aspecifiche con le membrane cellulari e promuovere il direzionamento selettivo solo verso le cellule che esprimono il recettore ASGP-R. Gli spettri ¹H NMR del dendrimerio acetilato Ac-La-G (4)-PAMAM-FITC **4** ottenuto (Fig.1), ha mostrato segnali attribuibili ai protoni metilenici del PAMAM (2-3,6 ppm), i segnali tipici dei composti FITC (6-8 ppm) ed La (3,8-4,3 ppm), ed il picco a 1.87 ppm relativo ai protoni -CH₃ dei gruppi acetile: questo ha confermato il successo di tutte le reazioni di coniugazione. Inoltre, come evidenziato nella Tabella 1, il numero delle molecole di FITC sui dendrimeri **2** e **3** è paragonabile, quindi il confronto in termini di assorbimento cellulare tra dendrimerio **2** e il dendrimerio acetilato **4** derivante

direttamente dal dendrimero **3**, è dipendente solo dalla presenza o assenza del ligando La e dall numero dei gruppi amminici non coniugati e potenzialmente protonabili in ambiente fisiologico. L'analisi SEC è stata eseguita su dendrimeri sintetizzati **1**, **2**, e **3** e i pesi molecolari medi ponderali (Mw) registrati sono stati pari a 7025, 12130, 15483 Da, rispettivamente, con una dispersione stretta, come indicato dai valori di indice di polidispersione (PDI, Mw/Mn) riportati in tabella 1, nel range 1,02-1,08.

Tabella 1. Caratterizzazione dei dendrimeri mediante analisi SEC.

Dendrimers	Number of terminal groups ^a			Nominal	Estimated ^b			
	NH ₂	La	FITC	Mw ^c (g/mol)	Mw ^c (g/mol)	Mn ^d (g/mol)	Mp ^e (g/mol)	PDI (Mw/Mn)
1	32 ^f	-	-	6900 ^f	7025 ± 100	6855 ± 50	6780 ± 50	1.02
2	20	-	12	-	12130 ± 290	11785 ± 250	11880 ± 300	1.03
3	9	12	11	-	15483 ± 150	15765 ± 100	15680 ± 150	1.08

^aStimati usando la seguente equazione: $[Mn_{(d)} - Mw_{(1)}]/FW_{(c)}$; dove $Mn_{(d)}$ l' Mw dei dendrimeri **2** o **3**, $Mw_{(1)}$ l' Mw del dendrimero **1**, e $FW_{(c)}$ il peso formula dei ligandi coniugati La o FITC, rispettivamente. ^bStimati mediante SEC usando destrani come standards. ^cPeso molecolare medio riferito al peso (Mw). ^dPeso molecolare medio riferito al numero (Mn). ^eMassa molare al picco massimo (Mp). ^fIn accordo a [33].

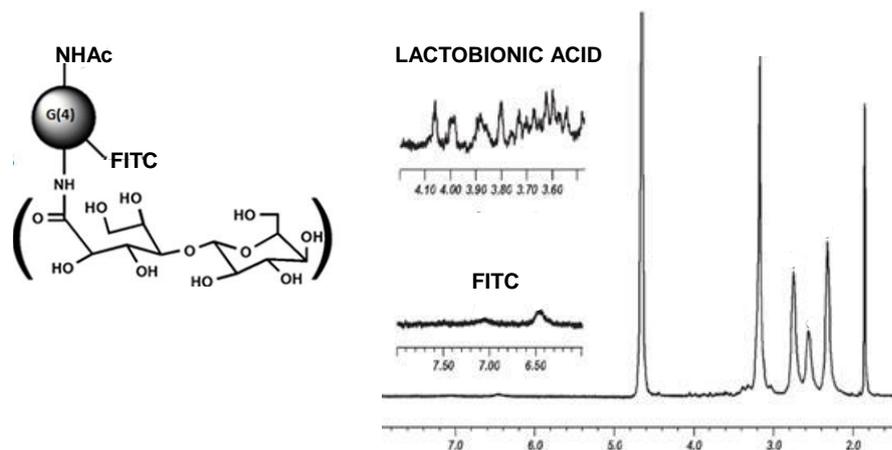


Fig.1. Spettro ¹H-NMR spectra del dendrimero Ac-La-G(4)-PAMAM-FITC **4**. Gli inserti mostrano le strutture di **4** ed i picchi caratteristici dell'acido lattobionico e di FITC.

La percentuale di gruppi amminici terminali sostituiti dalle unità di FITC sul dendrimero **2** e **3** (il grado coniugazione), è stata anche valutata con misurazioni UV a lunghezza d'onda di eccitazione ed emissione pari a 485 e 535nm, confrontando i loro valori $E^{1\%}$ con quelli del composto di riferimento FITC. Il grado di coniugazione così determinato, riferito alla sonda fluorescente, è stato di 0.037 e 0.034 per i dendrimeri **2** e **3** rispettivamente. Pertanto, i risultati ottenuti con le due procedure analitiche (SEC e UV), sono stati in buon accordo e comparabili. La massima lunghezza d'onda di eccitazione e di emissione registrate per i dendrimeri **2** e **3** sono state di 462/523 nm e 467/518 nm, rispettivamente, mostrando nessun sostanziale cambiamento rispetto alla molecola FITC non coniugata.

Inoltre, la caratterizzazione morfologica dei dendrimeri **1-4** mediante analisi DLS, ha mostrato una stretta distribuzione monomodale delle dimensioni con valori di PDI nel range di 0.065-0.087 e, come previsto, un progressivo aumento del diametro idrodinamico in seguito all'introduzione della FITC e/o La e/o gruppi acetile, con valori di dimensione, espressi come d_{mean} (nm, numero PSD), che si

aggirano da 4.2 ± 0.9 a 26.4 ± 0.2 , rispettivamente (Tabella 2, Fig.2). Le misurazioni di potenziale zeta condotte sui dendrimeri hanno rivelato valori positivi per i dendrimeri **1-3** ($+16.5 \pm 0,1$, $+12.7 \pm 0,6$ and $+9.4 \pm 0,1$ mV, rispettivamente) e come auspicabile, una carica leggermente positiva per il dendrimero acetilato **4** ($+0.2 \pm 0,1$) (Tabella 2, Fig.2). I valori positivi di potenziale zeta, hanno suggerito che dendrimeri potevano assumere una carica positiva a pH fisiologico, permettendo loro di essere trasportati nel citoplasma per adsorbimento per endocitosi mediata da attrazioni elettrostatiche con le membrane cellulari (notoriamente cariche negativamente) [37]. Per questo motivo abbiamo deciso di neutralizzare la carica positiva con l'acetilazione, promuovendo così esclusivamente un uptake cellulare selettivo mediante riconoscimento del recettore.

Tabella 2. Size Potenziale Zeta dei dendrimeri **1-5**

Dendrimers	Size d_{mean} (nm) ^a		PDI ^b	ζ (mV) ^c
	Z-average	Number PSD		
1	33.9 ± 0.1	4.2 ± 0.9	0.084 ± 0.001	$+16.5 \pm 0.1$
2	36.2 ± 1.1	6.9 ± 0.7	0.080 ± 0.003	$+12.7 \pm 0.6$
3	63.9 ± 0.4	24.3 ± 0.3	0.087 ± 0.002	$+9.4 \pm 0.1$
4	52.7 ± 0.2	26.4 ± 0.2	0.065 ± 0.001	$+0.2 \pm 0.1$
5	62.7 ± 1.2	34.3 ± 1.2	0.083 ± 0.001	$+0.2 \pm 0.5$

Sono riportati i valori come media \pm SD, con $n=3$.^a Diametro idrodinamico;^b PDI indice di polidispersione;^c ζ Potenziale zeta.

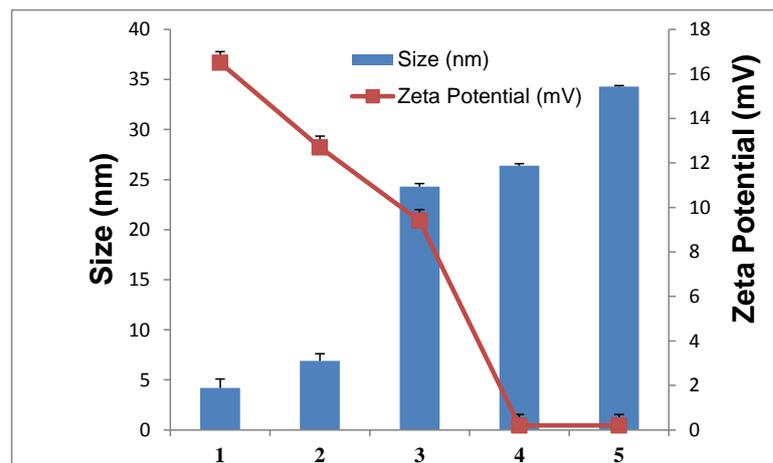


Fig.2. Rappresentazione grafica dei valori di Size e potenziale Zeta dei dendrimeri 1-5. I dati sono riportati come media \pm SD (n=3).

2.3.2 Incorporazione di sorafenib nel dendrimero Ac-La-G(4)-PAMAM-FITC **4**, e caratterizzazione

Il caricamento del sorafenib all'interno del dendrimero **4** è stato ottenuto seguendo la procedura descritta da Wang et al.[35], e la quantità di farmaco incapsulato nel nuovo dendrimero Ac-La-G (4) -PAMAM-FITC/sorafenib **5**, è stata determinata come efficienza di incapsulamento (EE) e come drug loading (DL) mediante HPLC, come descritto da Yao et al.[36]. In particolare, i valori di EE e di DL, pari a $43.8 \pm 2,6\%$ e $17.2 \pm 0,1\%$, rispettivamente, hanno suggerito che quasi la metà della quantità totale di sorafenib aggiunto è stata incorporata nel dendrimero, e che questa era appropriata per il delivery del sorafenib. Come mostrato nella Tabella 2 e nella figura 2, la dimensione media delle particelle di dendrimero **5** (34.3 ± 1.2 nm) è leggermente superiore a quella del corrispondente dendrimero privo del farmaco idrofobo sorafenib incapsulato (**4**), con uno stretto PDI di 0.043 ± 0.001 . Questi dati indicano la stabilità colloidale in soluzione acquosa del complesso **5**, parametro necessario per l'uptake cellulare. Inoltre, come previsto, le misure di potenziale zeta, non hanno evidenziato alcuna modifica della carica

superficiale ($+ 0.2 \pm 0,5$ mV), confermando che il sorafenib si trovi effettivamente all'interno del nucleo idrofobico del dendrimero.

2.3.3 Studi di rilascio *in vitro*

Gli studi *in vitro* di rilascio di sorafenib dal dendrimero Ac-La-G(4)-PAMAM-FITC/sorafenib **5**, sono stati condotti con lievi modifiche di un metodo di dialisi sviluppato da Yao et al.[36]. Il PBS-Tween 80 (1% w/v, pH 7.4) è stato selezionato come mezzo ricevente. Come evidenziato in figura 3, si è verificato un rilascio prolungato di sorafenib dal dendrimero **5**, e nessun effetto di tipo burst è stato registrato, a differenza di quanto accaduto con il farmaco libero. In particolare, il 28.5 ± 2.8 % del sorafenib è stato rilasciato dal complesso entro 96 ore, mentre già dopo 6 h è stato già velocemente rilasciato circa l' $87.5 \pm 3,2$ % del sorafenib libero.

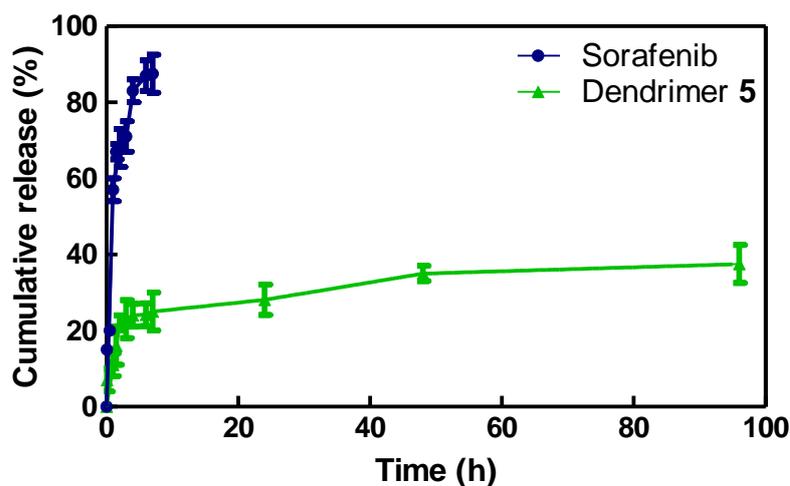


Fig.3. Profili di rilascio *in vitro* del sorafenib dal dendrimero Ac-La-G(4)-PAMAM-FITC/sorafenib **5**, in PBS, pH 7.4 a 37 °C. Per confronto è riportato il profilo del sorafenib determinato nelle stesse condizioni sperimentali. I dati sono riportati come media \pm SD (n=3).

2.3.4 Saggi di citotossicità

Gli effetti dei dendrimeri G(4)-PAMAM-FITC **2** e Ac-La-G(4)-PAMAM-FITC **4** sulla vitalità delle cellule di carcinoma del fegato umano, in particolare sulle cellule HepG-2 con elevati livelli di espressione di ASGP-R e sulle cellule HLE, senza alcuna espressione di ASGP-R, sono stati preliminarmente valutati mediante il saggio MTT, per stabilire la concentrazione più adatta e non tossica per effettuare i successivi esperimenti di uptake cellulare, e anche per determinare l'eventuale contributo all'attività antiproliferativa registrata dopo il trattamento delle cellule con il risultante complesso dendrimero**5**/sorafenib. Come evidenziato dai profili dose-effetto riportati in figura 4a, il dendrimero **2** è stato il più efficace su entrambe le linee cellulari, con valori di IC₅₀ (la concentrazione necessaria per il 50% di inibizione) di 0.2 ± 0.3 e 0.5 ± 0.4 mg/mL determinati sulle cellule HepG-2 ed HLE rispettivamente. Questi dati possono essere giustificati dalla maggiore carica positiva espressa dal dendrimero **2** rispetto al dendrimero **4**, dato che la tossicità dei dendrimeri cationici è stata ampiamente documentata[32]. Inoltre, il dendrimero **4** determina un maggiore effetto citotossico sulle cellule HepG-2 (valore IC₅₀: 0.5 ± 0.2 mg/mL) rispetto alle cellule HLE (la % della vitalità cellulare ottenuto dopo 72 h di incubazione a 0.5 mg/mL è stata: 72.9 ± 2.3 %), suggerendo così l'efficacia della frazione di acido lattobionico nel promuovere l'uptake selettivo da parte delle cellule HepG-2. Sulla base di questi risultati, per tutti gli esperimenti di uptake successivi, i dendrimeri **2** e **4** sono stati testati a concentrazioni di 0.01 mg/mL.

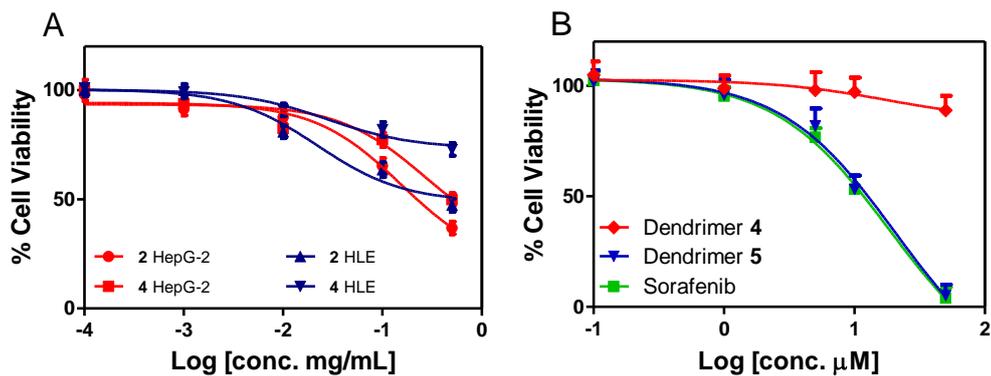
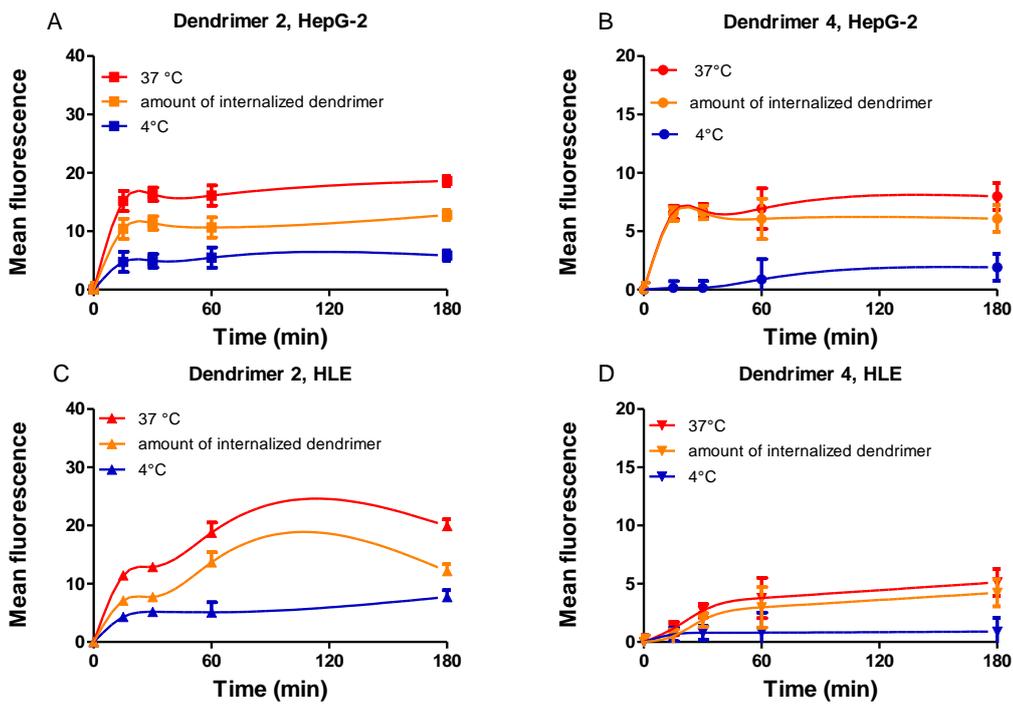


Fig.4. A) Vitalità cellulare determinata sulle cellule HepG-2 e HLE dopo 72 h di incubazione con il dendrimero **2** e **4**. B) Vitalità cellulare delle cellule HepG-2 trattate con il dendrimero **5** ed il sorafenib libero come composto di riferimento. In rosso è riportata la curva del dendrimero **4**, analizzato in un range di concentrazioni equivalenti a quelle testate per il dendrimero **5**. I dati sono espressi come media \pm SD (n=3).

2.3.5 Esperimenti di internalizzazione cellulare in vitro

Per valutare l'uptake preferenziale del dendrimero direzionato Ac-La-G(4)-PAMAM-FITC **4** da parte delle cellule che overesprimono il recettore ASGP-R, le cellule HepG-2 sono state incubate con i dendrimeri **4** (direzionato) e **2** (non-direzionato) per tempi compresi nel range 15-180 minuti, ed infine la fluorescenza media associata alle porzioni FITC dei dendrimeri, è stata determinata come descritto nella sezione sperimentale e confrontata con quella rilevata conducendo gli stessi esperimenti sulle cellule HLE, caratterizzate da bassa o nessuna espressione del recettore ASGP-R[31]. In figura 5a sono riportati i profili di fluorescenza media registrati nel tempo, determinati a 37 °C (uptake per endocitosi) e a 4 °C (binding extracellulare) per entrambi i dendrimeri in entrambe le linee cellulari. In ogni grafico, la curva gialla, è stata ottenuta dalla differenza delle altre due (37 °C e 4 °C) e rappresenta la quantità effettiva di dendrimero internalizzato dalle cellule in ciascun momento indagato. È interessante notare che

l'associazione cellulare di entrambi i dendrimeri marcati con FITC, è risultata quasi lineare nei tempi di incubazione osservati ed in tutte le condizioni sperimentali. Tuttavia, come illustrato nelle immagini di citometria a flusso (Fig.5.E) e nell'istogramma (Fig.5.F) ottenuto plottando i dati relativi alla quantità di dendrimeri internalizzata registrati al tempo selezionato di 30 min, il dendrimero **2** è stato maggiormente internalizzato in entrambi i modelli cellulari (valori di fluorescenza media: 11.4 ± 2.5 e 8.7 ± 2 nelle cellule HepG-2 ed HLE rispettivamente), come previsto in virtù delle interazioni aspecifiche con le membrane cellulari; il dendrimero direzionato **4**, invece, ha mostrato un uptake preferenziale nelle cellule HepG-2 rispetto alle cellule HLE (valori medi di fluorescenza: 7 ± 2 e 2 ± 1 nelle HepG-2 e HLE rispettivamente), postulando dunque un'internalizzazione recettore mediata.



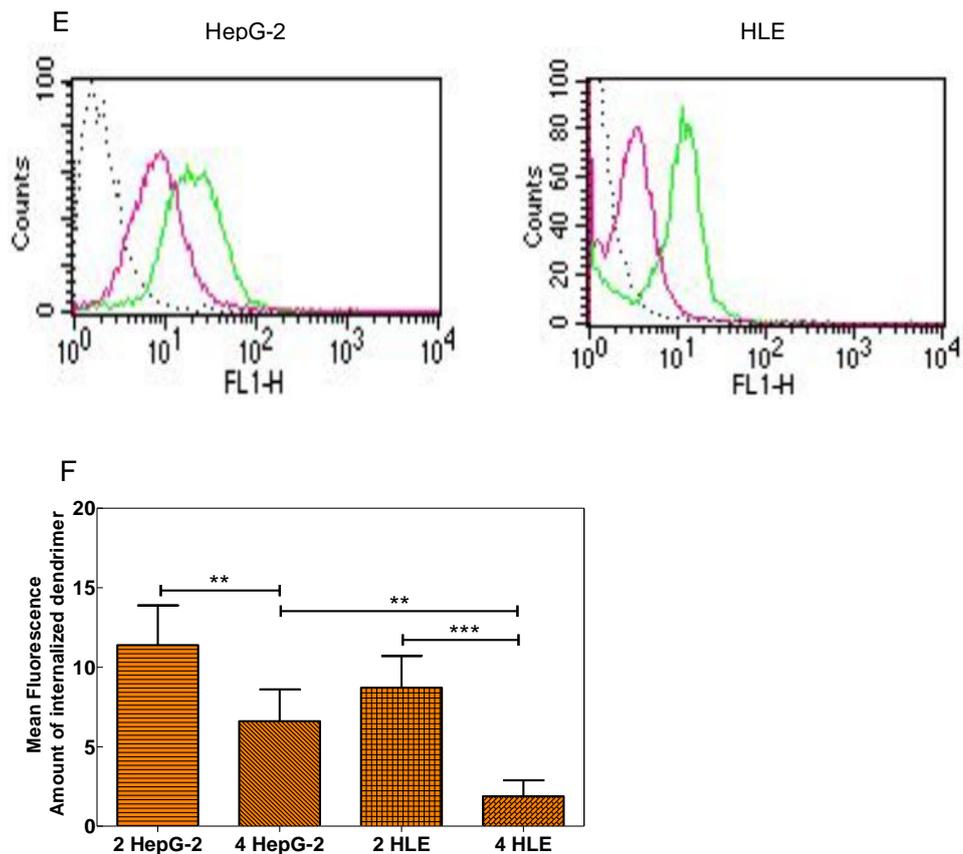


Fig.5. A-D) Uptake per endocitosi (37 °C) e binding extracellulare (4 °C) dei dendrimeri marcati con FITC **2** e **4** su cellule di tumore epatico umane HepG-2 ed HLE. La curva gialla, è stata ottenuta dalla differenza delle altre due (37 °C e 4 °C) e rappresenta l'effettiva quantità di dendrimero internalizzata dalle cellule in ogni tempo indagato. A - B) dendrimeri **2** e **4** su HepG-2; C-D) dendrimeri **2** e **4** su HLE; E) Analisi di citofluorimetria delle cellule HepG-2 ed HLE trattate con i dendrimeri **2** e **4** a 37 °C per 15 min. La linea bianca a puntini indica l'autofluorescenza delle cellule, le linee continue verde e fucsia indicano le flurescenza di **2** e **4** rispettivamente; F) Quantità di dendrimero internalizzata nelle cellule HepG-2 ed HLE dopo 30 min di incubazione. I dati rappresentano ts la media \pm SD, (n=3) e sono indicati con ** p<0.01, and *** p<0.001.

L'esperimento di competizione *in vitro* è stato eseguito per confermare la specificità di targeting ed il meccanismo di uptake del dendrimero **4** da parte delle cellule HepG-2, andando a valutare l'interazione di **4** con ASGP-R in presenza ed assenza del ligando agonista acido lattobionico (La, 20 μ M). In figura 6 (A, B) sono riportati l'istogramma dei valori di fluorescenza medi registrati dopo incubazione per 15-180 min nelle condizioni sperimentali sopra descritte, e l'analisi di citometria di flusso per il tempo rappresentativo di 30 min, rispettivamente. Entrambi evidenziano una significativa riduzione dell'intensità di fluorescenza media per il dendrimero **4** in presenza di acido lattobionico ad ogni tempo di incubazione (valori di fluorescenza media dopo 30 min: 1.5 ± 1 e 6.8 ± 1 per **4** in presenza e assenza di La (20 μ M) rispettivamente). Ciò ha suggerito che effettivamente il dendrimero **4** compete funzionalmente per la localizzazione nello stesso sito del ligando ASGP-R La. Come prevedibile, nel caso del dendrimero **2**, l'intensità di fluorescenza media non è cambiata significativamente, indicando l'assenza di concorrenza tra La e il dendrimero non direzionato **2** nei confronti dell'ASGP-R (dati non mostrati).

Inoltre, gli studi di uptake sono stati eseguiti con il dendrimero Ac-La-G(4)-PAMAM-FITC/sorafenib **5** sulle cellule HepG-2 ed HLE, al fine di valutare l'internalizzazione selettiva dendrimero anche dopo l'inserimento del farmaco. Il sorafenib libero è stato utilizzato come composto di riferimento. La concentrazione di sorafenib all'interno delle cellule è stata quantificata mediante uno spettrometro UV-vis e i valori di assorbanza registrati dopo incubazione di 30 e 180 min con **5** e sorafenib libero, sono riportati in figura 6 (C). Come evidenziato nel istogramma, la quantità di sorafenib nelle cellule HepG-2 trattate con il dendrimero **5**, era significativamente più alta rispetto a quella misurata all'interno delle cellule HLE (valori di assorbanza: $2.4 \times 10^{-5} \pm 0.1 \times 10^{-5}$ e $2,8 \times 10^{-5} \pm 0.3 \times 10^{-5}$, $9.1 \times 10^{-6} \pm 0.2 \times 10^{-6}$ e $1.5 \times 10^{-5} \pm 0.1 \times 10^{-5}$ per HepG-2 dopo 30 e 180 min e HLE dopo 30 e 180 min, rispettivamente) e leggermente superiore a quella

rivelata nelle HepG-2 incubate con sorafenib libero (valori di assorbanza: $2.1 \times 10^{-5} \pm 0.2 \times 10^{-5}$ e $2.5 \times 10^{-5} \pm 0.3 \times 10^{-5}$ dopo 30 e 180 min, rispettivamente). Questi dati hanno confermato la reale capacità del dendrimero direzionato di dirigersi preferenzialmente alle cellule che esprimono l'ASGP-R, e che, l'inserimento di sorafenib, non ha alterato questa abilità.

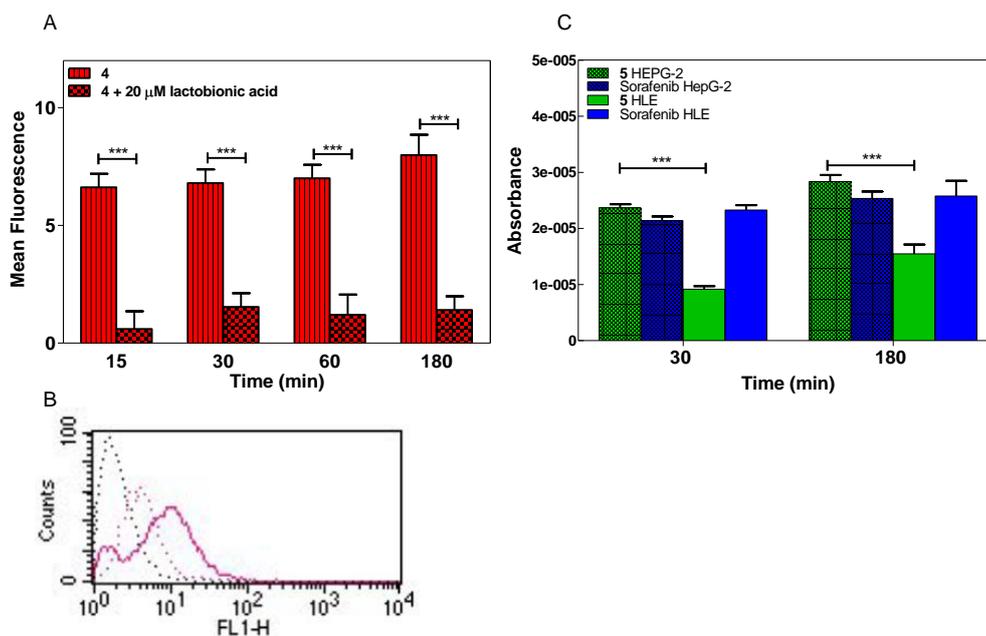


Fig. 6. A) Competizione per l'ASGP-R del dendrimero direzionato **4** con l'acido lattobionico. Le cellule HepG-2 sono state trattate con il composto La per 45 min prima del trattamento con la mix dendrimero**4**/acido lattobionico per 15-180 min e l'intensità di fluorescenza è stata quantificata mediante citofluorimetria, usando un citofluorimetro equipaggiato con laser ad argon 488 nm (Becton Dickinson). I dati sono stati interpretati usando il software CellQuest software, fornito dal produttore. B) Analisi citofluorimetrica dell'esperimento di competizione condotto sulle cellule HepG-2 per 30 min. La linea bianca a puntini indica l'autofluorescenza delle cellule, la linea continua fucsia rappresenta la fluorescenza di **4**, la linea fucsia a puntini rappresenta la fluorescenza di **4** in co-presenza di acido lattobionico. C) Valori di assorbanza registrati a $\lambda = 264$ nm con

lo spettrofotometroUV-vis Perkin Elmer Lambda Bio20 per quantificare la concentrazione del sorafenib all'interno delle cellule HepG-2 ed HLE, dopo incubazione con il dendrimero **5** ed il sorafenib libero per 30 e 180 min. I dati sono presentati come media \pm SD, (n=3) e sono indicati con *** p<0.001.

Inoltre, è stata eseguita un'analisi di microscopia confocale a scansione laser sulle HepG-2 incubate per 15 min con il dendrimero direzionato **4**, e l'immagine riportata in figura 7 mostra non solo l'efficace uptake del dendrimero a tempi brevi, ma anche la sua capacità di evadere le membrane endo-lisomiali ed entrare nel citoplasma, come dimostrato dalla combinazione della fluorescenza diffusa e puntiforme[26].

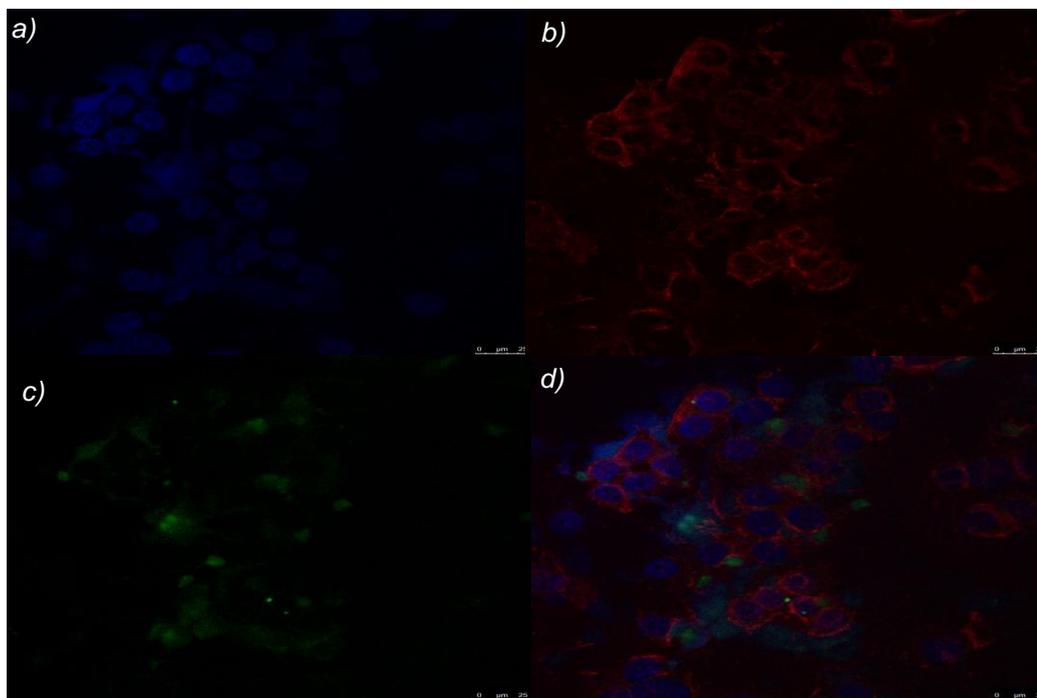


Fig.7. Singole immagini confocali rappresentative di cellule HepG-2 fissate e marcate con a) DAPI; b) Phalloidin-TRITC; c); Ac-La-G(4)-PAMAM-FITC **4** d) sovrapposizione dopo incubazione per un periodo di 15 min. Bar: 25 μ m.

2.3.6 Valutazione dell'efficacia antitumorale

La fase preliminare della valutazione dell'efficacia antitumorale del sorafenib incluso nel dendrimero, ha previsto lo studio di citotossicità del dendrimero **5** sulle cellule HepG-2 dopo 72 h di incubazione, utilizzando come composti di riferimento il sorafenib libero ed il dendrimero precursore **4**. I risultati, espressi come IC_{50} (rispettivamente 12.8 ± 2.3 e 11.4 ± 2.7 per **5** e sorafenib,) e rappresentati in figura 4 B, hanno mostrato una sovrapposizione quasi totale delle curve di vitalità cellulare del composto **5** e del sorafenib, dimostrando che il farmaco aveva preservato la sua attività nonostante fosse stato incluso nel carrier. Inoltre, è possibile osservare come il dendrimero **4**, testato in un intervallo di concentrazioni paragonabile a quello del dendrimero utilizzato per incapsulare il sorafenib, non è risultato citotossico, suggerendo che l'efficacia terapeutica del complesso dendrimero/sorafenib è stata determinata esclusivamente dal farmaco incorporato. Tuttavia, dopo il trattamento delle cellule per 1 o 24 ore con il dendrimero **5** e sorafenib libero, seguito da wash out e coltura in un mezzo fresco fino a 72 h, si è riscontrata una notevole maggiore citotossicità nel caso delle cellule trattate con il composto **5** rispetto a quelle trattate con sorafenib. Le percentuali di effetto antiproliferativo calcolate rispetto alle cellule non trattate, sono riportate in figura 8, in particolare, dopo 1 h il dendrimero **5** e il sorafenib avevano determinato il 20 ± 4 % e 7 ± 4 % di morte cellulare, e dopo 24 h, 57 ± 3 % e 10 ± 3 %, rispettivamente. Questo è probabilmente dovuto ad una maggiore ritenzione del farmaco all'interno delle cellule, come anche evidenziato dal profilo di cinetica di rilascio del farmaco riportato in figura 3.

Infine, per indagare la capacità del complesso **5** di indurre apoptosi, è stato eseguito il test di apoptosi mediante colorazione con Annessina V-ioduro propidio sulle cellule HepG-2 dopo 1 e 24 h di trattamento con **5** e sorafenib. Nella figura 8 B vengono presentate le frazioni di cellule positive all'annessina V su 15.000 cellule totali trattate con dendrimero **5** o sorafenib, espresse come variazione

rispetto alle cellule non trattate. Entrambi i composti inducono apoptosi, e anche se il dendrimero **5** è risultato poco attivo in questa direzione dopo 1 h di incubazione, dopo 24 h è stato osservato un aumento significativo dell'attività di induzione apoptotica. D'altra parte, il sorafenib, dopo 1 h è risultato più attivo di **5**, ma dopo 24 h, ha subito una lieve diminuzione della sua attività. Ancora una volta, questo comportamento potrebbe essere giustificato proprio con la cinetica di rilascio prolungato di sorafenib incorporato dal dendrimero (Fig.3).

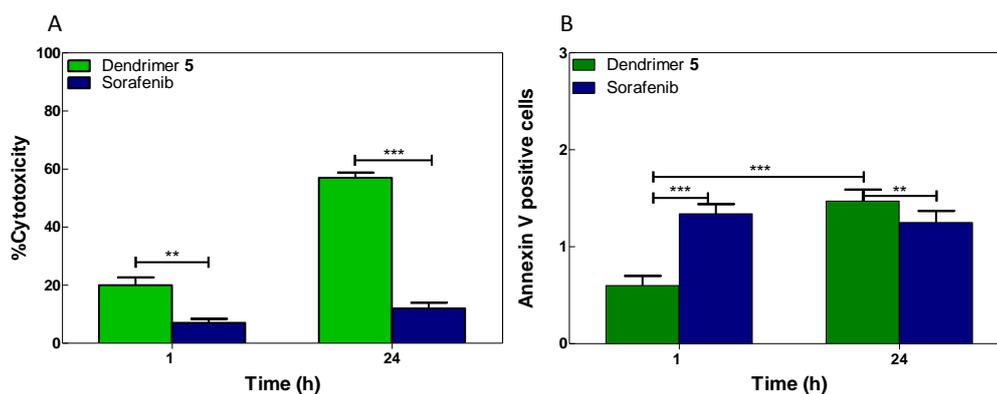


Fig.8. A) % di morte cellulare indotta dal dendrimero **5** e dal sorafenib libero dopo incubazione per 1 e 24 h seguite da wash out and crescita in mezzo fresco fino a 72 h. B) Cellule positive all' Annexin V della popolazione di cellule trattate con il dendrimero **5** e con il sorafenib, espresse come rapporto rispetto alle cellule non trattate. La differenza statistica è indicata con *** che indica che $p < 0.001$.

2.4 Conclusioni

In questo lavoro di ricerca è stato sintetizzato il dendrimero **4**, Ac-La-G(4)-PAMAM-FITC, ASGP-R direzionato, utile come sistema di rilascio di farmaci per la terapia del cancro del fegato, mediante coniugazione con un ligando ad elevata affinità per l'ASGP-R (acido lattobionico) ed un fluoroforo organico (FITC) allo scheletro del dendrimero G(4)-PAMAM. L'acetilazione dei gruppi amminici rimanenti ha permesso di migliorare il sistema, rendendolo selettivo

verso le cellule che esprimono il suddetto recettore, evitando l'internalizzazione tramite endocitosi mediate da assorbimento, che sebbene possa essere considerata un modo molto efficiente di ingresso nelle cellule, non permetterebbe una somministrazione di farmaci selettiva verso uno specifico tipo di cellula. Il sistema è stato completamente caratterizzato da un punto di vista chimico fisico e morfologico, e gli studi di uptake effettuati sulle cellule HepG-2 e HLE di cancro del fegato, hanno sottolineato la reale capacità del dendrimero **4**, di essere rapidamente interiorizzato e di discriminare tra i diversi tipi di cellule di mammifero. Gli studi di microscopia confocale e di competizione *in vitro*, hanno confermato questi risultati. Il risultante complesso dendrimero **5**/sorafenib è risultato stabile e caratterizzato da una cinetica di rilascio sostenuto del farmaco. Come evidenziato negli esperimenti condotti per valutare l'efficacia antitumorale, il sorafenib incluso nel dendrimero, non perde efficacia, al contrario, per via della cinetica di rilascio di tipo sostenuto, è in grado di produrre un effetto più duraturo nel tempo rispetto al sorafenib da solo. Questi risultati permettono di considerare questo nuovo dendrimero, direzionato all' ASGP-R, come un vettore adatto per il delivery selettivo di sorafenib nel citoplasma delle cellule di cancro al fegato overesprimenti questo recettore.

Bibliografia

- [1] A. Villanueva, and J. M. Llovet, *Gastroenterology* 140, 1410 (2011)
- [2] N. Mishra, N. P. Yadav, V. K. Rai, P. Sinha, K. S. Yadav, S. Jain, and S. Arora, *BioMed .Research. International.* 2013, 20 (2013)
- [3] G. Ashwell, and J. Harford, *Annu. Rev. Biochem.* 51, 531(1982)
- [4] A.L. Schwartz, S. E. Fridovich, B.B. Knowles, and H.F. Lodish, *J. Biol. Chem.* 256, 8878 (1981)
- [5] R. J. Fallon, and A. L. Schwartz, *J. Biol. Chem.* 263, 13159 (1988)
- [6] I. Hyodo, M. Mizuno, G. Yamada, and Y. Tsuji, *Liver.* 13, 80 (1993)
- [7] A. Ciechanover, A. L. Schwartz, and H. F. Lodish, *J. Cell. Biochem.* 23, 107 (1983)
- [8] L. Fiume L. Bolondi, C. Busi, P. Chieco, F. Kratz, M. Lanza, A. Mattioli, and G. Di Stefano, *J. Hepatol.* 43, 645 (2005)
- [9] H. Liu, H. Wang, Y. Xu, R. Guo, S. Wen, Y. Huang, W. Liu, M. Shen, J. Zhao, G. Zhang, and X. Shi, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 6, 6944 (2014) Epub 2014 Apr 18.
- [10] P. J. Julyan, L. W. Seymour, D. R. Ferry, S. Daryani, C. M. Boivin, J. Doran, M. David, D. Anderson, C. Christodoulou, A. M. Young, S. Hesslewood, and D. J. Kerr, *J. Control. Release.* 57, 281 (1999)
- [11] A. Azzariti, S. Mancarella, L. Porcelli, A. E. Quatrone, A. Caligiuri, L. Lupo, F. Dituri, and G. Giannelli, *Hepatology.*(2016)doi: 10.1002/hep.28835. [Epub ahead of print]
- [12] T. Gamstätter, A. Weinmann, S. Schadmand-Fischer, P. R. Spies, I. M. Niederle, M. Schuchmann, P. R. Galle, and M. A. Wörns, *Onkologie.* 34, 538 (2011) Epub 2011 Sep 16.
- [13] M. Chaparro, L. González Moreno, M. Trapero-Marugán, J. Medina, and R. Moreno-Otero, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 28, 1269 (2008)
- [14] M. Gillian, Keating, and A. Santoro, *Drugs.* 69, 223 (2009)
- [15] J. M. Llovet, S. Ricci, V. Mazzaferro, P. Hilgard, E. Gane, J. F. Blanc, A. C. de Oliveira, A. Santoro, J. L. Raoul, A. Forner, M. Schwartz, C. Porta, S. Zeuzem, L. Bolondi, T. F. Greten, P. R. Galle, J. F. Seitz, I. Borbath, D. Häussinger, T. Giannaris, M. Shan, M. Moscovici, D. Voliotis, J. Bruix, and SHARP Investigators Study Group, *N. Engl. J. Med* 359, 378 (2008)
- [16] J. Nicolas, S. Mura, D. Brambilla, N. Mackiewicz, and P. Couvreur, *Chem. Soc. Rev.* 42, 1147 (2013)
- [17] N. Kamaly, Z. Xiao, P. M. Valencia, A. F. Radovic-Moreno, and O. C. Farokhzad, *Chem. Soc. Rev.* 41, 2971 (2012)
- [18] N. Larson, and H. Ghandehari, *Chem. Mater.* 24, 840 (2012)
- [19] R. Plummer , R.H . Wilson, H. Calvert, A.V. Boddy, M. Griffin, J. Sludden, M. J. Tilby, M. Eatoc k, D. G. Pearson, C. J. Ottley, Y. Matsumura, K. Kataoka, and T. Nishiya, *Brit. J. Cancer* 104, 593 (2011)

- [20] M. R. Dreher, W. Liu, C. R. Michelich, M. W. Dewhirst, F. Yuan, and A. Chilkoti, *J. Natl. Cancer I.* 98, 335 (2006)
- [21] R. Duncan, *Nat. Rev. Drug Discov.* 2, 347 (2003)
- [22] D. Neri, and R. Bicknell, *Nat. Rev. Cancer.* 5, 436 (2005)
- [23] E. Ruoslahti, S. N. Bhatia, and M. J. Sailor, *J. Cell Biol.* 188, 759 (2010)
- [24] N. Denora, V. Laquintana, A. Lopalco, R. M. Iacobazzi, A. Lopodota, A. Cutrignelli, G. Iacobellis, C. Annese, M. Cascione, S. Leporatti, and M. Franco, *J. Control. Release.* 172, 1111 (2013)
- [25] Y. Y. Cheng, L. B. Zhao, Y. W. Li, and T. W. Xu, *Chem. Soc. Rev.* 40, 2673 (2011)
- [26] S. H. Medina, V. Tekumalla, M. V. Chevliakov, D. S. Shewach, W. D. Ensminger, and M. E. El-Sayed, *Biomaterials.* 32, 4118 (2011)
- [27] K. P. Anil, M. Andrzej, B. James, P. T. Thommey, H. B. Neil, and R. B. James, *Bioconjugate Chem.* 15, 1174 (2004)
- [28] D. Peer, J. M. Karp, S. Hong, O. C. Farokhzad, R. Margalit, and R. Langer, *Nat. Nanotechnol.* 2, 751 (2007)
- [29] K. M. Kamruzzaman Selim, Y. S. Ha, S. J. Kim, Y. Chang, T. J. Kim, G. Ho Lee, and I. K. Kang, *Biomaterials.* 28, 710 (2007)
- [30] K. M. Kamruzzaman Selim, Z. C. Xing, H. Guo, and I. K. Kang, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 20, 1945 (2009)
- [31] D. Witzigmann, L. Quagliata, S. H. Schenk, C. Quintavalle, L. M. Terracciano, and J. Huwyler, *Hepatol. Res.* 46, 686 (2016)
- [32] R. Duncan, and Izzo L., *Adv. Drug Delivery Rev.* 57, 2215 (2005)
- [33] D. A. Tomalia, A. M. Naylor, and W. A. Goddard III, *Angew. Chem., Int. Ed.* 29, 138 (1990)
- [34] F. Fu, Y. Wu, J. Zhu, S. Wen, M. Shen, and X. Shi, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 6, 16416 (2014)
- [35] Y. Wang, R. Guo, X. Cao, M. Shen, and X. Shi, *Biomaterials.* 32, 3322 (2011)
- [36] Y. Yao, Z. Su, Y. Liang, and N. Zhang. *Int. J. Nanomedicine.* 10, 6185 (2015)
- [37] J.G. Huang, T. Leshuk, F.X. Gu, Emerging nanomaterials for targeting subcellular organelles, *Nano Today* 6 (2011) 478–492.

Capitolo 3

Nanopiattaforme costituite da sorafenib e nanoparticelle superparamagnetiche di ossido di ferro utilizzabili per la terapia dell'epatocarcinoma con targeting magnetico

3.1 Introduzione

Come anticipato nei capitoli precedenti, il carcinoma epatocellulare (HCC) è la sesta causa più comune di cancro e la principale causa di morte nei pazienti con cirrosi, la cui incidenza è in aumento e rappresenta un tumore resistente alle terapie disponibili. Diversi sono i tentativi per migliorare l'attuale piano terapeutico previsto per questa patologia ed in questo ambito si colloca il lavoro di ricerca descritto in questo capitolo.

Le terapie basate sull'utilizzo di nanoparticelle (NP) offrono un nuovo approccio per direzionare specificamente farmaci antitumorali alle cellule tumorali e per penetrare in modo efficace le cellule tumorali resistenti, migliorando così l'accumulo intracellulare di tali farmaci e riducendo gli effetti collaterali della chemioterapia ad alte dosi[6-10]. In questa prospettiva, le NP magnetiche sono molto attraenti per il delivery di farmaci, in quanto sono state ampiamente dimostrate le loro caratteristiche di biocompatibilità, biodegradabilità e di indirizzarsi a siti specifici del corpo attraverso l'applicazione di un campo magnetico. Le NP magnetiche sono state ampiamente studiate per le loro diverse applicazioni biomediche, come agenti di contrasto di risonanza magnetica (MRI), nell'ipertermia, nel direzionamento selettivo di farmaci, come biosensori, e per la separazione delle proteine. Finora, molti sistemi a base di NP di ossido di ferro sono stati approvati per l'uso clinici[11-13]. In particolare, i sistemi di trasporto

basati su NP magnetiche sono metodi interessanti per localizzare un farmaco nel corpo mediante l'utilizzo di forze magnetiche che agiscono relativamente a lunga distanza, senza compromettere la maggior parte dei tessuti biologici[14,15]. Tra questi, le nanoparticelle superparamagnetiche di ossido di ferro (SPIONs) sono state ampiamente studiate per il loro uso nell'ipertermia fluida magnetica, ma anche come sistemi di trasporto di farmaci, permettendo così un trattamento multimodale dei tumori. Inoltre, le SPIONs sono state esplorate per il loro potenziale teranostico, in quanto consentono miglioramenti di caratteristiche nella MRI. Diversi studi clinici sono stati condotti per convalidare la sicurezza e l'efficacia di queste NP. In questo contesto, esperimenti precedenti hanno mostrato chiaramente la migliorata regressione del tumore utilizzando una terapia di combinazione di SPIONs con doxorubicina[16].

Per progettare e ottimizzare sistemi di drug delivery basati su SPION, devono essere considerate diverse caratteristiche: (a) le SPIONs devono avere dimensioni opportune per consentire una sufficiente attrazione dal campo magnetico e la loro penetrazione nel tumore o nel sistema vascolare che circonda il tumore; (B) il campo magnetico dovrebbe essere sufficientemente intenso da attrarre le NP magnetiche nella zona desiderata; (C) il vettore del farmaco deve trasportare e rilasciare una quantità sufficiente di agente antitumorale; e (d) il metodo di iniezione deve avere un buon accesso al sistema vascolare del tumore e dovrebbe evitare una clearance veloce da parte del sistema reticolo-endoteliale.

La progettazione di un sistema di trasporto del farmaco richiede il raggiungimento di caratteristiche chiave, tra cui le dimensioni, superficie e rivestimento delle particelle, pertanto i sistemi di drug delivery basati su SPION necessitano di raggiungere una prolungata emivita ematica, una migliorata stabilità negli ambienti biologici e, quindi, una maggiore probabilità di raggiungere le cellule bersaglio[17,18]. L'incorporazione di NP nel core idrofobico di micelle lipidiche modificate con polimeri, rappresenta una strategia efficace per ottenere nano-

formulazioni con buona biocompatibilità e flessibilità della chimica di superficie delle NP[19]. Inoltre, l'approccio basato sull'incapsulamento di NP in micelle lipidiche consente l'ulteriore co-incorporazione, nel core idrofobico, di una vasta gamma di farmaci scarsamente solubili in acqua. Diversi studi precedenti, attestano l'uso di micelle come nanosistema ospite per il simultaneo trasporto di farmaci antitumorali e NP magnetiche come agenti di contrasto MRI[20-24]. In particolare, L. Zhang et al. hanno esplorato il targeting attivo di sorafenib a cellule di carcinoma epatiche umane utilizzando micelle polimeriche funzionalizzate con folato caricate con SPIONs e sorafenib, dimostrando in tal modo attraverso il sistema di monitoraggio MRI il loro effetto di targeting tumorale *in vitro* [24] targeting. Tuttavia, ci sono ancora pochi esempi di utilizzo di micelle come nanovettori per il targeting magnetico attivo tramite SPIONs per il trasporto di farmaci antitumorali[25].

Nel lavoro presentato in questo capitolo, micelle a base di poli (etilen-glicole)-fosfoetanolammina (PEG-PE) e caricate sia con SPIONs che con sorafenib (SPION/sorafenib/micelle) sono state progettate, realizzate e completamente caratterizzate mediante tecniche complementari ottiche, strutturali e magnetiche. Il PEG-PE è tra i polimeri più promettenti, ampiamente utilizzato come supporto per il delivery di farmaci antitumorali[26-28]. La terminazione di PEG, fornendo uno strato protettivo idrofilo alla superficie delle micelle, si è dimostrata efficace nel limitare il naturale processo opsonizzazione delle particelle nel sangue, in quanto impedisce il riconoscimento da parte dei macrofagi, aumentando così l'emivita nel sangue. Qui, per la prima volta, sono presentate delle nuove nanopiatteforme lipidiche, disperdibili in acqua e stabili a lungo termine, in grado di attuare il targeting magnetico del sorafenib al sito del tumore per un efficace trattamento dell'HCC. Per realizzare tale importante compito, un sistema *in vitro* opportunamente progettato, in grado di simulare la portata del sangue nel fegato, è stato realizzato e applicato per dimostrare che le micelle caricate con SPION

possono essere attratte efficientemente utilizzando un campo magnetico clinicamente accettabile[14]. Infine, l'efficacia di targeting tumorale del sistema SPION/sorafenib/micelle, è stata valutata *in vitro* osservando il loro uptake nelle cellule di carcinoma epatico umano (HepG2), con o senza esposizione al campo magnetico, con una risultante migliorata efficacia antitumorale quando magneticamente mirato. Il futuro uso *in vivo* delle micelle lipidiche modificate con PEG, dovrebbe migliorare il profilo di sicurezza e di efficacia del sorafenib, riducendo la tossicità e assicurando un lungo tempo di permanenza nel flusso sanguigno.

3.2 Materiali e metodi

3.2.1 Materiali

Tutti i prodotti chimici utilizzati erano al massimo grado di purezza disponibile e sono stati utilizzati come ricevuti senza ulteriore purificazione o distillazione. Acido Oleico ($C_{18}H_{33}CO_2H$ o OLEA, 90%), 1-octadecene ($C_{18}H_{36}$ or ODE, 90%), oleyl amine ($C_{17}H_{33}NH_2$ or OLAM, 70%), iron pentacarbonyl ($Fe(CO)_5$, 98%), e dodecan-1,2-diol ($C_{12}H_{24}(OH)_2$ or DDIOL, 90%) e phosphotungstic acid (99.995%) sono stati acquistati da Sigma-Aldrich. 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-[methoxy (poly(ethylene glycol))-2000] (16:0 PEG-2-PE) sono stati acquistati da Avanti Polar Lipids. Sorafenib tosylate è stato acquistato da Selleck Chemicals LLC.

Tutti i solventi utilizzati erano di grado analitico ed acquistati da Aldrich. Tutte le soluzioni acquose sono state preparate usando acqua ottenuta da un sistema Milli-Q gradient A-10 (Millipore, 18.2 MΩcm, organic carbon content $\geq 4\mu g/L$).

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), FBS (Fetal Bovine Serum), penicillin (100 U/mL) e streptomycin (100 $\mu g/mL$) sono stati acquistati da EuroClone. Le fiasche di coltura cellulare e le piastre Petri sono state acquistate da

Corning (Glassworks). 3-(4,5-Dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) è stato acquistato da Sigma-Aldrich. I magneti sono stati acquistati da HKCM Engineering.

3.2.2 Sintesi delle SPIONs con rivestimento organico

Le SPIONs sono state sintetizzate secondo procedure riportate in letteratura [29, 30]. Una miscela contenente ODE (20 mL), DDIOL (2.5 mmol), OLAM (3 mmol), e OLEA (3 mmol) è stata caricata in un pallone a tre colli collegato ad un refrigerante a refluxo ed essiccata a 110 °C. È stata lasciata sotto agitazione per 1 h, quindi riscaldata sotto flusso di N₂ a 250 °C. Successivamente, 1 mL di una soluzione di Fe(CO)₅ (1 M) in ODE precedentemente degassata è stato aggiunto rapidamente alla miscela sotto agitazione vigorosa. La temperatura è stata poi abbassata a 130 °C, e la miscela di reazione è stata infine raffreddata a temperatura ambiente dopo esposizione all'aria per 60 min. Una soluzione contenente 2-propanolo e acetone (1: 1 v/v) è stata aggiunta alla miscela, e un materiale nero è stato precipitato e separato mediante centrifugazione (4 cicli). Il prodotto nero è stato sciolto in cloroformio per ottenere una chiara, soluzione colloidale stabile.

3.2.3 Preparazione di SPION/sorafenib/micelle

Quantità selezionate in modo opportuno di una stock solution di SPION (0.08 M) e sorafenib sono state co-dissolte in cloroformio con 150 µL di 16: 0 PEG-2-PE (3.5x10⁻² M). Il solvente è stato allontanato rapidamente per evaporazione a 25 °C con un evaporatore rotante. Lo strato essiccato di SPION /sorafenib / PEG-lipide è stato quindi mantenuo sotto vuoto per 1 h. Successivamente, 2 mL di tampone fosfato (PBS, 10 mM, pH 7.4) è stato aggiunto al film. Le SPION/sorafenib/micelle sono state ripetutamente riscaldate a 80 °C (con miscelazione vigorosa periodica) e successivamente raffreddate a temperatura ambiente (tre cicli). Dopo la formazione di micelle, una centrifuga (5000xg per 1

min) è stata effettuata per rimuovere l'eccesso di SPIONs o sorafenib che non erano stati incorporati nelle micelle. Successivamente, poiché questa sospensione conteneva sia micelle vuote che SPION/sorafenib/micelle, le micelle vuote sono state rimosse per ultracentrifugazione (200000xg) per 16 h. Le micelle vuote quindi sono rimaste in sospensione, mentre le SPION/sorafenib/micelle hanno formato un pellet. Il surnatante è stato scartato e le SPION/sorafenib/micelle sono staterisospese in acqua. La soluzione è stata filtrata utilizzando filtri 0.2 μm (Anotop, Whatman) [7, 29, 31] e liofilizzata. I campioni essiccati sono stati ricostituiti con acqua o PBS, prima della loro caratterizzazione o applicazione. Le micelle PEG-lipidiche caricate solo con SPIONs (SPION/micelle) sono stati ottenute seguendo lo stesso protocollo ma senza l'aggiunta del farmaco.

3.2.4 Sistema di flusso capillare in vitro

È stato appositamente progettato e realizzato un circuito dinamico utilizzato per simulare il flusso di sangue nel fegato del corpo umano. Tale circuito è composto da una conduttura formata da un tubo capillare di vetro con diametro interno di 4 mm e diametro esterno di 6 mm, un mini pompa peristaltica (VELP Scientific SP311) operanti con una portata di 5-125 mL/min, un flussometro digitale (serie Omega FLR1000) per misurare la portata corretta e un sensore di pressione differenziale costruito ad hoc, per controllare la caduta di pressione alla fine del sistema di accumulo. È stata creata una struttura magnetica formata da quattro anelli magnetici NdFeB permanenti (flusso magnetico $B = 1,27$ Tesla), con il diametro interno di 4 mm e il diametro esterno di 20 mm, separati da anelli polimeriche non magnetici. La cattura delle micelle da parte della struttura di magneti permanenti è stata studiata monitorando la variazione del contenuto di Fe (SPIONs) nel fluido in funzione del tempo. A questo scopo, durante ogni esperimento lungo 8 ore, una serie di campioni di fluido sono stati sequenzialmente raccolti in momenti prefissati e analizzati mediante ICP-AES (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy).

3.2.5 Colture cellulari

Le cellule di tumore epatocellulare umano HepG-2 sono state tenute in coltura in DMEM medium addizionato con 10% di FBS, 100U/mL di penicillina, 100 µg/mL di streptomicina, in un incubatore a 37 °C con umidità controllata e con atmosfera contenente 5% di CO₂.

3.2.6 Saggi di citotossicità

La citotossicità della SPION/sorafenib/micelle e SPION/micelle è stata determinata su linee di cellule di cancro epatico umano HepG-2 utilizzando il saggio MTT, come descritto in Denora et al.[32]. Brevemente, le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti ad una densità di 5,000 cellule/pozzetto; dopo incubazione di 24 h, sono state trattate con le SPION/sorafenib/micelle e con le SPION/micelle con sei diversi valori di concentrazione, nel range 0.06- 300 mg/mL nel mezzo di coltura. Per i camponi di SPION/sorafenib/micelle, la concentrazione di sorafenib testata era nel range 0,01-50 µM. Dopo 72 h di incubazione, una quantità di 10 µL di MTT 0.5% w/v è stata aggiunto a ciascun pozzetto e le piastre sono state incubate per altre 3 h a 37 °C. Infine le cellule sono state lisate mediante aggiunta di 100 µL di DMSO. L'assorbanza a 570 nm è stata determinata utilizzando un lettore di piastre PerkinElmer 2030 MULTILABEL Victor TM X3. La vitalità cellulare delle SPION/sorafenib/micelle è stata confrontata con i dati dello stesso esperimento condotto con sorafenib libero, sfruttando concentrazioni di sorafenib variabili nel range 0.01-50 µM.

L'effetto del campo magnetico sulla citotossicità delle SPION/micelle o delle SPION/ sorafenib/micelle, è stato valutato come segue: le cellule HepG-2 sono state seminate in piastre di coltura da 60 mm ad una densità di 500,000 cellule/piastra e incubate a 37 °C in incubatore umidificato con atmosfera al 5% di CO₂. Dopo 1 giorno, le cellule sono state esposte per 72 h alle SPION/micelle o alle SPION/sorafenib/ micelle a concentrazioni di 60, 30, 6, 0.6 mg/mL in termini

di concentrazione di SPION. Per le SPION/sorafenib/micelle, le concentrazioni di sorafenib testate sono state di 10, 5, 1 e 0.1 μM . Le cellule sono state sottoposte nel corso dell'incubazione all'azione di un campo magnetico esercitato da un anello magnetico di NdFeB (diametro esterno di 40 mm ed diametro interno di 30 mm, $B = 1.17$ Tesla). Dopo 72 h di incubazione, una quantità di 250 mL di MTT 0.5% w/v è stata aggiunta a ciascun pozzetto e le piastre sono state incubate per ulteriori 2 h a 37 °C. Infine, le cellule sono state lisate mediante aggiunta di 3 mL di DMSO. L'assorbanza a 570 nm è stata determinata come descritto sopra. Per confronto, lo stesso esperimento è stato condotto sulle cellule HepG2 incubate con SPION/sorafenib/micelle senza applicare alcun campo magnetico.

3.2.7 Studi di internalizzazione cellulare

Le cellule sono state seminate in piastre di coltura di 60 mm con una densità di 500,000 cellule/piastra ed incubate a 37 °C in atmosfera umidificata con il 5% di CO_2 . Dopo 1 giorno, il mezzo di coltura è stato sostituito con 3 mL di terreno contenente SPION/micelle a concentrazione pari alla loro IC_{50} (60 mg/mL a 72 h) e incubate per 4 e 24 h con e senza applicazione del campo magnetico indotto da un anello magnetico di NdFeB (diametro esterno di 40 mm e diametro interno di 30 mm, $B = 1.17$ Tesla) o da un magnete quadrato di NdFeB (lunghezza 60 mm e larghezza di 50 mm, $B = 1.17$ Tesla).

Dopo l'incubazione, il monostrato di cellule è stato lavato due volte con PBS freddo e poi digerito con 2 mL di una soluzione di HNO_3 (67%)/ H_2O_2 (30%), 1:1 (V/V), per 4 ore a 60 °C in stufa. Il contenuto di ferro è stato determinato mediante ICP-MS con uno spettrometro di massa Varian 820-MS ICP.

È stato anche qualitativamente rilevato l'uptake delle SPION/micelle da parte delle cellule utilizzando la colorazione con blu di Prussia. Dopo 4 h di incubazione con le SPION/micelle a concentrazioni 60 mg/mL in termini di concentrazione di SPION, in assenza e in presenza del campo magnetico indotto

dal magnete ad anello di NdFeB, le cellule HepG-2 sono state lavate tre volte con PBS e fissate con 2 mL di paraformaldeide 4% per 20 minuti. Dopo ripetuti lavaggi con PBS, le cellule fissate sono state incubate con 2 mL di una soluzione di blu di Prussia contenente una miscela 1:1 (v/v) di ferrocianuro di potassio (II) triidrato 10% e di soluzione acquosa di acido cloridrico 10%, a 37 °C per 30 min, e poi lavato per tre volte con una soluzione di PBS. La colorazione del Ferro delle cellule è stata osservata al microscopio Olympus CKX41.

3.2.8 Esperimenti cellulari di recovery

Il saggio di proliferazione cellulare è stato condotto sulle cellule HepG-2 trattate con SPION/sorafenib/micelle (10 μ M) ed esposte al campo magnetico per 4 h (o 24 h) e successivo lavaggio del mezzo contenente il complesso che è stato sostituito con 3 mL di terreno fresco. In seguito, la vitalità cellulare è stata valutata dopo 4, 24, 48 e 72 h e confrontata con i dati dello stesso esperimento condotto con sorafenib (10 μ M) e SPION/sorafenib/micelle (10 μ M in termini di Sorafenib o 60 mg/mL in termini di concentrazione di SPION) senza l'applicazione del campo magnetico.

3.2.9 Dimensione delle particelle, distribuzione dimensionale e carica superficiale

Il Diametro idrodinamico (size), la distribuzione delle dimensioni e la stabilità colloidale delle SPION/micelle e delle SPION/sorafenib/micelle sono stati rilevati utilizzando un Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Regno Unito (DTS 5,00).

In particolare, la dimensione e la distribuzione dimensionale sono state determinate mediante dynamic light scattering (DLS) dopo diluizione del campione in acqua demineralizzata. La distribuzione delle dimensioni è descritta in termini di indice di polidispersità (PDI). Le misurazioni di potenziale-zeta, e quindi di carica superficiale, sono state effettuate utilizzando la velocimetria laser

doppler (LDV) dopo diluizione del campione in soluzione acquosa di KCl (1 mM). Tutti i dati riportati sono presentati come media \pm deviazione standard di tre replicati.

2.9.10 Microscopia a Trasmissione Elettronica (TEM)

L'analisi di microscopia elettronica a trasmissione (TEM) è stata eseguita utilizzando un microscopio Jeol JEM-1011, funzionante ad una tensione di accelerazione di 100 kV. Le immagini TEM sono state acquisite da una fotocamera Olympus Quemesa (11 Mpx). I campioni sono stati preparati facendo cadere su una griglia di rame di 400 mesh rivestita di carbonio amorfo, una dispersione di SPION in cloroformio o, in alternativa, una sospensione acquosa di micelle, e lasciando evaporare il solvente. L'analisi statistica dei size (dimensione media SPION e la distribuzione delle dimensioni) dei campioni è stata eseguita mediante il programma di analisi Image J.

In particolare, la dimensione media dei NC e la deviazione standard relativa percentuale ($\sigma\%$) sono state calcolate per definire la distribuzione delle dimensioni delle SPION. Per l'osservazione della colorazione TEM positiva, dopo la deposizione del campione, la griglia è stata immersa in una soluzione 2% (w/v) di acido fosforico per 30 secondi. L'agente di colorazione in eccesso è stato rimosso dalla griglia risciacquando con acqua ultrapura (immergendo la griglia in acqua ultrapura tre volte per 10 secondi). Il campione sulla griglia è stato lasciato asciugare per una notte e infine conservato in una camera a vuoto fino all'analisi. Per le indagini di colorazione TEM negativa, 30 mL della soluzione 2% (w/v) di acido fosforico sono stati gettati sulla griglia in cui il campione era stato precedentemente depositato. L'agente colorante in eccesso è stato rimosso tamponando, al bordo della griglia, con carta da filtro bagnata con acqua ultrapura. Dopo la completa essiccazione del campione, la griglia è stata conservata in una camera sotto vuoto fino all'analisi.

3.2.11 Misure magnetiche

Le misure di suscettività magnetica AC a corrente alternata sono state eseguite utilizzando un sistema OXFORD Maglab2000 operante nella banda di frequenza 1-104 Hz con un campo magnetico AC di 10 Oe. La risoluzione del segnale AC è stata superiore 10^{-7} emu. Le misure di magnetizzazione in corrente continua DC a temperatura ambiente, sono state effettuate per mezzo di un magnetometro commerciale DC-SQUID (MPMS Quantum Design) con una risoluzione maggiore di 10^{-8} emu (RSO option).

3.2.12 Analisi HPLC ed UV

Le indagini HPLC-UV sono state effettuate utilizzando un sistema Agilent 1260 Infinity Quaternary LC, dotato di un detector UV-VIS 1260 Infinity Multiple Wavelength Detector e di un iniettore manuale Rheodyne Manual Sample Injector Valves 7725i. Il sorafenib è stato separato su una colonna Zorbax Eclipse Plus C18 (4.6 x 250 mm, 5 mm). Il sistema ha operato isocraticamente usando una fase mobile costituita da una miscela di acqua Milli-Q e metanolo con un rapporto di 20:80 V/V e pompata ad una portata di 1 mL/min a 25 °C. Il rilevatore UV è stato fissato ad una lunghezza d'onda di rilevamento di 250 nm.

3.3 Risultati e discussioni

In questo lavoro, sono descritti nuovi nanovettori basati su micelle di fosfolipidi PEG-modificati cariche di SPIONs e sorafenib, potenzialmente in grado di trasportate in modo efficiente e selettivo ai siti tumorali il chemioterapico per il trattamento dell'HCC, utilizzando impianti magnetizzabili. Al fine di poter svolgere questa rilevante funzione, è necessario monitorare le dimensioni e la stabilità della carica superficiale della nanostruttura, così come il carico di SPION e di farmaco antitumorale, per ottenere un nanoformulazione con elevata stabilità colloidale in ambiente fisiologico e capacità di essere attratto dal campo

magnetico e penetrare nel tumore o nel sistema vascolare che circonda il tumore, in cui il carico di farmaco deve essere rilasciato. Partendo da questi presupposti, sono state realizzate le SPION/sorafenib/micelle, sfruttando la natura idrofoba della superficie delle SPIONs e, allo stesso tempo, la solubilità in acqua molto scarsa ($\sim 10\text{-}20 \mu\text{M}$) del farmaco antitumorale. La tabella 1 riporta lo schema di realizzazione della nanoformulazione magnetica e terapeutica per potenziali applicazioni.

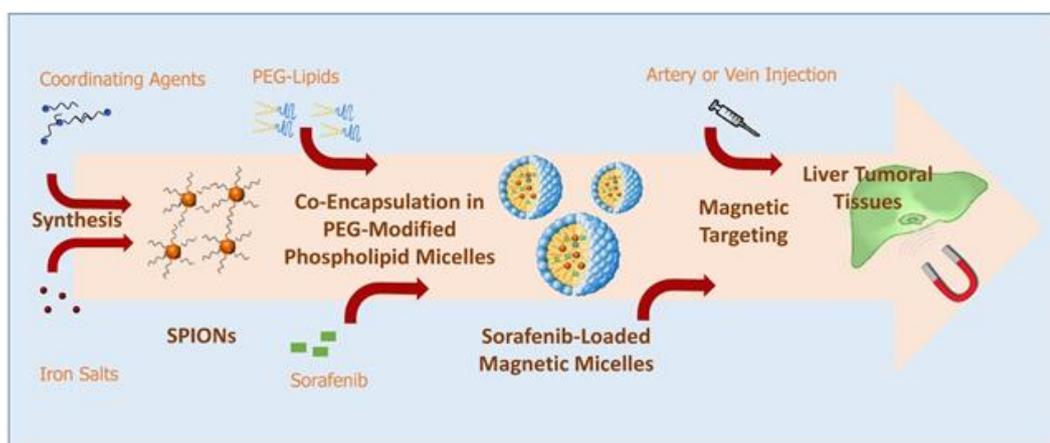


Tabella 1. Schema di preparazione delle micelle fosfolipidiche PEG-modificate caricate con sorafenib e SPIONs e loro possibile applicazione per il targeting magnetico dei tessuti tumorali .*Depalo et al. NanoResearch, accepted January 2017.*

3.3.1 Sintesi e caratterizzazione delle SPION con rivestimento organico

Le SPIONs, sintetizzate seguendo la procedura sperimentale riportata da Buonsanti et al., sono state caratterizzate mediante misure TEM, nonché, analisi SQUID[30]. La micrografia TEM riportata in figura 1A mostra chiaramente SPIONs presentanti una forma sferica o triangolare abbastanza regolare, con un diametro medio di (8.8 ± 0.9) nm. Il pattern di diffrazione a raggi X della polvere di SPIONs riportato da Buonsanti et al. può essere attribuito alla struttura a spinello

cubico sia di $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (maghemite) sia di Fe_3O_4 (magnetite), nonché ad una miscela di entrambe le fasi, impedendo così la loro discriminazione dovuta, anche, all' allargamento di linea significativo[30]. Infatti, il modello di interferenza a frangia delle SPIONs rivelate da immagini TEM ad alta risoluzione è compatibile sia con le fasi di maghemite che con quelle di magnetite[29].

Le proprietà magnetiche delle SPIONs sono state valutate con un magnetometro SQUID. In particolare, le misurazioni SQUID, effettuate a temperatura ambiente, hanno confermato il completo carattere superparamagnetico delle SPIONs sintetizzate. I dati indicano che le proprietà magnetiche delle SPIONs sono appropriate per il loro uso in applicazioni biomediche, soprattutto perché tali SPIONs hanno dimostrato un comportamento magnetico solo in presenza di un campo magnetico esterno applicato.

È stato osservato per queste SPIONs con rivestimento organico un valore di magnetizzazione ad alta saturazione ($M_s = 56,5$ emu/g). I valori RT di magnetizzazione in massa di SPIONs sono 90 emu/g e 74 emu/g per Fe_3O_4 e $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, rispettivamente. Tuttavia, valori di magnetizzazione ridotti sono comunemente osservati in NP di magnetite e maghemite, a causa della curvatura dei momenti magnetici alla superficie delle NP[33]. Inoltre, i valori RT di saturazione di magnetizzazione sono influenzati anche dalle dimensioni delle NP [34]. Poiché i valori sperimentali vanno da 60.5 [35] a 70 emu/g [36] per le NP di magnetite e da 32 [37] fino a 53 emu/g [38] per le NP di maghemite, rispettivamente, il valore di magnetizzazione sperimentale trovato qui, 56.5 emu/g, non permette di discriminare tra le due strutture cristalline di NP magnetiche di ossido di ferro.

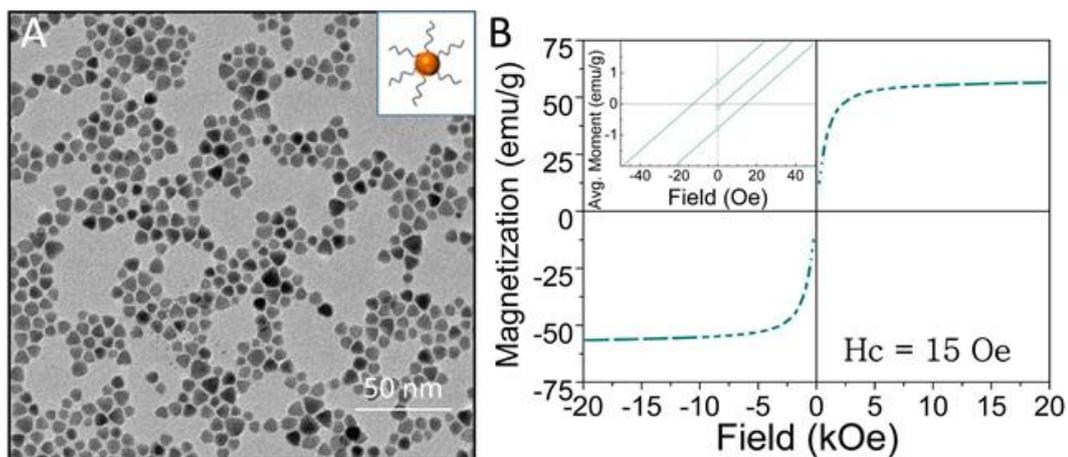


Fig.1. Micrografie TEM (A) e cicli di isteresi RT (B) di SPIONs con rivestimento organico.

3.3.2 Preparazione e caratterizzazione di SPION/micelle

Sono stati condotti degli studi preliminari SPION/micelle ad aumentato contenuto di SPION, al fine di valutare l'effetto del carico magnetico sulla dimensione idrodinamica e sulla distribuzione delle dimensioni delle micelle. Inoltre, sono stati approfonditi la stabilità colloidale in mezzi fisiologici dei nanovettori basati su SPION, così come il loro effettivo comportamento magnetico richiesto in seguito all'applicazione di un adeguato magnete extracorporeo. Le SPION/micelle sono state preparate ad un valore di concentrazione di PEG-PE fisso e variando la percentuale in peso di SPION. Vale a dire, quattro campioni sono stati preparati in una percentuale in peso di SPION di partenza di 16 (a), 20 (b), 24 (c) e 28 % (d), rispettivamente. Uno studio morfologico e strutturale delle SPION / micelle è stata eseguita mediante analisi DLS e TEM. L'analisi DLS ha rivelato una distribuzione monomodale delle dimensioni per i campioni a, b e c, fornendo un diametro idrodinamico di 48 (PDI = 0.193 ± 0.015), 50 (PDI = 0.181 ± 0.007), e 63 nm (PDI = 0.217 ± 0.016), rispettivamente (Fig.2A, linee, rossa, blu e verde, rispettivamente). Viceversa, l'analisi DLS eseguita sul campione d ha portato ad una distribuzione bimodale delle dimensioni, indicando una coesistenza di

aggregati piccoli con aggregati più grandi (Figura 2A, linea viola). In particolare, diametri medi idrodinamici di 51 e 212 nm sono stati registrati per gli aggregati più piccoli e più grandi, rispettivamente ($PDI = 0.379 \pm 0.049$). Pertanto, sono state osservate per il campione a, b, c, alte monodispersività e omogeneità mentre per il campione d si è registrata la formazione di aggregati più grandi in seguito all'elevata concentrazione di partenza delle SPIONs. I valori medi di diametro idrodinamico registrati per tutti i campioni indicano la formazione di aggregati micellari contenenti un numero variabile di SPIONs raggruppati in unica micella. Tale ipotesi è stata confermata definitivamente dalle indagini TEM. Le micrografie TEM, con colorazione positiva e negativa, del campione b, che, dall'analisi DLS, è risultato essere il campione più monodisperso tra quelli esaminati, hanno evidenziato la formazione di micelle PEG-PE contenenti ciascuna non solo uno SPION, bensì aggregati formati da più SPIONs, da 30 a 100 nm (Fig. 2 B e C).

I risultati delle misurazioni di potenziale-zeta hanno indicato una complessiva alta stabilità colloidale dei campioni, risultando in un valore di ζ potenziale di (-25 ± 1) mV (Fig. 2 D). Inoltre, è prevedibile che le catene idrofile di PEG esposte alla superficie delle micelle determinino una stabilizzazione sterica delle micelle in aggiunta a quella elettrostatica, portando quindi a proprietà di stealth per il sistema.

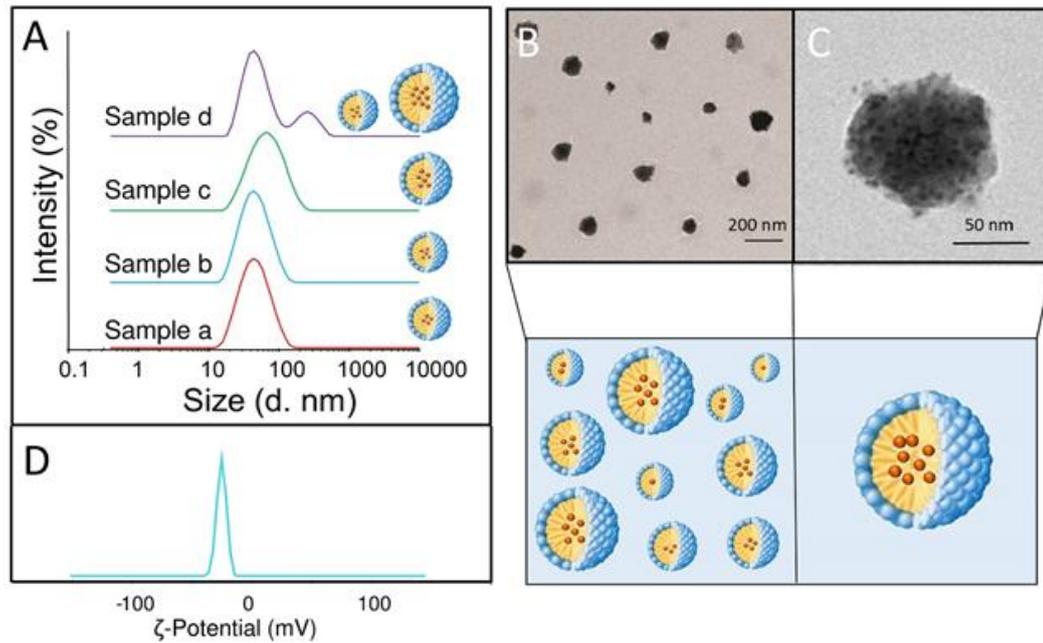


Fig.2. Distribuzione delle dimensioni (Size) ottenuta mediante DLS dei campioni di SPION/Micelle preparati a partire da % in peso di SPION di 16% (a), 20% (b), 24% (c) e 28% (d) (A). Micrografie TEM ottenute con colorazione positiva (B) e negativa (C), rispettivamente, per il campione con il 20% in peso di SPION (b) disperso in PBS con i corrispondenti sketches delle SPIONs incapsulate nel core idrofobico delle micelle PEG-PE. Misure di ζ -potenziale degli stessi campioni dispersi in PBS (D).

Le misurazioni SQUID, effettuate a temperatura ambiente, hanno confermato il completo carattere superparamagnetico delle SPIONs dopo la loro incorporazione nelle micelle, dimostrando così che il loro incapsulamento permette di conservare le loro proprietà superparamagnetiche. Questo risultato è particolarmente importante per future applicazioni *in vivo*, poiché le micelle cariche di SPIONs possono essere magneticamente direzionate, senza tuttavia presentare alcuna interazione magnetica residua alla temperatura corporea, e in ultimo prevenendo o comunque limitando sensibilmente la loro agglomerazione. Infatti, tale caratteristica permette, in linea di principio, alle SPION/micelle

sintetizzate, di rimanere in circolo dopo l'iniezione e di attraversare i sistemi capillari di organi e tessuti evitando embolia vasale e trombosi. È interessante notare, che le misure magnetiche RT dinamiche in funzione della frequenza (dati non riportati), hanno confermato i risultati ottenuti mediante analisi TEM e DLS. Una formula numerica, basata sul modello magnetico precedentemente riportato [39], ha portato infatti, ad un diametro medio delle SPION/micelle in soluzione di circa 80 nm. Inoltre, i cicli RT di isteresi magnetica, mostrati nella Figura 3 A, eseguiti sui quattro diversi campioni (a, b, c, d), sono stati confrontati con i risultati ottenuti per le SPIONs da sole (Figura 1 B) e ciò ha permesso di calcolare l'effettiva quantità di SPIONs incorporata nei diversi campioni di PEG-micelle. I risultati di tali calcoli basati sulle misurazioni SQUID dei differenti campioni di SPION/micelle sono riassunti nella figura 3 B. I valori di contenuto di SPION espressi come % in peso, ottenuti dalle misure magnetiche e riportati in Tabella B (figura 3) appaiono in effetti superiori a quelli calcolati teoricamente come rapporto tra il peso iniziale di SPION ed il peso totale del campione (16, 20, 24 e 28 %). Tale risultato può essere ragionevolmente spiegato tenendo conto che i cicli di ultracentrifugazione eseguiti sui campioni dopo la formazione delle micelle, portano all'eliminazione delle micelle vuote che rimangono disperse nel supernatante (vedere Sezione Sperimentale). Pertanto, il contenuto lipidico generale, e di conseguenza il peso totale dei campioni diminuisce, determinando un effettivo peso% di SPION superiore a quello teoricamente previsto nei campioni di partenza. È interessante notare che l'analisi magnetica si è rivelata uno strumento estremamente efficace e non distruttivo per valutare rapidamente e con accuratezza la quantità effettiva di SPIONs nelle nanoformulazioni a base di lipidi.

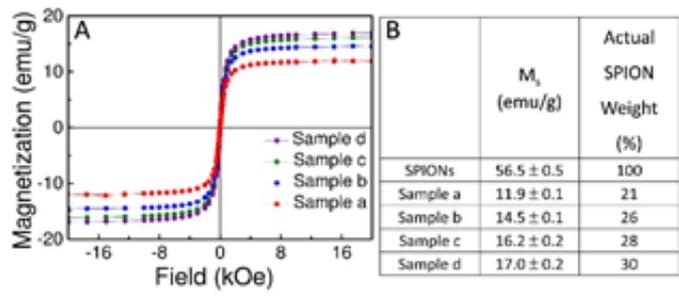


Fig.3. Cicli di isteresi RT delle SPION/micelle con carico crescente di SPION. In particolare, il contenuto di partenza di SPION è 16 (a), 20 (b), 24 (c) e 28 (d) % in peso, rispettivamente (A). Contenuto effettivo di SPION in % in peso nei quattro differenti campioni di SPION/micelle come calcolato dai valori di magnetizzazione di saturazione RT (M_s) (B).

3.3.3 Simulazioni di targeting magnetico in un sistema a flusso capillare *in vitro*

Un problema fondamentale nel delivery magnetico è rappresentato dalla capacità delle SPIONs di rimanere effettivamente confinate in regioni target del corpo contrastando il flusso di sangue che tende a portarle via. Pertanto, il comportamento delle SPION/micelle è stato studiato utilizzando un sistema *in vitro*, appositamente progettato per simulare la portata del flusso sanguigno nel fegato. In particolare, è stato specificamente sviluppato un circuito dinamico composto da un vaso di accumulo, una pompa peristaltica, un flussometro digitale, un sensore di pressione differenziale, un sistema di accumulo magnetico e un supporto per i campioni (Fig.4). In un tale sistema di accumulo, una NP magnetica, in un fluido dinamico, sottoposta ad velocità fissa di flusso e ad un campo magnetico statico, prova una forza magnetica attrattiva definita come :

$$F_M = V_{NP} \cdot \chi_{NP} \cdot H(x) \cdot \frac{\partial H}{\partial z}$$

dove V_{NP} è il volume delle NP, χ_{NP} è la suscettibilità magnetica (correlata con la magnetizzazione) delle NP, $H(x)$ è il campo magnetico a distanza x dal magnete e $(\partial H / \partial z)_x$ è il gradiente del campo magnetico nella direzione del flusso.

È, quindi, evidente che per una grande forza magnetica che agisce su una NP, è necessario un grande valore del prodotto $H(x) \cdot (\partial H / \partial z)_x$. Poiché il flusso è perpendicolare alla forza magnetica, la velocità di flusso interferirà con la forza di attrazione del magnete, ad esempio portate maggiori corrisponderanno ad un ridotto numero di nanovettori magnetici catturati dal campo magnetico.

Quindi, è stata progettata ed utilizzata una configurazione magnetica formata da quattro anelli magnetici permanenti di NdFeB con diametro interno di 4 mm e diametro esterno di 20 mm separati da anelli polimerici non magnetici. Tale configurazione permette di aumentare il numero delle zone di cattura all'interno del capillare di vetro (Figura 5B) introdotto negli anelli, cioè il numero di zone dove il prodotto $H(x) \cdot (\partial H / \partial z)_x$ è massimo.

Le SPION / micelle (campione b) sono state disperse in una soluzione fisiologica a pH 7.4 ad una concentrazione di 80 mg/L. La velocità di cattura degli anelli magnetici NdFeB ($B = 1.27$ Tesla) della definita configurazione, è stata testata con due diverse velocità di flusso, ovvero 100 e 50 mL/min, per la circolazione della soluzione nel modello di sistema di flusso capillare. Dopo otto ore, è stato riscontrato che una quantità corrispondente al 28% delle micelle magnetiche iniziali era stata catturata sotto un flusso di 50 mL/min, come valutato mediante analisi ICP-AES (Figura 5B). Tale valore è stato osservato diminuire leggermente fino al 23% al massimo flusso investigato di 100 mL/min, come ragionevolmente atteso (dati non riportati). Il proposto modello *in vitro* è stato chiaramente progettato solo per imitare le caratteristiche di base dei vasi sanguigni poiché vi

sono numerosi altri fattori che possono influenzare il targeting magnetico, incluse le proprietà meccaniche e di superficie della parete del vaso sanguigno. Pertanto, poiché il flusso *in vivo* delle micelle nel fegato, potrebbe essere sicuramente influenzato da molti ostacoli in forma di cellule e componenti della matrice extracellulare, è stato proposto ed utilizzato per simulare un tessuto organico un secondo modello di sistema comprendente invece, un tubo di vetro più grande (8 mm di diametro interno) completamente riempito di sfere di vetro con diametro da 0.8 a 1 mm (frazione vuota di circa 0.5 (Fig.4 C). Una velocità di flusso di 50 mL/min, è stata identificata come ottimale per la configurazione dinamica indagata sotto condizioni specifiche. Una simile configurazione dei quattro anelli magnetici permanenti di NdFeB è servita per la circolazione dinamica delle micelle. In questo caso (Fig.5A), dopo ore si è registrato un accumulo del 32% di micelle catturate, calcolato sulla base dei risultati della analisi elementare ICP-AES. Il registrato miglioramento nel tasso di cattura può essere ragionevolmente correlato alla maggiore resistenza delle SPION/micelle dovute all'attrito con la superficie delle sfere di vetro nel canale, che, influenzando la velocità di flusso all'interno del serbatoio di accumulo, promuove ulteriormente la cattura magnetica. Questi esperimenti hanno evidenziato, in primo luogo l'effetto della velocità di flusso sul grado di cattura delle SPION/micelle e, in aggiunta l'aumento della cattura nel più realistico tessuto biologico "simulato".

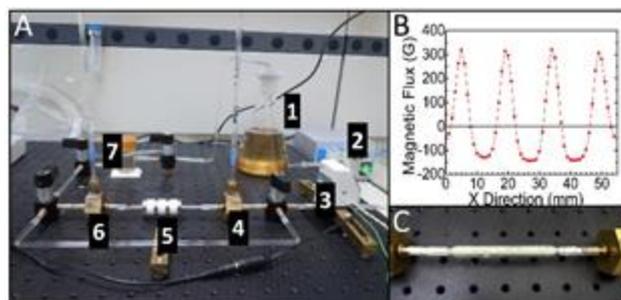


Fig.4 Figura del circuito dinamico con (1) vaso di accumulo, (2) pompa peristaltica, (3) flussimetro digitale, (4,6) sensori di pressione differenziale, (5) sistema di accumulo magnetico, (7) alloggiamento dei campioni (A). Gradiente del campo magnetico con la direzione del flusso (X Direction) (B). Simulazione del tessuto organico prima della circolazione del fluido magnetico (C). *Depalo et al. NanoResearch, accepted January 2017.*

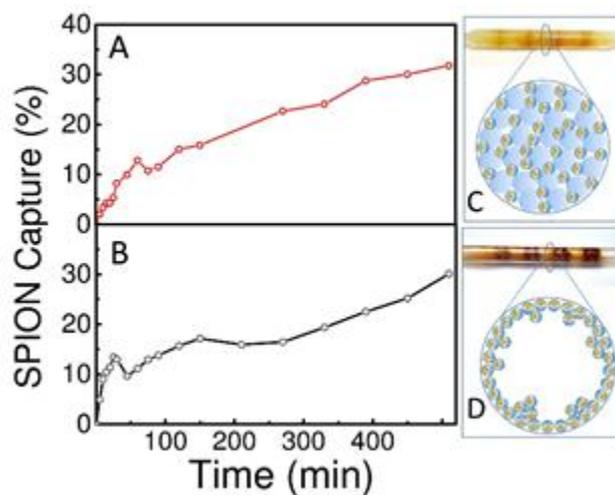


Fig. 5. Quantità (espressa come percentuale del contenuto iniziale) di SPION/micelle catturate in una simulazione di tessuto organico (A) e nel modello di sistema di flusso capillare (B), rispettivamente. Immagine del capillare di vetro riempito con sfere di vetro (C) e del capillare di vetro vuoto (D) con il loro

corrispondente disegno schematico dopo la circolazione della soluzione contenente SPION/micelle e rimozione dei magneti ad anello di NdFeB.

3.3.4 Preparazione e caratterizzazione di SPION/sorafenib/micelle

La successiva fase del lavoro è stata rappresentata dal co-incapsulamento sia delle SPIONs che sorafenib nel *core* micellare idrofobico.

In particolare, è stato studiato l'effetto di carico del farmaco sulla efficienza di incapsulamento, essendo tale parametro definito come la quantità (w/w %) di sorafenib incapsulato rispetto alla quantità iniziale utilizzata nella preparazione della nanoformulazione. La quantità di farmaco catturata nelle micelle è stata quantificata mediante analisi HPLC.

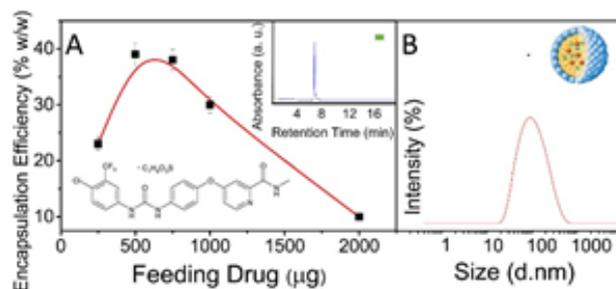


Fig.6. Efficacia di incapsulamento del farmaco nelle micelle PEG-PE come funzione del carico di sorafenib calcolata mediante analisi HPLC (A). Cromatogramma HPLC ottenuto dal sorafenib puro mediante assorbimento UV a 250 nm (Riquadro A). Distribuzione delle dimensioni ottenute mediante DLS delle SPION/sorafenib/micelle preparate a partire da un 20% in peso iniziale di SPION e 1 mg di sorafenib (B).

Inizialmente, nella preparazione micelle un aumento della quantità iniziale di sorafenib ad una prefissata quantità in peso di SPION (20%), ha comportato un incremento della quantità di farmaco incapsulato, come valutato dai valori di efficienza di incapsulamento (Fig.6). I risultati ottenuti hanno suggerito che,

sebbene l'efficienza di incapsulamento raggiunga il valore massimo (40%) quando il farmaco utilizzato è di 500 mg, con un carico effettivo di 150 μM , in realtà il più alto carico (235 μM) nella nanoformulazione risultante è stato osservato con un caricamento di sorafenib iniziale di 1 mg.

Tuttavia, quando la quantità iniziale di farmaco aggiunta è stata superiore a 1 mg, anche la quantità della precipitazione macroscopica che si verifica durante la preparazione delle micelle è aumentata. Di conseguenza, questa precipitazione macroscopica ha contribuito a diminuire il carico. L'analisi DLS ha rivelato una distribuzione omogenea e monomodale delle dimensioni delle SPION/sorafenib/micelle, con un diametro idrodinamico medio di 125 nm (PDI = 0.370 ± 0.025).

Inoltre, il valore di potenziale ζ di (-25 ± 2) mV è risultato in accordo con il valore ottenuto per le SPION/micelle, dimostrando quindi un'efficace incorporazione del sorafenib e delle SPIONs nel *core* idrofobico delle micelle ed evidenziando nuovamente l'elevata stabilità colloidale delle micelle in soluzione acquosa, requisito essenziale per eseguire *in vitro* e *in vivo*.

3.3.5 Esperimenti di citotossicità *in vitro*

Gli effetti citotossici delle SPION/sorafenib/micelle sulla linea di cellule di carcinoma epatico umano, vale a dire HepG-2, sono stati valutati eseguendo il saggio MTT di tossicità *in vitro* dopo una esposizione a lungo termine delle cellule, ed è stata infine valutata con il saggio MTT.

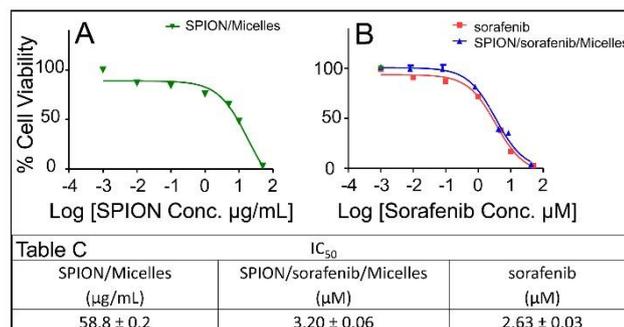


Fig.7. Risultati di vitalità cellulare delle HepG-2 dopo incubazione per 72h con SPION/micelle (A) o SPION/sorafenib/micelle, (B, linea blu) o sorafenib puro (B, linea rossa), rispettivamente. I valori di IC₅₀, risultanti dagli stessi saggi di vitalità, espressi come concentrazione di SPION per le SPION/micelle e come concentrazione di sorafenib per le SPION/sorafenib/micelle e per il sorafenib puro. I dati sono presentati come media±errore standard di tre distinti esperimenti eseguiti in triplicato (Tabella C).

La capacità del sorafenib libero di interferire con la vitalità cellulare è stata stimata utilizzando cellule non trattate come controllo. Inoltre, l'effetto delle SPION/micelle sulla vitalità cellulare è stato preliminarmente valutato, al fine di escludere il contributo alla citotossicità delle SPION/micelle, e quindi considerarlo specificamente riconducibile al farmaco antitumorale caricato nelle SPION/sorafenib/micelle (Fig.7). In particolare, le cellule HepG-2 sono state incubate per 72 h con le SPION/micelle a valori di concentrazione di SPION da 300 a 0.06 mg/mL (Fig.7A). Il valore IC₅₀ registrato è stato di 58.8±0.2) mg/mL in termini di concentrazione di SPION (Fig.7, Tabella C). Lo studio di citotossicità ha indicato che la vitalità delle cellule HepG-2 è stata solo minimamente influenzata dopo 72 h di incubazione dalle micelle senza sorafenib. Viceversa, lo studio di citotossicità eseguito con le SPION/sorafenib/micelle nelle stesse condizioni sperimentali testate per le SPION/micelle (72 h, con una concentrazione di SPION da 300 a 0.06 mg/mL) e valori di concentrazione di

sorafenib da 50 a 0.01 μM , ha rivelato maggiori effetti citotossici, concentrazione del farmaco dipendenti, sulle cellule HepG-2 (Fig.7 B, linea blu). In particolare, i valori di IC_{50} , espressi in funzione della concentrazione di sorafenib, è stato di $(3.20 \pm 0.06) \mu\text{M}$ ad una concentrazione di SPION di 22.38 mg/mL (Fig.7, Tabella C). Pertanto, l'effetto tossico delle SPION/sorafenib/micelle sulla vitalità cellulare è imputabile principalmente alla presenza dell'agente chemioterapico nella nanoformulazione, poiché lo studio di citotossicità eseguito sulle SPION/micelle aveva indicato che la concentrazione di SPION di 22.38 mg /mL non influenzava la vitalità delle HepG-2. Coerentemente, i valori di IC_{50} registrati per le SPION/sorafenib/micelle ha portato a valori abbastanza paragonabili a quelli ottenuti con l'incubazione delle cellule HepG-2 con sorafenib puro per 72 h, vale a dire $(2.63 \pm 0.03) \mu\text{M}$ (Fig.7B, linea rossa e tabella C). Questa prima serie di risultati sperimentali ha quindi evidenziato che l'attività antitumorale del sorafenib è ancora completamente conservata una volta inserito nei *core* idrofobici micellari.

3.3.6 Effetto del targeting magnetico sull'uptake cellulare delle SPION/micelle

Preliminarmente alla valutazione dell'effetto della esposizione delle cellule al campo magnetico sulla vitalità delle stesse e sull'uptake cellulare delle SPION/sorafenib/micelle, due distinti magneti di NdFeB con lo stesso valore di induzione magnetica ($B = 1.17$ Tesla), ma con una forma diversa, sono stati testati al fine di identificare la geometria del magnete più adatta per garantire il massimo uptake cellulare. In particolare, un magnete ad anello ed uno a forma quadrata, rispettivamente, le cui mappe di campo magnetico sono illustrate nella figura 8 A e B, sono stati, alternativamente, posizionati esternamente sul fondo della piastra Petri. Le cellule HepG-2 trattate nelle stesse condizioni sperimentali, incubate con le SPION/micelle, alla concentrazione in SPION di 60 mg/mL, per 4 e 24 h, senza esposizione al campo magnetico, sono state utilizzate come riferimento, mentre il controllo è stato rappresentato da cellule non trattate. L'uptake cellulare delle

SPION/micelle, verificatosi con e senza esposizione delle cellule al campo dei due differenti magneti, è stato determinato in termini di contenuto di ferro, mediante analisi ICP-MS. I dati riportati nella Tabella C della figura 8 mostrano chiaramente che l'esposizione al campo magnetico ha fortemente aumentato l'internalizzazione delle SPION/micelle nelle cellule HepG-2 in entrambi i tempi di incubazione esplorati. Inoltre, è stato riscontrato che il magnete ad anello è quello che possiede la geometria più idonea per promuovere un internalizzazione più efficiente di SPION/micelle nelle cellule HepG-2, già dopo 4 h di incubazione.

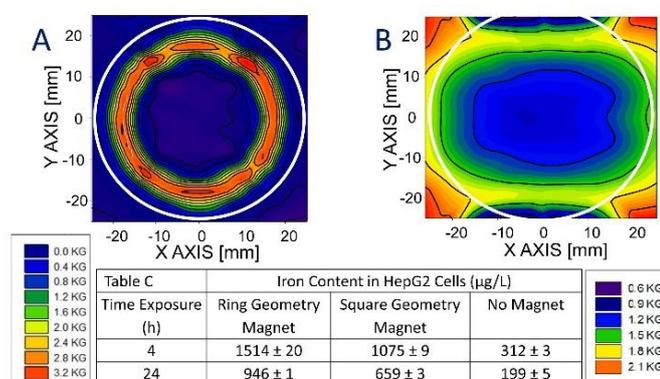


Fig.8. Rappresentazione grafica delle mappe di flusso magnetico dei magneti utilizzati per la valutazione dell' uptake da parte delle cellule HepG-2 delle SPION/micelle, generate utilizzando un magnete ad anello (A) e un magnete quadrato (B). Contenuto di ferro determinato mediante analisi ICP-MS in cellule di cancro al fegato HepG-2 dopo la loro incubazione per 4 h e 24 h, con SPION/micelle senza applicazione del campo magnetico e sotto l'esposizione ad un magnete ad anello o un magnete quadrato (Tabella C).

Da un punto di vista qualitativo, la conferma dell'effettiva internalizzazione cellulare delle SPION/micelle da parte delle cellule HepG-2 è stata ottenuta utilizzando la colorazione con blu di Prussia colorazione blu e la microscopia ottica. Lo studio *in vitro* è stato effettuato incubando le cellule HepG-2 con le

SPION/micelle a concentrazione di SPION di 60 mg/mL per 4 h, esponendole o meno al campo magnetico generato dal magnete a forma di anello, (che è stato dimostrato più efficace nell'indurre un maggiore uptake cellulare che rispetto al magnete quadrato).

L'esperimento di colorazione con blu di Prussia mostrato in figura 9, ha sottolineato che il grado di internalizzazione cellulare delle SPION/micelle è fortemente dipendente dalla presenza del campo magnetico. In particolare, le cellule mostrano una più intensa colorazione blu quando incubate con le SPION/micelle ed esposte al campo magnetico (Fig. 9 B), mentre le macchie blu nelle cellule trattate con le SPION/micelle nelle stesse condizioni ma in assenza di campo magnetico, sono state trovate significativamente meno intense (Fig. 9).

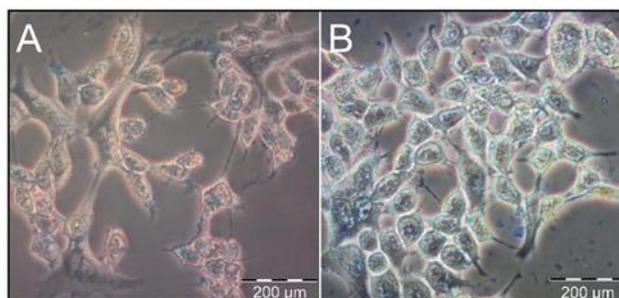


Fig.9. Immagini di colorazione con blu di Prussia delle cellule HepG-2 dopo 4 h di incubazione con SPION/micelle (concentrazione SPION di 60µg/mL) senza (A) e con (B) esposizione al magnete con geometria ad anello.

Tale test è stato in grado di dimostrare ulteriormente, da un punto di vista qualitativo, come il targeting magnetico sia in grado di promuovere un maggiore uptake cellulare, confermando i risultati quantitativi ottenuti mediante analisi ICP (Fig.8, Tabella C). Tuttavia è stato osservato un calo nella concentrazione di ferro intracellulare in seguito a trattamento per 24 h (Fig.8, Tabella C). Tale diminuzione può essere ragionevolmente attribuita al fatto che, dopo 24 ore di incubazione delle cellule con SPION/micelle, si può verificare in una certa misura

la morte cellulare, suggerendo un effetto citotossico intrinseco della formulazione testata. In effetti, lo studio di uptake è stato effettuato ad una concentrazione in termini di SPION di 60 mg/mL, che è il valore di IC50 ottenuto per le cellule trattate con le SPION/micelle per 72 h. Inoltre, lo studio di citotossicità, effettuato su cellule HepG-2 trattate con SPION/micelle, a concentrazioni di SPION nel ragen 0.6-60 mg/mL per 72 h, con e senza esposizione delle cellule al campo magnetico, ha indicato che la presenza del campo magnetico non induce un aumento nella tossicità delle cellule trattate con le SPION/micelle (Fig.10a), essendo i valori di vitalità cellulare registrati per le cellule esposte al campo magnetico, paragonabili a quelli delle cellule non esposte. Pertanto, la presenza di un campo magnetico promuove una maggiore internalizzazione di SPION/micelle da parte delle cellule, ma non produce alterazioni nella vitalità cellulare. La diminuzione della vitalità cellulare osservata dopo 72 h a concentrazione di SPION di 60 mg/mL (Figura 10 A) ha suggerito che la vitalità cellulare possa ridursi già dopo 24 h, causando una perdita parziale delle SPIONs accumulate nelle cellule morte, traducendosi così in un contenuto di ferro finale inferiore a quello riscontrato dopo 4 h (Fig. 8).

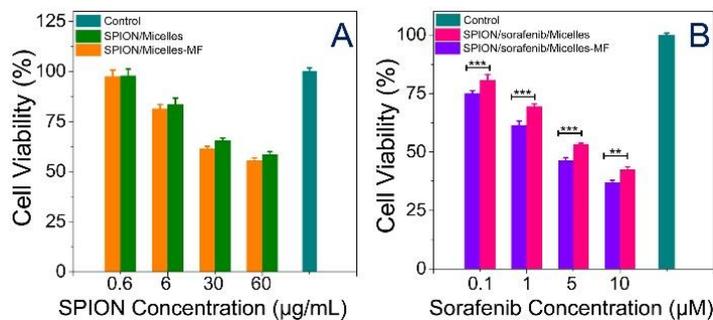


Fig.10. La vitalità cellulare delle cellule HepG-2 dopo 72 h di incubazione con SPION- Micelle direzionate o non direzionate da un campo magnetico. (A) % di vitalità cellulare delle cellule HepG-2 dopo incubazione con SPION/sorafenib/micelle (0.1-10 µM in termini di concentrazione di sorafenib e

0.06 al 60 mg/mL in termini di SPION) in presenza e in assenza di un campo magnetico. Ciascun composto è stato testato in triplicato, e gli esperimenti sono stati ripetuti tre volte. La significatività statistica è stata calcolata usando l'analisi a due vie della varianza (ANOVA) seguita dal post hoc test di Bonferroni (GraphPad Prism vers. 5). * = $P < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0,001$ (B).

Il calo della vitalità cellulare osservato, concentrazione di SPION dipendente, può essere ragionevolmente spiegato ipotizzando che, dopo la loro internalizzazione cellulare, le SPION/micelle possono rilasciare il loro contenuto originario di SPIONs in esse contenute. Queste, perdendo ioni ferro, possono indurre stress ossidativo tramite generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), attraverso trasferimento di energia o di elettroni all'ossigeno molecolare [27,40]. Chiaramente, l'effetto sulla vitalità cellulare è stato maggiore alle concentrazioni di SPION più alte testate.

3.3.7 Targeting magnetico ed efficacia antitumorale di SPION/sorafenib/Micelle

L'efficienza antitumorale del sorafenib, quando rilasciato per mezzo di targeting magnetico e incorporato nel sistema micellare, è stato studiato valutando la vitalità cellulare dopo incubazione delle cellule HepG-2 per 72 h con le SPION/sorafenib/micelle in presenza del campo magnetico. Il sorafenib è stato testato in un range di concentrazioni comprese da 0.1 a 10 μM , corrispondenti a concentrazioni di SPION variabili da 0.06 a 60 mg/mL.

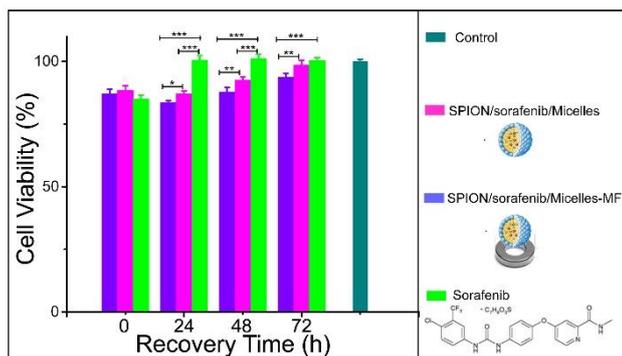


Fig.11. La vitalità cellulare delle cellule HepG-2 misurata dopo incubazione per 4 h con diverse formulazioni 10 μ M in sorafenib e 60 mg /mL in SPIONs, esposte o non esposte al campo magnetico (MF).

Come controllo, sono state utilizzate cellule non trattate. I risultati riportati in figura 10 B mostrano che le SPION/sorafenib/micelle hanno influenzato la vitalità cellulare in modo concentrazione dipendente, ed i valori di vitalità ottenuti per le cellule esposte al campo magnetico sono stati leggermente inferiori a quelli registrati per le cellule trattate con SPION/sorafenib/micelle, ma non esposte al campo magnetico. Come già dimostrato, la vitalità cellulare nelle cellule trattate con le SPION/micelle, testate nelle stesse condizioni sperimentali, è paragonabile sia che sia registrata in presenza che in assenza del campo magnetico, sebbene l'esposizione al campo magnetico induca un maggior uptake intracellulare.

Pertanto, il farmaco co-incapsulato con le SPIONs nelle micelle può essere considerato responsabile della citotossicità, registrata nelle stesse condizioni sperimentali delle cellule trattate con SPION/sorafenib/micelle ed esposte al campo magnetico, che è stata trovata superiore a quella osservata per le cellule incubate ma non esposte al campo magnetico.

L'elevata internalizzazione cellulare delle SPION/sorafenib/micelle, dovuta all'esposizione delle cellule al campo magnetico, ha un impatto significativo, in quanto permette l'accumulo di una dose di sorafenib maggiore nelle cellule,

favorendo così un migliorato effetto antitumorale del farmaco quando magneticamente direzionato e rilasciato dai nanovettori lipidi magnetici qui esplorati.

Infine, è stata studiata la maggiore efficacia antitumorale delle SPION/sorafenib/micelle magneticamente direzionate rispetto al farmaco libero da solo, incubando le cellule HepG-2 con le SPION/sorafenib/micelle ad una concentrazione in sorafenib di 10 μ M (concentrazione in SPION 60 mg/mL) per 4 h esposte o non esposte al campo magnetico indotto dal magnete ad anello. Successivamente, il terreno di coltura contenente le micelle è stato sostituito con un terreno fresco. Nel caso delle cellule trattate ed esposte al campo magnetico, l'anello magnetico è stato rimosso dopo l'incubazione di 4 h con le SPION/sorafenib/micelle. Dopo la rimozione del terreno contenente le micelle, le cellule sono state lasciate in coltura per ulteriori 24, 48 e 72 h, rispettivamente, prima di testare i possibili effetti del farmaco e valutare la vitalità cellulare. Le cellule trattate nelle stesse condizioni sperimentali con il sorafenib da solo, sono state utilizzate come riferimento (Fig.11). Subito dopo l'incubazione delle cellule con le SPION/sorafenib/micelle (esposte o non esposte al campo magnetico) o il sorafenib da solo, per 4 h, i valori della vitalità cellulare sono stati trovati paragonabili a quelli registrati al tempo 0. Questa prova, della mancanza di qualsiasi differenza rilevabile nella morte cellulare indotta da farmaci incapsulati nei nanovettori lipidici magnetici rispetto a quella indotta dal sorafenib libero, può essere ragionevolmente giustificata da una lenta cinetica di rilascio del farmaco dalle SPION/sorafenib/micelle, come riscontrato anche da Fang et al. per le cellule C6-ADR trattate con SPIONs caricate con doxorubicina [41]. È interessante notare che, una volta che il farmaco libero è stato rimosso e le cellule sono state incubate con mezzo fresco per 24 h, le cellule hanno ripreso a crescere come prima dell'esposizione al farmaco. Al contrario, le cellule trattate con le SPION/sorafenib/micelle hanno mostrato valori di vitalità cellulare, registrati dopo

rimozione delle SPION/sorafenib/ micelle e 24 h di ulteriore incubazione delle cellule con terreno di coltura fresco, di $(83.5\pm 0.8)\%$ e $(87.1\pm 2.2)\%$, per le cellule esposte e non esposte al campo magnetico.

La vitalità cellulare inferiore osservata per le cellule trattate con le SPION/sorafenib/micelle esposte al campo magnetico rispetto a quelle non esposte al campo magnetico, può essere attribuita sicuramente alla maggiore diffusione intracellulare delle micelle contenenti SPIONs quando magneticamente direzionate nelle cellule (Fig.11). Dopo 48 h di incubazione con terreno di coltura fresco, le cellule trattate con le SPION/sorafenib/micelle hanno cominciato a recuperare e crescere. Il processo di recupero delle cellule è risultato evidente dopo 72 h. Questo comportamento suggerisce che il profilo di rilascio di sorafenib dalle SPION/sorafenib/micelle è in grado di mantenere la concentrazione di farmaco intracellulare più a lungo termine rispetto al trattamento con il sorafenib da solo e che il loro uptake magneticamente direzionato permette una internalizzazione più efficiente delle SPION/sorafenib/micelle nelle cellule, determinando così un maggior effetto citotossico ed infine ottenendo un'efficienza antitumorale significativamente superiore a quella presentata dal farmaco da solo. Quest'ultima osservazione è stata confermata da un ulteriore esperimento di recovery, effettuato incubando le cellule HepG-2 con le SPION/sorafenib/micelle a concentrazione in sorafenib di $10\ \mu\text{M}$ per 24 h, esposte o meno al campo magnetico, e valutando la vitalità cellulare dopo 72 h dalla rimozione delle micelle. Come atteso, i valori della vitalità cellulare sono stati trovati inferiori per le cellule trattate con le SPION/sorafenib/micelle esposte al campo magnetico rispetto a quelle non esposte, cioè di $(72.5\pm 2,1)\%$ vs $(80.2\pm 1.5)\%$, evidenziando così ulteriormente una maggiore attività antitumorale delle nanoformulazioni preparate per il direzionamento magnetico.

3.4 Conclusioni

Nanoformulazioni basate su micelle lipidiche PEG-modificate cariche di SPIONs e sorafenib sono state progettate e realizzate sfruttando una strategia semplice e riproducibile che ha permesso di ottenere nanovettori magnetici caratterizzati da una significativa elevata stabilità in ambiente acquoso e un controllo accurato sul caricamento del farmaco. La caratterizzazione magnetica non solo ha confermato il successo dell'incapsulamento delle SPIONs nel *core* delle micelle, ma decisamente, si è anche dimostrata uno strumento estremamente efficace per determinare la quantità effettiva di NP magnetiche nella formulazione. La progettazione e l'applicazione del circuito dinamico *in vitro* simulante la velocità del flusso ematico nel fegato, ha sicuramente dimostrato che le SPION/micelle erano trattenute efficientemente utilizzando un campo magnetico, risultando quindi potenzialmente in grado di essere magneticamente direzionate ai siti tumorali sotto le condizioni di flusso tipicamente presenti nel fegato umano.

Uno studio sistematico sulla risposta *in vitro* delle cellule HepG-2 trattate con SPION/ sorafenib/micelle, sia esposte che non esposte al campo magnetico, ha fornito informazioni rilevanti sulla loro tossicità. Sono state valutate anche gli effetti citotossici del sorafenib libero e delle SPION/micelle per indagare i possibili fattori che influenzano specificamente la vitalità cellulare. I risultati sperimentali hanno dimostrato che l'attività antitumorale del sorafenib è ancora completamente conservata in seguito ad incapsulamento nei *core* micellari idrofobici, e che la presenza del campo magnetico promuove un'internalizzazione cellulare maggiore di SPION/micelle, senza tuttavia pregiudicare la vitalità cellulare. Infine, gli esperimenti di recovery hanno messo in evidenza la presenza nelle cellule, di una cinetica di rilascio di sorafenib più lenta nel caso di quelle trattate con SPION/sorafenib/micelle rispetto a quelle trattate con sorafenib libero. E' stata trovata un'efficacia antitumorale decisamente superiore delle SPION/sorafenib/micelle magneticamente direzionate. Le micelle PEG-PE

ottenute hanno permesso una valida combinazione del farmaco con nanovettori magnetici a base di NP in un nanoformulatione versatile che può essere opportunamente guidata verso i tessuti tumorali, e che potrebbe avere un forte impatto sulla terapia dell' HCC con direccionamento magnetico.

Bibliografia

- [1] Villanueva, A.; Llovet, J. M. Targeted Therapies for Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2011, 140, 1410–1426.
- [2] Goodwin, S. C.; Bittner, C. A.; Peterson, C. L.; Wong, G. Single-Dose Toxicity Study of Hepatic Intra-arterial Infusion of Doxorubicin Coupled to a Novel Magnetically Targeted Drug Carrier. *Toxicol. Sci.* 2001, 60, 177-183.
- [3] Deng, G. L.; Zeng, S.; Shen, H. Chemotherapy and target therapy for hepatocellular carcinoma: New advances and challenges. *World J. Hepatol.* 2015, 7, 787–798.
- [4] El-Serag, H. B.; Marrero, J. A.; Rudolph, L.; Reddy, K. R. Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2008, 134, 1752-1763.
- [5] Azzariti, A.; Porcelli, L.; Quatrone, A. E.; Paradiso, A.; Giannelli, G. Sorafenib effectiveness is inhibited in presence of Laminin-5 in HCC Cells. *Journal of Hepatology*. 2012, 56, S71–S224.
- [6] Kumar, A.; Jena, P. K.; Behera, S.; Lockey, R. F.; Mohapatra, S.; Mohapatra, S. Multifunctional magnetic nanoparticles for targeted delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2010, 6, 64–69.
- [7] Valente, G.; Depalo, N.; de Paola, I.; Iacobazzi, R. M.; Denora, N.; Laquintana V.; Comparelli, R.; Altamura, E.; Latronico, T.; Altomare, M.; Fanizza, E.; Striccoli, M.; Agostiano, A.; Saviano, M.; Del Gatto, A.; Zaccaro, L.; Curri, M. L. Integrin-targeting with peptide-bioconjugated semiconductor-magnetic nanocrystalline heterostructures. *Nano Research*. 2016, 9, 644–662.
- [8] Fanizza, E.; Iacobazzi, R. M.; Laquintana, V.; Valente, G.; Caliandro, G.; Striccoli, M.; Agostiano, A.; Cutrignelli, A.; Lopodota, A.; Curri, M. L.; Franco, M.; Depalo, N.; Denora, N. Highly selective luminescent nanostructures for mitochondrial imaging and targeting. *Nanoscale*. 2016, 8, 3350-3361.
- [9] Laquintana, V.; Denora, N.; Lopalco, A.; Lopodota, A.; Cutrignelli, A.; Lasorsa, F. M.; Agostino, G.; Franco, M. Translocator protein ligand-plga conjugated nanoparticles for 5-fluorouracil delivery to glioma cancer cells. *Mol. Pharm.* 2014, 11, 859-871.
- [10] Denora, N.; Cassano, T.; Laquintana, V.; Lopalco, A.; Trapani, A.; Cimmino, C.S.; Laconca, L.; Giuffrida, A.; Trapani, G. Novel codrugs with GABAergic activity for dopamine delivery in the brain. *Int. J. Pharm.* 2012, 437, 221-231.
- [11] Prijic, S.; Sersa, G. Magnetic nanoparticles as targeted delivery systems

in oncology. *Radiol. Oncol.* 2011, 45, 1-16.

[12] Arruebo, M.; Fernández-Pacheco, R.; Ibarra, M. R.; Santamaría, J. Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Nanotoday.* 2007, 2, 22-32.

[13] Veiseh, O.; Gunn, J.; Zhang, M. Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2010, 62, 284–304.

[14] Owen, J.; Rademeyer, P.; Chung, D.; Cheng, Q.; Holroyd, D.; Coussios, C.; Friend, P.; Pankhurst, Q. A.; Stride, E. Magnetic targeting of microbubbles against physiologically relevant flow conditions. *Interface Focus.* 2016, 6, 20150097.

[15] Alexiou, C.; Arnold, W.; Klein, R. J.; Parak, F. G.; Hulin, P.; Bergemann, C.; Erhardt, W.; Wagenpfeil, S.; Lubbe, A. S. Locoregional Cancer Treatment with Magnetic Drug Targeting. *Cancer Research.* 2000, 60, 6641–6648.

[16] Liang, P. C.; Chen, Y. C.; Chiang, C. F.; Mo, L. R.; Wei, S. Y.; Hsieh, W. Y.; Lin, W. L. Doxorubicin-modified magnetic nanoparticles as a drug delivery system for magnetic resonance imaging-monitoring magnet-enhancing tumor chemotherapy. *International Journal of Nanomedicine.* 2016, 11, 2021–2037.

[17] Veiseh, O.; Gunn, J. W.; Zhang, M. Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2010, 62,284-304.

[18] Shapiro, B.; Kulkarni, S.; Nacev, A.; Muro, S.; Stepanov, P. Y.; Weinberg, I. N. Open challenges in magnetic drug targeting. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol.* 2015, 7, 446–457.

[19] Kamaly, N.; Xiao, Z.; Valencia, P. M.; Radovic-Moreno, A. F.; Farokhzad, O. C. Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. *Chem. Soc. Rev.* 2012, 41, 2971–3010.

[20] Ao, L.; Wang, B.; Liu, P.; Huang, L.; Yue, C.; Gao, D.; Wu, C.; Su, W. A folate-integrated magnetic polymer micelle for MRI and dual targeted drug delivery. *Nanoscale.* 2014, 6, 10710–10716.

[21] Ye, F.; Barrefelt, A.; Asem, H.; Abedi-Valugerdi, M.; El-Serafi, I.; Saghafian, M.; Abu-Salah, K.; Alrokayan, S.; Muhammed, M.; Hassan, M. Biodegradable polymeric vesicles containing magnetic nanoparticles, quantum dots and anticancer drugs for drug delivery and imaging. *Biomaterials.* 2014, 35, 3885-3894.

[22] Hu, J.; Qian, Y.; Wang, X.; Liu, T.; Liu, S. Drug-Loaded and Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle Surface-Embedded Amphiphilic

- Block Copolymer Micelles for Integrated Chemotherapeutic Drug Delivery and MR Imaging. *Langmuir*. 2012, 28, 2073-2082.
- [23] Pouponneau, P.; Leroux, J.-C.; Soulez, G.; Gaboury, L.; Martel, S. *Biomaterials*. 2011, 32, 3481-3486.
- [24] Zhang, L.; Gong, F.; Zhang, F.; Ma, J.; Zhang, P.; Shen, J. Targeted therapy for human hepatic carcinoma cells using folate-functionalized polymeric micelles loaded with superparamagnetic iron oxide and sorafenib in vitro. *International Journal of Nanomedicine*. 2013, 8, 1517-1524.
- [25] Lin, M. M.; Kang, Y. J.; Sohn, Y.; Kim, D. K. Co-encapsulation of magnetic nanoparticles and doxorubicin into biodegradable microcarriers for deep tissue targeting by vascular MRI navigation. *J. Nanopart. Res.* 2015, 17, 248.
- [26] Wang, J.; Wang, Y.; Liang, W. Delivery of drugs to cell membranes by encapsulation in PEG-PE micelles. *J. Control. Release*. 2012, 160, 637-651.
- [27] Wang, J.; Fang, X.; Liang, W. Pegylated Phospholipid Micelles Induce Endoplasmic Reticulum-Dependent Apoptosis of Cancer Cells but not Normal Cells. *ACS Nano*. 2012, 6, 5018-5030.
- [28] Wang, Y.; Wang, R.; Lu, X.; Lu, W.; Zhang, C.; Liang, W. Pegylated Phospholipids-Based Self-Assembly with Water-Soluble Drugs. *Pharm. Res.* 2010, 27, 361-370.
- [29] Depalo, N.; Carrieri, P.; Comparelli, R.; Striccoli, M.; Agostiano, A.; Bertinetti, L.; Innocenti, C.; Sangregorio, C.; Curri, M. L. Bio-functionalization of anisotropic nanocrystalline semiconductor-magnetic heterostructures. *Langmuir*. 2011; 27,6962-6970.
- [30] Buonsanti, R.; Grillo, V.; Carlino, E.; Giannini, C.; Curri, M. L.; Innocenti, C.; Sangregorio, C.; Achterhold, K.; Parak, F. G.; Agostiano, A.; Cozzoli, P. D. Seeded growth of asymmetric binary nanocrystals made of a semiconductor TiO₂ rodlike section and a magnetic gamma-Fe₂O₃ spherical domain. *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 16953-16970.
- [31] Depalo, N.; Mallardi, A.; Comparelli, R.; Striccoli, M.; Agostiano, A.; Curri, M. L. Luminescent nanocrystals in phospholipid micelles for bioconjugation: An optical and structural investigation. *J. Colloid. Interface Sci.* 2008, 325, 558-566.
- [32] Denora, N.; Laquintana, V.; Lopalco, A.; Iacobazzi, R. M.; Lopodota, A.; Cutrignelli, A.; Iacobellis, G.; Annese, C.; Cascione, M.; Leporatti, S.; Franco, M. In vitro targeting and imaging the translocator protein TSPO 18-kDa

- through G(4)-PAMAM-FITC labeled dendrimer. *J. Control. Release.* 2013, 172, 1111-1125.
- [33] Coey J. M. D. Non collinear spin arrangement in ultrafine ferromagnetic crystallites. *Physical Review Letters.* 1971, 27, 1140-1142.
- [34] Kolhaktar, A.G.; Jamison, A. C.; Litvinov, D.; Willson, R. C.; Lee T. R. Tuning the magnetic properties of nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14, 15977-16009.
- [35] Zhang, Y.-Q.; Wei, X.-W.; Yu, R. Fe₃O₄ Nanoparticles-Supported Palladium-Bipyridine Complex: Effective Catalyst for Suzuki Coupling Reaction. *Catal. Lett.* 2010, 135, 256–262.
- [36] Riani P.; Napoletano M.; Canepa F., Synthesis, characterization and a.c. magnetic analysis of magnetite nanoparticles. *J. Nanopart. Res.* 2011, 13, 7013-7020.
- [37] Nurdin, I.; Johan, M. R.; Yaacob, I. I.; Ang, B. C.; Andriyana, A. Synthesis, characterization and stability of superparamagnetic maghemite nanoparticle suspension. *Materials Research Innovations.* 2014, 18, S6-203.
- [38] Kluchove, K.; Zboril, R.; Tucek, J.; Pecova, M.; Zajoncova, L.; Safarik, I.; Mashlan, M.; Markova, I.; Jancik, D.; Sebel, M.; Bartonkova, H.; Bellesi, V.; Novak, P.; Petridis, D. Superparamagnetic maghemite nanoparticles from solid-state synthesis – Their functionalization towards peroral MRI contrast agent and magnetic carrier for trypsin immobilization. *Biomaterials.* 2009, 30, 2855-2863.
- [39] Riani, P.; Lucchini, M. A.; Thea, S.; Alloisio, M.; Bertoni, G.; Canepa, F. New Approach for the Step by Step Control of Magnetic Nanostructure Functionalization. *Inorg. Chem.* 2014, 53, 9166–9173.
- [40] Latronico, T.; Depalo, N.; Valente, G.; Fanizza, E.; Laquintana, V.; Denora, N.; Fasano, A.; Striccoli, M.; Colella, M.; Agostiano, A.; Curri, M. L.; Liuzzi, G. M. Cytotoxicity Study on Luminescent Nanocrystals Containing Phospholipid Micelles in Primary Cultures of Rat Astrocytes. *PLoS ONE.* 2016, 11, e0153451
- [41] Fang, C.; Kievit, F. M.; Veiseh, O.; Stephen, Z. R.; Wang, T.; Lee, D.; Ellenbogen, R. G.; Zhang, M. Fabrication of Magnetic Nanoparticles with Controllable Drug Loading and Release through a Simple Assembly Approach. *J. Control. Release.* 2012, 162, 233–241.

Capitolo 4

Sintesi e caratterizzazione di un dendrimero fluorescente PAMAM di quarta generazione opportunamente funzionalizzato per l'imaging ed il targeting mitocondriale.

4.1 Introduzione

Attualmente lo studio e la terapia del cancro si basano su una paradossale miscela di vecchio e nuovo. La chirurgia, infatti, che rappresenta “il vecchio”, è ancora oggi il trattamento di elezione per la maggior parte dei tumori solidi, mai definitivamente sostituita dalla radioterapia. C'è da precisare che qualsiasi trattamento tende a far regredire o correggere gli effetti della malattia ma non ad eliminarne le cause. Più precisamente tutte le terapie mirano a ridurre la massa tumorale e quindi il numero di cellule maligne, piuttosto che a ricondurre alla normalità una cellula in fase degenerativa. Inoltre nessun farmaco o tecnica terapeutica si è dimostrato ad oggi in grado di prevenire lo sviluppo della malattia.

La “novità” nella terapia antitumorale è, invece, rappresentata dall'ampia scelta di farmaci oggi disponibili e di numerose molecole in fase di sperimentazione in grado di aumentare l'efficacia e ridurre la tossicità. Tuttavia ci sono diversi svantaggi legati all'uso dei farmaci chemioterapici antitumorali tradizionali e tra questi il basso indice terapeutico, la scarsa selettività d'azione nei confronti delle cellule tumorali con conseguente danneggiamento dei tessuti sani ed una riduzione di efficacia legata a fenomeni di farmaco resistenza. Negli ultimi anni sono stati compiuti grandi progressi nella cura del cancro sia perché studi di farmacocinetica più approfonditi hanno indicato un impiego più efficace e sicuro dei prodotti già in uso, sia perché sono emerse maggiori indicazioni sulle cause

del cancro grazie ad approfondite ricerche sulle strutture e funzioni cellulari [1]. In particolare tra le strategie innovative di intervento emergono terapie mirate a target non solo cellulari, ma anche intracellulari e molecolari della cellula tumorale, localizzati ad esempio nel citosol, su endosomi, mitocondri o nucleo [2]. Diversi studi, infatti, hanno dimostrato che anche i target a livello subcellulare possono essere utili sia per il rilascio di farmaci antitumorali che di agenti diagnostici [3]. Nell'ultimo decennio le nanotecnologie hanno avuto un notevole sviluppo in campo biomedico, ciò nonostante, la loro attuale applicazione si limita, nella maggior parte dei casi, ad un'interazione con la cellula bersaglio e gli studi terminano con l'internalizzazione del nanovettore ed il suo "carico".

Notevoli potenzialità risiedono nell'esplorazione del destino subcellulare dei sistemi nanoparticellari, la cui azione programmata potrebbe migliorare non solo il profilo terapeutico/diagnostico, ma consentirebbe anche la valutazione di specifiche interazioni vettore/target subcellulare. La progettazione di nuovi sistemi nanoparticellari di rilascio di farmaci o agenti diagnostici, non può dunque prescindere dalla conoscenza dei meccanismi intracellulari di apoptosi, trasduzione dei segnali, dei tipi di interazione subcellulari[4].

Tra gli organuli cellulari, i mitocondri rappresentano un interessante target subcellulare in quanto coinvolti nel metabolismo del calcio, nel processo di apoptosi e nel danno ossidativo. Non sorprende che le disfunzioni mitocondriali siano coinvolte nell'eziopatogenesi di una grande varietà di patologie umane, a partire da quelle di tipo neurodegenerativo fino al cancro[5]. Tuttavia, per diverse ragioni, inclusa l'identificazione di idonei biomarkers sulla membrana mitocondriale esterna (OMM), fino ad oggi il targeting mitocondriale è stato poco esplorato. I pochi esempi di nanosistemi direzionati al mitocondrio riguardano bioconiugati polimerici o carrier nanoparticellari che usano cationi lipofili come agenti direzionanti sito-specifico[4,5].

La proteina di traslocazione mitocondriale (TSPO) è stata scoperta nel 1977 quale sito di legame periferico a livello renale della molecola a struttura benzodiazepinica Diazepam e per questa ragione in passato nota come recettore periferico delle benzodiazepine (PBR). Si tratta di una proteina di 18-kDa in grado di legare con elevata affinità colesterolo e diversi farmaci, localizzata principalmente nella OMM come componente del complesso di trasporto mitocondriale del colesterolo[6-9]. In condizioni normali il TSPO è minimamente espresso a livello del cervello e del fegato umani[9-11] ed altamente espresso nei tessuti ad alta proliferazione e steroidogenetici, pertanto risulta coinvolto nei processi mitocondriali di steroidogenesi e proliferazione cellulare/apoptosi [12,13]. Ulteriori studi hanno dimostrato come l'espressione del TSPO aumenti selettivamente in diverse patologie, quali cancro, disfunzioni endocrine, danni cerebrali, stati neurodegenerativi, danno da ischemia-riperfusion e stati infiammatori[14-17]. In particolare, è stata riscontrata una sovraespressione del TSPO nel tumore cerebrale, nel carcinoma colon-rettale, nell'epatocarcinoma [18,19]. Per tutte le ragioni menzionate, il TSPO rappresenta un interessante target subcellulare non solo per l'imaging di stati patologici in cui tale proteina è sovraespressa, ma anche per il direccionamento selettivo di farmaci a livello mitocondriale[20-23].

Diversi sono i ligandi altamente affini e selettivi per il TSPO utilizzati per studiare le funzioni di questa proteina *in vitro* ed *in vivo*, tra questi, composti a struttura isochinolin carbossamidica (PK11195)[24], derivati benzodiazepinici (Ro-5-4864) [25], indoloacetammidi (FGIN-1)[26], fenossiarilacetammidi (DAA1106) [27,28], imidazo[1,2-a]piridine (CLINME)[27,29], e pirazolopirimidine (DPA-713) [27,28]. In realtà, nessuno dei ligandi TSPO sopra citati contiene gruppi organici, come ad esempio amminici, ossidrilici o carbossilici, potenzialmente utili per reazioni di coniugazione con ulteriori agenti terapeutici, diagnostici o con nanovettori impiegabili per imaging. Sebbene siano stati individuati diversi

promettenti ligandi per il TSPO, ad oggi esiste solo un esempio di nanocarrier in grado di direzionare agenti per imaging al TSPO[30].

Tra i nanovettori, i dendrimeri rappresentano una categoria emergente di nanomateriali, che in condizioni non tossiche, potrebbero essere utilizzati per scopi biomedici[31,32]. Si tratta di macromolecole polimeriche iper-ramificate che si irradiano da un “*core*” centrale con una struttura simmetrica. Diversamente da molti polimeri lineari, i dendrimeri rappresentano una classe di macromolecole la cui sintesi raggiunge elevati livelli di controllo. Tali sistemi possono considerarsi monodispersi, di forma globulare e con un gran numero di gruppi funzionali in periferia potenzialmente utili per successive coniugazioni. Rappresentano, pertanto, uno strumento ideale per studiare l’influenza di alcuni parametri chimico fisici come dimensioni del polimero, carica superficiale, natura chimica, sulla citotossicità, sul processo di internalizzazione recettoriale e sulle interazioni cellulari e subcellulari[33,34].

La maggior parte degli studi condotti con finalità terapeutiche e diagnostiche sono stati sviluppati con dendrimeri a struttura poli amidoamminica, noti anche come PAMAM, in quanto sono relativamente facili da sintetizzare a partire dalla prima generazione sino alla generazione 10 (G1-G10) o sono disponibili commercialmente, inoltre, hanno un numero elevato di gruppi funzionali periferici (da 4 a 4096), di diversa natura (es. ammine, acidi carbossilici, ossidrili) e pesi molecolari (da 657 a 935.000 g/mol) con indice di polidispersività prossimo a 1[35,36].

In questo capitolo vengono presentate la sintesi, la caratterizzazione, gli studi di internalizzazione cellulare e la marcatura mitocondriale di una nanoparticella dendrimerica a struttura poli-amidoamminica di quarta generazione [G(4)-PAMAM] marcata con il fluoroforo fluoresceina.

Il primo step è consistito nella sintesi di un nuovo potenziale ligando del TSPO ad elevata affinità e selettività, caratterizzato da una struttura 2-fenil-imidazo[1,2-a]piridin acetammidica e contenente un gruppo carbossilico utile per la successiva coniugazione con il dendrimero G(4)-PAMAM. Il secondo step e sua successiva marcatura con la fluoresceina isotiocianato (FITC) dando origine ad un nuovo dendrimero direzionabile al TSPO, il G(4)-PAMAM-FITC. Successivamente sono stati effettuati studi di binding e di internalizzazione endocitotica dei dendrimeri cationici G(4)-PAMAM in linee cellulari C6 di glioma di ratto che sovraesprimono il TSPO][37]. Dal momento che la tossicità dei dendrimeri cationici è stata ampiamente documentata[32], è stata in primo luogo determinata la citotossicità di tutti i dendrimeri preparati sulle cellule C6 attraverso il saggio MTT (bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) in modo che in tutti gli studi di endocitosi potessero essere utilizzate dosi non tossiche. Successivamente è stato valutato il meccanismo di uptake cellulare di questi dendrimeri nelle linee cellulari su menzionate, sotto l'influenza di vari inibitori di endocitosi. È stato dunque riscontrato che il dendrimero TSPO direzionato G(4)-PAMAM-FITC viene captato rapidamente nelle cellule mediante la via endocitotica, inoltre, esso si dirige al mitocondrio come è evidenziato dagli esperimenti di frazionamento subcellulare e dagli studi di co-localizzazione effettuati con la tecnica microscopica CAT (Confocal-AFM-TIRF).

4.2 Materiali e metodi

4.2.1 Materiali

I reagenti chimici di grado commerciale, incluso methyl acrylate, ethylenediamine, ethyl 2-bromoacetate, fluorescein isothiocyanate isomer 1 (FITC), 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC), triethylamine (TEA), anhydrous tetrahydrofurane (THF), Ethanol 96% (v/v) (EtOH), anhydrous *N,N*-dimethylformamide (DMF), dimethylsulfoxide (DMSO),

e i solventi sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (Milan, Italy), e usati senza ulteriori modifiche e purificazioni. Il ligando TSPO 2-(6,8-dichloro-2-(4-hydroxyphenyl)imidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)-*N,N*-dipropylacetamide (**3**) è stato preparato in accordo ad una procedura già descritta altrove[38]. Le cellule C6 di glioma di ratto, acquistate da Interlab Cell Line Collection (ICLC, Genova, Italy), sono state coltivate in DMEM addizionato con 10% di FBS, 100 U/mL di penicillina, 100 µg/mL di streptomina e 2 mM di L-glutamina (Lonza, Italy) in atmosfera umidificata al 5% CO₂ a 37 °C. Piastre Petri di coltura sono state acquistate da Corning, Glassworks (Corning, N.Y., USA). I radioligandi [³H]-Flunitrazepam e [³H]-PK 11195 sono stati acquistati da PerkinElmer Life Sciences. PK 11195, Flunitrazepam e 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (Milan, Italy).

4.2.2 Sintesi dei ligandi TSPO 1 e 2

Il nuovo ligando TSPO acido 2-(4-(6,8-dichloro-3-(2-(dipropylamino)-2-oxoethyl)imidazo[1,2-a]pyridin-2-yl)phenoxy)acetico(**1**) è stato preparato secondo la procedura sintetica descritta nello schema 1A a partire dal ligando TSPO **3** che, a sua volta è stato sintetizzato in accordo ad una procedura precedentemente messa a punto nei nostri laboratori[39]. Ad una soluzione in agitazione di **3** (0.30 g, 0.71 mmol) in THF anidro sono stati aggiunti, nell'ordine, etil 2-bromoacetato (1.57 mL, 14.2 mmol) e K₂CO₃ (0.49 g, 3.5 mmol). L'agitazione è stata mantenuta per oltre 24 h a 40 °C, poi è stato fatto evaporare il solvente sotto vuoto ed il residuo solido disciolto in 25 mL di 10 % NaHCO₃, estratto con etil acetato (3x20 mL) ed anidrificato (Na₂SO₄). L'evaporazione del solvente ha prodotto un residuo che è stato purificato per cromatografia su gel di silice [etere di petrolio/etil acetato 6/4 (v/v) come eluente] dando origine al composto puro etil 2-(4-(6,8-dichloro-3-(2-(dipropylamino)-2-ossietil)imidazo[1,2-a]piridin-2-il)fenossi)acetato(**2**). Alla soluzione dell'etil estere **2** (0.10 g, 0.20 mmol) in EtOH

(5 mL), è stata aggiunto NaOH (1M, 5 mL) goccia a goccia. La miscela è stata tenuta in agitazione a temperatura ambiente per 2 h. Successivamente è stato fatto evaporare il solvente a pressione ridotta ed il residuo disciolto in 20 mL di acqua ed estratto con etil acetato (3x20 mL). La fase acquosa raffreddata è stata acidificata a pH 4 con 0.1 M HCl ed il risultante precipitato dell'acido puro **1** è stato raccolto per filtrazione ed essiccato sotto vuoto. I composti **1-3** sono stati ottenuti con buone rese e caratterizzati completamente mediante analisi elementare, spettrometria di massa, spettroscopie infrarossa in trasformata di Fourier (FT-IR), ¹H NMR ed UV-Vis. In particolare, le analisi elementari sono state condotte con un Eurovector (Milano, Italia) modello EA 3000 CHN. Spettrometria di massa: la spettrometria con ionizzazione elettrospray (ESI-MS) è stata effettuata con un'interfaccia elettrospray ed uno spettrometro a trappola ionica (1100 Series LC/MSD Trap system Agilent, Palo Alto, CA). Gli spettri FT-IR sono stati ottenuti con uno spettrometro Perkin-Elmer 1600 FT-IR (Spectrum One). Per ogni spettro sono state effettuate 40 scansioni da 4000 to 400 cm⁻¹. Gli spettri ¹H NMR sono stati registrati su uno strumento Varian Mercury 300 MHz. I valori di chemical shifts sono riportati in ppm. ¹H chemical shifts sono riferiti al picco del solvente protico residuo usato come riferimento interno (2.50 ppm per il Dimetil Solfoossido-d₆, 4.80 ppm per Acqua-d₂, 7.24 ppm per Cloroformio-d). Gli spettri UV/Vis sono stati realizzati su uno spettrometro Perkin-Elmer Spectrometer Lambda Bio20 s.

Acido-2-(4-(6,8-dicloro-3-(2-(dipropilammino)-2-ossoetil)imidazo[1,2-a]piridin-2-il)fenossi)acetico 1: (85% resa). IR (KBr): 3436, 1632, 1613 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-d₆) δ: 0.6-0.9 (m, 6H, CH₃), 1.4-1.6 (m, 4H, CH₂), 3.0-3.3 (m, 4H, CH₂NCO), 4.22 (s, 2H, CH₂CO), 4.70 (s, 2H, OCH₂CO), 6.99 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, Ar), 7.52 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, Ar), 7.62 (s, 1H, Ar), 8.29 (s, 1H, Ar); ESI-MS: calcolata per [M-H]⁻ = 476.1 Trovata: m/z (% relativa al picco base) = 476.0 (100) [M-H]⁻.

Etil-2-(4-(6,8-dicloro-3-(2-(dipropilammino)-2-ossoetil)imidazo[1,2-a]piridin-2-il)fenossi)acetato 2: (60 % resa). IR (KBr): 1765, 1639 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3) δ : 0.70 (t, 3H, $J = 7.4$ Hz, CH_3), 0.82 (t, 3H, $J = 7.4$ Hz, CH_3), 1.28 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz, CH_3), 1.4-1.6 (m, 4H, CH_2), 3.06 (t, 2H, $J = 7.7$ Hz, CH_2NCO), 3.25 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H, CH_2NCO), 4.01 (s, 2H, CH_2CON), 4.25 (q, 2H, $J = 7.4$ Hz, CH_2OCO), 4.63 (s, 2H, OCH_2CO), 6.96 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, Ar), 7.24 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H, Ar), 7.54 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, Ar), 8.22 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H, Ar); ESI-MS: calcolato per $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 528.1$ Trovato: m/z (% relativa al picco base) = 528.0 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

4.2.3 Sintesi dei dendrimeri 4-7

I dendrimeri PAMAM sono stati sintetizzati, attraverso modifiche della procedura sintetica messa a punto per la prima volta da Tomalia et al.[35,36]. Questi dendrimeri sono stati preparati mediante sintesi divergente utilizzando come solvente il metanolo. In particolare, sono stati realizzati un *core* di etilendiammina e delle unità ramificate, a partire da metilacrilato ed etilendiammina. Ogni strato è stato ottenuto in due step sintetici: la reazione esaustiva di addizione di Michael e la reazione esaustiva di ammidazione. In primis, i gruppi amminici reagiscono con i monomeri di metilacrilato e solo successivamente viene addizionata l'etilendiammina. Le generazioni intermedie dei dendrimeri PAMAM possiedono in superficie dei gruppi esterei, mentre le generazioni piene dei gruppi amminici. In particolare, il dendrimero di piena generazione G(4)-PAMAM **4** è caratterizzato da 32 unità di gruppi amminici terminali. Il progresso delle reazioni di alchilazione e di ammidazione richieste per sintetizzare il dendrimero G(4)-PAMAM (**4**), è stato monitorato mediante spettroscopie FT-IR, ^1H e ^{13}C NMR e spettroscopia di massa.

Come sottolineato nello Schema 1B, il ligando TSPO **1** è stato coniugato ai gruppi amminici di superficie del dendrimero **4** attraverso una reazione con carbodiimide.

In particolare, il composto **1** (32 mmol) è stato solubilizzato in 2 mL di acqua deionizzata in presenza di TEA (2 mmol) e fatto reagire con EDC (38 mmol) per 15 min. Il ligando TSPO attivato è stato aggiunto a 2 mL di una soluzione acquosa del dendrimero G(4)-PAMAM **4** (1 mmol) in presenza di TEA (32 mmol) e la reazione è stata lasciata in agitazione overnight a temperatura ambiente. La miscela risultante è stata trasferita in tubi di membrana da dialisi (Spectra/Por[®] 3500 MwCO, RC) e purificata mediante tre-cinque successive procedure dializzanti contro acqua deionizzata per rimuovere l'eccesso del composto **1** e dell'agente di accoppiamento. La sospensione purificata è stata analizzata mediante size exclusion chromatography (SEC) per confermarne la purezza e successivamente liofilizzata per dare il dendrimero TSPO direzionato-G(4)-PAMAM (**5**) il quale è stato conservato a 4 °C fino ad ulteriore utilizzo. Il dendrimero **5** è stato completamente caratterizzato come descritto per il dendrimero **4**. Il numero di molecole di ligando TSPO **1** coniugate per mole di dendrimero è stato stimato usando sia la spettroscopia ¹H NMR che UV-Vis.

Il dendrimero TSPO direzionato-G(4)-PAMAM-FITC (**6**) è stato sintetizzato per aggiunta alla soluzione del dendrimero **5** (50 mg, 3.2 μmol) in acqua deionizzata, una soluzione di FITC (6.1 mg, 16 μmol) in DMF (4 mL). La soluzione è stata mantenuta in agitazione tutta la notte a temperatura ambiente sotto corrente di N₂ al buio, seguita dalla purificazione in tubi da dialisi come sopra descritto e dalla liofilizzazione per dare una polvere arancione. La coniugazione del FITC al dendrimero **4** è stata effettuata come descritto sopra dando origine al noto dendrimero FITC-G(4)-PAMAM (**7**, Schema 1B). Per stimare la quantità di FITC legata e libera, i dendrimeri **6** e **7** sono stati analizzati mediante SEC. La presenza del fluoroforo coniugato è stata inoltre confermata con le spettroscopie UV-Vis, di fluorescenza ed NMR.

Dendrimero TSPO direzionato-G(4)-PAMAM 5: ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 0.7-0.9 (m, 6H, CH₃), 1.4-1.6 (m, 4H, CH₂), 2.0-2.8 (br m, 364H, CH₂), 3.0-3.6 (br m,

4H, CH₂NCO + 120H, CH₂), 4.19 (s, 2H, CH₂CO), 4.32 (s, 2H, OCH₂CO), 6.89 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, Ar), 7.45 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, Ar), 7.58 (s, 1H, Ar), 8.52 (s, 1H, Ar).

Dendrimero TSPO direzionato-G(4)-PAMAM-FITC 6: ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ : 0.8-0.9 (m, 6H, CH₃), 1.4-1.6 (m, 4H, CH₂), 2.0-2.8 (br m, 364H, CH₂), 3.0-3.6 (br m, 4H, CH₂NCO + 120H, CH₂), 4.21 (s, 2H, CH₂CO), 4.52 (s, 2H, OCH₂CO), 6.4-6.6 (m, 4H, Ar), 6.95 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, Ar), 7.0-7.2 (m, 5H, Ar), 7.49 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, Ar), 7.61 (d, $J = 1.6$ Hz, 2H, Ar), 8.55 (d, $J = 1.6$ Hz, 2H, Ar).

4.2.4 Determinazione del contenuto di ligando TSPO 1 e di FITC nei dendrimeri 5-7

La percentuale di ligando TSPO 1 legato covalentemente alla superficie del dendrimero 5 (grado di coniugazione) è stata determinata mediante spettroscopia ¹H NMR ed UV. L'analisi ¹H NMR è stata condotta mediante comparazione dei valori degli integrali dei picchi di interesse della porzione di ligando, con quelli della porzione di dendrimero. L'analisi UV del dendrimero 5 è stata effettuata nel range 250–350 nm, in cui il carrier non assorbe e come solvente è stata usata una soluzione di DMSO/metanolo in quanto essa consente la solubilizzazione sia del ligando TSPO 1 libero che dei coniugati macromolecolari. Per il dendrimero 5 le misurazioni UV sono state compiute comparando il suo valore di E^{1%} con quello del ligando TSPO puro allo stesso massimo di assorbimento di quest'ultimo ($\lambda = 256$ nm). Nel caso dei dendrimeri 6 e 7, il grado di coniugazione si riferisce al fluoroforo FITC ed è stato determinato attraverso misurazioni a lunghezza d'onda di 464 nm corrispondente al massimo di assorbimento a cui il ligando TSPO 1 non assorbe. Per i dendrimeri 6 e 7, gli spettri di emissione e di eccitazione sono stati registrati mediante utilizzo di uno spettrofluorimetro Fluorolog 3 (HORIBA Jobin-Yvon).

4.2.5 Caratterizzazione morfologica dei dendrimeri 4-7

La dimensione molecolare e l'indice di polidispersività (PDI) dei dendrimeri **4-7** sono stati misurati usando la spettroscopia a correlazione fotonica (PCS, Nanosizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK) dopo diluizione in acqua demineralizzata o PBS. Lo stesso strumento è stato utilizzato per misurare il potenziale zeta mediante velocimetria laser doppler dopo diluizione della sospensione dei dendrimeri con una soluzione 1 mM di KCl. I pesi molecolari medi dei dendrimeri **4-7** sono stati determinati mediante analisi SEC, performati con Waters Associates (Milford, MA) Model 1515 HPLC pompa isocratica, una colonna ultrahydrogel 500 (Waters, 7.8 x 300 mm, 5 µm), un detector UV-Vis Waters 2487 o RID detector Waters2414 (Breeze Software per analizzare i dati cromatografici). Il sistema è stato calibrato con standard di destrani. L'esame morfologico dei dendrimeri **4-6** è stato valutato mediante atomic force microscopy (AFM). Le immagini AFM sono state ottenute mediante XE-100 (Park Systems, Suwon, Korea).

4.2.6 Saggi di binding recettoriale

La capacità dei composti **1** e **2** di legare con alta affinità e selettività la proteina di translocazione è stata valutata mediante saggi di binding recettoriale *in vitro*. Questi esperimenti sono stati condotti come precedentemente riportato da Denora et al.[40], per il recettore Centrale delle Benzodiazepine (CBR) ed il recettore Translocator protein 18-kDa (TSPO).

4.2.7 Valutazione della citotossicità e stabilità dei dendrimeri 4-7

L'attività di inibizione della crescita di tutti i dendrimeri sintetizzati (**4-7**) è stata valutata come precedentemente descritto, in accordo alla procedura leggermente modificata del National Cancer Institute, Developmental Therapeutics Program [22,41]. Le cellule C6 di glioma sono state seminate in una piastra a 96-pozzetti

dal giorno 0 a densità di 5×10^3 cellule/pozzetto in 200 μ L di mezzo. La concentrazione cellulare è stata stabilita in base al tempo di raddoppiamento della popolazione cellulare. Gli agenti da testare sono stati aggiunti al giorno 1 in sette diluizioni comprese nel range 0.001-1 mg/mL. Il numero delle cellule vitali è stato misurato mediante il saggio quantitativo colorimetrico MTT dopo 72 h di incubazione a 37 °C in atmosfera umidificata ed in presenza del 5% di CO₂. Le cellule non trattate sono state usate come controllo positivo e le cellule incubate con una soluzione al 2% (w/v) SDS sono state usate come controllo negativo. L'assorbanza di ogni singolo pozzetto è stata misurata mediante un microplate reader a 570 nm (Wallac Victor3, 1420 Multilabel Counter, Perkin-Elmer). Ogni test è stato ripetuto in triplicato in tre esperimenti separati. I risultati sono espressi come IC₅₀ che rappresenta la concentrazione necessaria per avere il 50% di inibizione. I valori di IC₅₀ per ogni dendrimero testato sono stati calcolati dalle curve dose-risposta usando il programma curve-fitting SigmaPlot 9.0 non-lineare.

Per determinare la stabilità dei coniugati in presenza del mezzo di coltura cellulare e delle cellule, è stata usata una procedura precedentemente riportata [42]. Brevemente, i dendrimeri **5-7** (0.01 mg/mL) sono stati incubati in terreno di coltura completo per 4 h a 37 °C. Successivamente, 1 mL del mezzo è stato aspirato ed essiccato sotto vuoto. Il residuo è stato ridisciolti in 1 mL di PBS ed analizzato mediante SEC come descritto sopra.

4.2.8 Uptake cellulare in presenza ed assenza di inibitori di endocitosi, studi di binding extracellulare, di esocitosi e di competizione dei dendrimeri 6 e 7

Le cellule sono state seminate al giorno 0 in piastre da 6 pozzetti a densità di 1×10^6 cellule/pozzetto in 1 mL di mezzo. L'uptake cellulare dei dendrimeri **6 e 7** è stato determinato in presenza ed assenza di inibitori di endocitosi. In particolare, sono stati selezionati vari composti ben caratterizzati come inibitori (Sigma-Aldrich) ed il tampone privo di potassio per la loro capacità di inibire specifici

step del processo di endocitosi e sono stati addizionati alle concentrazioni indicate 45 min prima dell'aggiunta dei dendrimeri. Dopo aver consultato la letteratura, è stato scelto un range opportuno per ogni inibitore e ne è stata testata l'efficacia e la citotossicità[43]. Infatti, è stata stabilita la citotossicità potenziale a breve termine (24 h) degli inibitori di endocitosi nelle cellule C6 (piastre a 96 pozzetti, 5,000 cellule/pozzetto) per assicurare la vitalità cellulare durante i saggi di uptake (2 h). Gli inibitori chimici sono stati preparati in un range di concentrazione noto per ridurre l'endocitosi [genisteina (20-400 μ M), fenilarsina ossido (PAO, 0.1-50 μ M), metil- β -ciclodestrina (M β CD, 5-100 mM), dynasore (5-100 μ M), e wortmannina (50 nM)][43,49]. Per la deplezione di potassio, le cellule sono state lavate due volte con il tampone privo di potassio (140 mmol/L NaCl, 20 mmol/L HEPES, 1 mmol/L CaCl₂, 1 mmol/L MgCl₂, 1 mg/mL D-glucose, pH 7.4), successivamente incubate per 15 min con un tampone ipotonico (1:1 tampone privo di potassio e acqua distillata) a 37 °C, e infine lavate nuovamente per tre volte con il tampone senza potassio. La citotossicità degli inibitori è stata valutata mediante il saggio colorimetrico MTT come descritto sopra. Pertanto, gli inibitori sono stati usati a concentrazioni che mostravano un minimo di 85% di vitalità cellulare durante le 24 h del periodo del saggio (Tabella 5). In particolare, come inibitori di endocitosi la genisteina è stata usata a concentrazione 100 μ M, PAO a 1 μ M, M β CD a 10 mM, dynasore a 50 μ M, wortmannina a 50 nM, ed il tampone privo di potassio con la composizione sopra descritta.

I dendrimeri **6** (0.015 mg/mL, 1 μ M in termini di FITC) o **7** (0.010 mg/mL, 1 μ M in termini di FITC) sono stati aggiunti al giorno 1 nei pozzetti in presenza ed assenza degli inibitori di endocitosi ed incubati ulteriormente per 2 h a 37 °C in atmosfera umidificata con il 5% CO₂. A determinati intervalli di tempo il mezzo è stato prelevato e le cellule lavate per tre volte con PBS freddo e lisate per aggiunta di 1 mL/pozzetto di una soluzione 50 % DMSO/50 % Etanolo. Successivamente, 200 μ L della risultante soluzione sono stati analizzati con il microplate reader

(Wallac Victor3, 1420 Multilabel Counter, Perkin-Elmer) con lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione pari a 485 e 535 nm, rispettivamente.

Al fine di determinare il binding extracellulare dei dendrimeri **6** e **7** è stata usata una procedura riportata in precedenza e leggermente modificata[42]. Brevemente, prima le cellule in esame sono state incubate a 4 °C per 25 min ed i dendrimeri testati sono stati disciolti in terreno completo e termostati a 4 °C. L'esperimento è partito con l'aggiunta in ciascun pozzetto del terreno completo contenente i dendrimeri **6** (0.015 mg/mL, 1 µM in termini di FITC) o **7** (0.010 mg/mL, 1 µM in termini of FITC). Le cellule sono state incubate per intervalli compresi tra 0-120 min a 4 °C, e dopo il periodo di incubazione, analizzate come sopra descritto per gli studi di uptake.

Negli esperimenti di esocitosi, le cellule sono state incubate per 2 h con i dendrimeri **6** o **7** a 37 °C come descritto sopra. Trascorse le 2 h del periodo di "carico", le cellule sono state lavate con PBS ed immediatamente incubate per 0-60 min (fase di esocitosi) solo con terreno. Ulteriori dettagli sperimentali sono stati descritti altrove [42].

Inoltre, per indagare la competizione del dendrimero **6** con il composto parente **1**, le cellule C6 sono state trattate con il ligando TSPO **1** a concentrazioni crescenti (10, 20 e 30 µM) per 45 min prima della sostituzione con il dendrimero **6** (0.015 mg/mL, 1 µM in termini di FITC) per 2 h a 37 °C. Il dendrimero **7** (0.010 mg/mL, 1 µM in termini di FITC) è stato usato come riferimento dal momento che non è un dendrimero direzionato al TSPO.

4.2.9 Frazionamento cellulare

Le cellule C6 di glioma sono state frazionate in nuclei (*N*), mitocondri (*M*), lisosomi (*L*), frazione microsomiale (*Mic*) e solubile (*S*) per mezzo di centrifugazione differenziale usando un protocollo adattato da Seib et al.[45].

Brevemente, le cellule C6 sono state esposte ai dendrimeri **6** e **7** (0.015 e 0.010 mg/ml, rispettivamente; 1 μ M in termini di FITC) per 24 h prima che il contenuto extracellulare fosse lavato via con PBS freddo. Ciò è stato seguito da un doppio lavaggio con PBS ed un lavaggio con il tampone di omogeneizzazione [250 mM saccarosio, 10 mM HEPES, 1 mM EDTA pH 7.4 ed un cocktail di proteasi contenente protinina (2 μ g/mL), leupeptina (2 μ g/mL), pepstatina A (1 mg/mL) e PMSF (1 mM)]. Le cellule C6 sono state raccolte, risospese nel tampone di omogeneizzazione in quantità pari a 2.5 volte il peso della cellula umida ed omogeneizzate mediante 7 passaggi in un cracker cellulare (clearance 6 μ m). Successivamente, l'omogeneizzato diluito è stato centrifugato a 1500 x g per 2 min a 4 °C ed il pellet risultante è stato lavato con il buffer di omogeneizzazione e centrifugato nuovamente per ottenere la frazione nucleare. Il sovrinatante della centrifugazione è stato centrifugato a 3000xg per 15 min a 4 °C. Il pellet è stato lavato con il buffer di omogeneizzazione e sottoposto ad ulteriori 15 minuti di rotazione a 3000xg. Il pellet risultante è stato indicato come frazione mitocondriale. Il sovrinatante corrispondente è stato ulteriormente centrifugato in sequenza, prima a 22000xg per 10 min per ottenere il pellet lisosomiale, poi a 100000xg per 30 min per ottenere il pellet microsomiale e la frazione solubile. Ogni frazione è stata diluita con PBS e la fluorescenza del FITC è stata misurata con un lettore di piastre (Wallac Victor3, 1420 Multilabel Counter, Perkin-Elmer) con lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione impostate a 485 e 535 nm, rispettivamente.

4.2.10 Microscopia in fluorescenza di cellule vitali

Questi esperimenti sono stati condotti come precedentemente riportato da Laquintana et al. [22]. In particolare, l'uptake dei dendrimeri FITC-coniugati **6** e **7** (0.015 e 0.010 mg/mL, rispettivamente; 1 μ M in termini di FITC) in cellule C6 di glioma di ratto è stato visualizzato 24–30 h dopo il trattamento, laddove è stata

anche valutata la morfologia mitocondriale delle cellule di controllo ai tempi designati dopo un'incubazione di 15–30 min a 37 °C in atmosfera al 5% di CO₂ con 25 nM MitoTracker Red CMXRos (Probes Molecolare) usato come marker mitocondriale.

4.2.11 Microscopia Confocale-AFM-TIRF(CAT)

La microscopia CAT è una combinazione di un avanzato microscopio a scansione di sonda (Bioscope Catalyst, Bruker Inc. USA), di un microscopio confocale (LSM 700, Zeiss GERMANY), e di un microscopio a riflessione interna totale di fluorescenza (Laser TIRF 3, Zeiss GERMANY; TIRF= total internal reflection fluorescence microscope). In particolare, in questo lavoro è stata utilizzata solo la microscopia confocale per l'indagine di cellule vitali e fissate.

4.2.12 Imaging confocale

La microscopia confocale a scansione laser è stata eseguita su un microscopio confocale Zeiss LSM700 (Zeiss, Germany) equipaggiato con un microscopio invertito Axio Observer Z1 (Zeiss, Germany) usando una lente ad immersione in olio ×100, 1.46 apertura numerica. I raggi laser con 359 nm, 488 nm, e 542 nm come lunghezza d'onda di eccitazione sono stati usati per l'imaging con DAPI, FITC, e Falloidina-TRITC, rispettivamente.

Nel caso delle cellule fissate, le cellule (10⁶ cellule/pozzetto) sono state fatte crescere su piastre di vetro (WillCo-Dish[®]) per 24 h e successivamente esposte al dendrimero **6** o **7** a concentrazione di 0.015 e 0.010 mg/mL, rispettivamente (1 μM in termini di FITC). Dopo un periodo di incubazione di 12 h, le cellule sono state poste in ghiaccio e lavate per tre volte con PBS freddo. Le cellule sono state poi fissate per 20 min in freezer con il 3% w/v di paraformaldeide in PBS. Dopo tre lavaggi successivi con PBS, le cellule sono state incubate per 30 min a 37 °C con 25 nM MitoTracker Red CMXRos (Molecular Probes), 1 μg/mL di DAPI

(Molecular Probes), o con 1 µg/mL di Falloidin-TRIC (Sigma) usati come markers mitocondriale, nucleare e di F-actina, rispettivamente. Dopo la colorazione con il marker appropriato, le cellule sono state visualizzate.

Per quanto riguarda l'imaging delle cellule vitali, sono state seminate a densità 100,000 cells/well su piastre di vetro fondi (WillCo-Dish®) e trattate come sopra descritto, tralasciando gli step di fissazione. In particolare, le cellule sono state incubate per 30 min a 37 °C con 25 nM MitoTracker Red CMXRos, 1 µg/mL di DAPI (Molecular Probes), o con 25 nM LysoTracker Red (Molecular Probes) usati come markers mitocondriali, nucleari e lisosomiali, rispettivamente. Tutti gli step di lavaggio sono stati condotti a 25 °C. Infine, il PBS è stato aggiunto alla piastra e le cellule successivamente visualizzate per un massimo di 30 min.

4.2.13 Analisi di co-localizzazione

E' stata stimata la differente localizzazione intracellulare dei dendrimeri **6** e **7** nella struttura dei lisosomi e dei mitocondri attraverso analisi di co-localizzazione. Questo è uno strumento potente per la dimostrazione della sovrapposizione spaziale e temporale nei modelli di distribuzione dei probes fluorescenti.

4.3 Risultati e discussioni

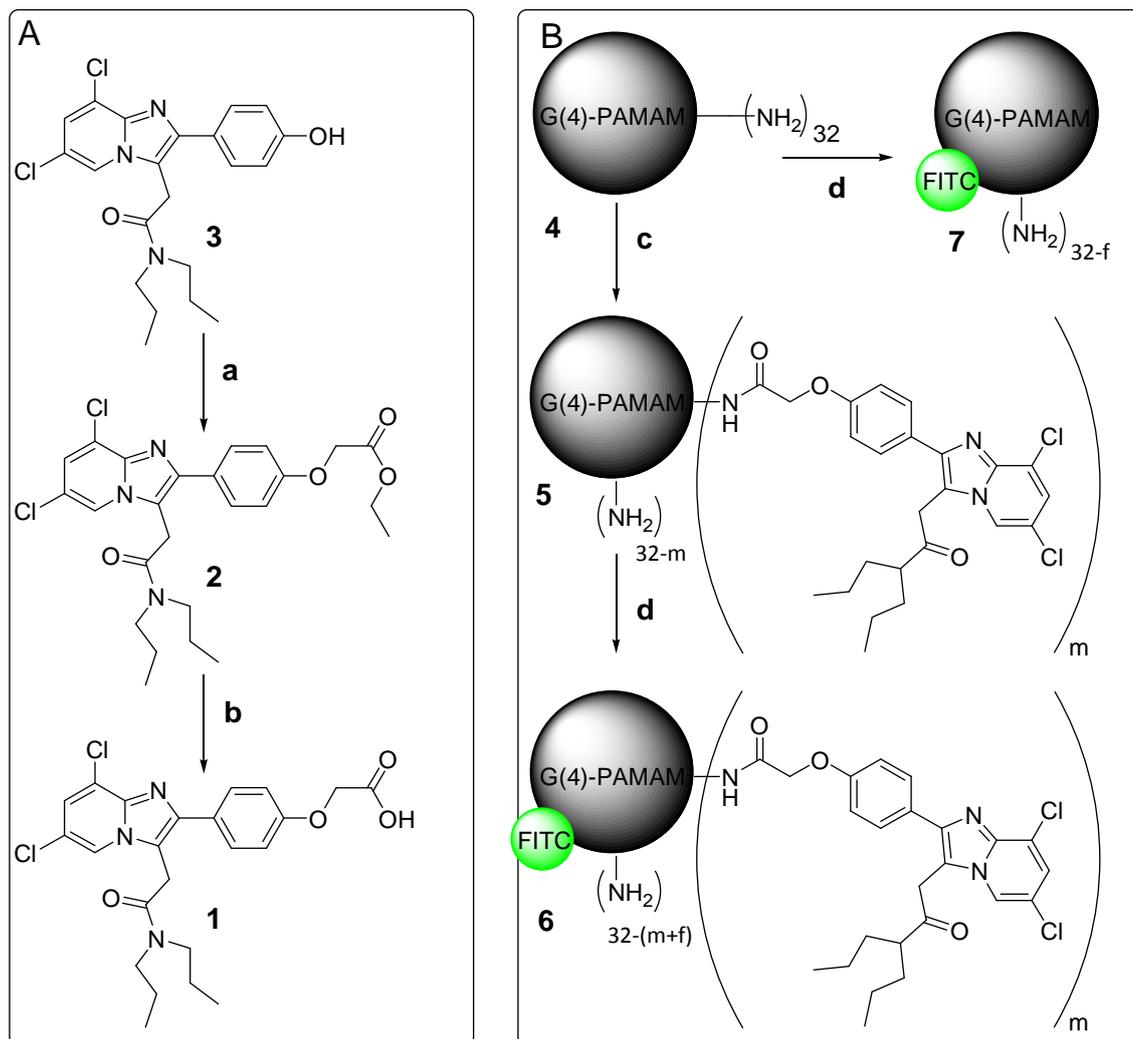
4.3.1 Sintesi dei ligandi TSPO 1 e 2

Al fine di sintetizzare un nuovo dendrimero direzionabile al TSPO in grado di visualizzare la proteina di translocazione mitocondriale 18-kDa nelle cellule viventi, il primo stadio del lavoro di ricerca ha riguardato la sintesi di un nuovo ligando **1** altamente affine e selettivo per il TSPO caratterizzato, in particolare, da un gruppo carbossilico idoneo a legare i gruppi amminici del dendrimero. Il gruppo di ricerca presso il quale svolgo il dottorato, ha recentemente individuato

nuovi ligandi del TSPO potenti e selettivi, caratterizzati da una struttura 2-fenilimidazo[1,2-a]piridinacetamidica e contenenti gruppi funzionali derivatizzabili [38,47,48]. Sulla base di questi risultati, attraverso una ben nota procedura sintetica riportata nello Schema 1, è stato introdotto un gruppo carbossilico sul potente e selettivo ligando **3**, che a sua volta è stato sintetizzato secondo una procedura sintetica precedentemente sviluppata nel nostro laboratorio [38].

In particolare, il nuovo ligando **1** acido-2-(4-(6,8-dicloro-3-(2-(dipropilamino)-2-oxoetil)imidazo[1,2-a]piridin-2-il)fenossi)acetico è stato preparato per idrolisi del corrispondente etil estere **2** [2-(4-(6,8-dicloro-3-(2-(dipropilamino)-2-oxoetil)imidazo[1,2-a]piridin-2-il)fenossi)acetato], in soluzione NaOH(1M)/etanolo (1:1, v:v). A sua volta il composto **2** è stato sintetizzato per reazione del ligando **3** con etil 2-bromoacetato in condizioni anidre. I composti **1-3** sono stati ottenuti con buone rese e appropriatamente caratterizzati mediante analisi elementare, spettrometria di massa, spettroscopia infrarossa in trasformata di fourier (FT-IR), ¹H NMR e spettroscopia UV-Vis come riportato nella parte sperimentale.

SCHEMA 1



A) Schema di sintesi dei nuovi ligandi per il TSPO **2** e **1**; a) etil 2-bromocetato, THF, K_2CO_3 , 24h, 40 °C; b) 1M NaOH/EtOH, 2h, rt. B) Schema di sintesi dei dendrimeri 4-7; c) EDC, TEA; acqua, 12 h, rt d) FITC, DMF, 12 h, rt, al buio. I simboli m ed f rappresentano rispettivamente i gruppi amminici sostituiti dal ligando **1** e dal FITC. $5m=16$; $6m= 11$, $f= 6$; $7f= 12$.

4.3.2 Affinità e selettività dei composti **1** e **2** verso il TSPO

Una volta sintetizzati i potenziali ligandi **1** e **2**, lo step successivo è consistito nel valutarne l'affinità e la selettività nei confronti del TSPO. In particolare, la selettività dei composti **1** e **2** verso il TSPO è stata determinata misurando le rispettive affinità dei composti per il recettore centrale delle benzodiazepine (CBR). Infatti, i TSPO sono stati scoperti come siti di legame di tipo periferico per la benzodiazepina Diazepam, la quale rappresenta un ligando per il CBR. Un gran numero di ligandi dei TSPO è spesso caratterizzato da alta affinità non solo per i TSPO, ma anche per il CBR e pertanto non possono essere considerati ligandi selettivi per il TSPO. È stato valutato, pertanto, il binding dei composti **1** e **2** per i recettori TSPO e CBR attraverso prove di spiazzamento consistenti nella valutazione della loro capacità di inibire il legame del [³H]-flunitrazepam o del [³H]-PK 11195 in omogenati di corteccia cerebrale di ratto. In questi studi, il flunitrazepam è stato scelto per le sue caratteristiche di ligando selettivo per il CBR, mentre il PK 11195 è stato selezionato in quanto ligando selettivo per il TSPO. I valori di concentrazione inibitoria (IC₅₀) misurati, sono elencati in Tabella 1 insieme a quelli relativi al ligando di partenza **3**, PK 11195 e flunitrazepam. Come è possibile osservare, i composti **1**, **2** e **3** manifestano alta affinità per il TSPO (2.12, 3.47, 2.74 nM, rispettivamente), dello stesso ordine di grandezza del PK 11195 (4.27 nM), che è stato usato come paragone. Inoltre, nessuno dei ligandi TSPO **1-3** testati ha mostrato affinità nei confronti del CBR come suggerito dai valori di IC₅₀ (>10⁵ nM). Questi risultati di binding indicano dunque che i composti **1** e **2** possono essere considerati nuovi ligandi del TSPO altamente affini e selettivi. In aggiunta, il composto **1** è uno dei pochi esempi noti in letteratura di ligandi del TSPO, il cui gruppo carbossilico consente una possibile successiva reazione di coniugazione, sulla superficie di nanovettori caratterizzati da adatti gruppi funzionali.

Tabella 1. Affinità dei composti **1-3** per il CBR ed il TSPO eseguita su corteccia cerebrale di ratto.

Compound	IC₅₀ (nM)^a	
	TSPO^b	CBR^c
1	2.12	>10 ⁵
2	3.47	>10 ⁴
3	2.74	>10 ⁵
PK11195	4.27	>10 ⁵
Flunitrazepam	-	5

^a I dati sono il risultato della media di tre esperimenti separati effettuati in duplicato che differiscono meno del 10%. ^{b,c} PK 11195, ligando selettivo per il TSPO, Flunitrazepam, ligando selettivo per il CBR; sono stati usati come confronto.

4.3.3 Sintesi e caratterizzazione strutturale dei dendrimeri **4, 5, 6 e 7**

L'identificazione dell'acido carbossilico **1** quale potente e selettivo ligando del TSPO, ha suggerito la possibilità di realizzare nuovi dendrimeri direzionabili al TSPO capaci di marcare *in vitro* la proteina di trasporto mitocondriale. La scelta su detti nanovettori è scaturita dalla curiosità di testare tali nuovi nanomateriali, che in concentrazioni non tossiche, potrebbero rappresentare un emergente strumento utilizzabile per scopi biomedici[31,32].

I dendrimeri, inoltre, sono sintetizzabili attraverso un controllo delle reazioni non facilmente raggiungibile per la maggior parte dei polimeri lineari, dando origine a macromolecole globulari quasi monodisperse, con un gran numero di gruppi

funzionali periferici. In seguito ai numerosi studi riportati in letteratura su dendrimeri poli(ammidoamminici) modificati, si è scelto di usare il dendrimero di quarta generazione G(4)-PAMAM (**4**). Tali dendrimeri, a partire dalla generazione 1 fino alla 4, sono stati sintetizzati nel nostro laboratorio, attraverso modifiche della procedura sintetica messa a punto per la prima volta da Tomalia ed altri[35,36]. In breve, sono stati realizzati il core di etilendiammina e le unità ramificate, a partire da metilacrilato ed etilendiammina. Ogni strato è stato ottenuto in due step sintetici: la reazione esaustiva di addizione di Michael e la successiva reazione esaustiva di ammidificazione. In primis, i gruppi amminici reagiscono con i monomeri di metilacrilato e solo successivamente viene addizionata l'etilendiammina. Le generazioni intermedie dei dendrimeri PAMAM possiedono in superficie gruppi esterei, mentre le generazioni successive denominate piene, gruppi amminici. In particolare, il dendrimero di piena generazione G(4)-PAMAM **4** è caratterizzato da 32 gruppi amminici terminali. Tutti i dendrimeri, di generazione piena ed intermedia, sono stati caratterizzati come descritto nella parte sperimentale. Il dendrimero **4** è stato caratterizzato in termini di peso molecolare, polidispersività e numero di gruppi amminici terminali (Tabella 2). I valori ottenuti erano in accordo con quelli teorici. Il dendrimero G(4)-PAMAM direzionabile al TSPO (**5**) è stato sintetizzato usando il ligando **1**. In particolare, il ligando **1** (Schema 1) è stato attivato con EDC (1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimide cloridrato) in acqua in presenza di TEA (trietilammina), ed aggiunto ad una soluzione del G(4)-PAMAM **4** sempre in presenza di TEA. Come riportato in Tabella 2, una media di 16 unità di ligando **1** sono state legate per reazione tra una mole di dendrimero **4** e 32 moli di acido carbossilico attivato **1**. Gli eccessi di ligando **1** libero e dell'agente condensante sono stati rimossi attraverso dialisi condotta in acqua deionizzata usando membrane con cut off (MwCO) pari a 3.5 kDa. La risultante sospensione purificata è stata successivamente liofilizzata e la purezza del coniugato è stata stimata attraverso cromatografia di esclusione (SEC) e spettroscopia ¹H-NMR.

Dopo aver caratterizzato il dendrimero G(4)-PAMAM direzionabile al TSPO **5** attraverso classiche metodiche analitiche FT-IR, UV, ¹H-NMR e SEC, il dendrimero è stato ulteriormente funzionalizzato per reazione con il ben noto fluoroforo organico fluoresceina isotiocianato, FITC, in N,N-dimetilformamide (DMF). La DMF è stata, successivamente rimossa per distillazione a pressione ridotta, mentre la fluoresceina in eccesso è stata allontanata mediante dialisi in acqua (M_wCO= 3.5 kDa). Il prodotto finale **6** ottenuto presenta un contenuto medio di 6 unità di fluoresceina (Schema 1, Tabella 2). Per caratterizzarlo, sono state utilizzate le tecniche analitiche UV-VIS e di fluorescenza. Come riportato in Tabella 3, l'inserimento del fluorocromo FITC dà origine ad un composto con un massimo di assorbanza a 467 nm (contro i 494 nm per il fluorocromo libero), ed una minima emissione nel verde a 518 nm (contro i 521 nm per il fluorocromo libero). È stato, inoltre, sintetizzato il dendrimero di controllo FITC-G(4)-PAMAM **7**, privo della porzione direzionante, seguendo una procedura simile a quella precedentemente descritta per l'agente **6**, facendo reagire il dendrimero G(4)-PAMAM **4** con FITC (Schema 1). Il dendrimero FITC-G(4)-PAMAM **7** è stato purificato mediante dialisi in acqua deionizzata per rimuovere l'eccesso di FITC non reagita, e caratterizzato, come il dendrimero **6**, mediante tecniche di spettroscopia UV-VIS e di fluorescenza. Come riportato in Tabella 3, esso ha un'assorbanza massima a 462 nm ed un'emissione a 523 nm. Le strutture chimiche di tutti i dendrimeri sono state determinate mediante spettri FT-IR, UV e ¹H-NMR. In particolare gli spettri FT-IR dei dendrimeri **4**, **5**, **6**, e **7** mostrano le tipiche bande della struttura poli(ammidoamminica) tra 3400-3200 e 1650 cm⁻¹ attribuibili ai gruppi amminici e carbonilici dell'ammide rispettivamente. Lo spettro ¹H-NMR dei coniugati **5** e **6** evidenzia, tra gli altri, segnali chiaramente attribuibili ai protoni metilenici del PAMAM insieme ai segnali relativi alla catena alchilammidica del ligando **1** ed ai suoi protoni aromatici. I pesi molecolari medi dei dendrimeri sintetizzati **4**, **5**, **6**, e **7** sono stati determinati mediante analisi SEC e sono rispettivamente: (M_w) 7,025, 15,600, 15,530, e 12,130 Da, come

riassunto in Tabella 2. L'indice di polidispersione (PDI) M_w/M_n valutato relativamente ai pesi molecolari riferiti, rispettivamente, alla massa e al numero, per tutti i coniugati è compreso nel range tra 1.02 e 1.08, indicando una minima dispersione dei pesi molecolari. In figura 1 è riportato un tipico profilo SEC del dendrimero G(4)-PAMAM direzionabile al TSPO. Tutti i profili SEC mostrano un'ampia distribuzione unimodale di pesi molecolari e si è osservato che i coniugati eluiscono leggermente prima del ligando **1**. I profili SEC monitorati con un detector ad indice di rifrazione ed a due lunghezze d'onda di 230 e 260 nm, per il G(4)-PAMAM **4** e per i dendrimeri **5**, **6** e **7**, sono quasi sovrapponibili. Deve essere anche precisato che il ligando **1** eluisce a 18.2 min con un picco molto stretto e che esso non è presente come impurezza nei dendrimeri, **5** e **6** così come è stato evidenziato dall'analisi SEC, pertanto tale considerazione è un'ulteriore evidenza che il ligando **1** nei dendrimeri **5** e **6** è presente solo in forma covalentemente legata.

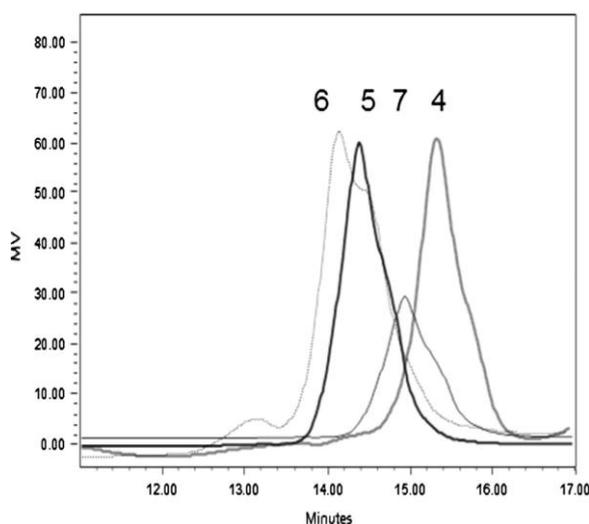


Fig.1 Profili SEC di eluizione dei dendrimeri **4**, **5**, **6** e **7**.

La percentuale dei gruppi amminici terminali dei dendrimeri sostituiti dalle unità di ligando **1** e/o di FITC (grado di coniugazione), è stata stimata mediante spettroscopia $^1\text{H-NMR}$ ed UV. Dai relativi spettri NMR protonici del G(4)-

PAMAM **4** e del ligando **1**, si evince che i segnali dei protoni aromatici sono attribuibili esclusivamente agli acidi carbossilici legati al dendrimero (6.5-8.5 ppm), mentre i gruppi metilenici del PAMAM corrispondono agli unici segnali osservati tra 2 e 3.6 ppm mentre i gruppi ammidici risuonano tra 7.8-8.5 ppm (Fig.2). Dai calcoli effettuati è risultato che ci sono approssimativamente 484 protoni metilenici nel dendrimero G(4)-PAMAM **4** e 6 protoni aromatici attribuibili alla molecola del ligando **1**. Per determinare il numero medio di molecole di ligando **1** per dendrimero, sono stati considerati come riferimento l'integrale tra 6.5-8.5 ppm corrispondente a 6 protoni aromatici e l'integrale tra 2.0-3.6 ppm corrispondente a 484 protoni metilenici. Come mostrato in Tabella 3, per il dendrimero **5** è stato riscontrato un grado di sostituzione (dei gruppi amminici con molecole di ligando **1**) pari al 23.7%. Considerato che ogni dendrimero G(4)-PAMAM **4** presenta 32 gruppi amminici, per il dendrimero **5** è risultato che il numero di molecole di ligando **1** legate è pari a 7.6 (Tabella 2). L'analisi UV dei coniugati è stata condotta nel range tra 250-350 nm, poichè il carrier non assorbe utilizzando come solvente il THF (tetraidrofurano), che consente la solubilizzazione sia del ligando **1** libero sia dei coniugati macromolecolari. Per i coniugati **5**, **6** e **7** le misurazioni UV sono state effettuate comparando i loro valori di estinzione molare ($E^{1\%}$) con quello del ligando **1** alla lunghezza d'onda di massimo assorbimento di quest'ultimo ($\lambda=260$ nm). Nel caso dei composti **6** e **7**, il grado di coniugazione riferito al probe fluorescente è stato valutato mediante misurazioni a lunghezza d'onda di 464 nm, corrispondente al massimo di assorbimento in cui il ligando **1** non assorbe. In Tabella 3 sono inoltre riportati i valori di lunghezza d'onda massima di eccitazione e di emissione dei dendrimeri **6** e **7**. In ogni caso, i risultati ottenuti con le tre procedure analitiche e riportati in Tabella 3 sono in discreto accordo e comparabili.

Tabella 2. Caratteristiche dei dendrimeri

Dendrimer	Numero stimato di gruppi/porzioni terminali ^a			Teorico	Stimato ^b			
	Gruppi amminici (n)	Ligando 1 (m)	FITC (f)	Mw ^c	Mw ^c	Mn ^d	Mp ^e	PDI
				(g/mol)				
4	32 ^f	-	-	6900 ^f	7025±100	6855±50	6780±50	1.02
5	16	16	-	-	15600±100	14500±100	16200±50	1.07
6	15	11	6	-	15530±150	14390±100	14500±150	1.08
7	20	-	12	-	12130±290	11785±250	11880±300	1.03

^aStimati usando la seguente equazione $[Mn_{(d)} - Mw_{(4)}]/FW_{(c)}$ dove $Mn_{(d)}$ rappresenta la M_w dei dendrimeri **5** o **7**, $Mw_{(4)}$ la M_w del dendrimero **4**, ed $FW_{(c)}$ il peso formula rispettivamente del ligando **1** coniugato o delle unità di FITC. Per il dendrimero **6**, il numero dei gruppi amminici sostituiti dal FITC è stato stimato mediante ¹H-NMR (Tabella 3 per dettagli). ^bValutati mediante SEC usando il destrano come standard. ^cPeso molecolare medio riferito al peso (M_w). ^dPeso molecolare medio riferito al numero (M_n). ^eMassa molare al picco massimo (M_p). ^fIn accordo con la nota [35].PDI: indice di polidispersione.

Tabella 3. Grado di coniugazione dei dendrimeri **5**, **6**, e **7**.

Sample	E^{1%} ^a	SD (g/g) (UV)	SD (mol/mol) (NMR)	SD % (NMR)	λ_{max} EX (nm)	λ_{max} Em (nm)
1	897.0	-	-	-	-	-
5	401.8	0.38 ± 0.1 ^b	7.58 ^b	23.7 ^d	-	-
6	13.5	0.026 ^c	5.70 ^c	17.8 ^e	467	518
7	21.6	0.037 ^c	4.81 ^c	15.0 ^e	462	523

^aDeterminato mediante analisi UV in acqua ad una lunghezza d'onda di 256 nm (**5**) o di 464 nm (**6,7**). ^bSi riferisce al grado di sostituzione del ligando TSPO **1**. ^cSi riferisce al grado di sostituzione del probe FITC. ^dPercentuale dei gruppi amminici terminali sostituiti con il ligando TSPO **1**. ^ePercentuale dei gruppi amminici terminali sostituiti da FITC.

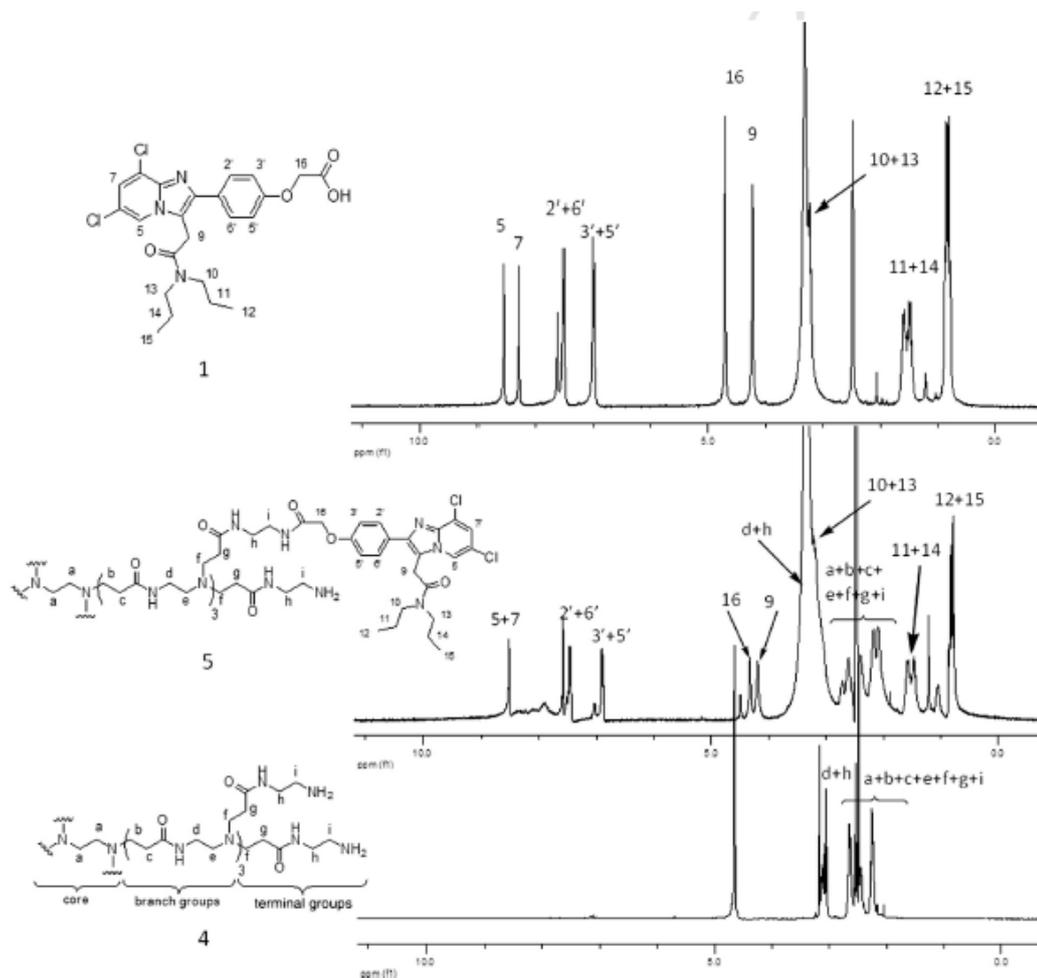


Fig.2 $^1\text{H-NMR}$ del dendrimero direzionato al TSPO G(4)-PAMAM **5**.

4.3.4 Caratterizzazione chimico-fisica e morfologica dei dendrimeri 4-7

La tabella 4 riassume le proprietà chimico-fisiche dei diversi dendrimeri sintetizzati **4**, **5**, **6** e **7**. Per il dendrimero di partenza G(4)-PAMAM **4**, è stata riscontrata una dimensione media di 4.28 ± 0.99 nm [d_{mean} (nm), numero PSD (distribuzione dimensionale di particelle in dispersione) in base al numero], che è in accordo con quella precedentemente riportata [36]. Come era prevedibile, si è osservato un incremento del diametro idrodinamico nel caso dei dendrimeri funzionalizzati con il ligando **1** o con il colorante FITC o con entrambi (Fig. 3A).

Per i dendrimeri **5**, **6** e **7** sono state rilevate dimensioni medie delle particelle rispettivamente pari a 17.14 ± 0.31 , 23.97 ± 4.15 e 62.53 ± 1.57 nm. In particolare, per i dendrimeri **6** e **7** dispersi in acqua deionizzata è stato osservato un incremento dimensionale che molto probabilmente è attribuibile alla presenza sulla superficie del dendrimero, della molecola lipofila **1** ligando del TSPO o del FITC o di entrambi, che alterano le proprietà chimico-fisiche del nanovettore. Infatti come riportato in Tabella 2, il dendrimero **6** ha un numero di unità di FITC inferiore rispetto al dendrimero **7**, inoltre possiede sulla sua superficie anche porzioni lipofile del ligando **1**, che non sono presenti sul dendrimero **7**. L'unità FITC è caratterizzata da un gruppo carbossilico che determina una variazione del potenziale zeta del sistema (Tabella 4) e potrebbe influenzare anche il diametro idrodinamico. Il diametro idrodinamico dei dendrimeri **6** e **7** è stato valutato anche in soluzione tampone fosfato (PBS), ed il risultato riportato in Tabella 4, ha evidenziato che non vi è nessuna differenza significativa con i dati ottenuti in acqua deionizzata per il dendrimero **6** (27.60 ± 1.30 nm). Mentre, per quanto riguarda il dendrimero **7**, è stato riscontrato un decremento dimensionale medio della particella quando dispersa in PBS (18.62 ± 0.44 nm). Inoltre, i dendrimeri **4**, **5**, **6**, e **7** risultano monodispersi come confermato dai valori di indice di polidispersività (PDI) compresi nel range tra 0.030 e 0.084. Questi risultati sono in accordo con una delle peculiari caratteristiche dei dendrimeri, ovvero la monodispersività del sistema, che li rende delle nanopiatteforme interessanti per la progettazione di biosensori. Infine è stato misurato il potenziale zeta di tutti i sistemi, il cui valore positivo ha suggerito che i gruppi amminici terminali dei dendrimeri PAMAM sono protonati e carichi positivamente a pH fisiologico (Fig. 3B). Questa caratteristica consente ai dendrimeri in primis di aderire alla membrana cellulare carica negativamente mediante interazioni elettrostatiche, e successivamente di essere assorbiti all'interno del citosol per endocitosi[4]. Inoltre, recenti studi hanno ampiamente dimostrato che polimeri carichi positivamente, come appunto i dendrimeri PAMAM, potrebbero determinare

l'escape endosomiale attraverso diversi meccanismi, il più comune dei quali è l'effetto osmotico detto anche effetto "proton-sponge"[4]. È interessante notare che il dendrimero **4**, preso come riferimento, ha il più alto valore in assoluto di potenziale zeta pari a +16.5mV (Tab. 4), mentre, quando funzionalizzato presenta valori di potenziale zeta più bassi rispettivamente di 13.8 e 11.4 mV (dendrimeri **5** e **6**). Quando sulla superficie del dendrimero G(4)-PAMAM è introdotto solo il FITC, come per il dendrimero **7**, il valore di potenziale zeta misurato è pari a 12.7 mV. L'aspetto morfologico dei dendrimeri **4**, **5**, **6** e **7** è stato valutato mediante la tecnica di microscopia a forza atomica (Atomic Force Microscopy AFM), in cui il campione da esaminare, costituito da una goccia della sospensione del dendrimero in DMSO (1mg/mL), è fissato per diffusione su mica con la procedura dello *spin-coating* (rivestimento per rotazione). Le immagini AFM dei dendrimeri **4-7** hanno mostrato una superficie piatta ed uniforme; in alcuni casi è stato riscontrato un incremento di dimensione, specialmente per i dendrimeri **6** e **7**, il che probabilmente è legato ad un'auto aggregazione dei dendrimeri dovuta all'introduzione del composto **1** e/o del FITC, o più probabilmente ad un artefatto tecnico legato alla lenta evaporazione del solvente (DMSO) forza i monomeri del dendrimero ad aggregarsi sulla superficie della mica.

In particolare, le immagini di Fig. 4a e b mostrano rispettivamente le forme di fase e topografiche (1 μ m \times 1 μ m) del dendrimero **4**. È possibile riconoscere alcuni dendrimeri G(4)-PAMAM ben separati, di diametro pari a 20 nm. Le foto 4c e d mostrano rispettivamente, le immagini 500 nm \times 500 nm di fase e topografiche del dendrimero **5**. È singolare il comportamento del dendrimero **5** quando disperso in acqua deionizzata e depositato su mica; le immagini AFM relative (Fig.5) hanno infatti evidenziato aggregati frattali più larghi e strutturati. La loro origine potrebbe essere correlata all'utilizzo di un solvente più polare (Costante dielettrica a 25 °C: acqua=78.5 μ ; DMSO=46.7 μ) il quale potrebbe indurre la formazione di aggregati frattali ben organizzati, come appunto accade in acqua. Questi aggregati

hanno mostrato una stabilità meccanica elevata tale da consentirne la visualizzazione sulla superficie di mica dopo l'evaporazione del solvente. Le Fig. 4e ed f mostrano rispettivamente le immagini di fase e topografiche $20\ \mu\text{m}\times 20\ \mu\text{m}$ del dendrimero **6**. Le immagini AFM del dendrimero **7** (dati non riportati) hanno evidenziato la propensione all'aggregazione di questo dendrimero su mica dove è possibile riscontrare la presenza di dense isole di nanoparticelle. Questo probabilmente è dovuto alla coniugazione con FITC, la quale riduce, come evidenziato dalle misure di potenziale zeta, la densità di carica superficiale del dendrimero PAMAM e quindi anche l'attrazione elettrica tra il dendrimero PAMAM (carico positivamente) e la superficie di mica (carica negativamente). In definitiva, le misurazioni AFM risultano in accordo con i dati di spettroscopia a correlazione fotonica (PCS), indicando che i dendrimeri mantengono inalterata la loro morfologia sferica e dimensione sul vetro, anche se sono stati osservati alcuni aggregati.

Tabella 4. Proprietà chimico-fisiche dei dendrimeri **4**, **5**, **6**, e **7**.

Dendrimeri	Size d_{medio} (nm) ^a		PDI ^b	ζ (mV) ^c
	Z-average	number PSD		
4	33.90 ± 0.10	4.28 ± 0.99	0.084 ± 0.001	+16.5 ± 0.1
5	74.39 ± 0.65	17.14 ± 0.31	0.044 ± 0.008	+13.8 ± 0.9
6	63.92 ± 0.42 (70.40 ± 2.30) ^d	23.97 ± 4.15 (27.60 ± 1.30) ^d	0.047 ± 0.002 (0.087 ± 0.002) ^d	+11.4 ± 0.5
7	94.24 ± 1.06 (41.46 ± 0.42) ^d	62.53 ± 1.57 (18.62 ± 0.44) ^d	0.030 ± 0.002 (0.041 ± 0.002) ^d	+12.7 ± 0.6

^a Diametro idrodinamico; ^b PDI indice di polidispersività; ^c ζ potenziale zeta; ^d misurato in PBS. I dati sono riportati come media ± SD, $n=3$.

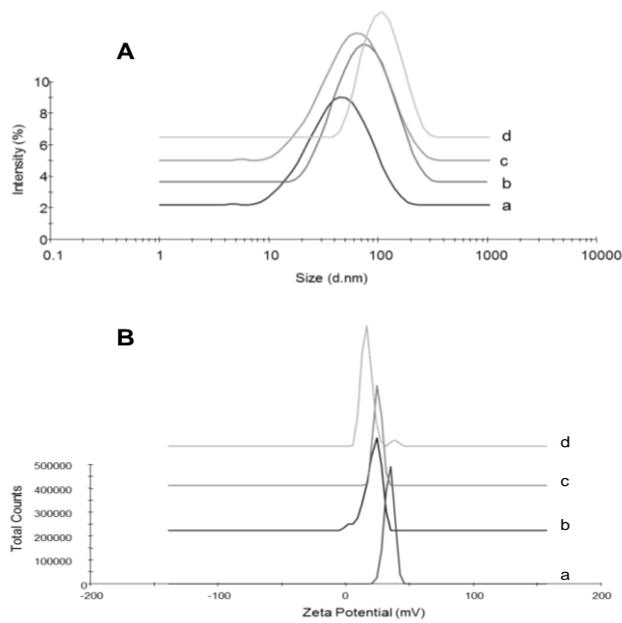


Fig.3. (A) Size Distribution per Intensità. Dendrimer G(4)-PAMAM **4** (a); Dendrimer direzionato al TSPO G(4)-PAMAM **5** (b); Dendrimer direzionato al TSPO G(4)-PAMAM-FITC **6** (c) e dendrimer G(4)-PAMAM-FITC **7** (d). (B) Distribuzione dei Potenziali. Dendrimer G(4)-PAMAM **4** (a); Dendrimer direzionato al TSPO G(4)-PAMAM **5** (b); Dendrimer direzionato al TSPO G(4)-PAMAM-FITC **6** (c) e dendrimer G(4)-PAMAM-FITC **7** (d).

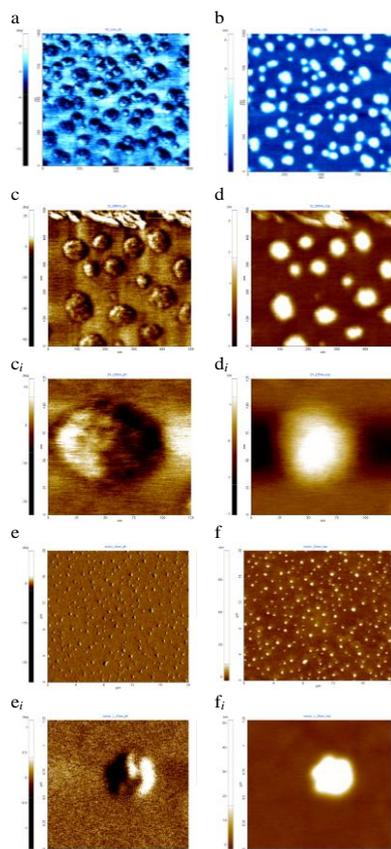


Fig. 4. Immagini AFM dei dendrimeri **4**, **5** e **6**. (a) Immagini di fase del dendrimero **4** di $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$ e; (b) Topografia $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$ della stessa regione in (a); (c) Immagini di fase del dendrimero **5** $500\ \text{nm} \times 500\ \text{nm}$; (d) Topografia $500\ \text{nm} \times 500\ \text{nm}$ della stessa regione in (c); (c_i) Immagini di fase $125\ \text{nm} \times 125\ \text{nm}$ della stessa regione in (c); (d_i) topografia $125\ \text{nm} \times 125\ \text{nm}$ della stessa regione in (d); (e) Immagini di fase del dendrimero **6** $20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$; (f) Topografia $20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$ della stessa regione in (e); (e_i) Immagini di fase del dendrimero **6** $1.25\ \mu\text{m} \times 1.25\ \mu\text{m}$; (f_i) topografia $1.25\ \mu\text{m} \times 1.25\ \mu\text{m}$. Denora et al. J. Control. Release. 2013, 172, 1111-1125.

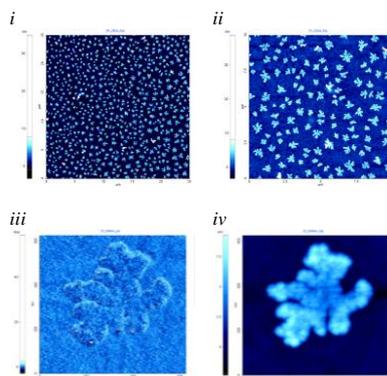


Fig.5. Immagini AFM degli aggregati frattali dei dendrimeri **5** su mica. (i) Topografia 25 $\mu\text{m} \times 25 \mu\text{m}$; (ii) Topografia 10 $\mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$; (iii) Immagini di fase 600 nm \times 600 nm; (iv) topografia 600 nm \times 600 nm della stessa regione in (iii).

4.3.5 Citotossicità e stabilità dei dendrimeri sulle cellule C6 di glioma

Sono stati esaminati gli effetti dei dendrimeri **4**, **5**, **6** e **7** sulla vitalità delle cellule C6 di glioma. Come mostrato in Fig.6, tutti i dendrimeri testati hanno evidenziato una citotossicità concentrazione dipendente, dopo 72 h di incubazione. In particolare, il dendrimero **4** è risultato il più attivo, come confermato dal suo valore di IC_{50} pari a 0.0065 mg/mL. È interessante osservare che i dendrimeri **5**, **6** e **7** (valori IC_{50} di 0.15, 0.39 e 0.011 mg/mL, rispettivamente), risultano meno citotossici del dendrimero **4**, suggerendo che la citotossicità sia proporzionale alla carica positiva espressa dalle nanoparticella. Questi risultati sono in accordo con quelli osservati da F.P. Seib et al.[47]. Pertanto, per tutti gli esperimenti successivi i dendrimeri **6** e **7** sono stati usati a concentrazioni di 0.015 and 0.010 mg/mL rispettivamente, e la microscopia in campo chiaro ha confermato l'assenza di evidenti segni di tossicità cellulare a queste concentrazioni. La stabilità dei dendrimeri **5**, **6** e **7** è stata valutata in terreno di coltura completo ed in presenza di cellule, al fine di evitare durante le misurazioni di uptake cellulare, potenziali artefatti dovuti al fluoroforo libero, ed inoltre per quantificare l'aliquota di ligando

TSPO **1** originatosi per idrolisi del legame ammidico tra il gruppo ammino terminale del dendrimero ed il gruppo carbossilico di **1**. Dopo 4h di incubazione con le cellule in terreno di coltura, la quantità di FITC libera misurata per il dendrimero **6** e **7** è stata rispettivamente dello 0.6 e 1.2 % del totale. Inoltre, dopo lo stesso periodo di incubazione, la quantità di ligando TSPO **1** libero misurata per i dendrimeri **5** e **6** è stata dello 0.2 e 0.3 % del totale. La presenza di alcuni contaminanti non ha interferito con i successivi esperimenti di uptake.

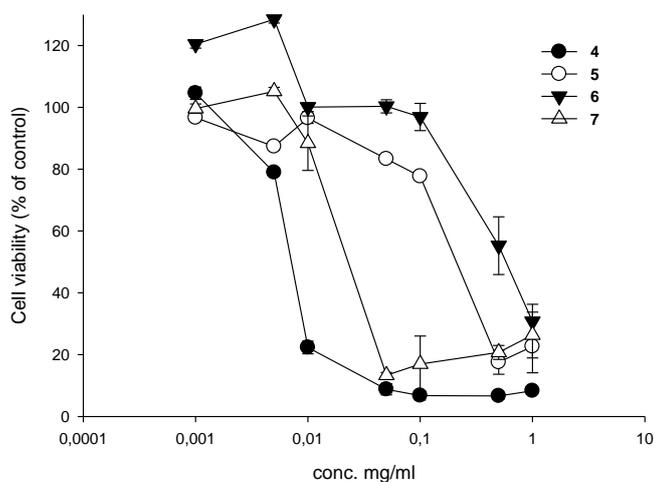


Fig.6. Citotossicità dei dendrimeri **4**, **5**, **6**, e **7** su cellule C6 di glioma. Il periodo di incubazione è stato di 72 h e le cellule seminate con una densità di 5,000 cellule/pozzetto. I dati sono presentati come media \pm SEM, $n=3$.

4.3.6 Uptake per endocitosi, binding extracellulare ed esocitosi dei dendrimeri **6** e **7** in cellule C6 di glioma.

Al fine di valutare i meccanismi di interazione dei dendrimeri coniugati con le cellule C6 di glioma, sono stati effettuati studi di binding extracellulare, di uptake e di esocitosi. L'associazione cellulare di entrambi i dendrimeri marcati con FITC, **6** e **7**, a 37 °C è risultata lineare durante il tempo di incubazione come mostrato in Fig. 7a e 7c, rispettivamente. Quando gli esperimenti sono stati condotti a 4 °C,

non è stato osservato alcun significativo binding extracellulare per i dendrimeri **6** e **7**. In particolare, nel caso dei dendrimeri **6** e **7**, è stata misurata rispettivamente una fluorescenza di binding extracellulare di circa 14 and 15 % del totale. Non sorprende che il profilo di associazione cellulare dei dendrimeri testati, ricalchi quello osservato in precedenza per il dendrimero G(4)-PAMAM funzionalizzato con il colorante organico Oregon Green [42]. Inoltre, non è stata osservata nel tempo, alcuna discernibile esocitosi dei dendrimeri **6** e **7** (Fig.7 b e d, rispettivamente).

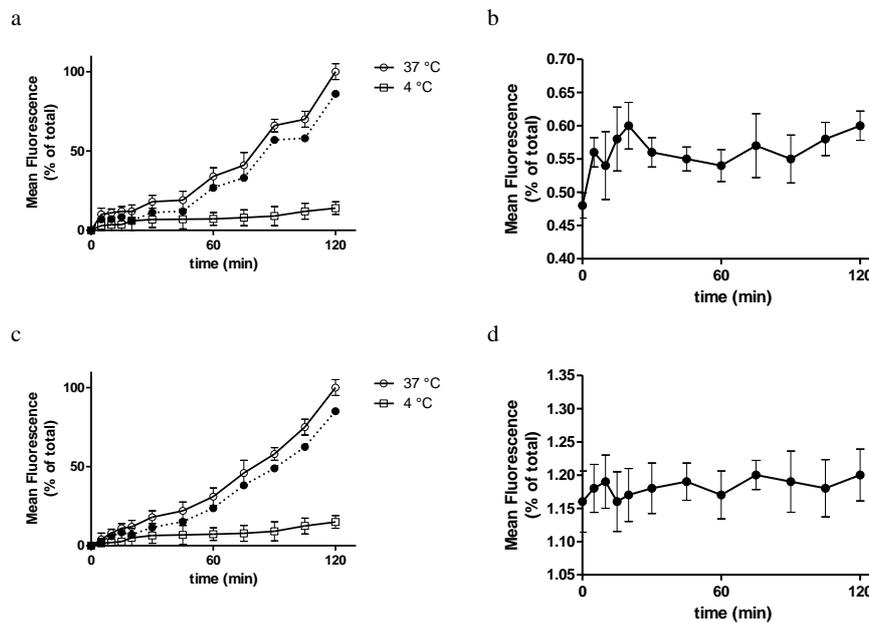


Fig. 7. Uptake per endocitosi, binding extracellulare, ed esocitosi dei dendrimeri FITC marcati **6** e **7** in cellule C6 di glioma. Pannello (a) endocitosi e pannello (b) esocitosi del dendrimero direzionato al TSPO G(4)-PAMAM-FITC **6**. Pannello (c) endocitosi e pannello (d) esocitosi del dendrimero G(4)-PAMAM-FITC **7**. Simboli plot per il pannello (a, c): aliquota del dendrimero internalizzato (●) stimata sottraendo i valori di uptake ottenuti a 4 °C da quelli ottenuti a 37 °C. I dati sono presentati come media \pm SEM, $n=3$.

4.3.7 Uptake cellulare in presenza di inibitori di endocitosi e studi di competizione dei dendrimeri 6 e 7

L'endocitosi può essere classificata in due ampie categorie: fagocitosi e pinocitosi. La fagocitosi è tipicamente ascrivibile a cellule specializzate, come ad esempio i macrofagi, mentre la pinocitosi si verifica in tutti gli altri tipi cellulari. Lo studio dei diversi meccanismi di pinocitosi è ancora un campo in evoluzione e nessun sistema corrente di classificazione risulta pienamente soddisfacente. Correntemente, la pinocitosi viene suddivisa in macropinocitosi, endocitosi clatrina-dipendente (CDE) e clatrina-indipendente (CIE). La macropinocitosi è un meccanismo endocitotico non selettivo di internalizzazione di macromolecole in sospensione mentre, CDE è la ben nota via endocitotica che rappresenta il meccanismo preferenziale per l'internalizzazione di nanoparticelle di dimensioni non superiori a 200nm [43]. Al contrario, il meccanismo CIE non è stato ancora ben chiarito[43]. E' stato dimostrato che nel processo di uptake di sistemi nanoparticellari sia coinvolto un certo numero di meccanismi di endocitosi e che questo sia strettamente dipendente dal tipo cellulare, dalla natura delle nanoparticelle e dalla loro dimensione[42,43,44]. La maggior parte dei dati relativi all'uptake cellulare dei sistemi nanoparticellari deriva da studi effettuati utilizzando inibitori chimici di endocitosi. Dal momento che gli specifici meccanismi di internalizzazione dei dendrimeri PAMAM non sono stati ancora ben chiariti, è stato analizzato l'uptake dei dendrimeri **6** e **7** in presenza di ben noti inibitori di endocitosi a concentrazioni testate per l'efficacia come per la citotossicità. Infatti è stata innanzitutto valutata la potenziale citotossicità a breve termine (24 h) degli inibitori di endocitosi sulle cellule C6 di glioma, per assicurare una certa vitalità cellulare durante i saggi di uptake (2 h). In particolare, gli inibitori sono stati utilizzati alle concentrazioni che mostravano un minimo di 85% di vitalità cellulare durante il periodo del saggio a 24 h (Tabella 5). In questo studio, come inibitori di endocitosi sono stati usati la genisteina (100 µM), l'ossido

di fenilarsina (PAO; 1 μ M), metil β -ciclodestrina (M β CD; 10 mM), dynasore (50 μ M), wortmannina (50 nM), ed il tampone privo di potassio (per la composizione vedere la parte sperimentale). In particolare, il PAO ed il tampone privo di potassio sono considerati degli inibitori del CDE; M β CD e genisteina come inibitori di CIE, mentre, dynasore e wortmannina come inibitori dell'endocitosi dinamina-dipendente e della macropinosi, rispettivamente. Come mostrato in Fig.8, il confronto tra le cellule C6 trattate con PAO e M β CD e non trattate, incubate con il dendrimero **6** per 2 h a 37 °C, ha evidenziato una significativa riduzione della fluorescenza associata alle cellule del 42 e 24 %, rispettivamente. E' stata osservata una riduzione marginale della fluorescenza associata alle cellule utilizzando il tampone privo di potassio, genisteina, e wortmannina. Mentre, non è stato riscontrato alcun significativo cambiamento nelle cellule trattate con dynasore. I risultati ottenuti per il dendrimero **6** sono paragonabili a quelli osservati per il **7** (dati non mostrati). Come riportato in precedenza e sulla base dei risultati appena enunciati, l'internalizzazione dei dendrimeri PAMAM **6** e **7** risulta in parte dovuta al meccanismo CDE (42% di inibizione in presenza di PAO, 21% di inibizione in presenza di tampone privo di potassio), ed anche al meccanismo colesterolo-dipendente (24% di inibizione in presenza di M β CD) [42].

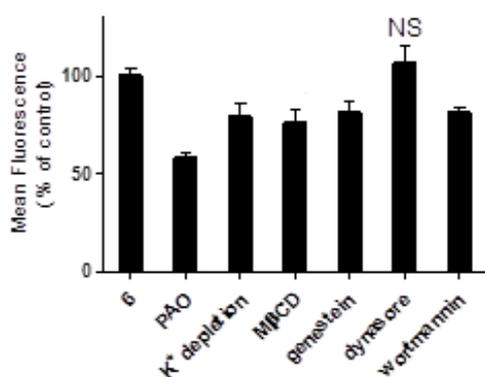


Fig.8. Effetto degli inibitori di endocitosi sull'accumulo del dendrimero **6** (37 °C; 2 h). I risultati sono espressi in relazione alla fluorescenza cellula-associata del

dendrimero **6**, usato come controllo, in assenza di inibitori. I dati rappresentano la media \pm SEM, $n=3$.

Tabella 5. Concentrazione degli inibitori di endocitosi e % di vitalità cellulare in cellule C6. I risultati sono riportati come media \pm deviazione standard, $n= 3$.

Meccanismi di endocitosi	Inibitori specifici	Concentrazione	% vitalità cellulare
Endocitosi Clatrina-dipendente	ossido di fenilarsina	1 μ M	90.8 \pm 2.3
	tampone privo di potassio	isotonic ^a	103.5 \pm 3.1
Endocitosi Clatrina-indipendente	metil- β -ciclodestrina	10 mM	86.4 \pm 5.2
Caveole mediato	Genisteina	100 μ M	101.5 \pm 8.6
Dynamina dipendente	Dynasore	50 μ M	91.9 \pm 2.7
Macropinocitosi	wortmannina	50 nM	105.4 \pm 6.8

^a Il tampone privo di potassio è stato usato con la seguente composizione : NaCl 140 mmol/l, HEPES 20 mmol/L, CaCl₂ 1 mmol/L, MgCl₂ 1 mmol/L, D-glucosio 1 mg/mL, pH 7.4.

Gli studi *in vitro* di competizione sono stati effettuati al fine di quantificare l'interazione dei dendrimeri **6** e **7** con il recettore TSPO in presenza ed assenza di concentrazioni crescenti (10, 20 e 30 μ M) del ligando, agonista TSPO, **1**. Il pretrattamento con **1** per 45 min prima dell'aggiunta del dendrimerio **6** (0.015 mg/ml, 1 μ M in termini di FITC) per 2 h a 37 °C, ha determinato una significativa riduzione dell'intensità di fluorescenza media di **6** con concentrazioni crescenti di agonista TSPO **1** (Fig.9). Questo suggerisce che il dendrimerio direzionato al TSPO G(4)-PAMAM-FITC **6** compete per la localizzazione per lo stesso sito del ligando TSPO **1**. Come era prevedibile, nel caso del dendrimerio **7**, l'intensità di

fluorescenza media non è variata a concentrazioni crescenti di ligando TSPO **1** (Fig.9) indicando l'assenza di competizione tra il ligando TSPO **1** ed il dendrimero non-TSPO direzionato **7**.

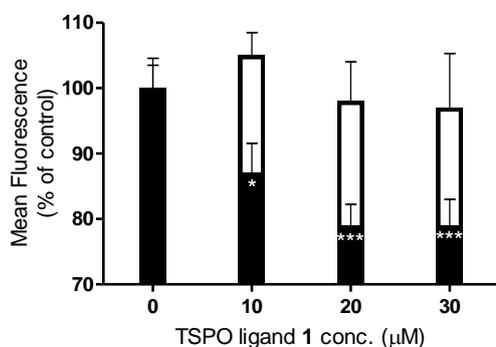


Fig.9. Competizione del dendrimero direzionato TSPO G(4)-PAMAM-FITC **6** con l'agonista TSPO **1**. Il nero corrisponde alla fluorescenza media di internalizzazione del dendrimero **6** ed il bianco rappresenta la fluorescenza media di internalizzazione del dendrimero **7**. Le cellule C6 di glioma sono state trattate con concentrazioni crescenti del composto **1** per 45 minuti prima della sostituzione con il dendrimero **6** (0.015 mg/mL) o **7** (0.010 mg/mL) per 120 minuti e l'intensità di fluorescenza quantificata mediante spettrofluorimetro (Wallac Victor3, 1420 Multilabel Counter, Perkin-Elmer). I dati rappresentano la media \pm SEM, $n=3$.

4.3.8 Destino intracellulare e studi di co-localizzazione dei dendrimeri **6** e **7** in cellule C6 di glioma.

Frequentemente vengono utilizzate due procedure per quantificare il trafficking dei polimeri terapeutici o diagnostici, nello specifico il frazionamento subcellulare e la microscopia confocale. Ad oggi, la maggior parte degli studi investiganti il trafficking intracellulare dei polimeri si è avvalsa della microscopia confocale. Alcune tecniche microscopiche basate sulla fluorescenza hanno maggiori limiti, tra questi: la risoluzione ottica del microscopio, capacità di analizzare un limitato

numero di cellule della popolazione e non meno importante, le proprietà del probe fluorescente. Quest'ultimo può essere soggetto a fotobleaching, quenching della fluorescenza concentrazione e pH-dipendente ed inoltre, il probe stesso potrebbe influenzare i meccanismi di uptake cellulare ed il successivo trafficking del coniugato. Mentre, il frazionamento subcellulare è impegnativo (molto laborioso, richiede un gran numero di cellule, richiede molti esperimenti di controllo per verificare l'integrità degli organuli) e l'uso della centrifugazione differenziale per monitorare il trasporto intracellulare dei polimeri terapeutici è ancora uno strumento molto importante. Pertanto, in questo studio, al fine di ottenere maggiori e più accurate informazioni circa il trasporto cellulare e la co-localizzazione dei dendrimeri **6** e **7**, sono stati usati sia il frazionamento mitocondriale che la microscopia confocale. In particolare, nel caso del frazionamento cellulare, le cellule C6 di glioma sono state frazionate in nuclei (*N*), mitocondri (*M*), lisosomi (*L*), frazione microsomiale (*Mic*) e solubile (*S*) per mezzo di centrifugazione differenziale usando un protocollo adattato da Seib et al. [45]. Le cellule C6 sono state esposte ai dendrimeri **6** e **7** (0.015 e 0.010 mg/mL, rispettivamente; 1 μ M in termini di FITC) per 24 h prima della procedura di frazionamento. Successivamente, è stata quantificata la quantità di FITC che si era legata alla membrana cellulare, e successivamente internalizzata nel citoplasma o translocata nei mitocondri, usando la procedura standard sopra menzionata. Come mostrato in Fig. 10, quando le cellule C6 sono state esposte per 24 h al dendrimero TSPO-direzionato G(4)-PAMAM-FITC **6**, la fluorescenza media rilevata nella frazione mitocondriale è stata del 39%. La fluorescenza è stata anche individuata nella frazione lisosomiale (31%) ed in misura minore nella frazione nucleare (4%), microsomiale (7%) e solubile (2%). In contrasto, il dendrimero G(4)-PAMAM-FITC **7**, il quale non è un sistema direzionato al TSPO, ha mostrato una distribuzione differente (Fig.10). Infatti, dopo il periodo di incubazione, la FITC rilevata nella frazione mitocondriale (21%) è stata significativamente più bassa rispetto a quella riscontrata per il dendrimero **6**.

Questa evidenza conferma che la porzione di legame al TSPO è capace di riconoscere la proteina di translocazione mitocondriale. I recuperi complessivi per i dendrimeri **6** e **7** sono stati 83 e 72% del totale, rispettivamente.

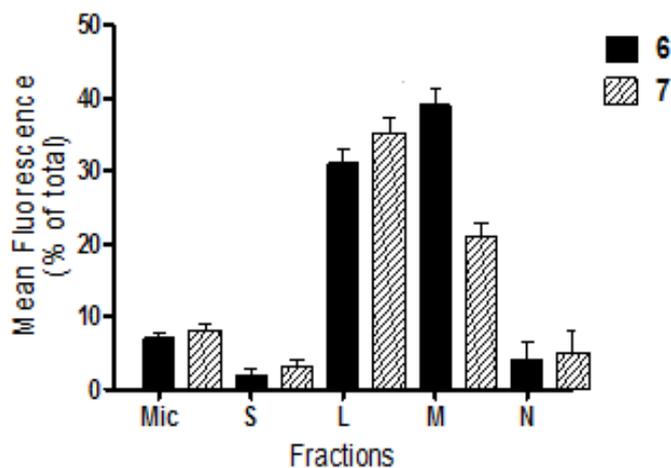


Fig.10. Frazionamento subcellulare delle cellule C6 dopo incubazione con i dendrimeri **6** e **7**. Abbreviazioni: frazioni microsomiale (*Mic*), solubile (*S*), lisosomiale (*L*), mitocondriale (*M*) e nucleare (*N*). I dati rappresentano la media \pm SEM, $n=3$.

Al fine di confermare le evidenze ottenute mediante frazionamento cellulare, gli studi di co-localizzazione cellulare dei dendrimeri fluorescenti **6** e **7** sono stati inizialmente condotti mediante microscopia ad epifluorescenza su cellule vitali. In particolare, le cellule C6 di glioma sono state incubate con i dendrimeri FITC-marcati **6** e **7** (0.015 e 0.010 mg/mL, rispettivamente; 1 μ M in termini di FITC) e visualizzate 24-30 h dopo il trattamento. Prima dell'acquisizione delle immagini, le cellule sono state incubate per 15–30 min a 37 °C in atmosfera di 5% CO₂ con MitoTracker Red CMXRos 25 nM usato come marker mitocondriale. Come mostrato in Fig.11 il dendrimero **6** entra in cellula e lega i mitocondri. Infatti la sovrapposizione del rosso (MitoTracker Red) e della fluorescenza verde (porzione

FITC di **6**) converge al giallo, indicando che la maggior parte del dendrimero TSPO direzionato G(4)-PAMAM-FITC **6** si co-localizza nei mitocondri. In contrasto, nel caso del dendrimero **7** la co-localizzazione non è stata così evidente come nel caso del dendrimero TSPO direzionato G(4)-PAMAM-FITC **6** (Fig. 11). Questi risultati supportano quelli ottenuti con il frazionamento cellulare.

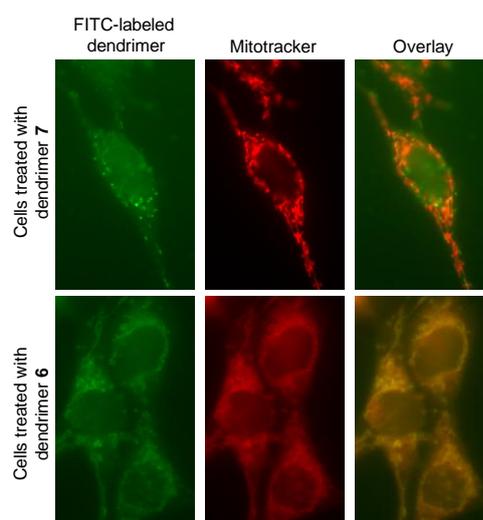


Fig.11. Analisi morfologica della struttura della rete mitocondriale in cellule C6 di glioma visualizzate con il dendrimero TSPO direzionato G(4)-PAMAM-FITC **6** o con il dendrimero G(4)-PAMAM-FITC **7** (verde) ed il MitoTracker Red (rosso), dopo un periodo di incubazione di 24 h. Overlay: quando il rosso ed il verde fluorescente convergono al giallo si ha evidenza di co-localizzazione.

Per quello che concerne la microscopia confocale, è stato utilizzato un innovativo microscopio Confocale-AFM-TIRF (CAT). In particolare, la microscopia CAT è una combinazione di un microscopio confocale, di una tecnica di microscopia a forza atomica e di un microscopio a riflessione interna totale di fluorescenza (TIRF=total internal reflection fluorescence microscope). Tuttavia, in questo lavoro è stata utilizzata solo la microscopia confocale su cellule fissate e vitali. La microscopia in fluorescenza delle cellule C6 incubate con i dendrimeri **6** e **7** ha

dimostrato chiaramente che la fissazione delle cellule alterava la distribuzione subcellulare di entrambi i dendrimeri FITC-marcati (dati non riportati). Sebbene siano state sviluppate in precedenza alcune metodologie per studiare il trafficking intracellulare di nanoparticelle, la loro utilità è limitata[45]. Pertanto, in questo studio sono state usate cellule fissate, colorate con DAPI e Falloidina, al fine di ottenere informazioni preliminari circa la distribuzione intracellulare dei dendrimeri **6** e **7**. Come mostrato in Fig.12, entrambi i dendrimeri FITC-marcati sono in grado di entrare nelle cellule C6 apparentemente senza alcun legame sulla superficie della membrana cellulare. Solo la visualizzazione delle cellule vitali fornisce un'immagine accurata della localizzazione intracellulare dei dendrimeri **6** e **7**. Pertanto, per poter ulteriormente capire se il dendrimero **6** fosse direzionato ai mitocondri, è stato condotto un esperimento di co-incubazione. Questo è stato realizzato incubando inizialmente le cellule C6 con i dendrimeri **6** o **7** come sopra descritto, e successivamente con il MitoTracker Red o il LysoTracker Red, per 30 min a 37 °C, al fine di marcare i mitocondri o i lisosomi, rispettivamente. La Fig. 13 pannello **A**, evidenzia la co-registrazione del dendrimero TSPO marcato-G(4)-PAMAM-FITC **6** e del MitoTracker Red con il giallo (freccie) indicanti le aree di sovrapposizione, mentre il rosso ed il verde indicano le aree in cui il dendrimero **6** (verde) ed il marker mitocondriale (rosso) non sono coincidenti. E' incoraggiante osservare che la maggior parte del verde converge al giallo, indicando che la maggioranza del dendrimero **6** abbia la stessa localizzazione cellulare del MitoTracker Red. Inoltre, il dendrimero **6** è co-localizzato e nessun'altra parte della cellula risulta marcata, neanche il nucleo. In contrasto, come visibile in Fig.13 pannello **A**, la fluorescenza del dendrimero G(4)-PAMAM-FITC **7** non si sovrappone con quella del marker mitocondriale. Questa evidenza, in accordo con i risultati acquisiti mediante microscopia ad epifluorescenza (Fig.11), conferma l'ipotesi che il dendrimero coniugato con il ligando TSPO **1** produce una chiara fluorescenza localizzata in cellula dovuta alla sua capacità di passare attraverso la membrana cellulare e legare la proteina target TSPO. Lo

stesso studio di co-localizzazione è stato condotto in presenza del marker lisosomiale LysoTracker. La Fig.13 pannello **B**, mostra la co-registrazione dei dendrimeri **6** o **7** e del LysoTracker Red con il giallo indicante le aree di sovrapposizione, mentre il rosso ed il verde indicano le aree dove i dendrimeri (verde) ed il marker lisosomiale (rosso) non sono coincidenti. Come era prevedibile, entrambi i dendrimeri risultano in qualche misura co-localizzati nei lisosomi. Inoltre, per quantificare la percentuale di co-localizzazione dei dendrimeri **6** e **7**, è stato usato un metodo computazionale. In particolare, tutti i pixel dell'immagine sono stati distribuiti in uno scatterogramma, in cui i due canali dell'immagine sono stati comparati tra di loro. I pixels di entrambi i canali aventi posizione identiche nell' immagine possono essere considerati una coppia. In accordo, ogni coppia di pixel presenta due intensità, una per ciascun canale (Fig.14). Le intensità dei due canali sono rappresentate dagli assi dello scatterogramma. Nella regione 3 dello scatterogramma sono presentati i pixel di co-localizzazione. I risultati hanno evidenziato che per il dendrimero TSPO direzionato-G(4)-PAMAM **6** e per il dendrimero G(4)-PAMAM **7** i pixel di co-localizzazione sono pari al 47 e 20 % del totale, rispettivamente. E' interessante notare che i risultati ottenuti usando il frazionamento cellulare e la microscopia confocale sono completamente in accordo tra di loro.

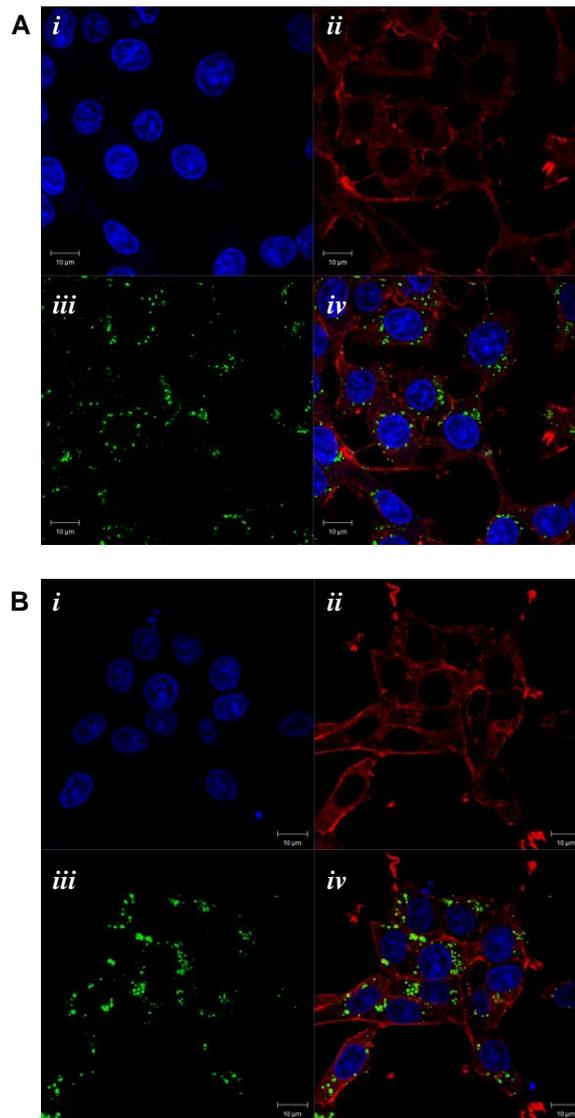


Fig.12. Singole sezioni confocali rappresentative di cellule C6 fissate e visualizzate con (A) *i*) DAPI; *ii*) Falloidina; *iii*) dendrimero TSPO direzionato-G(4)-PAMAM-FITC **6** (1 µM in FITC); *iv*) sovrapposizione; (B) *i*) DAPI; *ii*) Falloidina; *iii*) G(4)-PAMAM-FITC **7** (1 µM in FITC); *iv*) sovrapposizione, dopo un periodo di incubazione di 12 h. Barra: 10 µm.

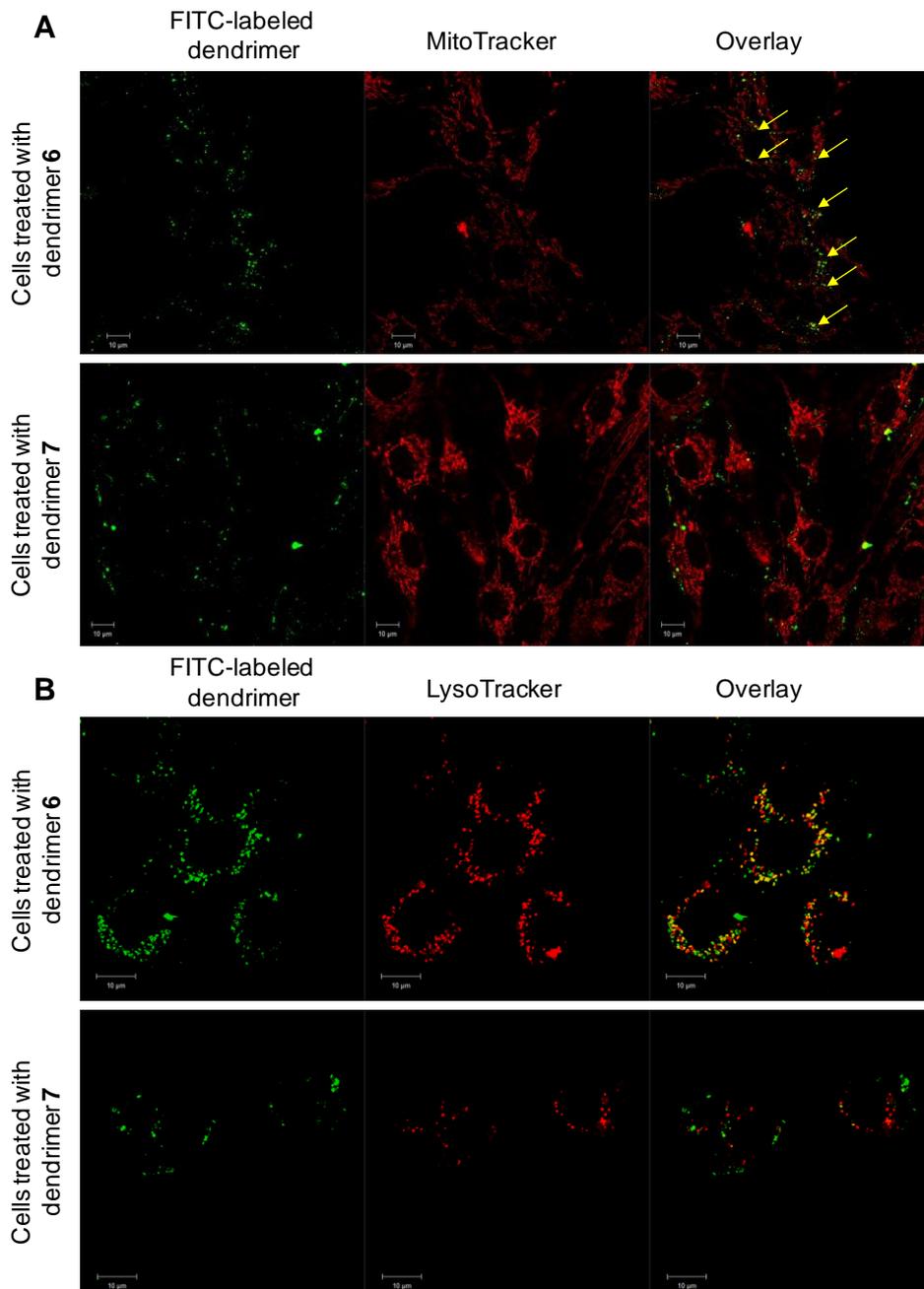


Fig.13. Singole porzioni confocali rappresentative di cellule C6 vitali e visualizzate con (A) dendrimero TSPO direzionato-G(4)-PAMAM-FITC **6** o G(4)-PAMAM-FITC **7** (1 μM in FITC) e MitoTracker Red (B) dendrimero TSPO direzionato-G(4)-PAMAM-FITC **6** o G(4)-PAMAM-FITC **7** (1 μM in FITC) e

LysoTracker Red, dopo un periodo di incubazione di 12 h. Overlay: quando il rosso e la fluorescenza verde convergono al giallo, è indice di co-localizzazione (frecche gialle). Barra: 10 μm .

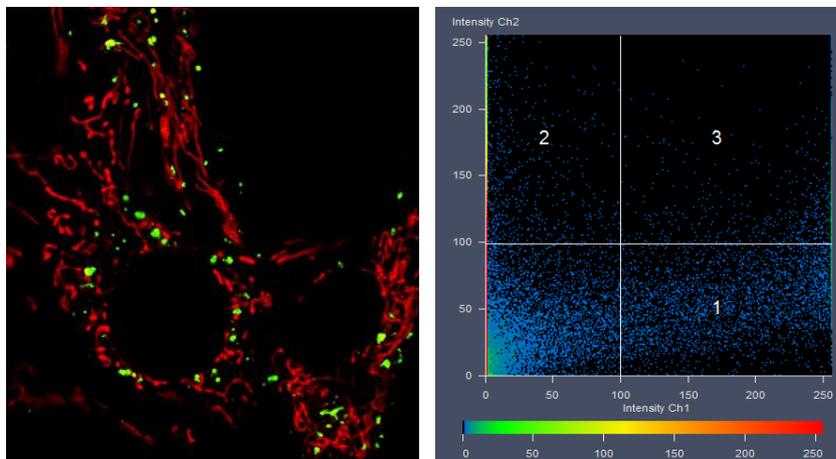


Fig.14. Analisi rappresentativa di co-localizzazione in una cellula C6 doppiamente marcata (panello sinistro dell'immagine di microscopia confocale; verde: dendrimero TSPO direzionato-G(4)-PAMAM **6** marcato con FITC 1 μM ; rosso: mitocondrio marcato con MitoTracker Red). Tutti i pixels in cui è stata scomposta l'immagine sono distribuiti in uno scatterogramma (pannello destro), in cui ciascuno dei due canali dell'immagine è correlato all'altro. I pixels di entrambi i canali aventi posizioni identiche possono essere considerati una coppia. In accordo, ogni coppia di pixel presenta due intensità, una per ciascun canale). Le intensità dei due canali sono rappresentate dagli assi dello scatterogramma. Nella regione 3 dello scatterogramma sono presentati i pixel di co-localizzazione.

4.4 Conclusioni

In questa prima fase del progetto di dottorato è stato realizzato un nuovo nanosistema per l'imaging direzionato al TSPO, in particolare il dendrimero **6**, che è stato sintetizzato usando il dendrimero G(4)-PAMAM come struttura di base, il composto acido 2-(4-(6,8-dicloro-3-(2-(dipropilamino)-2-

ossoetil)imidazo[1,2-a]piridin-2-il)fenossi)acetico come ligando altamente affine per il TSPO e coniugabile (composto **1**), ed il FITC come fluoroforo organico. Dopo una globale caratterizzazione chimico-fisica e morfologica, che ha sottolineato la monodispersività e la forma globulare del dendrimero sintetizzato con un diametro idrodinamico medio di circa 24 nm, è stata valutata la capacità di tale dendrimero TSPO direzionato-G(4)-PAMAM, agente per imaging, di essere internalizzato nelle cellule C6 di glioma e di direzionarsi verso una specifica proteina mitocondriale. In particolare, gli esperimenti di endocitosi hanno evidenziato che i dendrimeri analizzati vengono rapidamente internalizzati per pinocitosi mentre non è osservabile alcun significativo fenomeno di esocitosi. Inoltre è stata studiata la capacità del dendrimero direzionato al TSPO di mirare specificamente al mitocondrio attraverso due procedure frequentemente utilizzate per quantificare il trafficking intracellulare di polimeri terapeutici o diagnostici, nello specifico il frazionamento cellulare e la microscopia confocale e attraverso studi di competizione. Infatti quando il dendrimero **6** è stato incubato in presenza del ligando TSPO **1**, la fluorescenza media misurata diminuiva di circa il 20% sottolineando la competizione nei confronti della proteina mitocondriale. È interessante notare che i risultati ottenuti usando il frazionamento cellulare e la microscopia confocale sono completamente in accordo tra loro nell'evidenziare che il dendrimero TSPO direzionato-G(4)-PAMAM-FITC si co-localizza nella frazione mitocondriale e nei mitocondri rispettivamente.

La fase successiva di questo studio consisterà nella realizzazione di una nuova nanopiattoforma per l'imaging, in cui il probe fluorescente FITC sarà sostituito da un nucleo di nanocristalli luminescenti di CdSe@ZnS, quantum dots, emettitori di luce gialla, incorporati in nanoparticelle di silice amino funzionalizzata (QDs@SiO₂).

Bibliografia

- [1] E. Clerici, Lederle Oncology Training Program, Oncologia di base, 1983.
- [2] L. Rajendran, H.J. Knölker, K. Simons, Subcellular targeting strategies for drug design and delivery, *Nat. Rev. Drug Discov.* 9 (2010) 29-42.
- [3] E.H.Schacht, S.Vansteenkiste, L.Seymour, Veicoli macromolecolari come convogliatori di farmaci.
- [4] J.G. Huang, T. Leshuk, F.X. Gu, Emerging nanomaterials for targeting subcellular organelles, *Nano Today* 6 (2011) 478-492.
- [5] S.M. Monghimi, A.R. Rajabi-Siahboomi, Recent advances in cellular, sub-cellular and molecular targeting, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 41 (2000) 129-133.
- [6] C. Braestrup, R. Albrechtsen, R.F. Squires, High densities of benzodiazepine receptors in human cortical areas, *Nature* 269 (1977) 702-704.
- [7] R.R. Anholt, P.L. Pedersen, E.B. De Souza, S.H. Snyder, The peripheral-type benzodiazepine receptor. Localization to the mitochondrial outer membrane, *J. Biol. Chem.* 261, (1986) 576-583.
- [8] A. Verma, S.H. Snyder, Peripheral type benzodiazepine receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 29 (1989) 307-322.
- [9] V. Papadopoulos, M. Baraldi, T.R. Guilarte, T.B. Knudsen, J.J. Lacapere, P. Lindemann, M.D. Norenberg, D. Nutt, A. Weizman, M.R. Zhang, M. Gavish, Translocator protein (18 kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function, *Trends Pharmacol. Sci.* 27 (2006) 402-409.
- [10] C. Giatzakis, V. Papadopoulos, Differential utilization of the promoter of peripheral-type benzodiazepine receptor by steroidogenic versus nonsteroidogenic cell lines and the role of Sp1 and Sp3 in the regulation of basal activity, *Endocrinol.* 145 (2004) 1113-1123.
- [11] A.S. Basile, P. Skolnick, Subcellular localization of "peripheral-type" binding sites for benzodiazepines in rat brain, *J. Neurochem.* 46 (1986) 305-308.
- [12] J. Fan, M.B. Rone, V. Papadopoulos, Translocator protein 2 is involved in cholesterol redistribution during erythropoiesis, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 30484-30497.
- [13] A. Batarseh, V. Papadopoulos, Regulation of translocator protein 18kDa (TSPO) expression in health and disease states, *Mol. Cell. Endocrinol.* 327 (2010) 1-12.
- [14] P. Costantini, E. Jacotot, D. Decaudin, G. Kroemer, Mitochondrion as a novel target of anticancer chemotherapy, *J. Natl. Canc. Inst.* 92 (2000) 1042-

1053.

- [15] R. Rupprecht, V. Papadopoulos, G. Rammes, T.C. Baghai, J. Fan, N. Akula, G. Groyer, D. Adams, M. Schumacher, Translocator protein (18 kDa) (TSPO) as a therapeutic target for neurological and psychiatric disorders, *Nat Rev Drug Discov.* 9 (2010) 971-988.
- [16] S. Venneti, B.J. Lopresti, C.A. Wiley, The peripheral benzodiazepine receptor (Translocator protein 18 kDa) in microglia: from pathology to imaging, *Prog. Neurobiol* 80 (2006) 308- 322.
- [17] J.L. Bird, D. Izquierdo-Garcia, J.R. Davies, J.H. Rudd, K.C. Probst, N. Figg, J.C. Clark, P.L. Weissberg, A.P. Davenport, E.A. Warburton, Evaluation of translocator protein quantification as a tool for characterizing macrophage burden in human carotid atherosclerosis, *Atherosclerosis* 210 (2010) 388-391.
- [18] G. J. Pilkington, K. Parker, S. A. Murray, Approaches to mitochondrially mediated therapy. *Semin. Cancer Ther.* 18 (2008) 226-235.
- [19] S. Galiegue, N. Tinel, P. Casellas, The peripheral benzodiazepine receptors: a promising therapeutic drug target. *Curr. Med. Chem.* 10 (2003) 1563-1572.
- [20] N. Denora, V. Laquintana, A. Trapani, A. Lopodota, A. Latrofa, J.M. Gallo, G. Trapani, Translocator protein (TSPO) ligand-Ara-C (Cytarabine) conjugates as a strategy to deliver antineoplastic drugs and to enhance drug clinical potential, *Mol. Pharm.* 7 (2010) 2255- 2269.
- [21] V. Laquintana, N. Denora, A. Lopodota, H. Suzuki, M. Sawada, M. Serra, G. Biggio, A. Latrofa, G. Trapani, G. Liso, N-Benzyl-2-(6,8-dichloro-2-(4-chlorophenyl)imidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)-N-6(7nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol 4 ylamino)hexyl)acetamide as a new luorescent probe for peripheral benzodiazepine receptor and microglial cell visualization, *Bioconjugate Chem.* 18 (2007) 1397–407.
- [22] V. Laquintana, N. Denora, T. Musacchio, M. Lasorsa, A. Latrofa, G. Trapani, Peripheral Benzodiazepine Receptor ligand–PLGA polymer conjugates potentially useful as delivery systems of apoptotic agents, *J. Control. Release* 137 (2009) 185-195.
- [23] M. Bai, D.J. Bornhop, Recent avances in receptor-targeted fluorescent probes for in vivo cancer imaging, *Curr. Med. Chem.* 19 (2012) 4742-4758.
- [24] G. Le Fur, M.L. Terrier, N. Vaucher, F. Imbault, A. Flamier, J. Benavides, A. Uzan, C. Renault, M.C. Dubroeuq, C. Guérémy, Peripheral benzodiazepine binding sites: effect of PK11195, 1-(2-chlorophenyl)-n-(1-methylpropyl)-3 isoquinolinecarboxamide I. In vitro studies, *Life Sci.* 32

(1983) 1839-47.

[25] P.L. Marangos, J. Pate, J.P. Boulenger, R. Clark-Rosenber, Characterization of peripheral- type benzodiazepine binding sites in brain using [3H]Ro5-4864, *Mol. Pharmacol.* 22 (1982) 26-32.

[26] E. Romeo, J. Auta, A.P. Kozikowski, D. Ma, V. Papadopoulos, G. Puia, E. Costa, A. Guidotti, 2-Aryl-3 indoleacetamides (FGIN-1): a new class of potent and specific ligands for the mitochondrial DBI receptor, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 262 (1992) 971-978.

[27] P.J. Schweitzer, B.A. Fallon, J.J. Mann, J.S. Kumar, PET tracers for the peripheral benzodiazepine receptor and uses thereof, *Drug Discov. Today*, 15 (2010) 933-942.

[28] F. Chauveau, H. Boutin, N. Van Camp, F. Dollé, B. Tavitian, Nuclear imaging of neuroinflammation: a comprehensive review of [11C]PK11195 challengers, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imag.* 35 (2008) 2304-2319.

[29] H. Boutin, F. Chauveau, C. Thominaux, B. Kuhnast, M.C. Grégoire, S. JAN, R. Trebossen, F. Dollé, B. Tavitian, F. Mattner, A. Katsifis, In vivo imaging of brain lesions with [11C] CLINME, a new PET radioligand of peripheral benzodiazepine receptors, *Glia* 55 (2007) 1459-1468.

[30] L.E. Samuelson, M.J. Dukes, C.R. Hunt, J.D. Casey, D.J. Bornhop, TSPO targeted dendrimer imaging agent: synthesis, characterization and cellular internalization, *Bioconjugate Chem.* 20 (2009) 2082-2089. R.

[31] Duncan, R. Gaspar, Nanomedicine(s) under the microscope, *Mol. Pharmaceutics* 8 (2011) 2101-2141.

[32] R. Duncan, L. Izzo, Dendrimer biocompatibility and toxicity, *Adv. Drug Delivery Rev.* 57 (2005) 2215-2237.

[33] S. Svenson, Dendrimers as versatile platform in drug delivery applications, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 71 (2009) 445-462.

[34] J.B. Wolinsky, M.W. Grinstaff, Therapeutic and diagnostic applications of dendrimers for cancer treatment, *Adv. Drug Delivery Rev.* 60 (2008) 1037-1055.

[35] D.A. Tomalia, H. Baker, J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder, P. Smith, A new class of polymers: starburst-dendritic macromolecules, *Polymer J.* 17 (1985) 117-132.

[36] D.A. Tomalia, A.M. Naylor, W.A. Goddard III, Starburst dendrimers: molecular level control of size, shapes, surface chemistry, topology and flexibility from atoms to macroscopic matter. *Angew. Chem., Int. Ed.* 29 (1990) 138-175.

- [37] L. Veenman, E. Levina, G. Weisinger, S. Leschiner, I. Spanier, S.H. Snyder, A. Weizman, M. Gavish, Peripheral-type benzodiazepine receptor density and in vitro tumorigenicity of glioma cell lines, *Biochem. Pharmacol.* 68 (2004) 689-698.
- [38] N. Denora, V. Laquintana, M.G. Pisu, R. Dore, L. Murru, A. Latrofa, G. Trapani, E. Sanna, 2-Phenyl-imidazo[1,2-a]pyridine compounds containing hydrophilic groups as potent and selective ligands for peripheral benzodiazepine receptors: synthesis, binding affinity and electrophysiological studies, *J. Med. Chem.* 51 (2008) 6876-6888.
- [39] N. Denora, V. Laquintana, M.G. Pisu, R. Dore, L. Murru, A. Latrofa, G. Trapani, E. Sanna, 2-Phenyl-imidazo[1,2-a]pyridine compounds containing hydrophilic groups as potent and selective ligands for peripheral benzodiazepine receptors: synthesis, binding affinity and electrophysiological studies, *J. Med. Chem.* 51 (2008) 6876-6888.
- [40] N. Denora, V. Laquintana, A. Trapani, H. Suzuki, M. Sawada, G. Trapani, New fluorescent probes targeting the mitochondrial-located Translocator Protein 18 kDa (TSPO) as activated microglia imaging agents, *Pharm. Res.* 28 (2011) 2820-2832.
- [41] M.R. Boyd, D.P. Kenneth, Some practical considerations and applications of the National Cancer Institute in vitro anticancer drug discovery screen, *Drug Dev. Res.* 34 (1995) 91-109.
- [42] F.P. Seib, A.T. Jones, R. Duncan, Comparison of the endocytic properties of linear and branched PEIs, and cationic PAMAM dendrimers in B16f10 melanoma cells, *J. Control. Release* 117 (2007) 291-300.
- [43] D. Vercauteren, R.E. Vandenbroucke, A.T. Jones, J. Rejman, J. Demeester, S.C. De Smedt, N.N. Sanders, K. Braeckmans, The use of inhibitors to study endocytic pathways of gene carriers: optimization and pitfalls, *Mol. Ther.* 18 (2010) 561-569.
- [44] H. Hillaireau, P. Couvreur, Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery, *Cell. Mol. Life Sci.* 66 (2009) 2873-2896.
- [45] F.P. Seib, A.T. Jones, R. Duncan, Establishment of subcellular fractionation techniques to monitor the intracellular fate of polymer therapeutics I. Differential centrifugation fractionation of B16F10 cells and use to study the intracellular fate of HPMA copolymer-doxorubicin, *J. Drug Target.* 14 (2006) 375-390.
- [46] K. Sekimata, K. Hatano, M. Ogawa, J. Abe, Y. Magata, G. Biggio, M. Serra, V. Laquintana, N. Denora, A. Latrofa, G. Trapani, G. Liso, K. Ito,

Radiosynthesis and in vivo evaluation of N-[11C]methylated imidazopyridineacetamides as PET tracers for peripheral benzodiazepine receptors, *Nucl. Med. Biol.* 35 (2008) 327-334.

[47] N. Denora, V. Laquintana, A. Trapani, H. Suzuki, M. Sawada, G. Trapani, New fluorescent probes targeting the mitochondrial-located Translocator Protein 18 kDa (TSPO) as activated microglia imaging agents, *Pharm. Res.* 28 (2011) 2820-2832.

[48] S. Piccinonna, N. Denora, N. Margiotta, V. Laquintana, G. Trapani, G. Natile, Synthesis, characterization, and binding to the translocator protein (18 kDa, TSPO) of a new rhenium complex as a model of radiopharmaceutical agents, *Z. Anorg. Allg. Chem.* 2013; 639:1606–1612

[49] D.S. Goldberg, H. Ghandehari, P.W. Swaan, Cellular entry of G3.5 poly (amido amine) dendrimers by clathrin- and dynamin-dependent endocytosis promotes tight junctional opening in intestinal epithelia, *Pharm. Res.* 27 (2010) 1547-1557.

[50] E.M.M. Manders, F.J. Verbeek, J.A. Aten, Measurement of co-localization of objects in dual colour confocal images, *J. Microsc.* 169(3) (1993) 375-382.

Capitolo 5

Nanostrutture luminiscenti altamente selettive per l'imaging ed il targeting mitocondriale

5.1 Introduzione

Le formulazioni basate su sistemi nanoparticellari colloidali (NP) stanno emergendo come rivoluzionari strumenti clinici, utili per realizzare nanosistemi che possano fungere da agenti di contrasto o da carrier per il delivery di farmaci, a livello cellulare ma soprattutto subcellulare [1,2]. Le strategie di targeting e delivery a livello subcellulare infatti, sono state molto esplorate negli ultimi tempi, in quanto fondamentali per comprendere i meccanismi intracellulari che caratterizzano i diversi processi fisiologici o patologici, e quindi per poter progettare terapie opportune per il trattamento di specifiche patologie[3]. Tra gli organuli cellulari, i mitocondri rappresentano sicuramente uno dei più importanti bersagli, non solo per le funzioni estremamente rilevanti svolte atte a garantire la vitalità cellulare, ma anche perché disfunzioni o danni a questo livello, possono contribuire all'insorgenza di varie patologie umane, come ad esempio, patologie neurodegenerative, neuromuscolari, patologie cardiache, invecchiamento, diabete, obesità e cancro[4]. Sebbene siano stati già realizzati sistemi diagnostici e/o terapeutici basati su nanoparticelle colloidali, rispettivamente per l'imaging e la terapia di patologie non a carico dei mitocondri[1,5], di fatto, sono stati raggiunti solo piccoli progressi nello sviluppo di nanoparticelle colloidali multifunzionali, utili per la diagnosi ed il trattamento di patologie associate a disfunzioni mitocondriali[2,6]. Attualmente, per l'imaging mitocondriale sono disponibili sonde rappresentate da coloranti

prevalentemente organici, come ad esempio JC1 e MitoTracker, con una struttura chimica opportunamente progettata per legarsi alla membrana mitocondriale esterna (OMM), notoriamente caratterizzata da una carica negativa, e conseguentemente produrre un segnale fluorescente.[7,8] Purtroppo, tali fluorofori organici presentano alcuni limiti, quali la suscettibilità al photobleaching in seguito ad esposizione a luce continua, e una breve vita di fluorescenza (PL), impedendo così la fattibilità di rivelazioni tempo-dipendenti[7,8]. Le limitazioni suddette rendono questi probes meno interessanti per lo sviluppo di tecniche di imaging sensibili e di lunga durata, pertanto attualmente si stanno sviluppando nuovi probes molecolari fotostabili[9]. A tal proposito, un notevole vantaggio deriva dall'utilizzo di nanocristalli luminescenti semiconduttori, in particolare di quantum dots (QDs), come mezzi di contrasto fluorescenti caratterizzati da una fotostabilità superiore[10]. Rispetto ai coloranti organici, i QD sono caratterizzati da un ampio spettro di assorbimento, una banda di emissione stretta e soprattutto simmetrica, e lunghi tempi di vita di fluorescenza (PL), e ciò permette di realizzare un bio-imaging a lungo termine ed estremamente sensibile, perfino a livello di singole molecole[9]. Finora, solo pochissimi esempi di nanostrutture basate sull'utilizzo di Qds sono stati realizzati e proposti come nanoprobe fluorescenti per il targeting selettivo a livello mitocondriale. Tra questi compaiono Qds funzionalizzati con peptidi o piccole molecole per la marcatura specifica dei mitocondri. Ad esempio, un oligopeptide derivato dall'enzima citocromo-C ossidasi, ha dimostrato di essere in grado di penetrare attraverso le membrane cellulari e di trasportare i QDs all'interno delle cellule, specificamente a livello mitocondriale[11]. Recentemente è stato realizzato un altro esempio di Qds funzionalizzati per il targeting mitocondriale, ottenuto per coniugazione del trifenilfosfonio (TPP), una molecola lipofila cationica ampiamente usata a tale scopo, sulla superficie di QDs rivestiti di

poliacrilato e funzionalizzati con gruppi solfonato ed amminici, responsabili dell'escape endosomiale[12]. Allo stesso modo, Qds luminescenti a base di acido poli (lattico-co-glicolico) sono stati funzionalizzati con molecole di TPP ed utilizzati per il delivery di farmaci attivi a livello mitocondriale. In questi ultimi esempi, l'assorbimento preferenziale di tali Qds cationici funzionalizzati all'interno dei mitocondri, è stato guidato dal potenziale di membrana molto negativo attraverso la membrana mitocondriale interna.

Nel presente lavoro di tesi, è stata seguita una strategia originale ed innovativa per realizzare il targeting mitocondriale, basata sull'identificazione di un interessante biomarker localizzato sulla OMM. In particolare nanostrutture cariche positivamente di QDs luminescenti, a struttura core-shell di (CdSe)ZnS funzionalizzata con gruppi amminici superficiali, sono stati coniugati con un ligando di sintesi opportunamente progettato per legare selettivamente la proteina di traslocazione mitocondriale 18 kDa (TSPO). Il TSPO, prima noto come recettore periferico delle benzodiazepine, è una proteina con cinque domini transmembrana principalmente localizzata nella OMM, il cui ruolo biologico è associato con le funzioni mitocondriali di steroidogenesi, proliferazione cellulare ed apoptosi[13-17]. È interessante notare che livelli aberranti di TSPO sono stati osservati in diverse malattie, compresi cancro e malattie neurodegenerative. Per tutte queste ragioni il TSPO è considerato un bersaglio subcellulare estremamente attraente, utile per tracciare la sua distribuzione negli stati patologici over esprimenti tale proteina e per la realizzazione di un targeting selettivo di farmaci a livello mitocondriale[18-21]. Molte molecole altamente affini e selettive per il TSPO sono state sviluppate come ligandi di questo recettore e come tali studiate per il possibile impiego nella tomografia ad emissione di positroni (PET)[22], nella risonanza magnetica (MR) e nell'imaging ottico[13,23].

Nell'ambito di queste tecniche, l'imaging per fluorescenza emerge come uno strumento diagnostico versatile, ad alta sensibilità e selettività[24,25]. Di conseguenza, negli ultimi anni è stato attivamente perseguito lo studio e lo sviluppo di nuovi ligandi fluorescenti del TSPO che possano sostituire quelli attualmente in uso come radioligandi di questo recettore[25]. Sebbene sino ad oggi siano stati sintetizzati diversi ligandi TSPO-selettivi, il concetto di imaging mitocondriale attraverso NP mirate al TSPO, è stato poco esplorato a causa di vari motivi, tra cui l'identificazione di ligandi TSPO potenti e selettivi, contenenti funzioni organiche che permettano la loro ulteriore coniugazione sulla superficie delle NP senza d'altra parte comprometterne la capacità di riconoscere la proteina mitocondriale. In questa prospettiva, tra i pochissimi esempi di agenti di imaging basati su NP e TSPO direzionati, possiamo annoverare un sistema sintetizzato recentemente dal nostro gruppo di ricerca, basato su un dendrimero luminescente a struttura poli-amido-amminica di quarta generazione, [G(4)-PAMAM], opportunamente direzionato al mitocondrio mediante riconoscimento del recettore TSPO[26,27]. In questo caso, i molteplici gruppi amminici superficiali disponibili sul dendrimero, sono stati sfruttati per il legame sia con un probe fluorescente organico, ossia la fluoresceina isotiocianato (FITC) sia con un dominio molecolare di riconoscimento specifico del TSPO, caratterizzato da una struttura 2-fenil-imidazo-[1,2-a]piridin-acetammidica e da un gruppo carbossilico facilmente coniugabile. Il targeting mitocondriale selettivo ottenuto con il dendrimero [G(4)-PAMAM]-FITC]-TSPO direzionato, ha confermato l'effettiva capacità di riconoscimento del TSPO da parte del ligando utilizzato[27]. Tuttavia, questi nanocarriers luminescenti TSPO direzionati, sebbene selettivi per i mitocondri, soffrono delle principali limitazioni derivanti dall'uso del fluoroforo organico FITC. Per questo motivo è nato il progetto di sviluppare una nuova nanostruttura nanoparticellare, direzionata al TSPO,

in cui il dendrimero G(4)-PAMAM-FITC è stato sostituito, come probe fluorescente, dai QDs acquisendo i vantaggi legati alle loro superiori proprietà fotofisiche[28] e versatilità di chimica superficiale. In particolare, (CdSe)ZnSQDs luminiscenti, rivestiti di silice ammino funzionalizzata ($\text{NH}_2\text{-QD@SiO}_2\text{NPS}$) sono stati coniugati con successo con lo stesso ligando TSPO di sintesi, precedentemente utilizzato nella realizzazione del dendrimeroTSPO direzionato, riportato da Denora et al. [27]. Il nuovo nanosistema che ne è risultato ha visto convogliate in un'unica nanostruttura, la selettività del ligando scelto verso il TSPO, e le proprietà di fotostabilità e di elevata luminescenza dei Qds inorganici. A tale scopo, in questo studio i QDs luminescenti, di natura idrofoba, sono stati opportunamente progettati, controllandone dimensione, forma e carica superficiale, al fine di assicurare la disperdibilità in acqua, favorire l'internalizzazione cellulare ed il raggiungimento dei mitocondri, preservando la stabilità colloidale e le proprietà ottiche. Il rivestimento dei Qds in gusci di silice, ha consentito di migliorare in modo significativo la loro stabilità in fase acquosa, [29-31] dal momento che la silice è un materiale inerte, biocompatibile e trasparente, e pertanto in grado di ridurre il rilascio di ioni citotossici e di prevenire la foto-ossidazione dei QDs[32]. I QDs rivestiti di silice rappresentano un solido sistema inorganico, caratterizzato da una elevata stabilità chimica, un'idrofilia intrinseca ed una superficie altamente versatile, adatta ad essere funzionalizzata con molecole direzionanti al TSPO. La nanostruttura proposta in questo lavoro, offre in linea di principio, un grande vantaggio rispetto a quelli precedentemente descritti. Infatti essa combina ingegnosamente la stabilità fotofisica dei QDs, la versatilità del circostante guscio di silice, che rappresenta peraltro uno scheletro funzionale per reazioni ulteriori di coniugazione con entità di bio-riconoscimento e/o con agenti terapeutici, con le proprietà di riconoscimento del recettore TSPO

del ligando altamente affine e selettivo selezionato, in grado quindi di direzionare il nanosistema a livello mitocondriale[28]. Le caratteristiche fisiche e chimiche di questo nuovo nanomateriale sono state ampiamente indagate per mezzo di indagini morfologiche, strutturali ed ottiche, mentre gli studi in vitro di frazionamento subcellulare e le analisi di microscopia confocale a scansione laser e di colocalizzazione hanno infine dimostrato il successo di questa nuova nanostruttura di direzionarsi al mitocondrio mediante il riconoscimento molecolare del TSPO.

5.2 Materiali e metodi

5.2.1 Materiali

La sintesi dei CdSe@ZnS QD e le trasformazioni di superficie sono state ottenute utilizzando i seguenti reagenti: ossido di cadmio (99,5% in polvere, CdO), ossido di triottilfosfina (99%, TOPO), acido t-butilfosfonico (98%, tBuPOH), esadecilammina (grado tecnico 90%, HDA, Fluka), tributilfosfina (97%, TBP), selenio (99,99% polvere, Se), zolfo (99,9999 % polvere, S), triottilfosfina (90%, TOP), soluzione dietilzinco (1 M in EPTANI, Et₂Zn), e esametildisilattano (HMST). La crescita della shell di silice è stata effettuata con tetraetilortosilicato (98% d = 0,934 g/mL, TEOS), soluzione ammoniacale acquosa (d = 0,900 g/mL, NH₄OH), 5 poliossietilene nonilfenilietere (IGEPAL CO-520, Mn = 441), e la funzionalizzazione superficiale con (3-amminopropil) trietossisilano (97%, APS). Per il saggio della ninidrina sono stati utilizzate ninidrina e 2,6-lutidina (98%, Alfa Aesar). Per la reazione di coniugazione sono stati utilizzati (benzotriazol-1-ilossi)tris(dimetilammino) fosfonio esafluorofosfato (97%, BOP) e N, N-diisopropilettilammina (99,5% DIPEA). Tutte le sostanze chimiche, sono state acquistate da Sigma Aldrich e se non diversamente specificato, sono state utilizzate senza

purificazione. Il ligando TSPO 2- (6,8-dicloro-2- (4-idrossifenil) imidazo [1,2-a] piridin-3-il) -N,N-dipropilacetamide (MW=477 g/mol) è stato preparato secondo le procedure di sintesi riportate altrove.²⁷ Le cellule C6 di glioma di ratto sono state acquistate da Interlab Cell Line Collection (ICLC, Genova, Italia), sono state coltivate in DMEM high glucose supplementato con il 10% di siero fetale bovino inattivato al calore (FBS), 100 U per mL di penicillina, 100 ug per ml di streptomina e 2 mM L-glutamina (EuroClone, Italia) in atmosfera umidificata al 5% di CO₂ a 37 °C. Le fiasche di coltura monouso e le piastre di Petri sono state acquistate da Corning, Glassworks (Corning, NY, USA). 3-(4,5-Dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT) è stato acquistato da Sigma-Aldrich (Milano, Italia).

5.2.2 Sintesi di QD@SiO₂ NPs e funzionalizzazione con il ligando TSPO

La shell di silice è stata realizzata sul nucleo dei CdSe@ZnSQD precedentemente sintetizzati (d =4 nm e relativa deviazione standard $\sigma\%$ = 20%, vedere paragrafo 4.3 per maggiori informazioni e Fig.1A) ed in grado di emettere a 567 nm, utilizzando l'approccio della microemulsione acqua-in-olio [31,33-35] E' stata inizialmente preparata una soluzione di QD in cicloesano ($1,5 \times 10^{-6}$ M) e successivamente sono stati aggiunti in successione 350 mL di IGEPAL CO-520, 200 mL di NH₄OH e 30 mL di TEOS. La soluzione è stata quindi mantenuta sotto vigorosa agitazione ed a temperatura controllata di 28 °C per 18 h. La raccolta e la purificazione di QD@SiO₂ NPs (d =26 nm e deviazione percentuale relativa standard $\sigma\%$ = 15%, vedere paragrafo 4.3 per ulteriori informazioni e Fig.1B) sono avvenute mediante centrifugazione ed infine le NPs sono state disperse in 2 mL di etanolo. Il campione è stato liofilizzato e sono stati recuperati 2.4 mg/mL di QD@SiO₂ (concentrazione di QD 1,1 mg/mL con una concentrazione di NPs 10¹³/mL). La funzionalizzazione superficiale di

QD@SiO₂ NPs con i gruppi amminici è stata eseguita utilizzando APS: 80 mL di APS ($6,8 \times 10^{-4}$ mol) sono stati aggiunti ad una sospensione diluita di QD@SiO₂ NP (400 mL di QD@SiO₂ NP diluiti con 2 mL di etanolo) in condizioni di pH basiche (80 mL di soluzione di ammoniaca) e la sospensione finale è stata agitata per tutta la notte a 28 °C [33]. Le nanoparticelle NH₂-QD@SiO₂ sono state recuperate per centrifugazione e purificate dai reagenti che non hanno reagito mediante ripetuti cicli di centrifugazione/ridispersione in etanolo ed infine disperse in 1,5 mL di etanolo (0,6 mg/mL di NH₂-QD@SiO₂ NP). La titolazione dei gruppi amminici della sospensione di NP è stata effettuata utilizzando il saggio della ninidrina[36,37]. La soluzione di ninidrina è stata preparata sciogliendo 110 mg di ninidrina in 16 mL di etanolo (0,68% w/v) e 4 mL di 2,6-lutidina. 950 µL della soluzione di ninidrina sono stati aggiunti a 50 mL di NH₂-QD@SiO₂ NP, e la risultante sospensione è stata riscaldata a 80 °C per 10 min. In seguito a questo si è osservato un cambiamento di colore della sospensione da gialla a blu a causa della formazione, come sottoprodotto, del Blue di Ruhemann, il quale evidenzia la presenza di gruppi amminici e presenta uno spettro di assorbimento UV-Vis centrato con una banda a 570 nm. Dall'intensità di assorbimento alla lunghezza d'onda di massima assorbanza (570 nm) del sottoprodotto, dopo aver tracciato una curva di calibrazione ($\epsilon = 2020 \pm 90$ L/mol cm⁻¹), attraverso la legge di Lambert-Beer è stato stimato che la concentrazione di gruppi amminici primari era quasi $5,4 \pm 0,1$ mM (0,60 mg /mL di NH₂-QD@SiO₂ NP raccolti dal campione liofilizzato, con una concentrazione di QD pari a 0,28 mg/mL). La reazione di coniugazione del ligando TSPO su NH₂-QD@SiO₂ NP è stata eseguita mescolando opportune quantità di NH₂-QD@SiO₂ NP (400 µL) e di ligando TSPO in etanolo (1,5 mL) in presenza di BOP e DIPEA quali agenti promotori della coniugazione. I reagenti sono stati miscelati mantenendo costante, a 5, il rapporto molare

tra i gruppi NH_2 ed il ligando TSPO (2.2 μmol di gruppi NH_2 e 0.44 μmol di ligando TSPO) ed usando gli agenti reticolanti in quantità riferite al ligando TSPO con i seguenti rapporti molari: DIPEA:ligando TSPO 3:1 e BOP:ligando TSPO 1.2:1 rispettivamente. La sospensione è stata mantenuta in agitazione e a temperatura ambiente per 48 h trascorse le quali, le nanoparticelle TSPO-QD@SiO₂ sono state raccolte mediante centrifugazione a 7800g per 10 min (Beckman J2-21), purificate mediante tre cicli di ridispersione in etanolo/centrifugazione e disperse in 1 mL di etanolo per un'ulteriore caratterizzazione spettroscopica (0.30 mg/mL di TSPO-QD@SiO₂ NP con una concentrazione di QD 0.1 mg/mL). Il contenuto di ligando TSPO nel campione TSPO- QD@SiO₂ NP è stato determinato mediante la creazione preliminare di una curva di calibrazione (Fig.5A). In particolare, gli spettri di assorbanza UV-Vis sono stati registrati in funzione della concentrazione di soluzioni di ligando TSPO in etanolo e la curva di calibrazione è stata ottenuta interpolando l'intensità di assorbanza a 254 nm contro la concentrazione del ligando TSPO. L'andamento lineare del diagramma a dispersione ottenuto, ha consentito la determinazione del coefficiente di estinzione, pari a $\epsilon_{254 \text{ nm}} = 35945 \pm 710 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. In seguito è stato possibile determinare la quantità di ligando TSPO coniugata su TSPO-QD@SiO₂ Nps sfruttando la legge di Lambert-Beer, attraverso la misura dell'assorbanza a 254 nm del campione. Al fine di rimuovere il contributo all'assorbanza da parte dei Qds e dei fenomeni di scattering, la soluzione di NH₂-QD@SiO₂ NP è stata utilizzata come linea di base.

5.2.3 Microscopia a scansione elettronica

L'analisi di microscopia a trasmissione elettronica (TEM) è stata effettuata utilizzando un JEOL100, operante a 100 kV. Le immagini TEM sono state acquisite utilizzando una fotocamera Olympus Quemesa CCD 11 Mp. I

campioni sono stati preparati immergendo la griglia a 300 maglie di carbonio amorfo rivestita di Cu, nella sospensione di nanoparticelle in etanolo, e lasciando evaporare il solvente. L'analisi statistica delle dimensioni (dimensione media delle NP e deviazione standard relativa ($\sigma\%$) di ciascun campione di NP) è stata effettuata per mezzo di un programma di analisi ImageJ.

5.2.4 Caratterizzazione spettroscopica

Uno spettrofotometro Cary Varian 5000 UV-visibile-NIR è stato utilizzato per registrare gli spettri di assorbimento UV-Vis. Gli spettri di fotoluminescenza sono stati registrati usando un spettrofluorimetro Fluorolog 3 (HORIBA Jobin-Yvon) dotato di doppi reticoli cromatori di eccitazione e di emissione. Tutte le misurazioni ottiche sono state effettuate a temperatura ambiente. La relativa resa quantica di PL è stata misurata disperdendo i campioni in dimetilsolfossido (DMSO) ed usando cumarina 153 in DMSO come standard (QY assoluta in DMSO 75%) date le sue proprietà spettroscopiche (emissione centrata a 530 nm e spettri di eccitazione nell'intervallo di 370-450 nm, opportunamente corrispondenti quindi al range di spettro di emissione dei QD). La lunghezza d'onda di eccitazione utilizzata per le misure di QY di PL è stata di 395 nm. Gli spettri FTIR sono stati registrati con uno spettrofotometro Perkin-Elmer Spectrum One Fourier Transform Infrared equipaggiato con un rivelatore DTGS (triglicina solfato deuterata). La risoluzione spettrale utilizzata per tutti gli esperimenti è stata di 4 cm^{-1} . Per le misure ATR (a riflessione totale attenuata), l'elemento di riflessione interna (IRE) è stato un microprism di diamante di 4 mm di diametro. I campioni sono stati direttamente depositati come film sottile, sull'elemento di riflessione interna depositando la soluzione di interesse (10 μL) sulla faccia superiore del cristallo di diamante e al solvente di evaporare completamente.

5.2.5 Dimensione delle particelle, distribuzione dei size e carica superficiale

Il diametro idrodinamico (dimensione), la distribuzione delle dimensioni e la stabilità colloidale delle nanoparticelle, prima e dopo la reazione bioconiugazione con il ligando TSPO, sono stati rilevati utilizzando uno Zetasizer Nano ZS, della Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, Regno Unito (DTS 5,00). In particolare, la dimensione e la distribuzione dimensionale sono state determinate mediante dynamic light scattering (DLS) dopo diluizione delle NP in soluzione acquosa di (tampone borato, 50 mM, pH 8.5) con acqua demineralizzata. Il diametro idrodinamico è riportato in base al numero e la distribuzione dei size è rappresentata come indice di polidispersità (PDI). Le misurazioni di potenziale-zeta, cioè delle cariche superficiali, sono state effettuate utilizzando un velocimetro laser Doppler (LDV) dopo diluizione della soluzione acquosa di NP (tampone borato, 50 mM, pH 8.5) con una soluzione acquosa di KCl (1 mM). Tutti i dati riportati sono presentati come media \pm deviazione standard per tre replicati.

5.2.6 Colture cellulari e saggi di citotossicità

Le cellule C6 di glioma di ratto sono state mantenute a 37 °C in un incubatore umidificato in presenza di 5% CO₂ in terreno DMEM supplementato con 10% di FBS inattivato al calore, L-glutammina 2 mM, 100 U/mL di penicillina e 100 mg/mL di streptomina. I valori di citotossicità (espressi come IC₅₀, cioè la concentrazione della sostanza esaminata a cui la popolazione di cellule si riduce del 50%) di NH₂-QD@SiO₂ NP e TSPO-QD@SiO₂ NP sono stati determinati utilizzando il saggio MTT [(4,5-dimethylthiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio bromuro]. Le cellule sono state seminate ad una densità di 5000 cellule per pozzetto in

piastre da 96 pozzetti, e dopo incubazione di 24 h in DMEM, sono state trattate con concentrazioni dei campioni comprese tra 0.0001 e 0.1 mg/mL a 37 °C per ulteriori 72 h. Successivamente, sono stati aggiunti alle cellule 10 µL di MTT 0.5% e dopo un'ulteriore incubazione di 3 h a 37 °C, le cellule sono state lisate aggiungendo 100 µL di una soluzione di DMSO in ciascun pozzetto. L'assorbanza a 570 nm è stata registrata usando un Wallac Victor3 1420 Multilabel Reader della Perkin-Elmer, e il grado di vitalità cellulare è stato calcolato dalla seguente equazione, utilizzando il valore medio di assorbanza di tre replicati:

$$\% \text{ Cell viability} = [A_{570 \text{ nm}; \text{Sample}} / A_{570 \text{ nm}; \text{Control}}]$$

dove $A_{570 \text{ nm}; \text{Sample}}$ è l'assorbanza media a 570 nm registrata per ogni campione e $A_{570 \text{ nm}; \text{Control}}$ è l'assorbanza a 570 nm registrata per le cellule di controllo (cellule non trattate).

5.2.7 Esperimenti di frazionamento cellulare

Il frazionamento cellulare è stato ottenuto per mezzo di una centrifugazione differenziale secondo un metodo riportato in letteratura.²⁶ In particolare, le cellule C6 di glioma sono state frazionate in frazioni, rispettivamente: nucleare (N), mitocondriale (M), lisosomiale (L), microsomiale (MIC) e solubile (S). Prima di tutto, le cellule C6 sono state incubate per 12 h con NH₂-QD@SiO₂ NP o alternativamente con TSPO-QD@SiO₂ NP ad una concentrazione di 0.010 mg/mL. Successivamente il contenuto extracellulare è stato lavato via con PBS freddo e poi il pellet è stato lavato una volta con il buffer di omogeneizzazione (250 mM di saccarosio, 10 mM HEPES, 1 mM EDTA, pH 7.4) ed il cocktail aprotinina proteasi contenenti (2 µg/mL), leupeptina (2 µg/mL), pepstatina A (1 mg/mL) e PMSF (1 mM). Successivamente, è stata condotta la

centrifugazione differenziale per raccogliere le diverse frazioni cellulari delle cellule C6. Ciascuna frazione è stata diluita con PBS e l'intensità di fluorescenza a 570 nm (lunghezza d'onda di eccitazione a 400 nm), derivante dal nucleo di QD luminescenti delle NP sintetizzati, è stata misurata in un lettore per micropiastre (Wallac Victor3, 1420 Multilabel Counter, Perkin-Elmer).

5.2.8 Imaging confocale in cellule vitali

Questi esperimenti sono stati condotti come riportato precedentemente.²⁶ Per l'imaging di cellule vitali e non fissate, 10^5 cellule C6 di glioma per pozzetto sono state seminate in piastre con fondo di vetro (WillCo-Dish®) per 24 h e poi incubate per 6 h con $\text{NH}_2\text{-QD@SiO}_2$ NP o, alternativamente, con TSPO-QD@SiO_2 NP ad una concentrazione di 0.010 mg/mL. La corrispondente concentrazione di QD utilizzata è stata pertanto di circa 0.0045 mg/mL e 0.0033 mg/mL rispettivamente per $\text{NH}_2\text{-QD@SiO}_2$ e TSPO-QD@SiO_2 NP. La concentrazione di ligando TSPO nel campione TSPO-QD@SiO_2 NP è stata di 8×10^{-4} mg/mL. Successivamente, le cellule sono state trattate con una soluzione 100 nM di MitoTracker FM verde, utilizzato come marcatore mitocondriale, o con una soluzione 25 nM di LysoTracker verde (Molecular Probes), usato per marcare i lisosomi, per 30 min a 37 °C e successivamente lavate con PBS privo di fenolo a 25 °C. Le immagini delle cellule sono state acquisite nei successivi 30 min, utilizzando un microscopio confocale a scansione laser invertito Leica TCS SP5-II (Leica Microsystems, Germania) dotato di lenti ad immersione in olio di $\times 63$, 1.40 come apertura numerica. Raggi laser con lunghezze d'onda di 405 nm e 488 nm di eccitazione sono stati utilizzati per le immagini delle NP (la cui emissione rossa proviene da nuclei di QD) e di MitoTracker verde FM o LysoTracker verde (emissione verde), rispettivamente, e le immagini di microscopia a scansione

confocale di cellule di ratto glioma C6, di 10 μm di spessore, sono state acquisite nel campo chiaro e nei canali di rilevamento rosso e verde. Tutti i dati sono stati successivamente processati con i software Leica LAS AF LITE (Leica Microsystems, Germania) ed ImageJ.

5.2.9 Analisi di co-localizzazione

La localizzazione intracellulare di $\text{NH}_2\text{-QD@SiO}_2$ NP o, di TSPO-QD@SiO₂ NP è stata studiata attraverso l'analisi di co-localizzazione[27], che valuta la sovrapposizione spaziale e temporale delle due sonde fluorescenti nei modelli di distribuzione, vale a dire del MitoTracker Verde FM, usato per marcare i mitocondri, e dei QD emettitori nella regione del rosso, indicanti la distribuzione delle NPs. Per quanto riguarda l'imaging digitale, la fluorescenza emessa da sonde fluorescenti differenti che occupano gli stessi pixel nell'immagine, sono intese come co-localizzate. Dopo la creazione dello scatterplot, è stato possibile valutare quantitativamente la presenza e l'entità di co-localizzazione. In questo processo, lo scatterplot è stato utilizzato in combinazione con le immagini di fluorescenza per definire la posizione dei fluorofori co-localizzati. I coefficienti di co-localizzazione, che dipendono enormemente dalla corretta stima e risoluzione dello sfondo dell'immagine, sono stati calcolati e, a questo scopo, è stata eseguita la preliminare deconvoluzione dell'immagine. È riportato che i coefficienti possano essere utilizzati per stimare la co-localizzazione; nel nostro studio il coefficiente di sovrapposizione è stato determinato in accordo a Manders come segue:

$$r = \frac{i S_{1i} \cdot S_{2i}}{i S_{1i}^2 \cdot i S_{2i}^2}; 0 \leq r \leq 1$$

Dove S_{1i} e S_{2i} rappresentano le intensità dei pixel nel canale 1 e nel canale 2. Un importante vantaggio di questo coefficiente è che non è sensibile a differenze di intensità tra i componenti di un'immagine causata da marcature con fluorocromi differenti, e quindi non è sensibile al photo-bleaching o a differenti impostazioni degli amplificatori. L'analisi di co-localizzazione è stata eseguita utilizzando il software ImageJ.

5.2.10 Analisi statistica dei dati

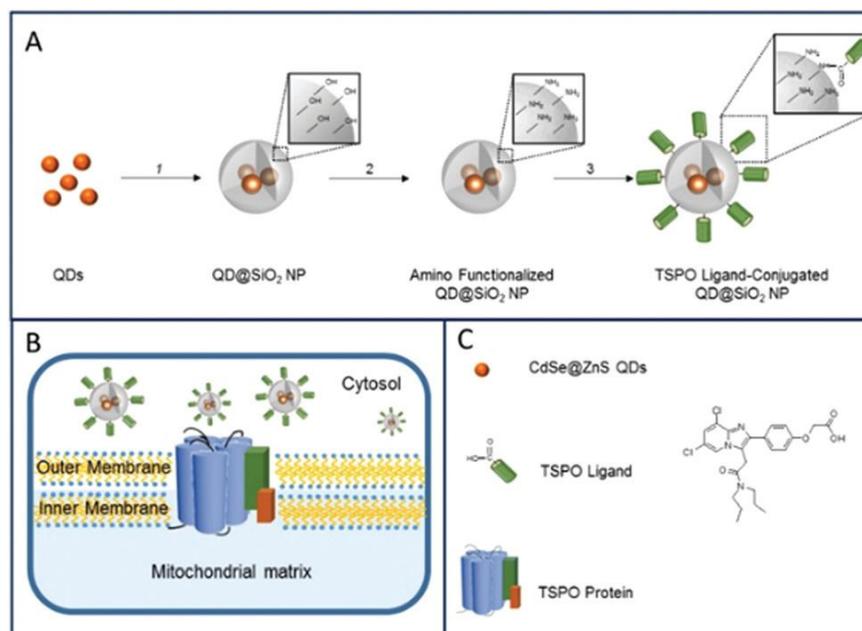
La significatività statistica è stata assegnata a $p < 0.001$ (***) e calcolata utilizzando una l'analisi della varianza one-way ANOVA seguita dal post hoc test Bonferroni (GraphPad Prism versione 5 per Windows, GraphPad Software, San Diego, CA). Dove indicato, è stata calcolata la deviazione standard della media (SD) ed è stato indicato il numero di esperimenti (n).

5.3 Risultati e discussione

5.3.1 Sintesi di QD@SiO₂ NPs e funzionalizzazione con il ligando TSPO

In questo lavoro, QDs luminescenti sono stati proposti come fluorofori inorganici per il targeting selettivo ed il bio-imaging dei mitocondri. Nello schema 1 (pannelli A e C) è riportato il percorso sintetico per ottenere il nanosistema direzionato. Il concetto generale è quello di coniugare le nanoparticelle di QD@SiO₂ con un composto sintetico caratterizzato da una struttura 2-fenil-imidazo[1,2-a] piridin-acetammidica, con proprietà di riconoscimento del recettore TSPO (Schema 1B e C). Nel design di queste nanoparticelle direzionate al TSPO (TSPO-QD@SiO₂ NPS) è stato necessario considerare alcuni punti fondamentali. Infatti, la dimensione, la

carica e la chimica superficiale, devono essere attentamente monitorati in fase di fabbricazione, perché da queste proprietà dipendono l'internalizzazione cellulare e la successiva capacità di attraversamento della membrana endosomiale, eventi questi ultimi, strettamente necessari per realizzare un targeting subcellulare. Allo stesso tempo, il processo di uptake cellulare non dovrebbe alterare radicalmente le proprietà fotofisiche dei QDs, in modo da limitare i fenomeni di quenching e quindi consentire alle nanoparticelle (Nps) TSPO-QD@SiO₂ di essere effettivamente localizzate all'interno dei mitocondri attraverso i mezzi di rilevamento ottico del segnale fluorescente. Infine, la selettività per i mitocondri richiede che ci sia un effettivo legame tra l'unità di riconoscimento ed il recettore TSPO, pertanto il ligando dovrebbe conservare la sua funzione biologica anche dopo essere stato coniugato alle NPs. In questa prospettiva, di recente nel nostro laboratorio è stato progettato e sintetizzato un nuovo ligando del TSPO caratterizzato da una struttura 2-fenilimidazo [1,2-a] piridin acetammidica, caratterizzato in particolare da un gruppo carbossilico potenzialmente derivatizzabile[27]. Questo stesso ligando è stato utilizzato per la coniugazione con i gruppi ammino terminali di superficie del dendrimero fluorescente G(4)-PAMAM, mantenendo la sua, ampiamente dimostrata affinità e selettività di legame nei confronti del TSPO. Sulla base di questi risultati, nel presente lavoro è stata progettata e realizzata una nuova nanostruttura basata sulla coniugazione dello stesso ligando TSPO con le nanoparticelle Qd@SiO₂ NPs. Inoltre, il sistema è stato ampiamente analizzato attraverso la combinazione di tecniche di caratterizzazione opportunamente scelte per indagare la sua effettiva capacità di visualizzazione *in vitro* dei mitocondri.



Scheme 1. A) Schema sintetico delle nanoparticelle TSPO-QD@SiO₂ NPS mediante rivestimento dei QDs (step 1) con una shell di silice, che è stata funzionalizzata con gruppi amminici per reazione con 3-(aminopropil)trimetossisilano (step 2) e successivamente coniugata con il ligando TSPO (step 3). B) Schema illustrativo del processo di riconoscimento molecolare tra TSPO-QD@SiO₂ NPS ed il recettore TSPO, principalmente localizzato nella membrana mitoconriale esterna. C): legenda dei simboli utilizzati nei pannelli A e B. *Fanizza et al. Nanoscale, 2016, 8, 3350–3361.*

5.3.2 Caratterizzazione morfologica ed ottica delle nanoparticelle TSPO-QD@SiO₂ NPS

In questo lavoro sono state sfruttate le eccezionali proprietà fotofisiche dei QDs idrofobici, per lo sviluppo di una sonda fluorescente altamente selettiva per il targeting mitocondriale. Il rivestimento con silice dei Qds è stato realizzato mediante un approccio in microemulsione acqua-in-olio [30,31,33] (Schema 1A, step 1 e Fig.1), con diverse finalità, quali ad

esempio, ottenere NPs dispersibili in un mezzo acquoso, proteggere i QDs evitando fenomeni di quenching del segnale, limitare il rilascio di ioni di metalli pesanti citotossici dai QD all'ambiente circostante. Questa strategia sintetica, consente di controllare la sintesi delle nanoparticelle core-shell QD@SiO₂ in un range di dimensioni di poche decine di nanometri di diametro, che è considerata, in linea di principio, la dimensione ideale per le NPs affinché possano penetrare in modo efficiente le membrane cellulari[36]. Inoltre, come riportato in precedenza, [30,31,33] la distribuzione dimensionale dei size delle nanostrutture core-shell, la molteplicità del core, lo spessore della shell di silice, tutti fattori determinanti per l'applicazione di tali nanostrutture come sonde ottiche *in vitro*, possono essere efficacemente controllati modulando la composizione della microemulsione acqua-in-olio, la concentrazione dei Qds e del precursore della shell di silice (TEOS). Mentre le dimensioni e la distribuzione dimensionale influenzano l'uptake cellulare, lo spessore del guscio di silice e la sua uniformità, hanno un impatto sulla fotostabilità della nanostruttura *in vitro*. Per tale ragione, sono stati selezionati opportuni rapporti molari tra QD e TEOS

Al fine di raggiungere nanostrutture colloidali QD@SiO₂ abbastanza piccole di dimensioni (26 nm), con una buona monodispersività ($\sigma\%=15\%$) e con un guscio di silice di spessore 10 nm ($\sigma\%=17\%$) (Fig. 1B), che riveste omogeneamente i QDs. Un tale valore di spessore della shell, è idoneo per isolare i QDs dall'ambiente, limitarne i fenomeni di quenching, e conseguentemente renderlo un probe ottico valido per l'imaging *in vitro* (Fig.2). Infatti una shell di silice non omogenea e troppo sottile (<10 nm) non sarebbe in grado di impedire efficacemente le interazioni dei QD con i mezzi fisiologici, inducendo in tal modo quenching in emissione. La superficie delle NPs è stata funzionalizzata con gruppi NH₂ mediante una reazione con 3-

(amminopropil)trimetossisilano ($\text{NH}_2\text{-QD@SiO}_2\text{NP}$, Schema 1, step 2) al fine di fornire dei siti di ancoraggio per il successivo legame con il ligando del TSPO, sfruttando la reattività del gruppo carbossilico di quest'ultimo, appositamente introdotto nella struttura. Tra i diversi protocolli riportati in letteratura per le reazioni di coniugazione, è stato scelto quello che ha previsto la dispersione in etanolo delle nanoparticelle $\text{NH}_2\text{-QD@SiO}_2$ e del ligando TSPO, e l'aggiunta di BOP, come agente di accoppiamento, e DIPEA come ammina organica per regolare il pH, promuovere l'attivazione dei gruppi carbossilici dei ligandi ed indurre una rapida reazione di amminolisi. Il rapporto molare dei gruppi NH_2 , calcolati secondo il noto saggio della ninidrina (descritto dettagliatamente nella sezione materiali e metodi, paragrafo 4.2), ed il ligando TSPO, è stato fissato a circa 5. In particolare, $\text{NH}_2\text{-QD@SiO}_2\text{NPs}$ contenenti $2,2 \mu\text{mol}$ di gruppi NH_2 hanno reagito con $0,4 \mu\text{mol}$ di ligando TSPO, in presenza di agenti reticolanti, come riportato nella sezione materiali e metodi. Queste condizioni di reazione, caratterizzate dall'uso di un grande eccesso di gruppi NH_2 rispetto alla quantità di ligando TSPO, sono state appositamente selezionate per ottenere solo una parziale neutralizzazione dei gruppi NH_2 in seguito alla coniugazione. In effetti, l'elevata capacità di binding del ligando TSPO, dimostrata in studi precedenti, ha suggerito che la frazione di ligando effettivamente esposta sulla superficie del TSPO- QD@SiO_2 NPs potrebbe effettivamente essere in grado di riconoscere i mitocondri anche a bassa concentrazione[27]. Invece, la presenza di gruppi NH_2 residui liberi sulla superficie di TSPO- QD@SiO_2 NPs potrebbe migliorare la loro stabilità colloidale in mezzo fisiologico e fornire una carica positiva di superficie, utile per l'internalizzazione delle Nps ed il successivo direzionamento ai mitocondri. Inoltre, ulteriori gruppi NH_2 liberi, potrebbero rimanere a disposizione per eventuali reazioni di coniugazione con agenti terapeutici e/o diagnostici.

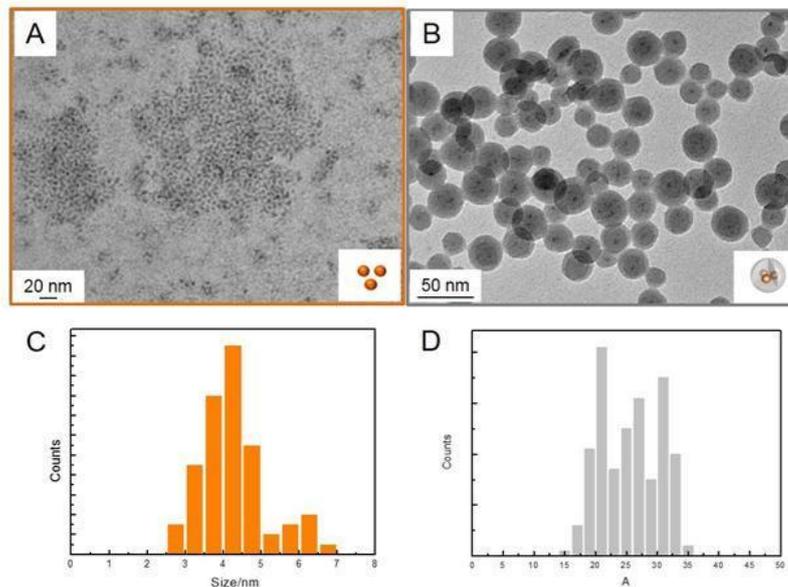


Fig.1. Immagini TEM (A, B) e relative distribuzione dimensionale (size) (C, D) di CdSe@ZnS QDs (A,C) e QD@SiO₂ (B, D), rispettivamente.

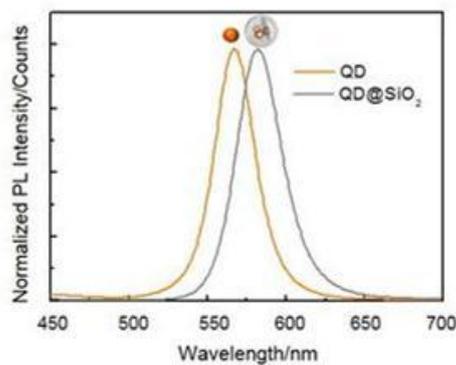


Fig.2. Intensità di fluorescenza dei QD (linea arancione) e QD@SiO₂ (linea blu).

Nelle figure 3 e 4 sono riportate le analisi ottiche e morfologiche delle nanoparticelle TSPO-QD@SiO₂ NPs. Lo spettro di assorbimento UV-Vis

(Fig.3B) combina le caratteristiche di assorbimento caratteristiche del ligando TSPO (le due bande centrate rispettivamente, a 254 e 333 nm, fig.3A, linea verde), con il profilo di assorbimento UV-Vis delle NH₂-QD@SiO₂ NPs (Fig.3A, linea blu), evidenziando così il successo della reazione di coniugazione nelle condizioni sperimentali specifiche, vale a dire, il tipo di reazione di coniugazione, rapporto molare del reagente, mezzo di reazione, temperatura e tempo. Lo spettro di assorbimento UV-Vis della sospensione TSPO-QD@SiO₂ Nps (Fig.3B) permette di stimare la concentrazione di ligando TSPO legata, in tutto il campione, come descritto nella sezione materiali e metodi. A partire da una sospensione 0,3 mg/mL di NH₂-QD@SiO₂ NPs contenente 2,2 μmol/mL di gruppi NH₂, la concentrazione di ligando TSPO che è stata riscontrata è stata: 24 μg/mL (0.05 μmol di TSPO in 1 mL di sospensione TSPO-QD@SiO₂ NPs, quindi poche centinaia di molecole di ligando per nanoparticella) pertanto è plausibile che sia rimasto un grande numero di NH₂ liberi.

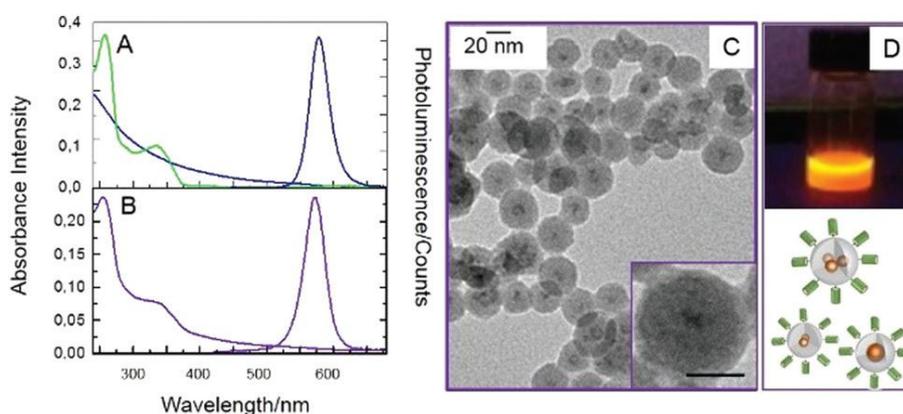


Fig.3 Spettri di assorbimento UV-Vis e fluorescenza (PL) di sospensioni di NH₂-QD@SiO₂ NPs diluite 1:20 (A, linea blu), di TSPO-QD@SiO₂ NPs (B, linea viola) e di una soluzione in etanolo del ligando TSPO (10 μM) (A, linea verde). Immagine TEM di TSPO-QD@SiO₂ NPs (C, scala:

10 nm), sketch della nanostruttura e foto del campione illuminato sotto una lampada UV (D). *Nanoscale*, 2016, 8, 3350–3361.

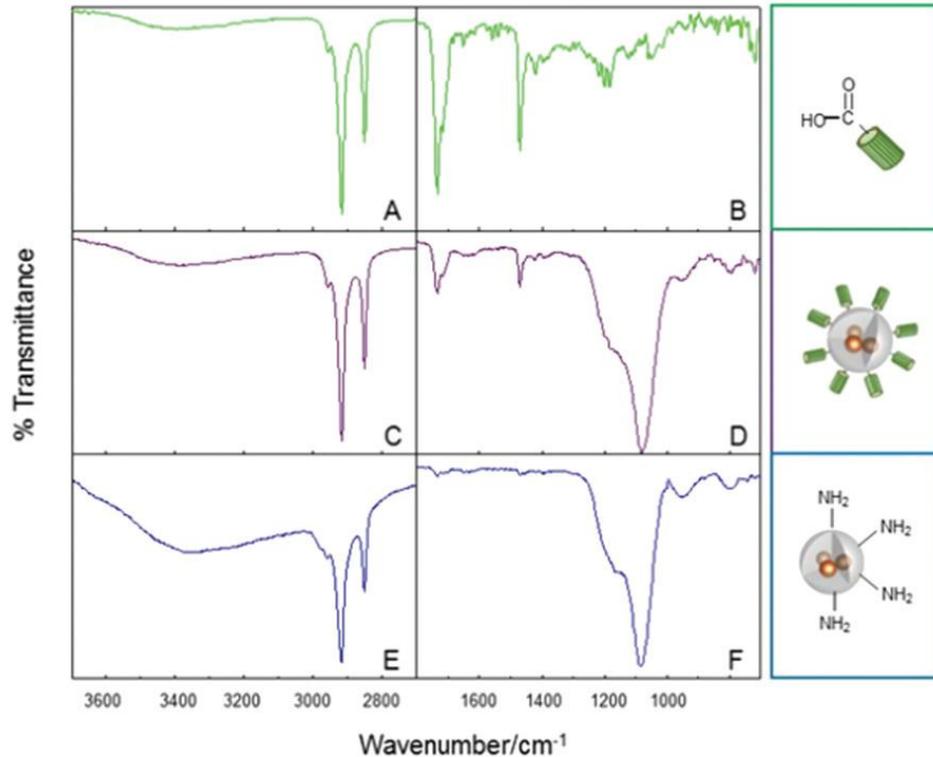


Fig.4 Spettri FTIR del ligando TSPO (A, B), TSPO-QD@SiO₂ NPs (C,D) e di NH₂-QD@SiO₂ NPs (E,F) insieme agli sketches della molecola di ligando e delle nanostrutture. *Nanoscale*, 2016, 8, 3350–3361.

E' da sottolineare il fatto che il campione conserva le proprietà di emissione dei QDs incontaminate, rappresentate da una banda stretta centrata a PL 575 nm [$\lambda_{ex} = 400$ nm, leggermente spostato verso il rosso rispetto alla banda di emissione del core dei QD (Fig.2)[33], corrispondente alla regione arancio dello spettro visibile, come rivelato anche dalla foto del campione illuminato sotto la lampada UV (Fig.3D). Inoltre, può essere osservato un leggero spostamento della PL verso il blu

nello spettro di TSPO-QD@SiO₂ NPs (Fig. 1B, linea viola) rispetto a NH₂-QD@SiO₂ NPs (Fig.3A, linea blu), e ciò può essere ragionevolmente attribuito all' ulteriore step di coniugazione con il ligando TSPO, che potrebbe aver rimosso una frazione delle NPs, probabilmente quelle a più alta molteplicità di nucleo[33]. La resa quantica relativa (quantum yield) di TSPO-QD@SiO₂ NPs ($QY_{\text{TSPO-QD@SiO}_2}=11\%$) è leggermente diminuito rispetto a NH₂-QD@SiO₂ NPs ($QY_{\text{NH}_2\text{-QD@SiO}_2}=15\%$), a conferma del mantenimento delle peculiari proprietà ottiche dei Qds luminescenti. Al fine di escludere qualsiasi contributo legato all'assorbimento non specifico del ligando TSPO sulla superficie di NH₂-QD@SiO₂ NPs, è stata preparata, in parallelo, una miscela fisica contenente NH₂-QD@SiO₂ NPs e ligando TSPO libero, nelle stesse condizioni sperimentali ottimizzate per la preparazione dei TSPO-QD@SiO₂ NPs ma senza l'aggiunta degli agenti promotori della coniugazione. Dopo la purificazione, sono state eseguite misure di assorbimento UV-Vis sulle NPs recuperate (Fig.5). Nello spettro di assorbimento UV-Vis della miscela purificata (Fig.5 B), non è stato rilevato il caratteristico assorbimento del legante TSPO, si deduce così che la formazione di un legame covalente avviene solo quando la reazione di coniugazione avviene in presenza di agenti di reticolazione, come descritto in precedenza.

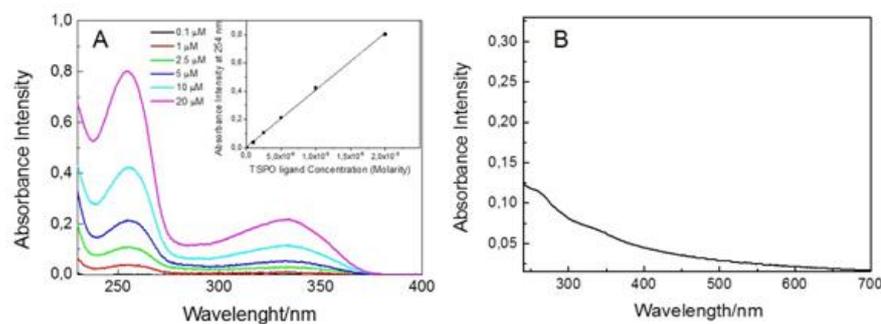


Fig.5. A) Spettri di assorbimento UV-Vis del ligando TSPO al variare della sua concentrazione nel range 0.1-20 μM , e curva di calibrazione (inserto) del ligando TSPO espressa come assorbanza a 254 nm in funzione della concentrazione di ligando ($\epsilon_{254 \text{ nm}}=35945\pm 710 \text{ L cm}^{-1}/\text{mol}$); B) Spettro di assorbimento UV-Vis di NPs dopo adsorbimento fisico del ligando TSPO sulla superficie di $\text{NH}_2\text{-QD@SiO}_2$.

In Fig.4 sono mostrate l'analisi FTIR di QD@SiO_2 NPs prima e dopo la coniugazione con il ligando TSPO e quella del solo ligando TSPO (Fig.4 A e B). Lo spettro FTIR di TSPO-QD@SiO_2 NPs (Fig.4 C e D) mostra chiaramente due picchi a 1739 e 1475 cm^{-1} ascrivibili allo stretching del gruppo ammidico ed allo stretching simmetrico del $\text{C}=\text{C}$ dell'anello aromatico del ligando TSPO, rispettivamente. Inoltre, è visibile una banda intensa da 1200 a 1000 cm^{-1} , attribuibile allo stretching simmetrico ed asimmetrico della rete silossanica Si-O-Si del guscio di silice.

Il nanosistema TSPO-QD@SiO_2 è stato ulteriormente caratterizzato dal punto di vista strutturale mediante indagini TEM, analisi DLS e misurazioni di potenziale zeta, poiché l'impiego di tale nanostruttura ibrida come sonda di imaging a livello subcellulare, necessita l'accurato controllo di dimensioni, morfologia e di carica superficiale. Infatti, questi parametri chimici e fisici influenzano significativamente i processi di

uptake cellulare, adsorbimento di membrana, trasporto di membrana, così come il destino intracellulare delle NPs all'interno della cellula ed il delivery verso l'organello bersaglio. La morfologia dei TSPO-QD@SiO₂, indagata mediante analisi TEM (Fig.3 C), rivela che le nanoparticelle hanno una dimensione di circa 29 nm, sono piuttosto monodisperse ($\sigma\%=7\%$), e con una struttura core-shell caratterizzata da un core di QDs sia multipli che singoli racchiuso in una shell di silice. L'indagine TEM evidenzia inoltre che in seguito alla funzionalizzazione dei QD@SiO₂, non si è verificata nessuna significativa aggregazione o modifica della geometria della nanostruttura (Fig.1B) e che le QD@SiO₂ NPs preservano la loro iniziale dimensione e distribuzione dimensionale. Il diametro idrodinamico, la stabilità colloidale e la densità di carica di superficie delle nanoparticelle luminescenti QD@SiO₂, sono stati determinati mediante analisi DLS e misurazioni di potenziale zeta, in ogni fase di funzionalizzazione, e quindi per i QD@SiO₂ NP, NH₂-QD@SiO₂ NP, ed infine per i TSPO-QD@SiO₂ NPs (Fig.6). L'analisi DLS indica chiaramente una distribuzione dimensionale monomodale, per ogni composto, suggerendo così che non si sia verificata aggregazione delle NPs in mezzo acquoso, ed un aumento del diametro medio passando dai QD@SiO₂ NP ai TSPO-QD@SiO₂ NP, come prevedibile a causa della coniugazione con il ligando TSPO (Fig. 6A). In particolare, è stato registrato un diametro medio di 37 (PDI 0,175±0,020), 39 (PDI 0,188±0,017) e 50 nm (PDI 0,190±0,025) per le diverse nanostrutture, rispettivamente. Le dimensioni del sistema TSPO-QD@SiO₂ NP valutate con la TEM (~29 nm) risultano differenti rispetto a quelle ottenute con la DLS. La ragione è riconducibile alla semplice considerazione che l'osservazione TEM è in grado di rilevare solo la frazione inorganica della nanostruttura ibrida. Viceversa, il valore di diametro idrodinamico più alto (50 nm) risultante dalle indagini DLS, considera la presenza oltre che della

componente inorganica, anche del ligando TSPO, della funzionalizzazione della superficie delle NPs, del guscio di idratazione, e anche dei controioni in eccesso. Infine, le misure di potenziale zeta, hanno chiarito l'effetto sulla carica superficiale delle NPs luminescenti, in ogni fase del processo di funzionalizzazione. In seguito all'inserimento di gruppi amminici, le nanoparticelle QD@SiO₂ cariche negativamente ($-32,0 \pm 2,0$ mV, Fig. 6B, linea rossa) diventano cariche positivamente ($14,6 \pm 0,3$ mV, Fig. 6B, linea blu), in accordo con i valori riportati in letteratura.[30] L'ulteriore coniugazione con il ligando TSPO risulta in un valore medio di ζ potenziale di $11,7 \pm 0,7$ mV (Fig.6B, linea viola). Il valore leggermente meno positivo di TSPO-QD@SiO₂ NP rispetto a quello del campione ammino funzionalizzato è ascrivibile alla diminuzione dei gruppi amminici liberi presenti sulla superficie del TSPO-QD@SiO₂ NP, a causa della loro neutralizzazione parziale per formazione di un legame covalente con il gruppo carbossilico della porzione direzionante. Questa evidenza rappresenta un'ulteriore conferma del successo della reazione di coniugazione. Inoltre, il valore positivo di ζ potenziale osservato per NH₂-QD@SiO₂ e TSPO-QD@SiO₂ NP suggerisce che le nanostrutture sono protonate e portano una carica positiva a pH fisiologico. Questa caratteristica è auspicabile per promuovere in una prima fase, l'adesione delle NP sulle membrane cellulari cariche negativamente per mezzo di attrazioni elettrostatiche, e poi in una seconda fase, il trasporto delle NP nel citoplasma mediante endocitosi per adsorbimento[1,2]. Inoltre, studi precedenti hanno ampiamente dimostrato che le nanostrutture cariche positivamente potrebbero anche indurre la fuga endosomiale, attraverso diversi meccanismi, il modello più popolare dei quali è l'effetto osmotico o detto anche effetto "proton sponge"[1,2]. In realtà, come riportato in precedenza[2], la dimensione di TSPO-QD@SiO₂ NP, nel range submicrometrico, dovrebbe garantire un uptake cellulare per endocitosi

energia dipendente, che è di solito limitato a particelle <100 nm o al massimo di alcune centinaia di nm di diametro. A questo proposito, Marrache et al. [2], hanno riportato un'indagine sistematica sull'effetto della dimensione e della carica di superficie di QDs funzionalizzati con TPP in cellule di cancro ovarico HeLa. Questi ricercatori hanno dimostrato che le particelle più piccole (80-100 nm) venivano maggiormente internalizzate, e che, a parità di diametro idrodinamico delle nanoparticelle, l'uptake aumentava per i QDS funzionalizzati con TPP con carica superficiale positiva pari a 1.3 mV, rimanendo costante fino ad una carica superficiale di 22 mV, e con un parallelo aumento dell'uptake mitocondriale.

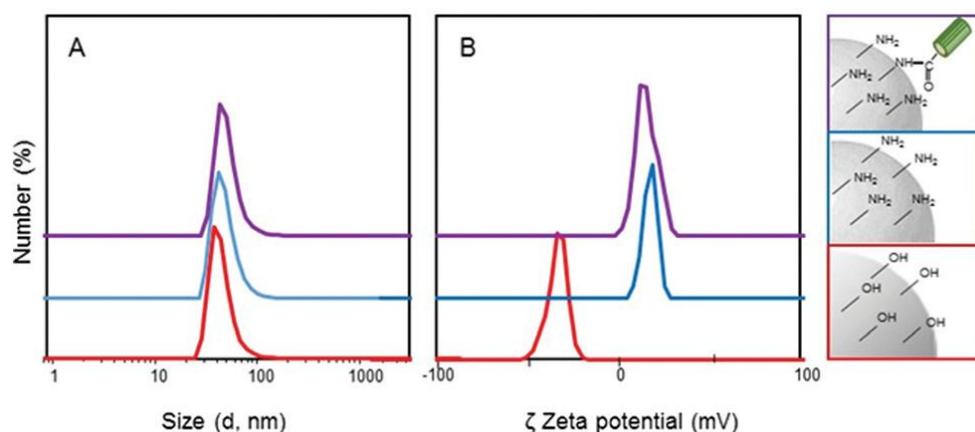


Fig.6 Distribuzione dei size di ottenuti mediante DLS (A) e potenziale zeta (B) di QD@SiO₂ NPs (linea rossa), NH₂-QD@SiO₂NPs (linea blu) e di TSPO-QD@SiO₂ NPs (linea viola), e sketch della relativa superficie di silice.

5.3.3 Studi *in vitro* di citotossicità, destino intracellulare e colocalizzazione di $\text{NH}_2\text{-QD@SiO}_2$ e TSPO-QD@SiO_2 NPs in cellule C6 di glioma di ratto.

Le cellule C6 glioma di ratto sono state selezionate quale modello cellulare adeguato per effettuare esperimenti di citotossicità, di destino intracellulare e studi di co-localizzazione, dal momento che over-esprimono il recettore mitocondriale TSPO. Al fine di selezionare una concentrazione di Nps adatta e non tossica da utilizzare per gli esperimenti di internalizzazione cellulare, è stata valutata la sopravvivenza cellulare delle cellule C6, dopo esposizione per 72 h a $\text{NH}_2\text{-QD@SiO}_2$ NP, prima e dopo coniugazione con il ligando TSPO.

La figura 7A presenta il profilo di vitalità cellulare ottenuto mediante il saggio MTT, variando la concentrazione delle NPs nell'intervallo 0,0001-0.1 mg/mL; si evince che $\text{NH}_2\text{-QD@SiO}_2$ NP e TSPO-QD@SiO_2 NP hanno determinato una citotossicità concentrazione-dipendente, ed i valori di IC_{50} stimati sono stati 0.040 ± 0.003 e 0.030 ± 0.002 mg/mL, rispettivamente e paragonabili tra di loro. Pertanto, per gli esperimenti successivi è stata utilizzata la concentrazione di 0.010 mg/mL per entrambi i campioni, corrispondente ad una concentrazione di QDs di circa 0.0045 mg/mL e 0.0033 mg/mL per $\text{NH}_2\text{-QD@SiO}_2$ e TSPO-QD@SiO_2 NP, rispettivamente. Gli esperimenti *in vitro* di destino intracellulare e gli studi di co-localizzazione sono stati eseguiti con TSPO-QD@SiO_2 NP, per esplorarne la capacità di entrare nelle cellule bersaglio e quindi dirigersi verso i mitocondri. La valutazione quantitativa dell'effettivo targeting subcellulare di TSPO-QD@SiO_2 NP è stata ottenuta utilizzando due tecniche complementari: il frazionamento subcellulare e la microscopia confocale a scansione laser. In particolare, per la prima tecnica, le cellule di glioma C6 sono state esposte a ciascuno dei due tipi di campioni di NP

(0.010 mg/mL) per 12 h e poi frazionate nelle varie componenti nucleare (N), mitocondriale (M), lisosomiale (L), microsomiale (Mic) e frazione solubile (S), per mezzo di una centrifugazione differenziale[27]. La caratteristica PL dei QDs è stata sfruttata per sondare e quantificare la quantità di NP legate alla membrana cellulare, e successivamente internalizzata nel citoplasma o traslocata ai mitocondri. La figura 7B mostra il confronto tra i valori di PL media (eccitazione fissata a 400 nm ed emissione a 570 nm di lunghezza d'onda) registrati nella frazione lisosomiale (L), nucleare (N), microsomiale (Mic), solubile (S) e mitocondriale (M) dopo esposizione delle cellule C6 alle NPs amino funzionalizzate o TSPO-direzionate. Quando le cellule C6 sono state trattate con TSPO-QD@SiO₂ NP, la fluorescenza media ottenuta nella frazione mitocondriale recuperata è stata di circa il 40%. Un valore di intensità PL significativo è stato rilevato anche nella frazione lisosomiale (27%), mentre valori medi PL meno intensi sono stati recuperati nelle frazioni nucleari (4%), microsomiale (5%) e solubile (10%). Al contrario, le Np luminescenti amino funzionalizzate e non direzionate, hanno fornito una diversa distribuzione intracellulare del segnali di PL. Infatti, il valore medio di PL rilevato nella frazione mitocondriale (8%) era significativamente inferiore rispetto a quello osservato per le TSPO-QD@SiO₂ NPs. In questo caso, il valore di intensità PL superiore è stato registrato nella frazione lisosomiale (33%), ed un segnale di PL non trascurabile è stato rilevato anche nella frazione solubile (15%). Infine, i valori di PL nel mezzo microsomiale e nella frazione nucleare sono stati 5 e 6%, rispettivamente (Fig.7B). I risultati ottenuti dallo studio di frazionamento subcellulare, hanno chiaramente dimostrato il verificarsi della internalizzazione cellulare sia delle Np amino funzionalizzate che di quelle TSPO direzionate, per mezzo di un meccanismo di endocitosi[37-39]. In effetti, è ben documentato che nanoparticelle con

dimensioni ≤ 50 nm e carica superficiale >10 mV, possono subire una elevata internalizzazione cellulare attraverso un processo di uptake non specifico, ossia di endocitosi per adsorbimento. Pertanto, in questo caso, è ragionevole assumere che, le cariche positive sulla superficie delle NP ammino funzionalizzate, (con dimensioni ≤ 50 nm e carica superficiale >10 mV) possono promuovere interazioni ioniche con le componenti anioniche della membrana cellulare (quali glicoproteine, proteoglicani) avviando così la loro rapida diffusione attraverso la membrana, principalmente attraverso un meccanismo di endocitosi clatrina mediato, ed il trafficking delle Nps verso il compartimento acido endosoma/lisosoma. Infatti, i valori medi di PL registrati per entrambi i campioni nella frazione lisosomiale, suggeriscono che le nanoparticelle sono inglobate in vescicole in seguito all'endocitosi clatrina dipendente, e che, quando sono in grado di uscirne, vengono intrappolate dai lisosomi. D'altra parte, la localizzazione delle NP nei compartimenti subcellulari diversi dai lisosomi, ha anche definitivamente confermato la capacità di una frazione significativa di NP di distrurre gli organuli endosomiali e quindi diffondere nel citoplasma delle cellule viventi. La fuga dal compartimento endo-lisosomiale osservata per entrambi i sistemi di NP, direzionate e non direzionate, potrebbe essere attribuita principalmente all'effetto osmolitico o anche noto come effetto "proton sponge" che è stato ampiamente riportato in letteratura come il più popolare modello di meccanismo atto a giustificare la capacità di fuga di NP cationiche dai compartimenti endo-lisosomiali[40]. Tale effetto si basa sull'assorbimento di protoni nel compartimento endosomiale, grazie alla capacità tamponante dei gruppi amminici liberi in eccesso presenti sulle NP, che comporta una riduzione dell'acidità locale, con conseguente attivazione della pompa protonica ATPasi dipendente transmembrana, verso il trasporto addizionale di protoni e controioni all'interno dell'endosoma, al

fine di raggiungere il pH richiesto nell'ultimo stadio della maturazione delle vescicole (late endolysosome). Questo differenziale di forza ionica è plausibilmente responsabile dell'induzione del rigonfiamento osmotico ed in ultima analisi dell'eventuale rottura della membrana endosomiale, causando così il rilascio delle NP luminescenti nel citosol, con conseguente possibilità di direzionamento delle stesse a livello mitocondriale[41].

Inoltre, la rottura della membrana degli organelli, quali endosomi e lisosomi, potrebbe avvenire anche con un meccanismo diverso, ossia grazie all'attrazione elettrostatica tra la superficie carica positivamente delle NP e la membrana degli organuli carica negativamente[42]. È interessante notare che il valore di intensità PL (40%) registrato nella frazione mitocondriale dopo incubazione delle cellule con TSPO-QD@SiO₂NP, dimostra univocamente l'elevata selettività di questo verso il recettore mitocondriale. Al contrario, le Np non direzionate, NH₂-QD@SiO₂, come prevedibile, si localizzano principalmente nelle frazioni lisosomiali e solubili (Fig.7B). Questi risultati indicano che solo il sistema TSPO-QD@SiO₂ NP è in grado di dirigersi selettivamente al mitocondrio, confermando l'efficienza di riconoscimento molecolare del ligando TSPO verso lo specifico recettore di membrana mitocondriale, anche in seguito al suo ancoraggio sulla superficie di silice. Inoltre, lo studio di localizzazione subcellulare ha dimostrato che il valore di intensità media PL registrato nella frazione mitocondriale è stato del 40% per il nanosistema TSPO-QD@SiO₂ NP (contro l' 8% per le NP non direzionate), mentre per la nanostruttura precedentemente riportata basata su dendrimeri G(4)-PAMAM-FITC, il valore di intensità media PL recuperato nella frazione mitocondriale è stato del 39% per il dendrimero direzionato al TSPO, contro il 21% per il non direzionato G(4)-PAMAM-FITC[27]. Tale confronto indica chiaramente una maggiore specificità di

localizzazione nel compartimento subcellulare mitocondriale dei QD luminescenti colloidali rispetto ai dendrimeri G(4)-PAMAM-FITC, dimostrando così anche la loro superiore selettività di targeting mitocondriale.

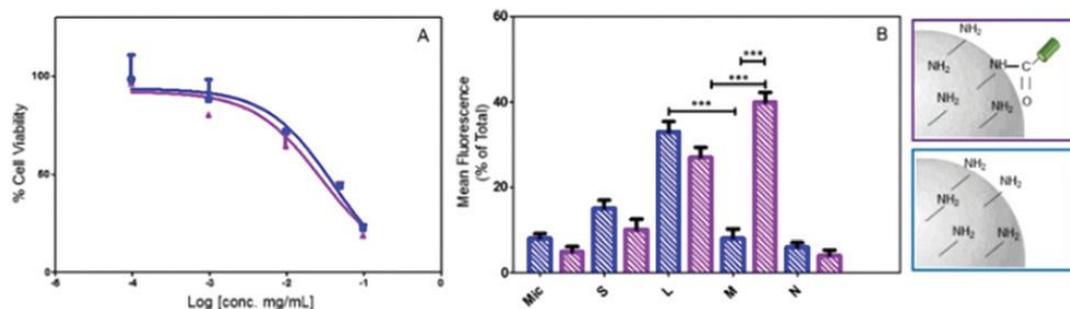


Fig.7. A) Profili di vitalità cellulare-concentrazione ottenuti incubando le cellule C6 di glioma di ratto cells per 72 h con QD@SiO₂ NPs (curva blu) e TSPO-QD@SiO₂ NPs (curva viola). Ogni punto rappresenta il valore medio di tre esperimenti indipendenti. B) Frazioni subcellulari di cellule C6 dopo incubazione con QD@SiO₂ NPs (barre blu) e TSPO-QD@SiO₂ NPs (barre viola). Sigle: microsomiale (Mic), solubile (S), lisosomiale (L), mitocondriale (M) e nucleare (N). Valori statistici: $p < 0.001$ (***) sono stati stimati usando il two-way ANOVA test ed il Bonferroni post hoc test. I dati rappresentano media \pm SD, $n=3$.

Le abilità di internalizzazione cellulare e di targeting mitocondriale sono state dimostrate anche mediante studi di co-localizzazione cellulare. Le immagini in Figura 8 mostrano le cellule C6 di glioma di ratto incubate con il composto fluorescente NH₂-QD@SiO₂ NP (Fig.8, pannello superiore) o TSPO-QD@SiO₂ (Fig.8, pannello inferiore) e visualizzate in microscopia confocale a scansione laser in cellule non fissate ma vitali, per evitare gli artefatti derivanti dalla fissazione delle cellule[27]. L'indagine di microscopia confocale a scansione laser ha confermato l'alta qualità e la robustezza del nanosistema QD@SiO₂ NP, anche alle molto basse esplorate concentrazioni di QD, nell'ordine dei nanogrammi. Un'alta

sensibilità di PL è stata raggiunta senza l'innestarsi di alcun photobleaching, anche in seguito a continua esposizione alla luce, non solo durante l'acquisizione dell'immagine, ma anche nel set di esperimenti successivamente ripetuti e per periodi molto più lunghi. Per gli studi cellulari di co-localizzazione, la caratteristica PL rossa del nucleo dei QD consente la localizzazione di QD@SiO₂ NP, mentre il MitoTracker verde, usato come marcatore specifico dei mitocondri, permette la localizzazione dei mitocondri. La sovrapposizione dei segnali di PL risulta in un'immagine di fluorescenza multicanale, che fonde il contributo di entrambi i probes e rappresenta un metodo efficace per valutare la co-localizzazione.

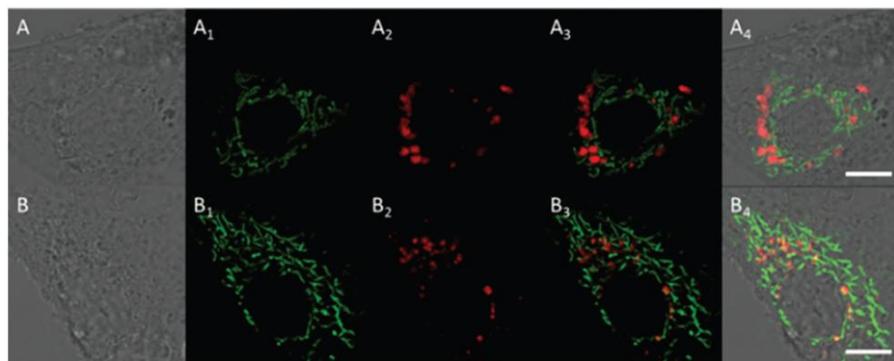


Fig.8. Immagini confocali rappresentative di cellule C6 incubate con QD@SiO₂ NPs (A, A1, A2, A3, A4) e TSPO-QD@SiO₂ NPs (B, B1, B2, B3, B4). Campo chiaro (A, B), verde (A1, B1), rosso (A2, B2), overlay (A3, A4, B3, B4). Scala= 10 μ m.

Le immagini in campo chiaro (Fig.8, pannelli A e B), e dei canali verde (Fig.8, pannelli A1 e B1) e rosso (Fig.8, pannelli A2 e B2) sono mostrate in figura 8 insieme alle immagini di sovrapposizione (Fig.8, pannelli A3, B3 e A4, B4). In particolare, l'immagine di microscopia confocale delle cellule incubate con le nanoparticelle TSPO-direzionate rivela che la maggior parte delle zone rosse (Fig.8, pannello B2) converge al giallo

nell'immagine di sovrapposizione (Fig.8, pannello B3) come risultato della sovrapposizione della PL rossa dei QD con quella verde specifica del marcatore mitocondriale (Fig.8, pannello B1). Questa prova ottica e la concomitante mancanza di sovrapposizione del rosso della PL dei QDs e del verde del marcatore mitocondriale, nel pannello di sovrapposizione relativo al campione $\text{NH}_2\text{-QD@SiO}_2$ NP (Fig.8, pannello A3), sono in grado di supportare in modo efficace i risultati ottenuti dall'esperimento di frazionamento subcellulare. Queste evidenze, considerate insieme, confermano l'effettiva capacità di direzionamento selettivo del sistema TSPO-QD@SiO_2 NP ai mitocondri. Inoltre, un'esperimento di co-localizzazione è stato eseguito, nelle stesse condizioni sperimentali, in presenza di un marcatore lisosomiale, LysoTracker verde. Entrambi i sistemi, TSPO -direzionato e non direzionato, hanno mostrato una co-localizzazione a livello lisosomiale, in accordo con il proposto meccanismo di uptake cellulare per endocitosi (Fig.9).

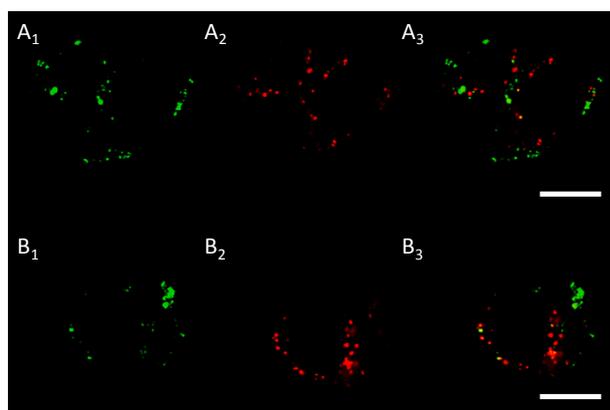


Fig.9. Immagini rappresentative di cellule vitali C6, marcate con LysoTracker verde (A1, B1) $\text{NH}_2\text{QD@SiO}_2$ NPs (A2) e TSPO-QD@SiO_2 NPs (B2). Sovrapposizione (A3, B3), la co-localizzazione è evidenziata dalla convergenza al giallo delle fluorescenze rossa e verde. Scala = 10 μm .

I risultati di fluorescenza degli studi co-localizzazione sono rappresentati graficamente in uno scatterogramma, in cui l'intensità di un canale è rappresentato contro l'intensità del secondo canale per ciascun pixel (Fig. 10). I pixel di entrambi i canali aventi identica posizione nell'immagine, possono essere considerati come una coppia. Nella regione 3 di dispersione sono presentati i pixel co-localizzazione. I pixel di co-localizzazione misurati per NH₂-QD@SiO₂ NP e TSPO-QD@SiO₂ NP sono stati rispettivamente il 7% e il 58% del totale, evidenziando un buon accordo tra i risultati ottenuti dagli esperimenti di frazionamento subcellulare e quelli di microscopia confocale. Inoltre, i corrispondenti coefficienti di sovrapposizione di Manders[43] calcolati per i nanosistemi non mirati e mirati, come media di tre diverse immagini indipendenti, sono 0.09 e 0.49 rispettivamente. Il valore del coefficiente di Manders' superiore misurato per il sistema TSPO-QD@SiO₂ NP conferma la co-localizzazione dei canali verde e rosso, rappresentanti, rispettivamente, la PL del marker mitocondriale e quella rossa dei QDS. Questa evidenza conferma indubbiamente che solo le nanoparticelle TSPO-QD@SiO₂ sono state selettivamente convogliate al mitocondrio, dal momento che è stata ottenuta una trascurabile localizzazione mitocondriale con il nanosistema ammino funzionalizzato NH₂-QD@SiO₂ NP.

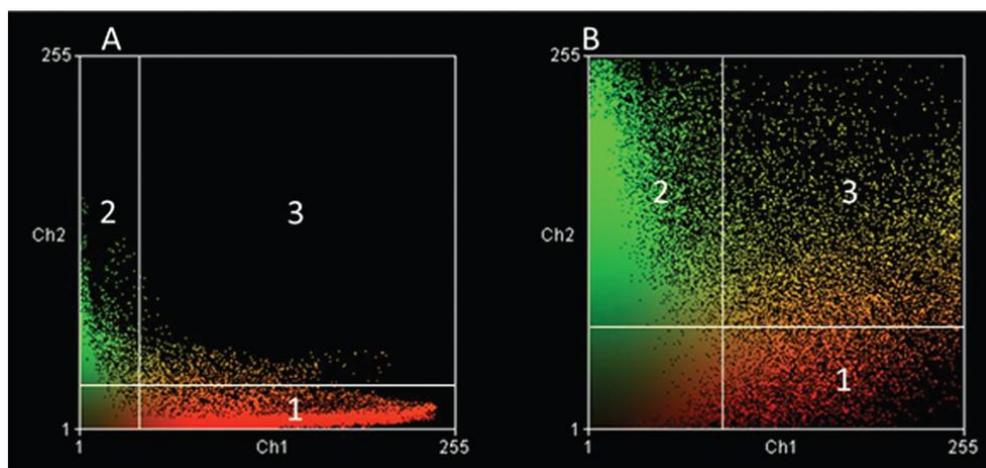


Fig.10. Analisi di co-localizzazione in cellule C6 di glioma di ratto marcate con due markers. Tutti i pixels delle immagini A3 e B3, riferite a cellule C6 trattate con QD@SiO₂ NPs e con TSPO-QD@SiO₂ NPs, rispettivamente e riportate in Fig.8, sono visualizzati negli scatterogrammi A e B in cui vengono confrontati i due canali delle immagini. I pixel di entrambi i canali che hanno posizioni identiche nell'immagine, possono essere considerati come una coppia. Di conseguenza, ogni coppia di pixel ha due intensità, una per ogni canale. Le intensità dei due canali sono riportate sugli assi dei grafici di dispersione. Nella regione 3, sono visualizzati i pixel di co-localizzazione.

5.4 Conclusioni

In questo lavoro è stato riportato lo sviluppo di nanomateriali multifunzionali ibridi basati su QD luminescenti come agenti di bio-imaging, in grado di riconoscere la proteina di traslocazione mitocondriale. In particolare, è stato efficacemente sintetizzato un nanosistema per l'imaging direzionato al TSPO, utilizzando NH₂-QD@SiO₂ come piattaforma di base per l'ulteriore legame covalente con il ligando altamente affine e selettivo per il TSPO caratterizzato da un

gruppo carbossilico derivatizzabile. Le nanoparticelle QD@SiO₂ NP si sono dimostrate un sito di ancoraggio del ligando TSPO ottimale, preservandone inalterata la sua capacità di riconoscere la proteina mitocondriale. Il nanomateriale luminescente TSPO direzionato basato su QD, ha acquisito la fluorescenza caratteristica dei QD ed uno spettro di assorbimento che combina le caratteristiche dei QD e del ligando TSPO. Il nanosistema è caratterizzato da una superficie carica positivamente, una dimensione nel range submicrometrico, con un diametro idrodinamico di circa 49 nm e una ristretta distribuzione dimensionale. La capacità dell'agente di imaging TSPO-QD@SiO₂ di essere internalizzata in cellule C6 di glioma di ratto e dirigersi allo specifico bersaglio mitocondriale TSPO, è stata valutata mediante tecniche di frazionamento subcellulare e microscopia confocale. I risultati complessivi hanno dimostrato, univocamente, la capacità del nanosistema TSPO-QD@SiO₂ NP di riconoscere lo specifico bersaglio mitocondriale, mentre è stata rilevata solo una quasi trascurabile localizzazione ai mitocondri del sistema NH₂-QD@SiO₂ NP. Inoltre, questi nanosistemi direzionati al TSPO, sono altamente luminescenti e stabili, e combinano in un'unica struttura una straordinaria resistenza al photobleaching sotto continua esposizione alla luce durante l'acquisizione delle immagini di microscopia confocale, e l'elevata selettività del ligando verso il TSPO. Il nanosistema luminescente multifunzionale risultante, possiede una selettività unica come agente di imaging mitocondriale e di conseguenza un significativo potenziale impatto per future applicazioni in campo biomedico, sia per la diagnosi che per la terapia.

Bibliografia

- [1] R. K. Pathak, N. Kolishetti and S. Dhar, *Wiley Interdiscip. Rev.: Nanomed. Nanobiotechnol.*, 2015, 7, 315.
- [2] S. Marrache and S. Dahr, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2012, 109, 16288.
- [3] L. Y. T. Chou, K. Ming and W. C. W. Chan, *Chem. Soc. Rev.*, 2011, 40, 233.
- [4] S. Fulda, L. Galluzzi and G. Kroemer, *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2010, 9, 447.
- [5] D. Peer, J. M. Karp, S. Hong, O. C. Farokhzad, R. Margalit and R. Langer, *Nat. Nanotechnol.*, 2007, 2, 751.
- [6] L. M. Wang, Y. Liu, W. Li, X. M. Jiang, Y. L. Ji, X. C. Wu, L. G. Xu, Y. Qiu, K. Zhao, T. T. Wei, Y. F. Li, Y. L. Zhao and C. Y. Chen, *Nano Lett.*, 2011, 11, 772.
- [7] B. A. D. Neto, J. R. Correa and R. G. Silva, *RSC Adv.*, 2013, 3, 5291.
- [8] C. W. T. Lung, Y. Hong, S. Chen, E. Zhao, J. W. Y. Lam and B. Z. Tang, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, 135, 62.
- [9] V. Biju, T. Itoh and M. Ishikawa, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, 39, 3031.
- [10] K. D. Wegner and N. Hildebrandt, *Chem. Soc. Rev.*, 2015, 44, 4792.
- [11] A. Hoshino, K. Fujioka, T. Oku, S. Nakamura, M. Suga, Y. Yagamuchi, K. Suzuki, M. Yasuhara and K. Yamamoto, *Microbiol. Immunol.*, 2004, 48, 985.
- [12] A. Chakraborty and N. R. Jana, *J. Phys. Chem. C*, 2015, 119, 2888.
- [13] R. Rupprecht, V. Papadopoulos, G. Rammes, T. C. Baghai, J. Fan, N. Akula, G. Groyer, D. Adams and M. Schumacher, *Nat. Rev.*, 2010, 9, 971.
- [14] C. Bento de Lima, E. K. Tamura, T. Montero-Melendez, J. Palermo-Neto, M. Perretti, R. P. Markus, S. H. Poliselli; and F. Farsky, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2012, 417, 918.
- [15] L. Veenman, V. Papadopoulos and M. Gavish, *Curr. Pharm. Des.*, 2007, 13, 2385.
- [16] J. Fan, M. B. Rone and V. Papadopoulos, *J. Biol. Chem.*, 2009, 284, 30484.

- [17] A. Midzak, N. Denora, V. Laquintana, A. Cutrignelli, A. Lopedota, M. Franco, C. D. Altomare and V. Papadopoulos, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2015, 76, 231.
- [18] N. Denora, V. Laquintana, A. Lopedota, A. Latrofa, J. M. Gallo and G. Trapani, *Mol. Pharm.*, 2010, 7, 2255.
- [19] V. Laquintana, N. Denora, A. Lopedota, H. Suzuki, M. Sawada, M. Serra, G. Biggio, A. Latrofa, G. Trapani and G. Liso, *Bioconjugate Chem.*, 2007, 18, 1397.
- [20] V. Laquintana, N. Denora, T. Musacchio, M. Lasorsa, A. Latrofa and G. Trapani, *J. Controlled Release*, 2009, 137, 185.
- [21] M. Bai and D. J. Bornhop, *Curr. Med. Chem.*, 2012, 19, 4742.
- [22] K. Sekimata, K. Hatano, M. Ogawa, J. Abe, Y. Magata, G. Biggio, M. Serra, V. Laquintana, N. Denora, A. Latrofa, G. Trapani and G. Liso, *Nucl. Med. Biol.*, 2008, 35, 327.
- [23] J. Salaklang, B. Steitz, A. Finka, C. P. O'Neil, M. Moniatte, A. J. van der Vlies, T. D. Giorgio, H. Hofmann, J. A. Hubbell and A. Petri-Fink, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2008, 47, 7857.
- [24] O. S. Wolfbeis, *Chem. Soc. Rev.*, 2015, 44, 4743.
- [25] N. Denora, V. Laquintana, A. Trapani, H. Suzuki, M. Sawada and G. Trapani, *Pharm. Res.*, 2011, 28, 2820.
- [26] L. E. Samuelson, M. J. Dukes, C. R. Hunt, J. D. Casey and D. J. Bornhop, *Bioconjugate Chem.*, 2009, 20, 2082.
- [27] N. Denora, V. Laquintana, A. Lopalco, R. M. Iacobazzi, A. Lopedota, A. Cutrignelli, G. Iacobellis, C. Annese, M. Cascione, S. Leporatti and M. Franco, *J. Controlled Release*, 2013, 172, 1111.
- [28] A. Sperling and W. J. Parak, *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. A*, 2010, 368, 1333.
- [29] A. Guerrero Marinez, J. Perez-Juste and L. M. Liz-Marzan, *Adv. Mater.*, 2010, 22, 1182.
- [30] M. Corricelli, N. Depalo, E. Di Carlo, E. Fanizza, V. Laquintana, N. Denora, A. Agostiano, M. Striccoli and M. L. Curri, *Nanoscale*, 2014, 6, 7924.
- [31] E. Fanizza, N. Depalo, L. Clary, A. Agostiano, M. Striccoli and M. L. Curri, *Nanoscale*, 2013, 5, 3272.
- [32] C. Graf, Q. Gao, I. Schütz, C. N. Noufele, W. Ruan, U. Posselt, E. Korotianskiy, D. Nordmeyer, F. Rancan, S. Hadam, A. Vogt, J. Lademann, V. Haucke and E. Rühl, *Langmuir*, 2012, 28, 7598.

- [33] E. Fanizza, C. Urso, V. Pinto, A. Cardone, R. Ragni, N. Depalo, M. L. Curri, A. Agostiano, G. M. Farinola and M. Striccoli, *J. Mater. Chem. C*, 2014, 2, 5286.
- [34] R. Koole, M. M. van Schooneveld, J. Hilhorst, C. D. Donega, D. C.'t Hart, A. van Blaaderen, D. Vanmaekelbergh and A. Meijerink, *Chem. Mater.*, 2008, 20, 2503.
- [35] P. Yang, N. Murase, M. Suzuki, C. Hosokawa, K. Kawasaki, T. Kato and T. Taguchi, *Chem. Commun.*, 2010, 46, 4595.
- [36] G. Xiao and L.-S. Gan, *Int. J. Cell Biol.*, 2013, 703545.
- [37] S. J. Tan, N. R. Jana, S. J. Gao, P. K. Patra and J. Y. Ying, *Chem. Mater.*, 2010, 22, 2239.
- [38] L. Y. T. Chou, K. Ming and W. Chan, *Chem. Soc. Rev.*, 2011, 40, 233.
- [39] L. Y. T. Chou, K. Ming and W. C. W. Chan, *Chem. Soc. Rev.*, 2011, 40, 233.
- [40] Z. Chu, Y. Huang, Q. Tao and Q. Li, *Nanoscale*, 2011, 3, 3291.
- [41] E. Soto-Cantu, R. Cuento, J. Koch and P. S. Russo, *Langmuir*, 2011, 28, 556.
- [42] N. Depalo, L. Catucci, A. Mallardi, A. Corcelli and A. Agostiano, *Bioelectrochemistry*, 2004, 63, 103.
- [43] E. M. M. Manders, F. J. Verbeek and J. A. Aten, *J. Microsc.*, 1993, 169, 375.

Capitolo 6

OSSERVAZIONI CONCLUSIVE GENERALI

In questo lavoro di tesi, sono state realizzate e descritte nuove strategie di direzionamento all'epatocarcinoma di farmaci antitumorali mediante sistemi nanoparticellari e di visualizzazione in cellule tumorali della proteina di traslocazione mitocondriale TSPO.

In particolare, è stato progettato e realizzato un nanocarrier in grado di attuare un targeting attivo del recettore per le asialoglicoproteine, ASGP-R, notoriamente over espresso sulla superficie degli epatociti in presenza di epatocarcinoma (HCC), rappresentato da un dendrimero PAMAM funzionalizzato con acido lactobionico come molecola di riconoscimento del recettore, ed in grado di veicolare il sorafenib quale farmaco antitumorale, direttamente al sito d'azione. Il sistema si è dimostrato in grado di essere rapidamente internalizzato dalle cellule di epatocarcinoma, di rilasciare il farmaco con una cinetica di rilascio di tipo sostenuto, di preservare l'efficacia farmacologica del sorafenib, ottenendo un effetto più duraturo nel tempo rispetto alla somministrazione del farmaco da solo. In aggiunta, l'incorporazione del sorafenib nel dendrimero, ha permesso di aumentare la solubilità del farmaco in ambiente acquoso. Per queste ragioni, questo nuovo dendrimero direzionato all'ASGP-R, può essere considerato come un vettore adatto per la delivery selettivo di sorafenib nel citoplasma delle cellule di cancro al fegato overesprimenti questo recettore.

Inoltre è stata esplorata una strategia di targeting epatico di tipo fisico, mediante la realizzazione di nanovettori magnetici caratterizzati da micelle fosfolipidiche peghilate, veicolanti all'interno SPIONs in grado di direzionarsi sotto l'azione di un campo magnetico applicato dall'esterno, ed il sorafenib come agente antitumorale. I risultati sperimentali hanno dimostrato che l'attività del sorafenib

rimane invariata anche in seguito ad incapsulazione nelle micelle, che la presenza di un campo magnetico applicato dall'esterno, promuove un'elevata internalizzazione cellulare del sistema SPION/micelle e che il sistema SPION/sorafenib/micelle, magneticamente direzionato, risulta in una più efficace attività antitumorale. Le PEG-PE micelle hanno consentito quindi la combinazione del farmaco con nanoparticelle magnetiche, realizzando così una nanoformulazione versatile in grado di essere guidata, mediante campo magnetico, verso specifici tessuti tumorali e che pertanto potrebbe avere un elevato impatto nella terapia dell'HCC.

Infine, sono stati realizzati due diversi sistemi nanoparticellari in grado di direzionarsi selettivamente a livello mitocondriale, riconoscendo la proteina di Traslocazione mitocondriale (TSPO), attuando così un targeting di tipo subcellulare. In particolare, il primo sistema è rappresentato da un dendrimero PAMAM di quarta generazione, opportunamente funzionalizzato per il riconoscimento selettivo del recettore TSPO con un ligando a struttura imidazopiridinacetammidica e con FITC come fluoroforo organico per consentirne la visualizzazione. In una fase successiva, per ovviare ai limiti legati all'utilizzo della FITC come fluoroforo organico, è stato realizzato un secondo nanosistema in grado di direzionarsi selettivamente al TSPO, rappresentato da una nanostruttura ibrida basata su QDs fluorescenti opportunamente funzionalizzati per il riconoscimento del recettore TSPO, con lo stesso ligando altamente affine e selettivo utilizzato per il dendrimero. In entrambi i casi, i risultati sperimentali hanno confermato il grande potenziale di questi nanosistemi multifunzionali di riconoscere lo specifico bersaglio mitocondriale e quindi di poter essere utilizzati come agenti per l'imaging mitocondriale *in vitro*.