



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato di Ricerca in Scienze Molecolari e Biomolecolari
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche (STEBICEF)
SSD CHIM/09

NANOSTRUTTURE COMPOSITE AD AZIONE TERANOSTICA PER IL TRATTAMENTO DEL CANCRO

IL DOTTORE
Paola Varvarà

IL COORDINATORE
Ch.ma Prof.ssa Patrizia Diana

IL TUTOR
Ch.mo Prof. Gaetano Giammona

CICLO XXXII
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2020

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1. Criticità nella veicolazione di farmaci antineoplastici	1
1.2. La nanomedicina nella terapia antineoplastica	5
1.2.1. Direzionamento tumorale	7
1.2.2. Ipertermia e terapia nano-fototermica (NPTT) nel trattamento del cancro	11
1.3. Teranostica e terapia personalizzata	14
1.4. Nanoparticelle superparamagnetiche di ossidi di ferro (SPIONs)	17
1.4.1. Usi in terapia antineoplastica	22
1.4.2. Usi in diagnostica per immagini	20
1.5. Nanorods di oro	25
1.5.1. Usi in terapia antineoplastica	31
1.5.2. Usi in diagnostica per immagini	30
2. SCOPO	34
3. RISULTATI E DISCUSSIONE	36
3.1. Produzione e classificazione di SPIONs come agenti di contrasto	36
3.2. SPIONs contenenti collagenasi per la veicolazione di farmaci antineoplastici	40
3.2.1. Sintesi e caratterizzazione del derivato α,β -poli(N-idrossietil, azidopropil, pentinil)- D,L-aspartammide (PHEAPA)	40
3.2.2. Preparazione e caratterizzazione dei DDS	41
3.1.3 Studi <i>in vitro</i>	47

3.3. Gold nanorods con rivestimento polimerico poliamminoacidico per la terapia termoablative del cancro al colon	53
3.3.1. Sintesi e caratterizzazione del copolimero PHEA-LA-PEG-FA	53
3.3.2. Preparazione e caratterizzazione degli AuNRs rivestiti vuoti e carichi di Irinotecano	55
3.3.3. Caratterizzazione biologica e studi in vivo	60
3.4. Gold nanorods con rivestimento polimerico polisaccaridico per la terapia fototermica del cancro al colon	66
3.4.1. Sintesi e caratterizzazione di GG-LA	66
3.4.2. Preparazione e caratterizzazione dei AuNRs rivestiti	68
3.4.3. Studi <i>in vitro</i>	74
3.5. Nanostrutture a base di copolimeri a blocchi di neosintesi per potenziali usi in teranostica	83
4. CONCLUSIONI	89
5. PARTE SPERIMENTALE	91
5.1. Produzione e classificazione di SPIONs come agenti di contrasto	91
5.1.1. Materiali	91
5.1.2. Sintesi delle nanoparticelle di ossido di ferro	91
5.1.3. Classificazione delle nanoparticelle di ossido di ferro	91
5.1.4. Caratterizzazione delle nanoparticelle di ossido di ferro	92
5.2. Spions contenenti collagenasi per la veicolazione di farmaci antineoplastici	93
5.2.1. Materiali	93
5.2.2. Sintesi polimerica e preparazione dei nanogeli	93

5.2.3. Caratterizzazione chimico-fisica	95
5.2.4. Caratterizzazione biologica	97
5.3. Gold nanorods con rivestimento polimerico poliamminoacidico per la terapia termoablativa del cancro al colon	100
5.3.1. Materiali	100
5.3.2. Sintesi e preparazione	100
5.3.3. Caratterizzazione chimico-fisica	102
5.3.4. Caratterizzazione biologica e studi <i>in vivo</i>	104
5.4. Gold nanorods con rivestimento polimerico polisaccaridico per l'ipertermia oncologica	107
5.4.1. Materiali	107
5.4.2. Sintesi e caratterizzazione dei derivati e dei sistemi rivestiti	107
5.4.3. Studi biologici	111
5.5. Nanostrutture a base di copolimeri a blocchi di neosintesi per potenziali usi in teranostica	113
5.5.1. Materiali	114
5.5.2. Sintesi dei derivati polimerici PEG-DFO-Phen	114
5.5.3. Preparazione e caratterizzazione dei nanosistemi	116
Finanziamenti	117
Ringraziamenti	118
6. BIBLIOGRAFIA	1199

1. INTRODUZIONE

1.1.Criticità nella veicolazione di farmaci antineoplastici

Secondo l'American Cancer Society, il cancro è un gruppo di patologie caratterizzate dalla crescita incontrollata e dalla disseminazione di cellule anomale, che può condurre a morte (Siegel et al., 2018). Questa definizione appare chiara ed efficace, ma non sottolinea la complessità e la variabilità della malattia neoplastica. Il cancro è infatti una patologia altamente eterogenea che presenta cause, decorsi ed esiti non determinati con certezza.

Al momento attuale, la terapia antitumorale convenzionale ha previsto l'utilizzo di svariati trattamenti che includono chirurgia, radioterapia e terapia ormonale, e tra cui spicca la chemioterapia, ovvero la terapia farmacologica mirata alla morte delle cellule tumorali (Siegel et al., 2016). Nonostante gli sforzi profusi, le statistiche aggiornate al 2017 rivelano però come il cancro continui a rappresentare una delle maggiori cause di morte della popolazione globale, attestandosi al secondo posto (17.08%), preceduto solamente dalle malattie cardiovascolari (31.8%) (Ritchie et al., 2018) (Figura 1).

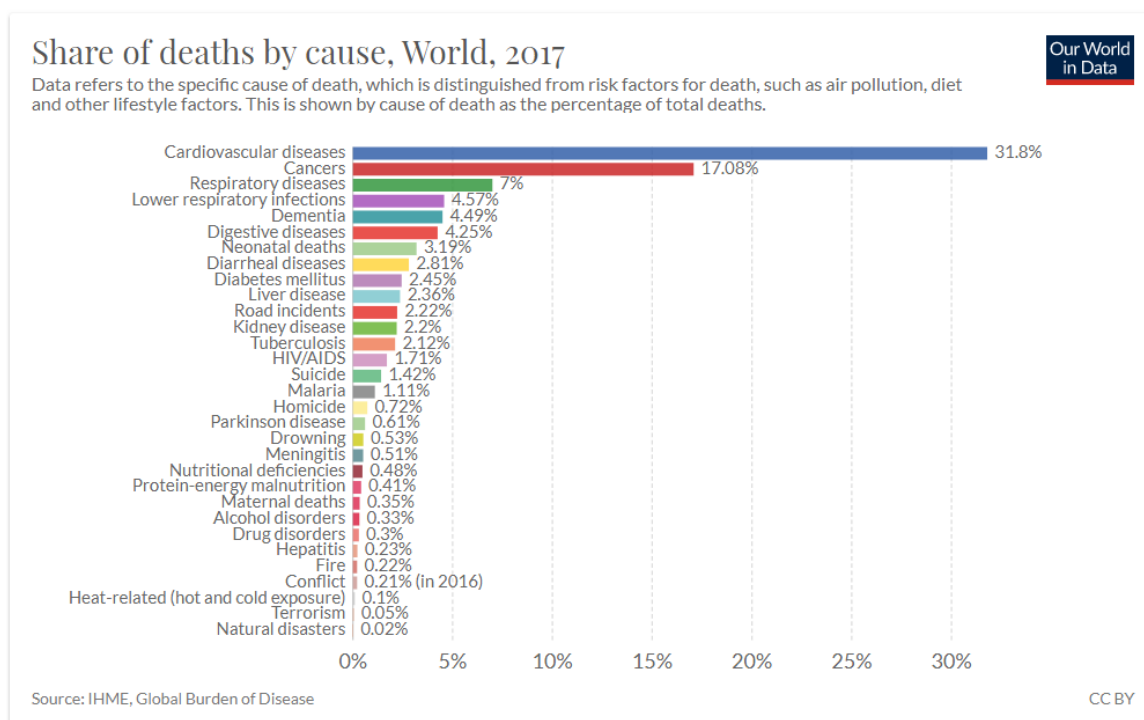


Figura 1. Decessi registrati nella popolazione mondiale nel 2017 raggruppati per causa di morte ed espressi come percentuale sul totale dei decessi (Ritchie et al., 2018).

Pertanto, risulta doveroso intervenire in questo ambito in modo da sviluppare nuove strategie in grado di migliorare gli esiti dei trattamenti ed incrementare le percentuali di sopravvivenza. La messa a punto ed il progresso di metodologie innovative non possono prescindere dalla conoscenza approfondita dei fattori che limitano il successo delle terapie attualmente adoperate. Sebbene i trattamenti convenzionali abbiano infatti ottenuto diversi risultati positivi, numerose sono ancora le criticità della chemioterapia, tra cui lo scarso accumulo del farmaco nel sito tumorale e l'alta incidenza di effetti collaterali, riconducibili ad una bassa selettività dell'agente terapeutico nei confronti del tessuto bersaglio.

I tumori solidi possono essere considerati degli organi anomali a tutti gli effetti. La loro struttura è infatti molto complessa ed è composta da una grande varietà di citotipi, tra cui cellule epiteliali, endoteliali, perivascolari, staminali mesenchimali, fibroblasti e cellule del sistema immunitario, oltre alle cellule cancerose primarie (Egeblad et al., 2010). Le diverse tipologie cellulari che fanno parte "dell'organo" tumore sono immerse in una vera e propria matrice extracellulare (ECM) neoplastica composta da una rete intricata di collagene, glicoproteine e proteoglicani che ha come principali funzioni il supporto ed il sostegno, ma è coinvolta altresì nel trasporto di nutrienti ed ossigeno alla massa tumorale.

I citotipi non tumorali e la ECM sono organizzati in un *milieu* detto microambiente tumorale (TME) ed hanno un ruolo tutt'altro che passivo. Il microambiente di un tumore in fase di sviluppo rappresenta un fattore regolatorio di fondamentale importanza nella carcinogenesi. Negli ultimi decenni, numerose ricerche hanno inoltre indicato che i processi di carcinogenesi e neoangiogenesi sono determinati non solo dall'interazione tra cellule tumorali e cellule dell'endotelio vascolare e linfatico, ma anche dall'intervento delle cellule stromali ed infiammatorie non neoplastiche che circondano il tumore (Bhowmick et al., 2004; Bissell et al., 2005; Huang et al., 2006).

In generale si può affermare che i citotipi facenti parte del TME comunicano e cooperano incessantemente intervenendo in ciascuno degli stadi dello sviluppo del cancro: trasformazione neoplastica, proliferazione, invasione, metastasi (McMillin et al., 2013; Velaei et al., 2016). Le componenti del TME possono inoltre influire sulla sensibilità delle cellule neoplastiche verso il trattamento chemioterapico. I fattori di natura fisica che possono inficiare la riuscita della terapia farmacologica includono l'alta densità cellulare, la pressione dei fluidi fisiologici e la rigidità della matrice extracellulare. Considerato che i farmaci vengono generalmente veicolati alla massa tumorale attraversando gli spazi interstiziali tramite fenomeni diffusivi, la presenza di barriere fisiche e biochimiche, limita fortemente

la penetrazione del principio attivo all'interno del tumore solido, riducendone l'efficacia (Tannock et al., 2002; Jang et al., 2003; Kyle et al., 2007).

Le caratteristiche del TME che interferiscono in misura maggiore con l'efficacia del trattamento chemioterapico sono riassunte nella Tabella 1.

Tabella 1. Caratteristiche del TME che limitano la riuscita del trattamento chemioterapico.

Fattori del microambiente tumorale	Meccanismo	Risultati	Riferimenti bibliografici
<i>Barriere fisiche</i>	Penetrazione limitata di farmaci e DDSs	Incapacità di veicolare farmaci nelle zone interne della massa tumorale	(Minchinton et al., 2006)
	Modifiche del flusso del fluido interstiziale	Flusso in direzione uscente dalla massa tumorale ai tessuti circostanti	(Jain, 2012)
<i>ECM</i>	Resistenza ai farmaci mediata da CAM-DR	Attivazione di segnali apoptotici tramite interazione ligando-recettore mediata da integrine	(Kijima et al., 2008)
	Porosità	Limitazione del trasporto di molecole	(Loessner et al., 2010)
<i>Shear stress dei fluidi</i>	Attivazione di segnali autocrini (IGF-1R)	Incremento del rilascio di IGF-1	(Santoro et al., 2015)
	Apoptosi mediata da recettori dipendenti dalle caspasi	Apoptosi indotta da TRAIL	(Mitchell et al., 2013)
<i>Ipossia</i>	Quiescenza delle cellule tumorali	Diminuzione dell'efficacia citotossica di agenti antineoplastici	(Kovacic et al., 2005)
	Efflusso di farmaco incrementato ad opera di HIF-1	Riduzione della quantità di farmaco presente nelle cellule bersaglio	(Gottesman et al., 2002)
	Incremento dei segnali antiapoptotici mediato da HIF-1	Diminuzione della morte cellulare per necrosi o apoptosi	(Rohwer et al., 2011)
<i>pH</i>	«Ion trapping»	Riduzione della permeabilità cellulare nei confronti di molecole cariche positivamente	(Raghunand et al., 2000)
<i>Interazioni tra cellule</i>	Secrezione di citochine	Attivazione di segnali antiapoptotici	(Jones et al., 2016)
	Interazioni tra cellule tumorali e stromali	Chemioresistenza	(Rafii et al., 2008)
<i>Fibroblasti associati alle cellule tumorali (CAFs)</i>	Secrezione di citochine	Chemioresistenza	(Pasquier et al., 2018)
	Modifica del metabolismo dei CAFs ad opera di linfociti T	Chemioresistenza	(Wang et al., 2016)
<i>Macrofagi associati al tumore (TAM)</i>	Secrezione di citochine	Attivazione di segnali antiapoptotici	(De Palma et al., 2013)

Idealmente, un trattamento chemioterapico risolutivo con effetti a lungo termine è quello che consente al farmaco di raggiungere la quasi totalità delle cellule tumorali. Infatti, nel caso in cui il farmaco non abbia accesso all'intero set di cellule alterate, la tipica crescita incontrollata delle cellule neoplastiche comprometterebbe la riuscita della terapia, incentivando inoltre lo sviluppo di fenomeni di resistenza. Per tali ragioni, la ricerca odierna si sta incentrando in misura sempre maggiore sullo studio dei fattori che influenzano la veicolazione di molecole bioattive e sulle strategie da adottare per ottenere un *Drug Delivery* performante (Jain, 1994).

All'atto pratico, le variabili che influenzano l'efficacia della chemioterapia sono numerose ed ascrivibili alle proprietà chimico-fisiche del farmaco, alle modalità di somministrazione del trattamento ed alle caratteristiche del tumore (Bast et al., 2017). Un farmaco somministrato per via endovenosa ed indirizzato ad un tumore solido deve essere capace di attraversare le pareti dei vasi ed i tessuti circostanti per raggiungere il sito bersaglio. Questo trasporto dipende dalle proprietà del farmaco ma anche da fattori inerenti alle strutture anatomiche, come ad esempio la distribuzione del flusso sanguigno e l'architettura del sistema di microvasi che nutrono la massa tumorale, o ancora dalla presenza di componenti extravascolari, quali cellule sane, cellule associate al tumore e la matrice extracellulare tumorale (ECM) (Dewhirst et al., 2017).

Come già accennato, un ulteriore fenomeno di enorme importanza che limita la riuscita del trattamento antineoplastico è rappresentato dalla resistenza dei tumori nei confronti delle molecole chemioterapiche. Esistono due tipi di resistenza ai farmaci: la resistenza intrinseca e la resistenza acquisita. La resistenza intrinseca, detta anche primaria, è dovuta ad un'insensibilità innata della linea cellulare tumorale nei riguardi della molecola adoperata. La seconda tipologia di resistenza, detta acquisita (anche chiamata adattiva o secondaria), è sviluppata come misura di difesa in seguito alla continua esposizione a farmaci chemioterapici. Una volta che la resistenza verso un dato agente viene acquisita, viene solitamente adottato l'impiego di nuovi farmaci che non presentano resistenza crociata. Le mutazioni spontanee, conseguenti alla continua e non risolutiva esposizione a farmaci chemioterapici, conducono all'accumulo di cloni resistenti (Goldie et al., 1979). Inoltre, la presenza di ceppi mutati selezionati tramite meccanismo di evoluzione Darwiniana o di sottopopolazioni staminali che presentano una resistenza innata verso il trattamento, è spesso responsabile di fenomeni di ricaduta o disseminazione metastatica in altre sedi dell'organismo (Frank et al., 2010; Greaves et al., 2012).

1.2. La nanomedicina nella terapia antineoplastica

Si può affermare che lo scarso successo della chemioterapia tumorale sia da attribuire in prima istanza ad una scorretta veicolazione dell'agente antineoplastico. Il mancato raggiungimento del sito bersaglio è infatti responsabile della parziale inefficacia, nonché dello sviluppo di resistenza acquisita e della comparsa di effetti collaterali a carico di strutture anatomiche sane. Negli ultimi decenni si è assistito ad un crescente interesse nei confronti della nanotecnologia applicata all'ambito biomedico e in particolare al trattamento del cancro (Moghimi et al., 2005). La nanomedicina si definisce come la branca della nanotecnologia che si propone di utilizzare strutture nanometriche per il trattamento, la diagnosi, il monitoraggio e il controllo di sistemi biologici (Sanna et al., 2014). Nell'ambito della terapia dei tumori, la strategia "nano" si promette di far fronte alle carenze dei trattamenti attualmente esistenti, avendo come obiettivo principale l'incremento della biodisponibilità *in situ* delle molecole bioattive veicolate per ottenere una maggiore efficacia contestualmente ad una riduzione degli effetti collaterali che si verificano nei distretti *non target*.

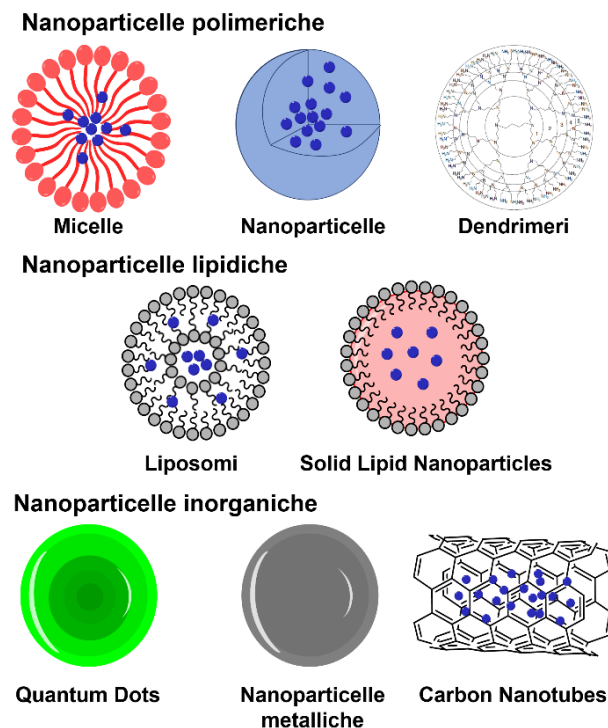


Figura 2. Panoramica dei nanostrutture più utilizzati in ambito biomedico.

Al giorno d'oggi, sono state proposte numerose tipologie di nanostrutture utilizzabili in ambito biomedico a base polimerica, lipidica, inorganica o composita. Tra i più impiegati si annoverano nanoparticelle e micelle polimeriche, dendrimeri, liposomi, nanoparticelle

lipidiche, nanocristalli, nanosistemi compositi con core metallico (es. oro, ossidi di ferro, argento), o ancora nanostrutture a base di carbonio e silicio (Figura 2).

In virtù delle loro dimensioni, i materiali nanostrutturati esibiscono proprietà chimiche, meccaniche, magnetiche, elettriche uniche e decisamente diverse da quelle riscontrate nei materiali in bulk. Le caratteristiche vantaggiose dei nanocarrier che rendono conto del loro utilizzo nel *drug delivery* sono numerose (Wicki et al., 2015).

Innanzitutto, posseggono dimensioni ideali per una possibile internalizzazione cellulare. Come conseguenza, mostrano un elevato rapporto superficie/volume, sfruttabile per la funzionalizzazione superficiale e per la decorazione (tramite interazioni fisiche o coniugazione chimica) con molecole di interesse terapeutico o che presentano funzionalità accessorie. L'incorporazione di sostanze attive all'interno di nanostrutture offre inoltre la possibilità di aumentarne la biodisponibilità e di regolarne il rilascio mediante differenti meccanismi. La capacità di alcuni nanosistemi di magnificare la solubilità di molecole idrofobiche, generalmente di difficile somministrazione, consente di incrementare la quota di composto attivo nel sito bersaglio. Inoltre, è stato dimostrato che i nanoveicoli sono in grado di aumentare il tempo di circolazione ematica del cargo e di proteggerlo nei confronti di fenomeni di degradazione prematura.

I nanocarrier possono essere progettati per rilasciare i composti veicolati in seguito a differenti generi di innesco (temperatura, pH, ambiente riducente etc.) che si verifica solo in prossimità della zona d'interesse, rendendo ancora più specifica la consegna dell'agente terapeutico. Infine, si può ottenere una terapia mirata e selettiva nei confronti del distretto di interesse sfruttando metodiche di direccionamento passivo, attivo o fisico che consentono, in aggiunta, la riduzione degli effetti collaterali indesiderati secondari al trattamento.

Nel contesto della nanomedicina i polimeri hanno svolto un ruolo fondamentale nell'evoluzione della tecnologia del *drug delivery* e del rilascio modulabile di sostanze di diversa natura chimica. Gran parte dei progressi raggiunti nella nanomedicina sono infatti da attribuire alla possibilità di progettazione di materiali polimerici con caratteristiche fisiche e proprietà biologiche specifiche e mirate agli scopi prefissati (Liechty et al., 2010). Tra i polimeri utilizzabili per la formulazione di nanosistemi terapeutici, i poliamminoacidi e i polisaccaridi, così come i loro derivati di sintesi, ricoprono una posizione di rilievo in quanto, per merito delle evidenti analogie con composti endogeni, presentano profili di biocompatibilità, biodegradabilità e, talvolta, proprietà biologiche paragonabili a proteine e carboidrati.

1.2.1. Direzioneamento tumorale

Tra i più grandi obiettivi della nanomedicina nella cura dei tumori solidi vi è la messa a punto di una terapia direzionata. Questo intento può essere raggiunto tramite una molteplicità di strategie di direzioneamento.

Dal momento in cui il tumore si accresce le proprie dimensioni fino a superare i 3mm di diametro, le ridotte possibilità di diffusione limitano il trasporto di ossigeno e nutrienti e risulta essenziale la formazione di nuovi vasi sanguigni in grado di soddisfare le esigenze nutrizionali della massa in costante crescita (LaRocque et al., 2009). In molti tipi di tumori studiati, lo squilibrio che viene a crearsi tra le quantità di fattori angiogenetici prodotti e metalloproteinasi della matrice (MMPs), provoca la formazione di una vascolatura anomala ed altamente disorganizzata che presenta numerose discontinuità al livello dell'endotelio vascolare (Iyer et al., 2006). Nella vascolatura normale, la presenza di giunzioni serrate è responsabile della formazione di un epitelio cosiddetto "continuo" che impedisce il passaggio di molecole con dimensioni maggiori di circa 4nm. I vasi tumorali neoformati possiedono invece una permeabilità particolarmente elevata dovuta alla carenza di cellule muscolari lisce e alla presenza di cellule perivascolari difettose o assenti, che causa un aumento notevole dell'ampiezza delle fenestrature. Questo fenomeno, in associazione alla produzione di fattori di permeabilizzazione, incrementa di gran lunga la capacità di extravasazione di molecole di elevate dimensioni, permettendo a macromolecole o strutture complesse con diametro fino a 600nm di raggiungere i tessuti neoplastici (McDonald et al., 2003; Cho et al., 2008). Inoltre, dato che il tumore non presenta un sistema linfatico ben strutturato e funzionante, le nanostrutture extravasate tendono a risiedere per un periodo maggiore in sede tumorale, aumentando il tempo di contatto con la massa tumorale (Figura 3). La combinazione di questi due fenomeni è detta *Enhanced Permeability and Retention* (EPR) ed è responsabile del cosiddetto direzioneamento passivo di carrier nanostrutturati e del loro accumulo in sede tumorale in virtù delle loro dimensioni (Matsumura et al., 1986; Maeda et al., 1989).

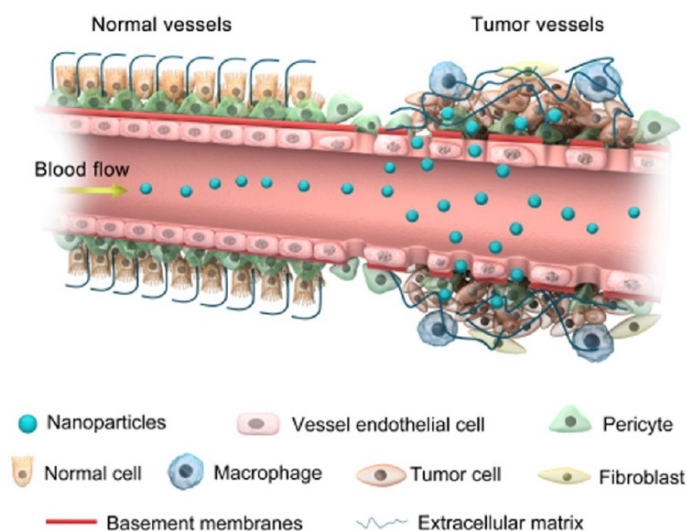


Figura 3. Razionale dell'effetto EPR mediante rappresentazione grafica dell'extravasazione di particelle nanometriche dai neovasi tumorali con struttura alterata (Abdalla et al., 2018).

Per poter essere veicolato mediante targeting passivo, un nanosistema deve possedere certi requisiti. L'effetto EPR è innanzitutto strettamente dipendente dalle dimensioni del carrier adoperato. Particelle con diametro idrodinamico inferiore ai 10nm sono facilmente filtrate per via renale, mentre per dimensioni superiori ai 100nm, i fenomeni di eliminazione a carico del fegato diventano preponderanti. Da ciò ne deriva che l'optimum dimensionale per la produzione di nanoparticelle risiede tra i 10 e i 100nm (Albanese et al., 2012).

Le dimensioni dei nanoveicoli non rappresentano però l'unico fattore che determina la riuscita della veicolazione tramite effetto EPR. La carica superficiale delle nanoparticelle influisce notevolmente con la loro biodistribuzione, il loro accumulo nell'organismo e la loro bioeliminazione. Si è visto che nanovettori con potenziale elettrico di superficie neutro o negativo presentano un adsorbimento di proteine plasmatiche ridotto e, di conseguenza, tempi di circolazione più duraturi (Yamamoto et al., 2001; Alexis et al., 2008). Particelle cariche positivamente, vengono invece internalizzate più facilmente in maniera aspecifica nella maggioranza delle cellule (Blanco et al., 2015).

In seguito a somministrazione, le nanoparticelle possono essere riconosciute come estranee e opsonizzate tramite adsorbimento di proteine plasmatiche e componenti del sistema reticolo-endoteliale (RES) (Aggarwal et al., 2009). L'opsonizzazione ha lo scopo di consentire l'interazione delle particelle ritenute estranee con specifici recettori epatici e splenici (cellule di Kupffer e macrofagi) e di avviare il processo di bioeliminazione dei nanoveicoli. Il ridotto tempo di circolazione che deriva dalla rapida eliminazione dei sistemi somministrati induce una riduzione del tempo di circolazione ematica che non permette

l'accumulo nel sito bersaglio. L'evasione dal RES può essere raggiunta tramite la messa a punto di sistemi *stealth*, ovvero non riconoscibili da opsonine e proteine plasmatiche. La strategia prevede l'impiego di rivestimenti, classicamente di natura polimerica, che aumentano l'idrofilicità e l'ingombro sterico dei nanostrutture (Owens et al., 2006). Tra i polimeri più ampiamente usati per questo scopo vi è il polietilenglicole (PEG) ma anche diversi tipi di polisaccaridi, nonché altri polimeri di sintesi di natura prevalentemente idrofila. Il PEG è comunemente utilizzato come agente di modifica di superficie in quanto non tossico ed approvato dalla FDA per applicazioni orali e parenterali sull'uomo (Jokerst et al., 2011). Lo *shell* idrofilico che deriva dall'utilizzo di suddetti polimeri previene il riconoscimento da parte del RES, agendo inoltre da guscio protettivo nei confronti di fenomeni di aggregazione.

Nonostante la comprovata efficacia del targeting passivo, alcune considerazioni sull'effetto EPR risultano d'obbligo. L'effetto EPR non è identico per ciascun tumore, ma appare di differente entità in base al paziente ed al tipo di formazione neoplastica (Golombek et al., 2018). L'aumento della permeabilità e della ritenzione di strutture nanometriche è stato ampiamente testato su modelli di tumore con piccole dimensioni. Masse tumorali di più ampie dimensioni analizzate nella pratica clinica hanno frequentemente mostrato la presenza di ostruzioni ed embolizzazioni delle componenti vasali che potrebbero inficiare la riuscita del direccionamento passivo (Young et al., 2012; Reddel et al., 2019). In aggiunta, tumori in fase avanzata possiedono sovente zone necrotiche non efficientemente vascolarizzate (Maeda, 2015). Questi motivi rendono conto della forte variabilità dell'effetto EPR e spingono alla ricerca di ulteriori strategie che possano affiancare il targeting passivo nel trattamento dei tumori solidi.

Un incremento delle possibilità di successo della nanoterapia può essere raggiunto direccionando attivamente il sistema verso proteine di membrana o recettori sovraespressi nella sede bersaglio. La decorazione con ligandi capaci di riconoscere attivamente il target farmacologico è detta targeting attivo ed ha lo scopo di incrementare la selettività della nanomedicina, in modo da aumentarne l'efficacia e ridurre l'esposizione sistemica indesiderata all'agente chemioterapico.

Il riconoscimento selettivo di determinati ligandi da parte delle cellule bersaglio aumenta la quota di medicamento che giunge in prossimità del tumore (Muhamad et al., 2018). I ligandi di direccionamento attivo possono fungere da punto di approdo ed ancoraggio per il carrier o addirittura innescare processi di internalizzazione. Nel primo caso, il veicolo ha la

possibilità legarsi alle molecole target e di rilasciare il suo contenuto per un tempo protratto ad una distanza ravvicinata, mentre nel caso in cui venga avviato un processo endocitotico mediato da recettore, le molecole attive saranno liberate all'interno del citoplasma o delle strutture intracellulari. Ad oggi, sono stati proposti ed impiegati numerosi agenti di targeting attivo che includono anticorpi e loro frammenti, materiale genetico (aptameri), proteine, piccoli peptidi e ligandi recettoriali (Figura 4).

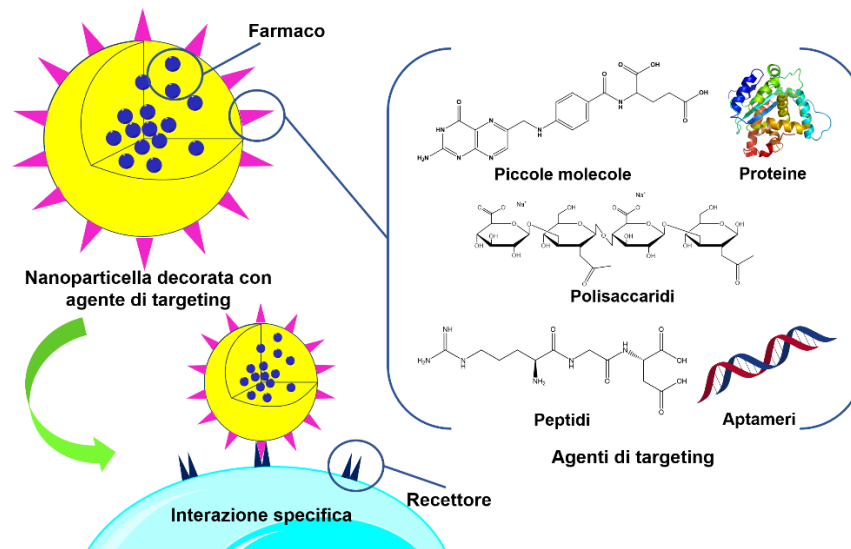


Figura 4. Rappresentazione grafica del meccanismo di targeting attivo mediato da differenti tipologie di agenti di direzionamento.

Un'ulteriore strategia di targeting è rappresentata dalla messa a punto di sistemi in grado di rispondere a stimoli endogeni o esogeni (Ding et al., 2016; Qu et al., 2016). Sfruttando tale sensibilità si ha la possibilità di aumentare la quota di farmaco nel sito di azione mediante due meccanismi. Il meccanismo più comunemente adottato si propone di regolare la quantità e/o la localizzazione del rilascio di farmaco dal nanocarrier in seguito a ricezione di determinati stimoli. Questo può avvenire facendo sì che il rilascio sia favorito in determinate condizioni, o addirittura progettando strutture con meccanismo di rilascio on/off, capaci di liberare le molecole veicolate *on demand*. Il secondo meccanismo si propone invece di effettuare un vero e proprio *guided delivery* (es. con nanoparticelle magnetiche) che consente di guidare il destino del veicolo dall'esterno dell'organismo. Gli stimoli endogeni utilizzabili derivano principalmente dalle condizioni fisio-patologiche del sito bersaglio, come ad esempio un pH alterato, il gradiente di potenziale redox o la concentrazione di particolari enzimi, mentre gli stimoli esogeni includono temperatura, luce, campo magnetico ed ultrasuoni (Tabella 2).

Tabella 2. Panoramica degli stimoli esogeni ed esogeni più comunemente sfruttabili nel *drug delivery* per ottenere un controllo dell'entità e della localizzazione del rilascio di sostanze attive.

Tipologia di DDSs	Stimoli
<i>DDSs che rispondono a stimoli esogeni</i>	Temperatura (Taurin et al., 2018)
	Luce (Shiao et al., 2014)
	Campo magnetico (Golovin et al., 2018)
	Ultrasuoni (Pitt et al., 2004)
<i>DDSs che rispondono a stimoli endogeni</i>	pH (Jin et al., 2011; Hujaya et al., 2018)
	Enzimi (Zhang et al., 2017)
	Redox (Qin et al., 2017)

1.2.2. Ipertermia e terapia nano-fototermica (NPTT) nel trattamento del cancro

La terapia ipertermica è un approccio terapeutico che sfrutta l'innalzamento di temperatura provocato dall'utilizzo di diverse tipologie di dispositivi, che consente il raggiungimento di temperature superiori a 41-42°C (Lagendijk, 2000; Dewey, 2009).

Il razionale dell'utilizzo dell'ipertermia nel trattamento del cancro trova le sue fondamenta nella possibilità di indurre alterazioni a carico delle strutture cellulari mediante l'apporto di calore. Infatti, è stato dimostrato che in seguito ad esposizione a temperature superiori di 40°C si verifica una denaturazione delle proteine intracellulari, con conseguente destabilizzazione delle strutture cellulari fondamentali, quali citoscheletro e membrana plasmatica, che comporta un'alterazione dei normali processi di trasduzione del segnale ed interferisce con i meccanismi di riparazione del DNA (Streffer, 1995). I danni accumulati a carico di queste componenti essenziali induce una sensibilizzazione dell'area trattata nei confronti di radioterapia e chemioterapia o addirittura porta a morte cellulare per apoptosi o necrosi (Hildebrandt et al., 2002; Wust et al., 2002; Roti Roti, 2004).

Generalmente il tessuto sano, in seguito ad un tempo di esposizione pari ad 1 ora a temperature superiori di 44°C non subisce danni, eccezion fatta per il tessuto nervoso

(Sminia et al., 1994). Al contrario, i tumori solidi risultano maggiormente sensibili all'innalzamento della temperatura.

Le motivazioni di questa superiore sensibilità sono state spiegate da Reinhold, il quale ipotizzò che i fenomeni ipossici e la riduzione del pH al livello locale, dovuti alla presenza di un sistema di vascolarizzazione caotico, siano responsabili dell'aumento di suscettibilità del cancro nei confronti del calore (Reinhold et al., 1986; Vaupel et al., 1995). In particolare, l'ipotesi per cui l'effetto ipertermico possa essere amplificato in strutture che presentano vascolatura alterata, prevede che il calore somministrato non abbia la possibilità di propagarsi in maniera naturale, bensì sia forzato a risiedere per più tempo all'interno del tumore solido a causa dell'inadeguata struttura vascolare presente nel sito neoplastico (Figura 5) (Chichel et al., 2007).

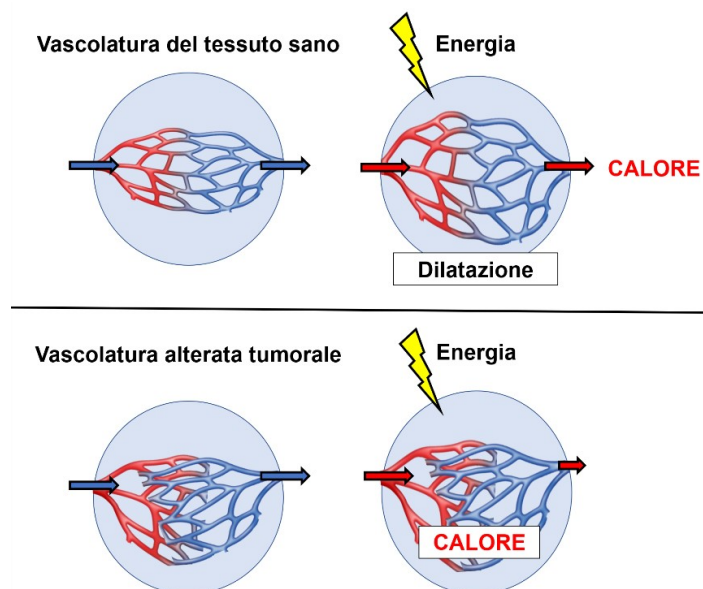


Figura 5. Distribuzione alterata del calore nel sito tumorale causata dalla presenza di vascolatura anomala e disorganizzata.

L'effetto dell'ipertermia dipende dalla temperatura e dal tempo di esposizione. Tra le fonti di energia utilizzate per aumentare la temperatura nel tumore si annoverano campi magnetici alternati, le microonde, radiofrequenza, ultrasuoni e sorgenti di raggi infrarossi (Van der Zee, 2002).

Nell'ipertermia convenzionale, si utilizza una fonte esterna (ipertermia "out-inside") che genera un gradiente di temperatura tra la superficie del corpo e il tumore, in cui la temperatura va diminuendo man mano che ci si allontana dalla fonte esterna. Infatti, le temperature raggiunte nel tumore solido sono altamente disomogenee, fatto che rende impossibile l'ottenimento di una vera e propria terapia mirata. Inoltre, non si verifica alcuna discriminazione termica tra il tessuto bersaglio e i tessuti normali e questa mancanza di

selettività nel riscaldamento dei tessuti potrebbe portare all'insorgenza di effetti collaterali (Chatterjee et al., 2011).

L'applicazione della nanotecnologia ha permesso di affrontare e prevenire questi effetti collaterali mediante l'utilizzo di nanosistemi come agenti di ipertermia, capaci di assorbire l'energia prodotta dalla fonte esterna e di invertire la perdita di calore dall'interno verso l'esterno (ipertermia "inside-out") (Figura 6).

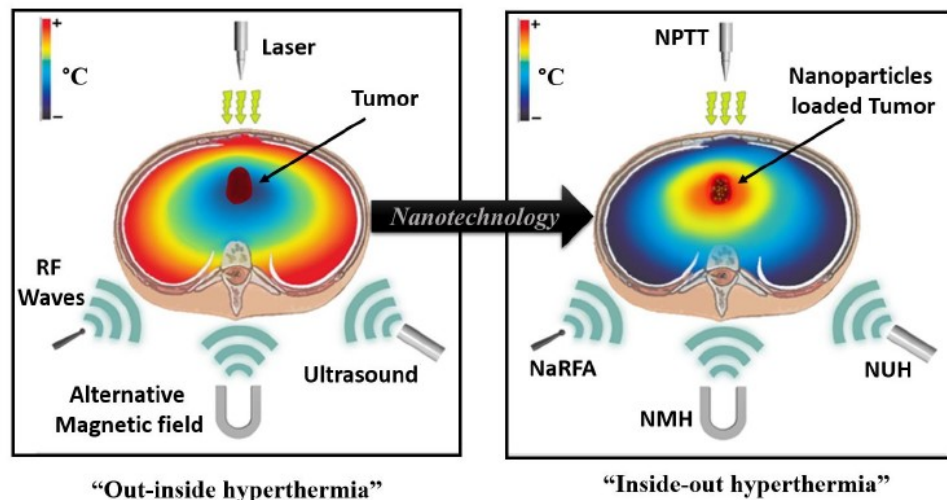


Figura 6. Rappresentazione dell'ipertermia classica e della terapia ipertermica mediata da nanoveicoli. Le nanoparticelle accumulate in sede tumorale sono in grado di assorbire l'energia e convertirla in energia termica in maniera localizzata, aumentando efficacia e selettività del trattamento (Beik et al., 2016).

L'utilizzo di nanosistemi allo scopo di accrescere e focalizzare spazialmente il trattamento di ipertermia prende il nome di terapia nano-fototermica (NPTT). In questo modo, la localizzazione dell'energia termica sulla massa tumorale, induce la morte cellulare mirata, aumentando l'efficacia della terapia e riducendo gli effetti collaterali a carico dei tessuti sani (Bañobre-López et al., 2013; Raouf et al., 2013).

1.3. Teranostica e terapia personalizzata

Nonostante i numerosi progressi conseguiti, soltanto una piccola percentuale dei nano *Drug Delivery Systems* progettati ha dimostrato un consistente aumento dell'efficacia del trattamento in fase clinica (Etheridge et al., 2013). Questa affermazione implica che al momento odierno, la nanomedicina nella cura dei tumori solidi veda ancora la necessità di modificare e migliorare le sue criticità, per giungere alla messa a punto di strategie più efficaci.

La conoscenza sempre più raffinata, seppur ancora parziale, dei tumori solidi dal punto di vista anatomico, biochimico e immunoistochimico, ha recentemente condotto ad una rivisitazione delle attuali strategie terapeutiche antitumorali in favore di un approccio più consapevole e personalizzato. La medicina personalizzata, talvolta chiamata medicina di precisione, è emersa come risposta alla variabilità individuale e si basa infatti sulla comprensione dei meccanismi molecolari della patologia (Hodson, 2016). In particolare, si è visto che lo stesso trattamento terapeutico praticato su ampie fette di popolazione che presentano identici quadri diagnostici, induce risposte e *outcomes* diversi. Da qui si è giunti al concetto cardine che prevede terapie *ad hoc* che tengono conto non solo del quadro diagnostico-clinico, ma anche della risposta individuale in ciascuno step del trattamento.

Negli ultimi anni, l'intento di personalizzare la terapia delle patologie che presentano un elevato grado di variabilità, ha orientato la ricerca biofarmaceutica verso un nuovo tipo di strategia terapeutica: la *teranostica*. Il termine teranostica si riferisce alla produzione di sistemi che consentono di effettuare simultaneamente terapia e diagnosi di uno stato patologico.

Sebbene i test diagnostici *in vitro* (analisi del genoma, trascrittoma, proteoma e metaboloma) siano in grado di discernere i pazienti che risponderanno con maggiori probabilità ad un determinato trattamento dai cosiddetti pazienti *non-responders*, l'imaging "molecolare" presenta vantaggi aggiuntivi poiché è una tecnica che consente la visualizzazione, la caratterizzazione e la quantificazione dei processi biologici su scala cellulare *in vivo* ed in tempo reale (Pysz et al., 2010; Tian et al., 2012).

L'approccio teranostico, ed in particolare nanoteranostico, sfrutta l'imaging di precisione e si propone diversi obiettivi, tra cui: modulare il trattamento in base al paziente ed allo stadio della malattia, permettere un maggior controllo del rilascio e della veicolazione della sostanza attiva, aumentando la selettività per il sito bersaglio (Crawley et al., 2014; Jeelani

et al., 2014), consentire di visualizzare la biodistribuzione della molecola veicolata e/o il suo accumulo in vivo, in modo da poter monitorare in maniera sempre più accurata la risposta terapeutica (Lammers et al., 2010).

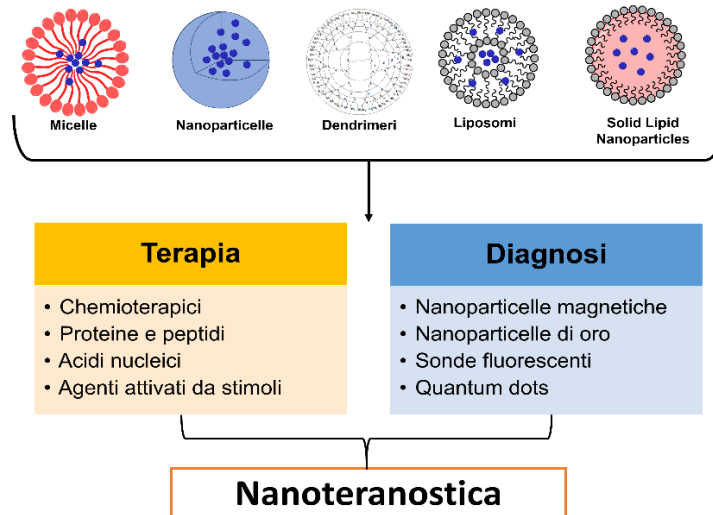


Figura 7. Nanoteranostica: nanosistemi polimerici, metallici e a base di lipidi per il trattamento e la diagnosi del cancro (Silva et al., 2019).

I sistemi nanostrutturati ad oggi proposti come agenti teranostici sono caratterizzati da grande diversità in termini di composizione, struttura, caratteristiche morfologiche, così come, modalità diagnostiche e di direzionamento (Figura 7). Tuttavia, essi devono possedere 3-4 componenti principali: un gruppo funzionale o un componente con proprietà di contrasto; una componente, spesso polimerica che, oltre a costituire parte integrante del sistema nano strutturato, ne garantisca stabilità, biocompatibilità e/o biodegradabilità; una molecola bioattiva in grado di esplicare l'effetto terapeutico; possibilmente uno o più gruppi funzionali o molecole per il direzionamento attivo (Caldorera-Moore et al., 2011; Krasia-Christoforou et al., 2013)(Figura 8).



Figura 8. Componenti strutturali di un tipico sistema nanoteranostico.

I sistemi nanoteranostici sono dunque dei nanoDDSs a tutti gli effetti, ma offrono in più i vantaggi derivanti dall'impiego di un agente di contrasto e dalla conseguente possibilità di visualizzazione diagnostica.

Gli agenti di *imaging* più ampiamente usati in teranostica, considerate le loro numerose e differenti proprietà, consentono diversi approcci terapeutici e diagnostici, rendendo sempre più vicina la personalizzazione della terapia antineoplastica. Le nanoparticelle superparamagnetiche di ossido di ferro (SPIONs) (descritte in dettaglio nel paragrafo 1.4) presentano un'ampia area superficiale utile per l'adsorbimento di diverse biomolecole e sostanze attive, risultano particolarmente adatte come agenti di contrasto per la risonanza magnetica (Louie, 2010) ed hanno mostrato, inoltre, forti potenzialità nell'applicazione terapeutica dell'ipertermia magnetica, grazie alla loro capacità di trasformare l'energia elettromagnetica proveniente da un campo esterno ad alta frequenza in calore, provocando la termoablazione oncologica (Xie et al., 2009). I nanomateriali a base d'oro (GNMs: *nanoshells*, *nanorods*, *nanocages*), (descritti in dettaglio nel paragrafo 1.5) appaiono bio-inerti, facilmente modificabili tramite l'utilizzo di biomolecole o altre sostanze chimiche e si configurano ottimi agenti teranostici per la terapia fototermica in quanto subiscono eccitazione quando sottoposti ad irradiazione nel campo del vicino infrarosso (NIR), inducendo un innalzamento della temperatura del microambiente che li circonda (Choi et al., 2012). I nanomateriali a base di carbonio (grafene, *carbon nanotubes* e *carbon nanodots*) possiedono interessanti proprietà ottiche, come ad esempio la fluorescenza. Inoltre, alcuni di essi sono dotati anche di eccellenti proprietà elettriche e della capacità di assorbire nella regione NIR, caratteristica sfruttabile per la fotoablazione termica della massa cancerosa (Robinson et al., 2008; Sun et al., 2008; Yang et al., 2010; Liu et al., 2011).

1.4. Nanoparticelle superparamagnetiche di ossidi di ferro (SPIONs)

Le nanoparticelle superparamagnetiche di ossidi di ferro (SPIONs) sono delle strutture con core magnetico di dimensione compresa tra i 10 e i 100 nm, costituito generalmente da magnetite (Fe_3O_4), maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) ed ematite ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) (Wahajuddin et al., 2012). La caratteristica peculiare di questa tipologia di nanostrutture è la loro capacità di subire magnetizzazione temporanea e contestuale all'applicazione di un campo magnetico esterno. Al contrario di ciò che avviene per i magneti permanenti, la magnetizzazione acquisita cessa in seguito alla rimozione del campo magnetico applicato, riportando le SPIONs alle loro condizioni iniziali, in cui la magnetizzazione media risultante è azzerata (Figura 9) (Kodama, 1999).

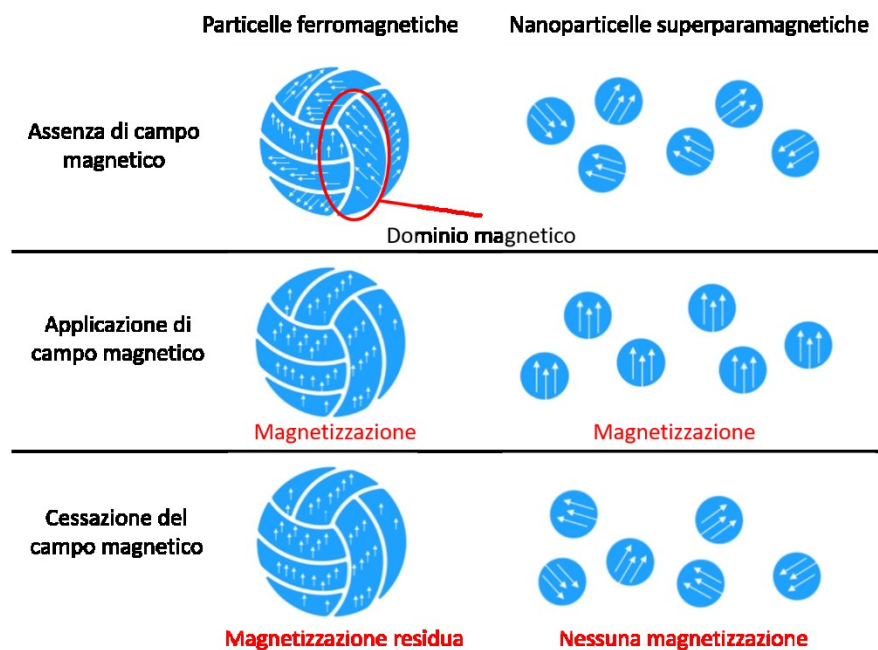


Figura 9. Illustrazione del comportamento ferromagnetico degli ossidi di ferro in bulk in confronto con il superparamagnetismo esibito dalle SPIONs (Alcantara et al., 2012).

Tale proprietà, che mostra aspetti tipici sia del paramagnetismo che del magnetismo, è chiamata superparamagnetismo ed è una diretta conseguenza delle dimensioni nanometriche.

Gli ossidi di ferro in bulk sono composti da ioni Fe^{2+} e Fe^{3+} e posseggono domini magnetici multipli. I momenti magnetici risultano allineati all'interno di ciascun dominio, ma gli spin presentano una disposizione casuale tra un dominio e l'altro. Come conseguenza, esibiscono un comportamento ferrimagnetico caratterizzato da magnetizzazione residua permanente al di sotto della cosiddetta temperatura di Curie (770°C per il ferro) (Buschow, 2001). Particelle

di uguale composizione, ma aventi diametri inferiori ad un valore critico, presentano invece un singolo dominio magnetico. Il diametro critico è strettamente dipendente dalla forma delle particelle (anisotropia) e dalla tipologia del materiale (approssimativamente 70-150nm per le particelle sferiche di magnetite) ed è definito come il diametro massimo oltre il quale il mantenimento dei confini dei domini non è più energeticamente favorito (Gossuin et al., 2009). Quando il diametro delle particelle di ossidi di ferro è ulteriormente ridotto al di sotto di 20nm, l'energia termica disponibile a temperatura ambiente è maggiore della barriera di energia magnetostatica, e permette ai dipoli magnetici di non orientarsi, mostrando un comportamento paramagnetico. L'applicazione di un campo magnetico consente invece l'allineamento degli spin presenti nelle particelle a singolo dominio che ne provoca la magnetizzazione (Butler et al., 1975; Krishnan, 2010)..

Negli anni '70 si è assistito allo sviluppo di una fiorente ricerca incentrata sulla sintesi e sulle proprietà magnetiche delle nanoparticelle di ossido di ferro (Tari et al., 1979). Le tecniche proposte per la produzione di SPIONs sono numerose e comprendono metodiche fisiche, chimiche e biologiche (Figura 10).

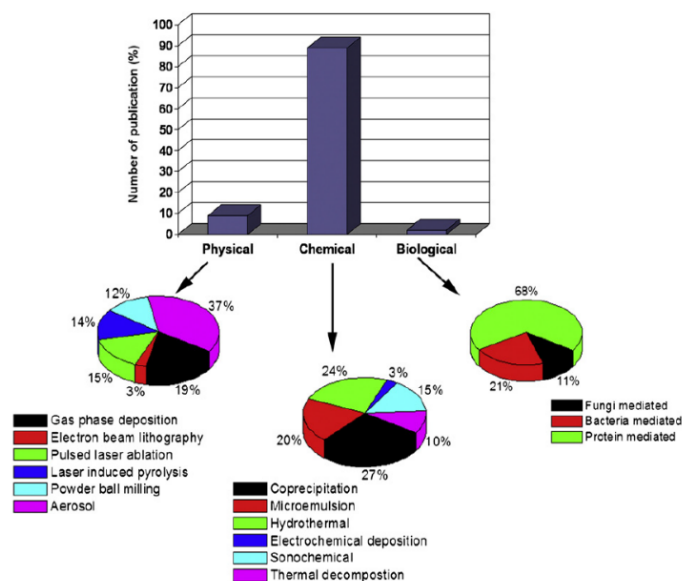


Figura 10. Tecniche fisiche, chimiche e biologiche di produzione di SPIONs e relative percentuali di impiego nella produzione scientifica (Mahmoudi et al., 2011).

Il metodo della coprecipitazione è di certo il più utilizzato poiché consente di ottenere particelle di dimensione modulabile e con bassa polidispersità in tempi brevi e con costi ridotti. La precipitazione rappresenta un a tipologia di cristallizzazione che conduce alla formazione delle particelle in seguito a fenomeni di nucleazione e successivo accrescimento dei cristalli. Tramite questa tecnica i nuclei possono aumentare le proprie dimensioni in maniera uniforme, portando idealmente alla produzione di nanoparticelle monodisperse

(Lamer et al., 1950). Nella pratica, si è visto che la sintesi di nanoparticelle con stretta distribuzione dimensionale possa avvenire anche in seguito a nucleazioni multiple accoppiate al processo di denominato *Ostwald ripening*, il quale consente l'ottenimento di cristalli uniformi di maggiore dimensione derivanti dalla crescita secondaria di alcuni nuclei a discapito della dissoluzione dei reticoli di minore dimensione (den Ouden et al., 1991). Il metodo di produzione di SPIONs più comunemente usato è stato messo a punto da Massart nel 1981 e prevede la precipitazione in atmosfera inerte di nanoparticelle di magnetite con dimensioni pressoché uniformi, attuata mediante aggiunta di base ad una dispersione contenente ioni Fe^{2+} e Fe^{3+} in rapporti stechiometrici 1:2. In tale procedura, l'assenza di ossigeno ha lo scopo fondamentale di evitare l'eventuale conversione della magnetite in ferridrite ($(\text{Fe}^{3+})_2\text{O}_3 \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$) (Massart, 1981). Il controllo della crescita dei cristalli nella metodica della precipitazione rappresenta un fattore chiave e può essere raggiunto variando i tempi di reazione e/o i rapporti molari tra i reattivi.

Per poter essere utilizzate in ambito biomedico, le SPIONs devono necessariamente essere rivestite onde evitare fenomeni di aggregazione e/o ossidazione ed aumentare la loro biocompatibilità. Una volta somministrate nel circolo ematico, le SPIONs non rivestite sarebbero inoltre oggetto di pronta opsonizzazione, favorita dalla loro natura idrofobica. Un *coating* idrofilico è in grado di ridurre significativamente i fenomeni di adsorbimento delle proteine plasmatiche e di minimizzare l'aggregazione delle nanoparticelle sfruttando eventuali repulsioni elettrostatiche e steriche donate dall'agente di rivestimento. Senza un rivestimento adeguato, l'idrofobicità e l'elevato rapporto superficie/volume delle SPIONs porterebbero alla formazione di clusters, che per attrazioni magnetiche dipolo-dipolo condurrebbero ad un comportamento non più superparamagnetico, bensì ferromagnetico (Hamley, 2003). Per tali ragioni, il bilancio lipofilico/idrofilico e la carica superficiale conferiti dall'agente di superficie impiegato risultano di rilevante importanza poiché fondamentali per il mantenimento della stabilità della dispersione colloidale.

Le strategie di stabilizzazione si dividono approssimativamente in due tipologie: l'utilizzo di molecole organiche tra cui polimeri e tensioattivi (Babes et al., 1999) o il rivestimento inorganico per mezzo di silice, carbonio, metalli nobili. Le interazioni tra gli agenti di *capping* (rivestimento) e le SPIONs possono essere di carattere covalente o di natura debole (fisoadsorbimento). SPIONs che presentano gruppi ossidrilici esposti in superficie sono facilmente funzionalizzabili tramite opportune metodiche. La sililazione rappresenta la modifica superficiale di tipo chimico più ampiamente attuata, data l'alta reattività dei

silossani nei confronti delle funzionalità ossidriliche che porta alla formazione di legami covalenti Fe-O-Si e Si-O-Si (Bini et al., 2012). In particolare, il 3-amminopropil-trietil-silossano (APTES) ha trovato largo impiego in tal proposito (Muthiah et al., 2013; Alpsy et al., 2018; Sodipo et al., 2018) in quanto, a causa della presenza di un gruppo amminico primario terminale, consente di effettuare ulteriori modifiche di superficie.

Molecole a più alto peso molecolare, come ad esempio tensioattivi o polimeri, possono essere ancorate chimicamente o adsorbite fisicamente sulla superficie delle SPIONs per costituire un guscio protettivo e fornire una maggiore biocompatibilità per applicazioni biomediche. Tra i materiali polimerici più comunemente utilizzati per questo scopo fanno parte macromolecole naturali come chitosano (Shi et al., 2009), destrano (Sakulkhu et al., 2014) e pullulano (Gupta et al., 2005), e derivati sintetici come PEG (Gillich et al., 2013), PVP (Aliakbari et al., 2019), PVA (Strehl et al., 2016), PLGA (Saengruengrit et al., 2018). La versatilità dei materiali polimerici offre numerosi vantaggi, poiché il loro impiego consente di ottenere sistemi con dimensioni e proprietà di superficie estremamente modulabili in fase di sintesi, nonché svariate possibilità di funzionalizzazione. Il rivestimento si propone quindi di proteggere gli ossidi di ferro nei confronti degli agenti esterni tramite la formazione di strutture *core-shell*, donando inoltre la possibilità di decorare le particelle con molecole fluorescenti, ligandi di targeting attivo, o ancora di caricare molecole bioattive sfruttabili nel *drug delivery*.

1.4.1. Usi in diagnostica per immagini

Per merito delle loro proprietà magnetiche e delle loro dimensioni, le SPIONs rappresentano utili agenti di contrasto per la risonanza magnetica nucleare (MRI) e per l'imaging di particelle magnetiche (MPI). Per ottenere un una elevato potere di contrasto, le SPIONs devono presentare alcune caratteristiche fondamentali, tra cui una stretta distribuzione dimensionale, un momento superparamagnetico elevato ed uniforme, stabilità nei confronti dell'aggregazione, ma anche bassa tossicità *in vivo* (Jun et al., 2007; Laurent et al., 2008).

La risonanza magnetica nucleare è una tomografia che adopera la combinazione di campi magnetici ed onde radio per l'acquisizione di immagini diagnostiche. Questa metodica di imaging sfrutta un forte campo magnetico che produce un allineamento dei momenti magnetici dei protoni del campione. In seguito, l'applicazione di onde radio è in grado di ruotare tali momenti magnetici di un una certa angolazione chiamata *flip angle*. Alla cessazione dell'impulso radio, viene misurata l'entità e la velocità della cessione energetica prodotta dal ripristino dell'allineamento degli spin con il campo magnetico (rilassamento

T1) e dalla loro oscillazione durante il rilascio di suddetta energia (rilassamento T2) (Edelman et al., 1990)

Le SPIONs agiscono principalmente alterando i valori di T2 dei protoni dell'acqua che le circonda. Al momento dell'applicazione del campo magnetico, i momenti magnetici delle particelle si allineano creando un ampio ed eterogeneo gradiente di campo magnetico attraverso il quale si ha la diffusione dell'acqua, innescata dall'attrazione esercitata sugli spin dei suoi protoni. L'accoppiamento dipolare dei momenti magnetici dei suddetti protoni e delle particelle provoca uno sfasamento degli spin con conseguente aumento del tempo di rilassamento T2 e diminuzione del segnale. Per tal motivo le SPIONs sono denominate agenti di contrasto negativo per risonanza magnetica, in quanto le aree che presentano alte concentrazioni di SPIONs sono identificabili con la comparsa di zone più scure nell'immagine acquisita. La modifica superficiale di SPIONs tramite agenti di rivestimento polimerici e agenti di targeting tissutale ha lo scopo di aumentare la loro concentrazione nell'area di interesse, incrementando le proprietà di contrasto (Berry et al., 2008).

Una nuova metodica di imaging che utilizza SPIONs come agente di contrasto principe è il *Magnetic Particle Imaging* (MPI), tecnica diagnostica quantitativa che offre alta sensibilità ed alta risoluzione. Al contrario delle tradizionali metodiche di imaging, come la risonanza magnetica e la tomografia assiale computerizzata (TAC), l'MPI viene definita una tecnica di visualizzazione del tracciante (*tracer imaging*), così come la tomografia ad emissione di positroni (PET) e la tomografia a emissione di fotone singolo (SPECT) (Wu et al., 2019). I risultati ottenuti in seguito a studi sugli animali ne hanno aperto la strada per svariate applicazioni, tra cui l'imaging vascolare (Ludewig et al., 2017) ed oncologico (Fu et al., 2012). Il crescente interesse nei confronti di tale metodica ha portato inoltre, in tempi recenti, alla produzione di apparecchi per effettuare MPI sull'uomo, che al momento attuale risultano in fase di sperimentazione (Graeser et al., 2019).

L'MPI sfrutta la non linearità delle curve di magnetizzazione dei materiali ferromagnetici e la possibilità di ottenere una saturazione della loro magnetizzazione mediante applicazione di campi magnetici (Gleich et al., 2005). La saturazione della magnetizzazione di SPIONs causa la soppressione selettiva delle frequenze armoniche, che può essere codificata spazialmente per generare l'immagine diagnostica (Figura 11). Un grande vantaggio evidenziato dall'uso dell'MPI è che i tessuti biologici non interferiscono con la bassa frequenza dei campi magnetici impiegati, non comportando alcun tipo di alterazione del segnale registrato.

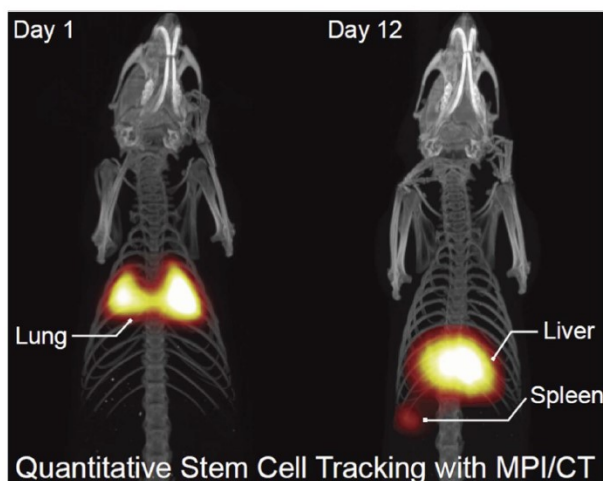


Figura 11. Immagine rappresentativa della visualizzazione della biodistribuzione di cellule staminali marcate con particelle magnetiche in seguito a iniezione intravenosa (Tay et al., 2016).

Le tipologie di SPIONs in commercio più utilizzate in risonanza magnetica sono i due traccianti ferucarbotran (Resovist®), presente sui mercati europei e asiatici, e ferumoxytol, venduto anche negli Stati Uniti. Gli stessi agenti di contrasto superparamagnetici utilizzabili per la risonanza magnetica, possono essere sfruttati per l'MPI, motivo per cui negli ultimi anni la sintesi di SPIONs sta registrando una nuova ondata di interesse.

1.4.2. Usi in terapia antineoplastica

Il comportamento superparamagnetico delle SPIONs e la possibilità di ottenerne la stabilizzazione ed ingegnerizzazione mediante svariati agenti di rivestimento, offrono un ampio ventaglio di utilizzi nell'ambito biomedico ed in particolare nel trattamento del cancro. La ricerca in questo campo ha prodotto quindi diversi sistemi terapeutici a base di SPIONs impiegabili nel *drug delivery* di chemioterapici, focalizzando l'attenzione su due delle caratteristiche cardine di tali particelle inorganiche: l'opportunità di ottenerne un direzionamento guidato tramite applicazione di campo magnetico e le loro capacità ipertermiche.

Le proprietà superparamagnetiche delle SPIONs offrono quindi un'ulteriore *chance* per ottenere una veicolazione mirata al tumore in maniera non invasiva. Il direzionamento di farmaci che si basa su materiali magnetizzabili è stato proposto per migliorare l'efficacia dei trattamenti, riducendo gli effetti collaterali correlati alla scarsa selettività degli agenti chemioterapici (Kumar et al., 2018). Il targeting magnetico è realizzabile tramite impiego di nanoparticelle superparamagnetiche accoppiato all'applicazione di un campo magnetico esterno generato da bobine elettromagnetiche (Hoshier et al., 2018) o da magneti permanenti

(Carenza et al., 2014; Price et al., 2017). Un esempio di *delivery* magnetico riportato nella letteratura recente è rappresentato dalla produzione di SPIONs con rivestimento a base di un derivato pegylato del polisaccaride naturale inulina, al quale sono state conferite proprietà di direzionamento attivo mediante innesto di molecole di acido folico (Licciardi et al., 2019). In questo studio, le SPIONs contenenti doxorubicina sono state adoperate *in vivo* per il trattamento di *xenografts* di tumore al colon, valutando le differenze apportate dal direzionamento magnetico in termini di efficacia e di accumulo nel sito tumorale. I risultati hanno evidenziato un accumulo intratumorale più che raddoppiato nel caso di terapia assistita da targeting magnetico (magnete permanente; B:1.3T), accompagnato da un maggiore quantitativo di farmaco nell'area di interesse e migliori prestazioni nel limitare l'accrescimento delle neoplasie.

Le SPIONs sono state utilizzate non solo come DDSs aventi proprietà di contrasto e capaci di *guided delivery*, ma anche come veri e propri agenti terapeutici per ipertermia tumorale. L'ipertermia magnetica (MHT) trova il suo razionale nella capacità di nanoparticelle magnetiche di convertire l'energia generata da un campo magnetico o elettromagnetico a corrente alternata con una frequenza approssimativa di 1 MHz, in calore (Lee et al., 2011). Tra le applicazioni della MHT più studiate vi è senz'altro la terapia antineoplastica che si basa sull'induzione di morte cellulare in seguito a riscaldamento delle cellule tumorali. Nell'ambito della MHT, Hayashi et al. hanno proposto un elegante sistema che sfrutta l'applicazione dell'ipertermia magnetica come innesco per il rilascio di farmaci. Il loro lavoro ha portato alla realizzazione di SPIONs con rivestimento a base di β -ciclodestrine (β -CDs) ingegnerizzate con molecole di acido folico mediante *click chemistry*. Grazie alla presenza delle β -CDs, il costrutto è stato in grado di alloggiare il farmaco chemioterapico tamoxifene tramite formazione di un complesso *host-guest* e di magnificare il suo rilascio quando sottoposto ad un campo magnetico alternato con frequenza di 230KHz a seguito di un aumento della temperatura (Hayashi et al., 2010). Gli stessi autori hanno successivamente progettato e testato una nuova piattaforma superparamagnetica su *xenografts* murini di mieloma multiplo, indagandone le proprietà di contrasto in risonanza magnetica nucleare e l'efficacia antineoplastica esibita dopo trattamento magneto-termico. In questo caso le SPIONs non sono state utilizzate in forma individuale, bensì raggruppate in *clusters* rivestiti dal SH-PEG-folato ed in assenza di farmaco chemioterapico. I sistemi così messi a punto hanno mostrato proprietà di contrasto in MRI superiori a quelle del Resovist®, un accumulo preferenziale nel sito tumorale e la capacità di ridurre la crescita delle neoplasie con

contestuale aumento delle percentuali di sopravvivenza registrate dopo trattamento magnetotermico (Hayashi et al., 2013).

1.5.Nanorods di oro

I colloidali di oro vengono collettivamente denominati nanoparticelle di oro (AuNPs) e comprendono tutte le tipologie di strutture di dimensione nanometrica a base di tale metallo nobile. L'utilizzo dell'oro per la produzione di nanoveicoli trova la sua ragion d'essere nei molteplici vantaggi offerti da questo prezioso materiale, tra cui la possibilità di ottenere strutture nanometriche di forme e dimensioni controllate, l'elevata stabilità chimica e la versatilità delle applicazioni in ambito biomedico (Jain et al., 2012).

L'oro in forma colloidale presenta proprietà elettroniche ed ottiche di gran lunga differenti rispetto alla sua forma in bulk, derivanti dal fenomeno di Risonanza Plasmonica di Superficie Localizzata (LSPR). I "plasmoni" sono oscillazioni degli elettroni liberi di un metallo e possono essere descritti come una nube elettronica carica negativamente che viene spazzata dalla sua posizione di equilibrio situata in prossimità di un lattice di ioni positivi (Figura 12) (Maier, 2007).

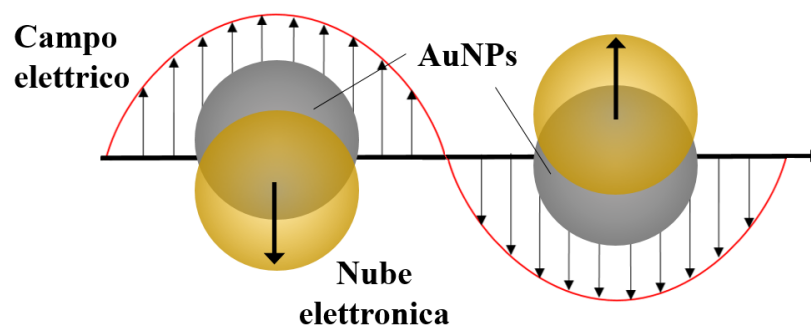


Figura 12. Rappresentazione dell'oscillazione della nube elettronica di colloidali di oro in seguito al verificarsi della risonanza plasmonica di superficie localizzata (LSPR) (Kelly et al., 2003).

Quando le nanoparticelle di oro vengono irradiate con radiazioni elettromagnetiche con appropriate lunghezze d'onda comprese nelle regioni del visibile (VIS 400-800 nm) e del vicino infrarosso (NIR 800-2500 nm), il campo elettrico fa sì che gli elettroni liberi oscillino armonicamente ed in maniera localizzata attorno all'intera struttura particellare. Tale oscillazione è frutto dell'allontanamento temporaneo degli elettroni dal lattice costituito da ioni positivi in seguito ad eccitazione con lunghezza d'onda opportuna che consente la vera e propria risonanza del plasmone (Kittel, 2004). L'assorbimento e la diffusione della radiazione incidente che deriva dalla LSPR e dal suo rilassamento, risulta particolarmente interessante per lo sviluppo di dispositivi biomedici di diversa natura quali biosensori, *Drug Delivery Systems* e agenti di contrasto.

Ad oggi, è possibile produrre AuNPs con le più svariate forme e dimensioni. Tra le strutture colloidali a base di oro si annoverano infatti costrutti puri come nanosfere, nanorods, nanocubi, nanotriangoli, nanostelle e sistemi ibridi come nanoshells, nanorices e molti altri (Figura 13). La larghezza, la posizione e il numero di picchi LSPR sono determinati dalla forma e dalle dimensioni delle AuNPs e la loro riduzione della simmetria è un metodo efficace per modificare il loro spettro di risonanza plasmonica (Kelly et al., 2003; Xia et al., 2005).

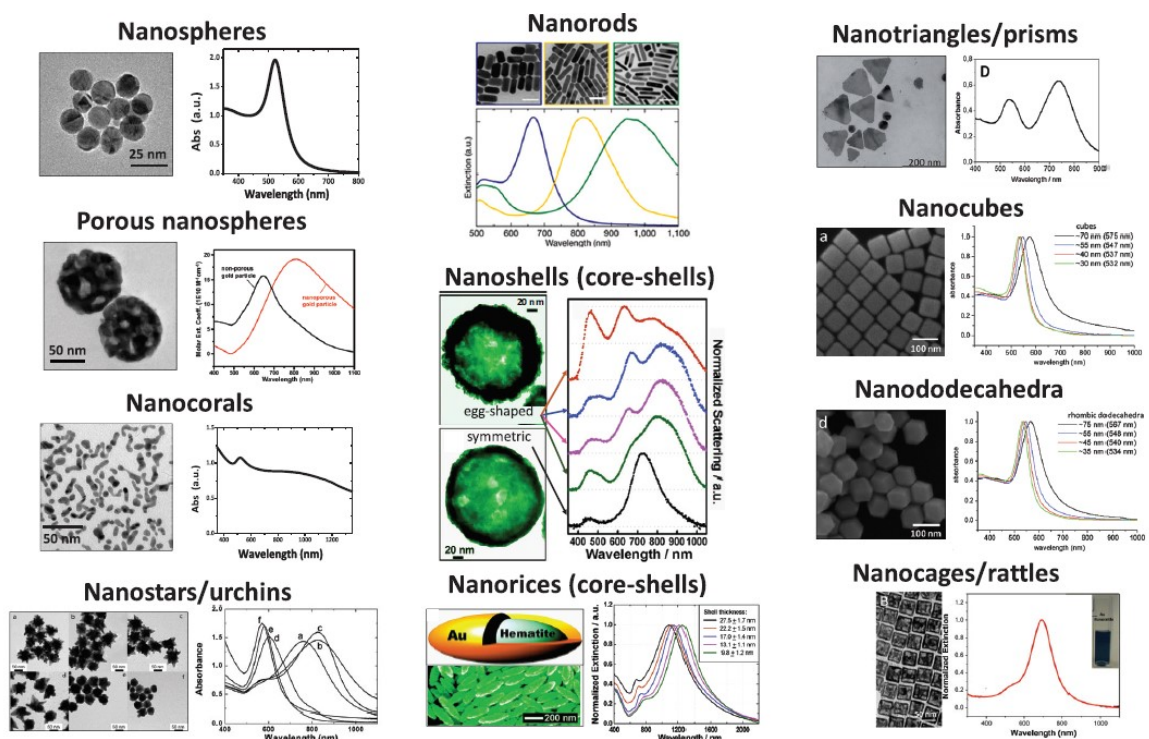


Figura 13. Nanoparticelle di oro di diverse forme e dimensioni e relativo profilo LSPR (Amendola et al., 2017).

Eventuali variazioni dello stato di aggregazione e dei parametri dell'indice di rifrazione locale determinano lo spostamento del picco di assorbimento LSPR. Nello specifico, si è visto che il picco di assorbimento plasmonica subisce un *red shift* in seguito ad aggregazione o ad aumento di dimensioni di nanosfere di oro, alterando il colore della dispersione (da rosso a blu) e spostando la loro banda SPR (tipicamente compresa tra 500 e 550nm) verso lunghezze d'onda maggiori. Le particelle anisotropiche di oro come ad esempio nanoshells e nanorods, a causa del loro rapporto tra lunghezza e altezza (rapporto d'aspetto) maggiore di 1, presentano due bande di assorbimento LSPR. Queste sono chiamate bande plasmoniche trasversale e longitudinale e sono diretta conseguenza dell'oscillazione della nube elettronica rispettivamente lungo l'asse trasversale (minore) e longitudinale (maggiore) della particella

anisotropica (Figura 14). In questo caso, si assisterà ad un *red shift* della banda plasmonica longitudinale con l'aumentare del rapporto d'aspetto (Hao et al., 2004; Jain et al., 2006).

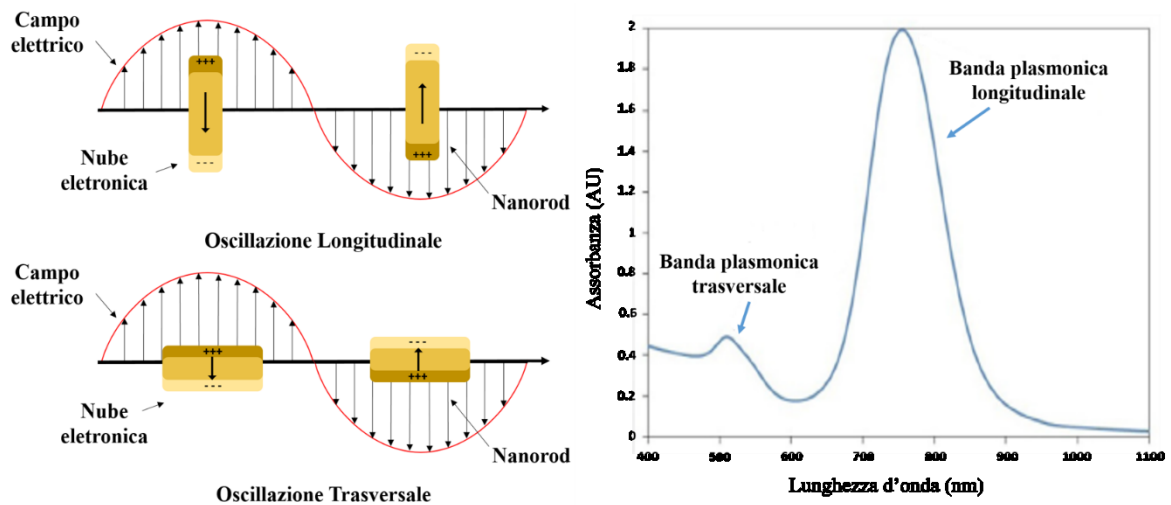


Figura 14. Schema illustrativo della LSPR di nanorods di oro e relativo spettro VIS-NIR (Cao et al., 2014)

La forma, le dimensioni ed il rapporto d'aspetto delle AuNPs incidono quindi fortemente con le loro proprietà ottiche ed elettriche legate alla LSPR e perciò si deduce facilmente che diverse tipologie di AuNPs trovino applicazioni differenti in nanomedicina.

All'interno delle AuNPs, le nanoparticelle di forma cilindrica, dette *gold nanorods* (AuNRs) hanno mostrato caratteristiche particolarmente ricercate per lo sviluppo di nanotecnologie innovative in ambito biomedico. Per tale ragione, negli ultimi decenni sono state messe a punto diverse metodiche di sintesi di AuNRs, principalmente classificabili in tre categorie: il metodo elettrochimico (Yu et al., 1997; Chang et al., 1999), il metodo “stampo” (Foss et al., 1994) e il metodo assistito dalla formazione di semi (*seed-mediated*). I primi due metodi citati, nonostante le dovute differenze procedurali, prevedono la formazione dei nanorods in seguito a deposizione elettrochimica in presenza o in assenza di uno stampo che possa agevolare la crescita preferenziale di una delle dimensioni delle particelle. Entrambi sono stati ampiamente utilizzati, in particolar modo per la produzione di biosensori, ma presentano diversi svantaggi tra cui i più significativi rappresentano la complessità di esecuzione, le basse rese e l'alta polidispersità del prodotto dovuta a deposizione disomogenea nello stampo (Van Der Zande et al., 2000). In vista di ciò, il metodo che ha trovato più largo impiego nella sintesi di AuNRs è la cosiddetta *seed-mediated growth*.

Il largo successo raggiunto da questo metodo è attribuibile alla sua semplicità, alle alte rese e alla facilità di controllare con precisione le dimensioni ed il rapporto d'aspetto degli AuNRs prodotti mediante la modulazione dei parametri cardine.

Il metodo di produzione di AuNRs assistita da “semi” è articolato principalmente in due step sintetici che prevedono rispettivamente la nucleazione di strutture sferoidali di pochi nanometri di diametro (2-8 nm) e la loro crescita in seguito a deposizione di oro sui nuclei neoformati, in condizioni di riduzione controllata. Questo approccio, sviluppato per la prima volta da Jana et al. nel 2001 (Jana et al., 2001), ha subito varie rivisitazioni nel corso degli anni. Tra le modifiche proposte, la procedura sintetica realizzata da Nikoobakht ed El-Sayed nel 2003 ricopre un posto di rilievo, configurandosi come uno tra i metodi più utilizzati tutt'oggi per la produzione di AuNRs. In particolare, la tecnica prevede la preparazione della dispersione di semi di oro tramite riduzione estemporanea di ioni Au^{3+} forniti sotto forma di acido tetracloroaurico ($HAuCl_4$) per mezzo di un agente riducente forte ($NaBH_4$) ed in presenza del tensioattivo cationico cetiltrimetilammonio bromuro (CTAB). Separatamente, viene preparata la dispersione di crescita mediante miscelazione di soluzioni con concentrazione precisamente nota di $HAuCl_4$ e $AgNO_3$ in presenza di CTAB, seguita dall'aggiunta di acido ascorbico. Successivamente all'aggiunta dei semi alla soluzione di crescita, gli AuNRs accrescono le loro dimensioni tramite deposizione di Au metallico sui nuclei. La crescita preferenziale longitudinale è raggiunta a causa della presenza delle micelle di tensioattivo, che fungono da stampo, nonché sfruttando il contributo degli ioni Ag^+ , i quali consentono di mantenere l'anisotropia delle particelle durante la deposizione degli strati di crescita (Nikoobakht et al., 2003).

Sebbene consenta di ottenere elevate rese, il metodo della crescita mediata dai semi è un approccio estremamente delicato in cui la variazione dei parametri critici, come ad esempio la concentrazione ed il grado di purezza dei reattivi, la temperatura ed il tempo di crescita condurrà alla produzione di AuNRs con forma, dimensioni, resa e caratteristiche LSPR significativamente diverse (Gole et al., 2004; Murphy et al., 2005). Per tali ragioni, appare di estrema importanza mantenere inalterate tutte queste variabili in vista dell'ottenimento di risultati riproducibili.

L'oro in forma nanometrica è un colloide liofobo nei confronti di fasi disperdenti acquose, e per tal motivo non può essere utilizzato *in vivo* se non opportunamente rivestito.

Nonostante l'inerzia chimica esibita dal materiale in bulk, l'oro presenta la possibilità di interagire con diverse funzionalità e macromolecole quando ridotto in dimensioni

nanometriche. Tra le molecole utilizzabili per il rivestimento di superfici di oro, i composti a base di zolfo, ed in particolare i composti tiolici, ricoprono un ruolo di spicco nella stabilizzazione di queste nanostrutture. È stato visto infatti che l'interazione Au-S è classificabile quale chemioadsorbimento e, pertanto, possiede caratteristiche tipiche di un legame covalente (Gao et al., 2012; Häkkinen, 2012). Composti solforati, come ad esempio strutture che presentano ponti disolfuro, si sono dimostrati di efficacia quasi paragonabile ai tioli nella stabilizzazione di superfici di oro. In questo particolare caso, la letteratura suggerisce che la forte interazione tra le due controparti avvenga in seguito a clivaggio a carico dei legami -S-S- comportando il chemioadsorbimento ad opera delle funzioni tioliche così generate (Grönbeck et al., 2000). Altre molecole che hanno mostrato un'efficiente azione protettiva nei confronti dei colloidi di oro sono i composti amminici. L'analisi delle interazioni tra alchilammine ed AuNPs effettuata da Kumar et al. nel 2003 ha dimostrato che questi composti sono in grado di interagire con l'oro secondo due modalità: la formazione di un complesso elettrostatico tra i gruppi amminici in forma protonata e gli ioni AuCl_4^- o AuCl_2^- situati sulla superficie delle AuNPs, e la complessazione che porta alla costituzione del complesso $[\text{AuCl}(\text{NH}_2)\text{R}]$, di natura più stabile. In vista di quanto detto, ad oggi sono stati proposti differenti agenti stabilizzanti che includono piccole molecole, così come macromolecole in forma nativa o modificata (Kumar et al., 2003).

L'agente polimerico che ha trovato più largo impiego nella modifica superficiale di colloidi di oro ad uso biomedico è il PEG tiolato (PEG-SH). Data la sua natura idrofilica, il PEG dona proprietà *biofouling* e incrementando i tempi di circolazione plasmatica e la citocompatibilità dei nanocostrutti. La superficie dei colloidi di oro, dato l'elevato rapporto superficie/volume esibito, è inoltre in grado di adsorbire fisicamente molecole e macromolecole in maniera aspecifica, come nel caso in cui si utilizzino rivestimenti proteici che presentano domini idrofobici. Altri agenti che non appartengono alla classe delle macromolecole utilizzati nella stabilizzazione di AuNPs sono rappresentati da zuccheri opportunamente modificati tramite inserzione di funzionalità tioliche (glucosio, lattosio, fruttosio) e fosfolipidi.

Il rivestimento delle AuNPs, oltre che essere un requisito necessario per applicazioni biomediche, permette di aumentare la citocompatibilità ed al contempo consente il caricamento fisico o chimico di molecole bioattive e funzionalità di targeting per la costituzione di DDSs innovativi.

La modifica della chimica di superficie delle AuNPs si riflette in maniera imponente sulle loro capacità di adsorbimento non specifico e di targeting cellulare. Nel loro studio, Huff et

al. hanno paragonato la localizzazione ed il meccanismo d'azione in seguito ad irradiazione nel NIR di nanorods di oro con diverso rivestimento. I risultati hanno mostrato che AuNRs rivestiti con il tensioattivo cationico CTAB sono in grado di essere internalizzati aspecificamente all'interno delle cellule, ivi esplicando il loro effetto ipertermico. Al contrario, i loro analoghi ottenuti in seguito a rimozione del surfactante e rivestimento con un derivato tiolato dell'acido folico si accumulano sulla superficie della membrana cellulare e causano un danno membranale che porta a morte cellulare in seguito ad esposizione NIR.

1.5.1. Razionale dell'uso di AuNRs in diagnostica per immagini

In virtù delle loro proprietà di risonanza plasmonica di superficie localizzata (LSPR), i nanorods di oro, così come i loro analoghi isotropi, sono dei candidati ideali per diverse metodiche di imaging tra cui spiccano l'optical imaging, l'imaging fotoacustico (PA) e la luminescenza a due fotoni.

La microscopia ottica a campi scuri, detta anche *optical imaging*, è una metodica che sfrutta la capacità di alcuni agenti di contrasto di provocare una intensa diffusione della luce incidente. Questo fenomeno si osserva nel caso in cui si adoperi una radiazione con lunghezza d'onda che coincide con la banda di assorbimento LSPR ed è stato visto inoltre che l'utilizzo di lunghezze d'onda comprese nel range del NIR (circa 800nm) riducono al minimo i fenomeni di diffusione del background. In ragione di ciò, i nanorods di oro appaiono i candidati più idonei per questa tipologia di imaging, presentando bande di assorbimento plasmonico proprio all'interno della regione NIR (Xiao et al., 2010).

La tomografia fotoacustica (o optoacustica) è una nuova tecnica ibrida ad alta risoluzione che consente la visualizzazione di cellule e tessuti situati anche in strati profondi. Questa forma di tomografia adopera la combinazione di irradiazione laser e rilevazione di ultrasuoni. In particolare, un raggio laser ad alta potenza che emette impulsi di brevissima durata viene utilizzato per irradiare il tessuto, generando un immediato innalzamento termico localizzato. Le diverse componenti dei tessuti sono in grado di assorbire una differente quantità di energia luminosa che può essere convertita in onde ultrasoniche mediante effetto termoelastico (effetto fotoacustico) e quindi rilevata ed utilizzata per la ricostruzione di una "immagine acustica" 3D del tessuto (Li et al., 2015). A causa della LSPR, i nanorods di oro portano ad un assorbimento ottico di gran lunga maggiore rispetto a quello riscontrato nei classici coloranti organici, e per tale motivo risultano ottimi agenti di contrasto per imaging fotoacustico (Jain et al., 2006).

La metodica di imaging di luminescenza a due fotoni (*Two-Photon Luminescence*) si basa sull'eccitazione di molecole fluorescenti o di altri materiali, come l'oro colloidale, mediante

l'utilizzo di un laser multifotone. In particolare, l'agente di contrasto viene stimolato simultaneamente da due fotoni emessi da un laser ad alta potenza focalizzati tramite l'obiettivo di un microscopio, detto microscopio multifotone. L'energia assorbita in seguito a stimolazione viene quindi emessa e visualizzata sotto forma di fluorescenza. I nanorods di oro possono essere utilizzati efficientemente nella luminescenza a due fotoni in quanto il segnale da loro generato si dimostra notevolmente più acceso e definito rispetto a quello registrato con le classiche molecole fluorescenti (Durr et al., 2007; Zhao et al., 2012)

1.5.2. AuNRs nella terapia antineoplastica

Ad oggi, la ricerca biofarmaceutica ha messo a punto diversi sistemi a base AuNRs allo scopo di veicolare farmaci. Gli AuNRs presentano vistosi vantaggi nell'ambito del *drug delivery* come la possibilità di ottenere strutture biocompatibili tramite adeguati agenti di rivestimento, l'inerzia biologica e le caratteristiche ottiche esibite.

In ragione delle loro proprietà ottiche di risonanza plasmonica di superficie, gli AuNRs non sono da considerare dei semplici veicoli inerti, bensì dei veri e propri agenti terapeutici a sé stanti, utilizzabili nella terapia fototermica (PTT) del cancro.

La terapia fototermica (PTT) è una metodica basata sulle capacità di ipertermiche di certi agenti, denominati agenti fototermici, i quali risultano in grado di assorbire la luce con lunghezza d'onda opportuna per poi rilasciare l'energia immagazzinata, sotto forma di calore. Infatti, in seguito ad assorbimento di luce, gli elettroni degli agenti di PTT effettuano transizioni dallo stato fondamentale allo stato eccitato e questa energia di eccitazione elettronica viene successivamente ceduta sotto forma energia termica (Khot et al., 2019).

Gli agenti fototermici possono essere cromofori naturali o molecole coloranti esogene, come il verde indocianina [Chen, W. R. et al. 1995], le naftalocianine [Jori, G. et al. 1996] e le porfirine coordinate con metalli di transizione [Jori, G. et al. 1990]. I cromofori naturali, tuttavia, hanno lo svantaggio di possedere un assorbimento molto basso e di subire alterazione fotochimica in seguito a irradiazione laser prolungata (*photobleaching*). Degli agenti fototermici che non presentano queste problematiche sono le nanoparticelle a base di oro, tra cui gli AuNRs in quanto hanno una maggiore fotostabilità e non soffrono di *photobleaching* [Huang, X. et al. 2008].

L'utilizzo di nanoparticelle nella PTT, che prende il nome di terapia nano-fototermica (NPTT), consente di ottenere trattamenti più localizzati ed efficaci. I nanorods di oro si rivelano degli ottimi agenti per NPTT in seguito a semplice irradiazione tramite luce laser fredda avente lunghezza d'onda corrispondente (o prossima) alla banda LSPR esibita, generando un aumento della temperatura nel sito di accumulo tumorale che provoca morte

cellulare. Un'ulteriore motivazione che spinge all'impiego di AuNRs in NPTT deriva dall'evidenza che composti largamente presenti nei tessuti biologici, come acqua ed emoglobina, presentano il minimo assorbimento nella regione del vicino infrarosso (in particolare nel range 700-900 nm) (Figura 15).

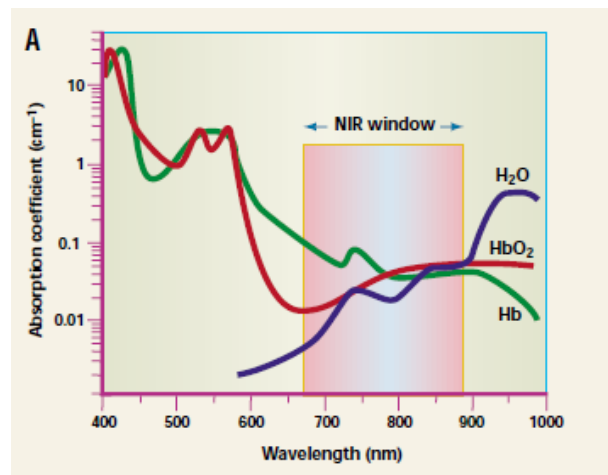


Figura 15. Spettri di assorbimento di emoglobina (Hb), ossiemoglobina (HbO₂) e acqua, con focus sulla regione del vicino infrarosso (Weissleder, 2001).

In vista di ciò, l'utilizzo in NPTT di nanoparticelle che possiedono bande LSPR nel suddetto range, evita l'insorgenza fenomeni di interferenza in seguito a trattamento con sorgenti di luce NIR, permettendo inoltre una più libera trasmissione della radiazione elettromagnetica e una maggiore penetrazione nei tessuti molli (profondità sino a 10 cm) (Weissleder, 2001). L'impiego di AuNRs ha condotto alla realizzazione di strategie innovative nel trattamento del cancro, portando alla produzione di nanoveicoli di diversa natura ad uso terapeutico e diagnostico.

La possibilità di migliorare le performance del trattamento chemioterapico tramite utilizzo contestuale della PTT è stata dimostrata sperimentalmente. Hauck et al hanno ottenuto un incremento dell'efficacia chemioterapica del cisplatino quando coadiuvata da trattamento di PTT mediato da nanorods di oro. I nanosistemi rivestiti da un doppio strato polimerico ottenuto mediante interazioni elettrostatiche sono stati testati *in vitro* in co-somministrazione con cisplatino su cellule OCI AML3 (leucemia mieloide umana). La terapia combinata ha dimostrato prestazioni nettamente superiori rispetto a quelle registrate per i singoli trattamenti (chemioterapico o PTT), suggerendo il verificarsi di un effetto sinergico (Hauck et al., 2008).

L'impiego di AuNRs offre l'affascinante possibilità di sfruttare le proprietà di ipertermia per stimolare il rilascio di composti attivi con modalità ed in sedi personalizzabili. Con questi

intenti, Zhang et al. hanno messo a punto un sistema a base di AuNRs che presenta un guscio polimerico termosensibile composto prevalentemente da PNIPAM in cui è incorporato l'agente antineoplastico doxorubicina. Tramite studi *in vivo* su modelli di tumore al seno murini, gli autori hanno dimostrato che il calore generato per mezzo di trattamento con laser NIR è stato in grado di favorire il rilascio del farmaco dalle maglie polimeriche in seguito a *shrinking* e di aumentare il quantitativo di costrutto accumulato nel sito tumorale in seguito a somministrazione parenterale (nonostante l'assenza di ligandi di targeting attivo) probabilmente a causa di un'aumentata permeabilità vasale laser-mediata (Zhang et al., 2015). Un altro interessante esempio di promozione del rilascio di chemioterapici tramite terapia fototermica è stato riportato da Xiao et al. Il rivestimento degli AuNRs prodotti è costituito da frammenti complementari di DNA parzialmente funzionalizzati con acido folico che consentono il caricamento di doxorubicina ed il contestuale direccionamento tramite targeting attivo. L'irradiazione con laser NIR ha condotto ad un aumento dell'efficacia su xenografts murini di carcinoma cervicale in seguito ad una combinazione tra rilascio del chemioterapico favorito dalla denaturazione delle catene di DNA ed effetto di ipertermia terapeutica (Xiao et al., 2012).

Al fine di incrementare internalizzazione cellulare ed efficienza ipertermica di AuNRs, Choi et al. hanno adottato una strategia affascinante che prevede la realizzazione di veri e propri nanocarrier a base di chitosano e Pluronic F68 reticolati, con un core che non incorpora molecole chemioterapiche, bensì una molteplicità di AuNRs. I veicoli proposti hanno mostrato ottime capacità di accumulo e termoablazione tumorale *in vivo*, indicando la possibilità di ottenere risultati promettenti nel trattamento fototermico del cancro, anche in assenza di farmaco (Choi et al., 2011).

2. SCOPO

Il presente percorso di dottorato ha avuto come obiettivo la progettazione, l'ottimizzazione e la caratterizzazione di nanosistemi compositi a base polimerica con un potenziale uso teranostico nel trattamento del cancro.

All'interno del ventaglio di agenti di contrasto finora proposti in letteratura, sono stati selezionati e studiati in misura maggiore le nanoparticelle superparamagnetiche di ossidi di ferro (SPIONs) e i colloidi anisotropi di oro (AuNRs).

Il progetto si è focalizzato sulla messa a punto di sistemi di veicolazione compositi che hanno previsto l'utilizzo di derivati polimerici di neosintesi prevalentemente di natura poliamminoacidica e polisaccaridica. Tali polimeri citocompatibili sono stati impiegati con l'intento di far fronte alle limitazioni degli agenti di contrasto, offrendo la possibilità di incorporare nel sistema finale molecole bioattive e agenti di direzionamento attivo, nonché conferendo stabilità chimico-fisica nei confronti dell'aggregazione.

In vista di poter impiegare le nanoparticelle superparamagnetiche per scopi diagnostici, è stata progettata e realizzata una metodica di sintesi, classificazione e caratterizzazione di SPIONs con rivestimento polisaccaridico (carbossimetildestrano) per un utilizzo diagnostico mediante *Magnetic Particle Imaging* (MPI) o risonanza magnetica nucleare (MRI).

Nell'ambito della sintesi e caratterizzazione di SPIONs, sono stati prodotti, caratterizzati e testati dei sistemi teranostici costituiti da nanogeli con core superparamagnetico rivestiti con un copolimero di neosintesi di natura poliamminoacidica in grado di reticolare sfruttando la *click chemistry* e di incorporare il farmaco antitumorale doxorubicina e l'enzima proteolitico collagenasi. Il costrutto così progettato sarebbe potenzialmente in grado di giungere in prossimità dell'area neoplastica tramite targeting passivo o guidato da campo magnetico esterno, laddove l'azione proteolitica della collagenasi sulla matrice extracellulare consentirebbe il raggiungimento del nanoveicolo al sito bersaglio ed il conseguente rilascio del principio attivo.

L'indagine sulle potenzialità dei colloidi anisotropi di oro nell'ambito della teranostica antineoplastica ha portato alla realizzazione di due studi.

Sono stati innanzitutto sintetizzati e caratterizzati *nanorods* di oro con rivestimento polimerico amminoacidico derivatizzato con un composto che reca ponti disolfuro (acido lipoico) e molecole di agente direzionante (acido folico). Il farmaco antineoplastico irinotecano è stato successivamente incorporato all'interno dei carrier così rivestiti. In

seguito a caratterizzazione chimico-fisica e biologica delle potenzialità nell'ipertermia terapeutica, le capacità di targeting tumorale e l'efficacia di tali nanostrutture nella terapia fototermica (PTT) sono state indagate *in vivo* su modelli di cancro al colon umano.

Il secondo studio sulle nanoparticelle cilindriche di oro ha previsto la sintesi, la preparazione e la caratterizzazione di *nanorods* rivestiti con piccole molecole solforate (acido lipoico), con catene polisaccaridiche di gomma gellano e con il derivato covalente della gomma gellano siglato GG-LA. L'obiettivo di questo lavoro è stato il confronto tra le caratteristiche chimico-fisiche ed ipertermiche dei costrutti proposti e la selezione del candidato più promettente per un uso nell'ipertermia nel trattamento del cancro. Il sistema più performante è stato quindi sfruttato per il caricamento di un principio attivo foto-attivabile (verteporfin) per un potenziale utilizzo nella combinazione di terapia fototermica (PTT) e fotodinamica (PDT).

Infine, sono stati proposti dei polimeri a base acrilica sintetizzati tramite polimerizzazione RAFT, recanti molecole di agente complessante ioni e radionuclidi (deferossamina). Le nanoparticelle ottenute dalla nanoprecipitazione di tali derivati sono state progettate per accogliere e chelare al loro interno ioni Fe^{3+} e/o radionuclidi per un possibile impiego nella diagnostica per risonanza magnetica (MRI) o per tomografia ad emissione di positroni (PET).

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1. Produzione e classificazione di SPIONs come agenti di contrasto

Le nanoparticelle superparamagnetiche di ossido di ferro (SPIONs) sono l'agente di contrasto chiave per la risonanza magnetica nucleare ed il *Magnetic Particle Imaging* (MPI). In particolare, l'imaging MPI è una nuova tecnica che negli ultimi anni sta accrescendo la sua popolarità in quanto permette di visualizzare nanoparticelle magnetiche con alta risoluzione spaziale e temporale (Buzug et al., 2012). Tale metodica consente la visualizzazione tridimensionale della localizzazione e della concentrazione di SPIONs e può essere impiegata per diverse applicazioni di imaging clinico (Schulz et al., 2015). Le *performance* dell'MPI dipendono però fortemente dalle caratteristiche dell'agente di contrasto utilizzato, ed in particolare dalle dimensioni e dalla distribuzione dimensionale delle SPIONs impiegate. Tali parametri si configurano critici poiché influenzano profondamente la magnetizzazione dell'agente di contrasto e perciò la risoluzione delle immagini ottenute.

Il Resovist[®], originariamente prodotto come agente di contrasto per la risonanza magnetica, è stato successivamente utilizzato per analisi di MPI anche *in vivo*. Questo è composto da particelle di ossido di ferro di circa 5nm di diametro (misure TEM), molte delle quali sono aggregate in forma di clusters, reputati i veri e propri responsabili delle buone proprietà di contrasto del materiale (Du et al., 2013). Nonostante ciò, l'efficacia del Resovist[®] non è ancora soddisfacente e negli ultimi anni si stanno cercando nuovi agenti di contrasto con prestazioni superiori (Chelluri et al., 2015).

In vista di ciò si è pensato mettere a punto una metodica di sintesi/classificazione di SPIONs con rivestimento polimerico (carbossimetil destrano), che consente di ottenere e purificare nanoparticelle superparamagnetiche con diametro controllato e basse polidispersità per un possibile uso come agenti di contrasto.

Le SPIONs sono state prodotte mediante la tecnica di coprecipitazione, ampiamente utilizzata poiché consente la sintesi delle suddette nanoparticelle con alte rese e bassi costi. Una tipica procedura di preparazione di SPIONs prevede, per l'appunto, la coprecipitazione di ioni ferrici e ferrosi in presenza di una base, sotto forma di ossidi di ferro rappresentati dai minerali maghemite ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$) e magnetite (Fe_3O_4) (Figura 16).

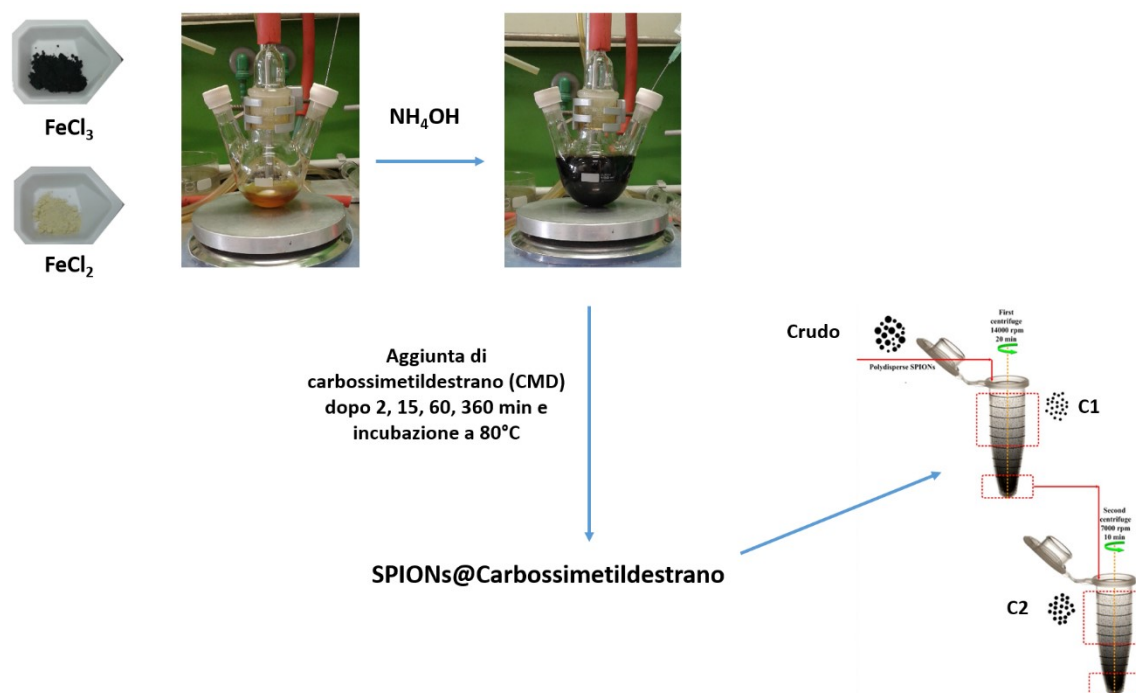


Figura 16. Schema di produzione per coprecipitazione e classificazione di SPIONs rivestite con carbossimetil destrano.

Durante la procedura sintetica, la formazione di maghemite rappresenta un evento indesiderato poiché è stato visto essere in grado di alterare le proprietà magnetiche delle SPIONs prodotte, riducendo le loro abilità di contrasto. Per tali ragioni, è di grande importanza che la presente sintesi sia condotta in atmosfera inerte, in questo caso in contropressione di azoto, per ridurre i fenomeni di ossidazione. L'aggiunta di base, evento che scatena la precipitazione degli ossidi di ferro, è considerato un parametro critico in quanto la concentrazione di NH_4OH , così come il tempo di incubazione con base, influiscono notevolmente sulle dimensioni delle nanoparticelle prodotte. A tal proposito, si è proceduto mantenendo fissa la concentrazione di NH_4OH (12M) e variando i tempi di reazione in sua presenza, al fine di ottenere popolazioni con differenti diametri idrodinamici.

Al termine dell'incubazione con NH_4OH , si è dunque proseguito aggiungendo l'agente di rivestimento desiderato, al fine di conferire stabilità nei confronti dell'aggregazione e citocompatibilità più elevata. L'agente di rivestimento utilizzato è stato il carbossimetil destrano (CMD) con peso molecolare compreso tra 10 e 20 KDa, selezionato in modo da poter meglio comparare le performance delle nanoparticelle prodotte con quelle del mezzo di contrasto di riferimento (Resovist[®]).

L'azione di rivestimento da parte del CMD blocca la fase di crescita delle SPIONs e, per questo, il polisaccaride è stato utilizzato contestualmente come agente di *quenching* dell'accrescimento particellare.

Con questa metodica sono state prodotte 4 tipologie di SPIONs ottenute in seguito ad aggiunta di una dispersione di CMD dopo 2, 15, 60, 360 minuti di incubazione con la base. Al termine della procedura di rivestimento a caldo (80°C), il campione è stato purificato tramite dialisi.

Le SPIONs sono state dunque classificate mediante centrifugazioni seriali a tempi e rpm decrescenti. In questo contesto, è importante tenere a mente che l'obiettivo del lavoro intrapreso non si identifichi nel protocollo di centrifugazione di per sé, ma nello sviluppo di una metodica che permetta la formulazione e l'isolamento di SPIONs con una dimensione controllabile in fase di sintesi e con una stretta distribuzione dimensionale, al fine di ottenere migliori prestazioni in ambito terapeutico e diagnostico.

Le SPIONs così frazionate sono state caratterizzate in termini di dimensioni e polidispersità mediante analisi di *Dynamic Light Scattering* (DLS) (Tabella 3).

Tabella 3. Dati DLS delle SPIONs ottenute dopo classificazione.

Tempo di aggiunta del CMD* (min)*¹	Stadio di centrifugazione*²	Z-Average (nm)	PdI
2	0	98.29	0.178
	1	40.15	0.094
	2	65.26	0.139
15	0	137.3	0.206
	1	65.7	0.127
	2	86.57	0.167
60	0	155.5	0.245
	1	67.87	0.173
	2	107.3	0.167
360	0	259.5	0.214
	1	75.54	0.191
	2	109.2	0.118

*¹ Tempo di incubazione con NH₄OH prima dell'aggiunta di CMD.

*² Numero di centrifugazioni effettuate

La tabella 3 mostra che la dimensione delle SPIONs prodotte è proporzionale al tempo di incubazione con NH₄OH. Inoltre, i dati raccolti evidenziano come la procedura di

centrifugazione abbia consentito di diminuire la polidispersità del campione crudo e di separare le nanoparticelle in base alle dimensioni. Risulta infatti evidente che i diametri idrodinamici delle particelle classificate aumentano all'aumentare del numero di centrifugazioni effettuate.

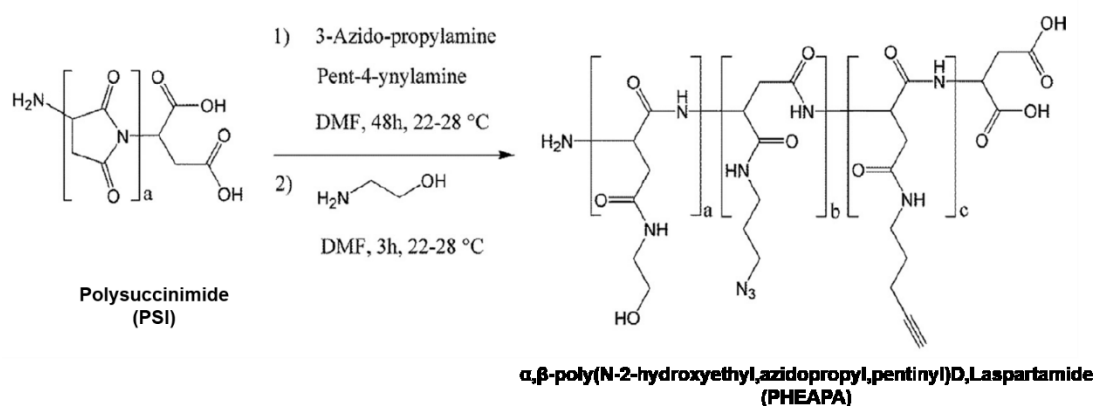
La procedura descritta consente dunque l'ottenimento di SPIONs con diametro controllato e basse polidispersità per un possibile utilizzo come agenti di contrasto per MRI e MPI, ma anche come materiale di partenza per la messa a punto di *drug delivery systems* teranostici.

Il lavoro è stato condotto in collaborazione con Seyed Mohammadali Dadfar e sotto la supervisione del Prof. Dr. Dr. Twan Lammers presso il dipartimento di Nanomedicina e Teranostica dell'università RWTH di Aachen (Germania) e risulta ancora in corso. Saranno infatti effettuati studi MPI sulle particelle prodotte, volti a testare la capacità delle SPIONs di fungere da mezzo di contrasto per MPI e a confrontare le prestazioni delle stesse con l'agente di contrasto per MPI di riferimento Resovist®.

3.2. SPIONs contenenti collagenasi per la veicolazione di farmaci antineoplastici

3.2.1. Sintesi e caratterizzazione del derivato α,β -poli(N-idrossietil, azidopropil, pentinil)-D,L-aspartammide (PHEAPA)

La sintesi del derivato idrofilico della polisuccinimide (PSI), denominato PHEAPA ha previsto un *iter* sintetico sviluppato in due fasi consecutive, condotte in ambiente organico anidro, senza isolamento degli intermedi di reazione (Schema 1).



Schema 1. Schema della procedura sintetica di PHEAPA

Il copolimero sintetizzato consiste in un backbone di acido poliaspartico, derivatizzato principalmente con etanolammina e recante innesti di molecole di 3-azido-1-propanammina e 4-pentin-1-ammina. Il percorso sintetico è stato messo a punto e ottimizzato considerando le reattività delle ammine impiegate in modo da ridurre il numero degli step procedurali. Durante il primo step di sintesi, l'attacco nucleofilo a carico dei gruppi immidici della PSI da parte delle due ammine 3-azido-1-propanammina e 4-pentin-1-ammina, ha determinato l'apertura degli anelli (*ring opening*) parziale degli anelli succinimidici con contestuale innesto di terminali azidici e pentinici sul backbone polimerico. Solo dopo aver monitorato la completezza dello step precedente tramite corsa cromatografica, si è proceduto eseguendo sostituzioni nucleofile a carico dei restanti anelli della PSI tramite aggiunta di un eccesso di etanolammina, convertendo le unità ripetitive di succinimide residue in funzioni aspartammidiche recanti etanolammina in catena laterale.

I gradi di derivatizzazione (DD%) del copolimero neosintetizzato sono stati ricavati per mezzo di analisi ¹H NMR (Figura 17). L'avvenuta funzionalizzazione della PSI è stata dimostrata dalla presenza dei picchi di risonanza a 2.28 e 2.16ppm, attribuibili rispettivamente ai protoni metilenici della 3-azido-propilammina (metilene in α al gruppo azidico) e della 4-pentin-1-ammina (metilene in α al gruppo alchidico).

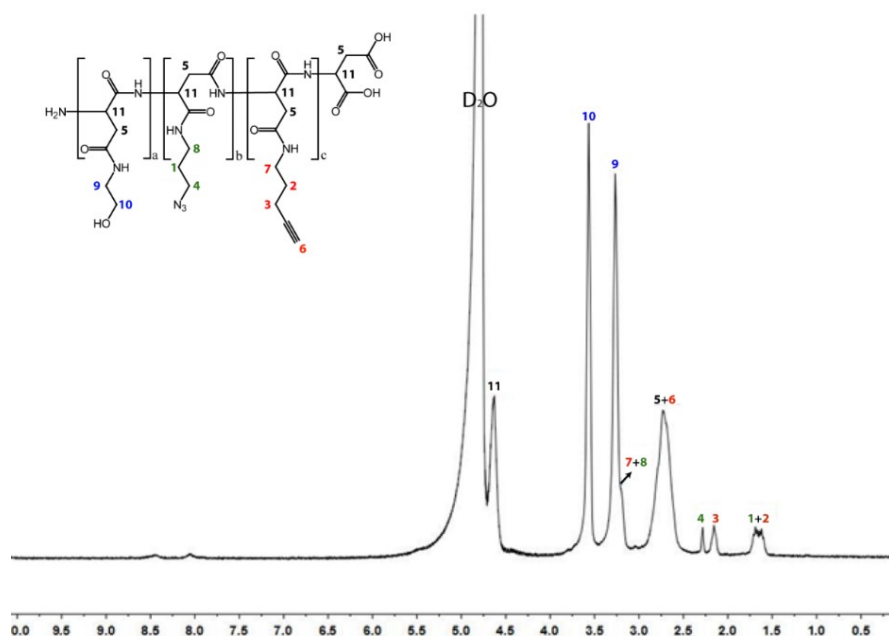


Figura 17. Spettro ^1H NMR PHEAPA in D_2O

L'innesto delle ammine è stato inoltre confermato dalla comparsa dei picchi nella regione tra 1.51 e 1.75ppm. La valutazione dei DD% è stata dunque effettuata prendendo in considerazione il segnale relativo al protone metinico del backbone polimerico, visualizzabile a 4.53ppm, e confrontandone l'integrale con i picchi di risonanza dei protoni metilenici dell'etanolammina (3.61ppm), della 3-azido-propilammina (2.28ppm) e della 4-pentin-1-ammina (2.16ppm). Dai calcoli è risultato un DD% prossimo al valore teorico del 10%, che si attesta al 9% circa (mol/mol%) per entrambe le ammine legate.

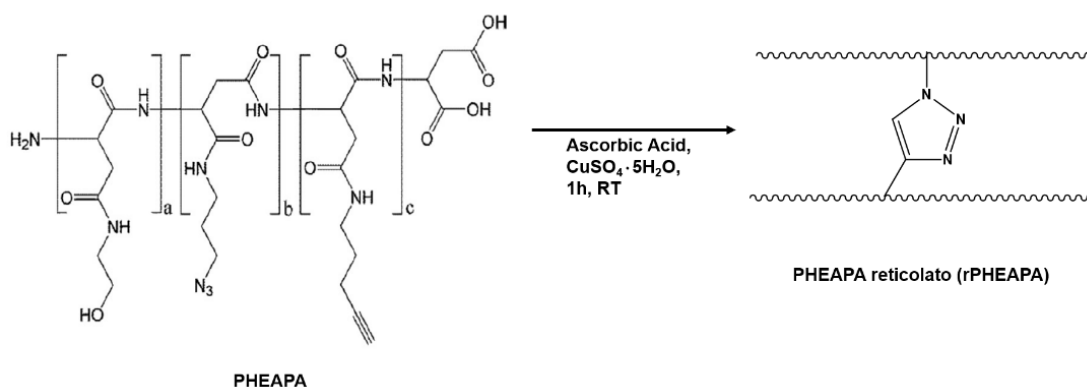
Il peso molecolare medio del derivato PHEAPA è stato calcolato mediante di cromatografia ad esclusione dimensionale (SEC) che ha restituito valore di 54.2 kDa con una polidispersità pari a 1,43.

3.2.2. Preparazione e caratterizzazione dei DDS

Il copolimero PHEAPA è stato utilizzato per rivestire nanoparticelle superparamagnetiche di ossido di ferro (SPIONs). Il rivestimento per mezzo di un polimero idrofilo è stato effettuato con lo scopo di prevenire l'aggregazione delle SPIONs in ambiente acquoso, di prolungare la loro circolazione nel torrente ematico ed infine di permettere il caricamento di molecole bioattive.

La procedura di rivestimento ha previsto l'incubazione delle SPIONs con una dispersione polimerica ed è stata favorita tramite sonicazione ed agitazione vorticoso, in modo da fornire energia e porre efficacemente in contatto la superficie delle nanoparticelle con le catene

polimeriche. Le interazioni stabilite tra PHEAPA e la superficie delle SPIONs sono presumibilmente deboli, di tipo elettrostatico o forze di Van der Waals ed inoltre, la natura idrofilica del polimero non consente la formazione di uno *shell* di rivestimento che possa mantenersi sufficientemente stabile in ambiente acquoso (es. fluidi fisiologici). Come noto in letteratura, uno dei metodi più efficaci per aumentare la resistenza meccanica in mezzo acquoso di aggregati costituiti da polimeri altamente idrofilici, è la reticolazione delle catene polimeriche. La strategia di *cross-linking* è stata infatti ampiamente adottata in diversi campi della tecnologia farmaceutica ed in particolare nella stabilizzazione di sistemi di veicolazione di farmaci (Thakur et al., 2018). Che sia di natura chimica o fisica, è stato dimostrato che tale procedura è in grado di migliorare le proprietà meccaniche di costrutti polimerici idrofilici, aumentandone la resistenza nei confronti di fenomeni di erosione e di degradazione idrolitica (Palumbo et al., 2018, 2019). Inoltre, in seguito a reticolazione, è possibile dar vita a geli chimici affini nei confronti di composti con diverso bilancio di idrofobicità/idrofilicità, come ad esempio farmaci e molecole bioattive. Per tali ragioni si è proceduto alla reticolazione chimica del PHEAPA adsorbito sulle SPIONs, tramite *click chemistry*. In particolare, i terminali azidici e pentinamminici innestati sul backbone polimerico sono stati sfruttati per condurre una cicloadizione 1,3-dipolare che dà luogo alla formazione di un anello triazolico in grado di fungere da ponte tra due catene polimeriche adiacenti (Schema 2).



Schema 2. Schema della procedura di reticolazione di PHEA-AP-PA

Tale reazione di cicloadizione, nominata reazione di Huisgen, avviene in seguito ad aggiunta di quantità catalitiche di ione rameoso e permette di ottenere conversioni molto alte, in assenza di sottoprodotti di reazione ed in tempi molto ristretti. In ultima istanza, il catalizzatore è stato allontanato mediante dialisi e i nanogeli superparamagnetici reticolati (SPIONs@rPHEAPA) sono stati recuperati tramite freeze-drying.

Al fine di ottenere dei veri e propri sistemi teranostici, si è proceduto all'incorporazione di molecole bioattive all'interno delle maglie dei nanogeli superparamagnetici. In vista di un potenziale utilizzo nel trattamento del cancro alla mammella sono state dunque selezionate la doxorubicina, farmaco d'elezione nella chemioterapia della suddetta patologia e la collagenasi, enzima proteolitico deputato alla lisi del collagene (tra i principali costituenti della matrice extracellulare). In particolare, sono state prodotte tre tipologie di sistemi, denominati SPIONs/Doxo, SPIONs/Col e SPIONs/Doxo@Col, caricati rispettivamente con la sola doxorubicina, la sola collagenasi e simultaneamente con le due molecole. La preparazione dei primi due tipi di sistemi ha richiesto la semplice incubazione di SPIONs@rPHEAPA in presenza della molecola selezionata, consentendone l'incorporazione per mezzo di interazioni elettrostatiche e di Van der Waals. I nanocostrutti SPIONs/Doxo@Col sono stati invece prodotti a partire da SPIONs/COL, a seguito di incubazione con doxorubicina.

Il diametro medio idrodinamico e la carica superficiale sono stati indagati in acqua bidistillata e in PBS pH 7.4 tramite analisi di *Dinamic Light Scattering* (DLS). Tutti i vettori ottenuti presentano dimensioni nanometriche, potenziali ζ negativi di entità paragonabili e contenuto in doxorubicina e/o collagenasi (DL%) adeguato agli scopi prefissati (Tabella 4). In seguito a reticolazione, il diametro delle SPIONs rivestite ha subito una notevole diminuzione, indicando la formazione di una struttura "collassata" a causa dell'avvenuta formazione di legami intercatena irreversibili. La riduzione nel PDI in SPIONs@rPHEAPA potrebbe essere dovuta inoltre ad un aumento nella stabilità dei nanogeli in seguito a *cross-linking*. In generale, non si osservano variazioni significative negli Z-Average registrati per tutti i campioni reticolati analizzati, sebbene si possa notare una lieve tendenza alla riduzione dei diametri medi idrodinamici per i nanogeli dispersi in PBS pH 7.4, causata probabilmente dall'aumento della forza ionica del mezzo.

Tabella 4. Valori di Z-average, Pdl, potenziale ζ e DL% dei nanogeli carichi ottenuti

Campione	Mezzo	Z-Average (nm)	PdI	ζ Potential (mV)	DL% DOX	DL% COL
SPIONs@PHEAPA	H ₂ O	247.6	0.402	-29.5±5.5		
	PBS pH 7.4	219.2	0.379	-8.1±5.19	-	-
SPIONs@rPHEAPA	H ₂ O	160.3	0.253	-20.7±4.12		
	PBS pH 7.4	147.1	0.212	-7.2±4.41	-	-
SPIONs/COL	H ₂ O	144.8	0.09	-34±4.43		
	PBS pH 7.4	128.1	0.113	-17.2±5.21	-	0.7
SPIONs/Doxo	H ₂ O	119.2	0.17	-27.1±2.36		
	PBS pH 7.4	107.6	0.152	-18.4±9.14	3.6	-
SPIONs/Doxo@Col	H ₂ O	121.2	0.149	-20.7±5.5		
	PBS pH 7.4	99.4	0.121	-12±4.38	5.3	0.7

I potenziali ζ risultano essere fortemente negativi in acqua bidistillata, valori tipici di colloidi con scarsa tendenza all'aggregazione, mentre subiscono una riduzione in valore assoluto per i campioni dispersi in tampone. Per quanto concerne la capacità di incorporazione di molecole bioattive, è stato notato che il quantitativo di doxorubicina caricato nelle SPIONs/Doxo@Col risulta essere maggiore rispetto a quello calcolato per SPIONs/Doxo. Questa differenza nella percentuale di farmaco incorporato è probabilmente attribuibile all'instaurarsi di interazioni elettrostatiche aggiuntive tra il farmaco, che presenta gruppi basici protonati a pH neutro e la collagenasi già presente nel sistema, che esibisce invece una carica netta negativa.

In ultimo, mediante saggio alla ferrozina è stato possibile risalire al contenuto di Fe₃O₄% nei sistemi SPIONs/Doxo@Col, espresso come percentuale tra il peso in Fe e il peso del sistema, che risulta ammontare al 6.5%.

Gli studi di rilascio di doxorubicina da SPIONs/Doxo@Col sono stati effettuati simulando un modello a due compartimenti separati da una membrana da dialisi. Gli esperimenti sono stati condotti in tampone fosfato isototonico pH 7.4 a 37°C ed hanno previsto il prelievo a tempi prestabiliti di un volume noto di soluzione dal compartimento accettore, prontamente rimpiazzato da un egual quantitativo di tampone fresco, in modo da garantire le condizioni *sink*. Il quantitativo di doxorubicina è stato calcolato tramite analisi UV dei prelievi effettuati. La curva di rilascio risultante, riportata in Figura 18a, denota un profilo di liberazione del farmaco graduale durante il tempo di durata di analisi, senza un significativo *burst effect* e con una quantità massima rilasciata del 44,6% rispetto alla dose incorporata. Solamente il 22% del cargo viene rilasciato dopo 2h ed il raggiungimento dello stato stazionario avviene dopo 4h dall'incubazione, denotando un comportamento tipico dei sistemi a rilascio sostenuto. Questo profilo di rilascio suggerisce che i nanogeli possano essere in grado di liberare il farmaco in maniera bimodale, consentendo un rilascio di una dose più massiccia durante le prime ore e di una dose di mantenimento nelle ore a seguire.

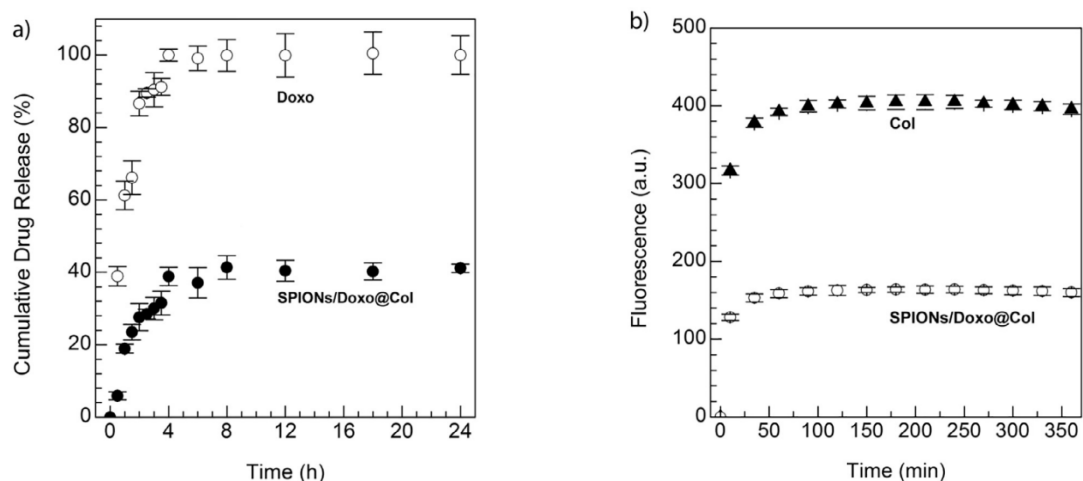


Figura 18. Studi di rilascio di doxorubicina (a) e di collagenasi (b) dai sistemi SPIONs/Doxo@Col

La diffusione delle nanoparticelle dai capillari alle cellule tumorali è limitata dalla presenza della ECM neoplastica e dipende fortemente dalla grado di reticolazione, dalla densità e dalla rigidità del collagene che la compone (Netti et al., 2000; Ramanujan et al., 2002). L'utilizzo di collagenasi nel design di nanomedicamenti ha lo scopo di migliorare la capacità di penetrazione attraverso le maglie della matrice extracellulare tumorale e aumentare la quota di farmaco nel sito bersaglio (Kuriyama et al., 2001).

La collagenasi caricata nel sistema SPIONs/Doxo@Col non è però una piccola molecola, bensì un enzima proteolitico che necessita della corretta conformazione (*folding*) per esercitare la propria azione litica nei confronti del collagene. Come riportato in letteratura,

l'incorporazione di enzimi o proteine all'interno o sulla superficie di nanoparticelle potrebbe causare una variazione nella struttura tridimensionale della catena amminoacidica in questione. In alcuni casi, si può giungere ad un *misfolding* proteico (strutturazione tridimensionale erronea e quindi non funzionale) ed in rari casi alla *restitutio* della corretta conformazione in seguito a *misfolding* (Armstrong, 2008; Fei et al., 2009).

La capacità dei nanogeli di rilasciare collagenasi enzimaticamente attiva è stata indagata determinando le cinetiche di idrolisi di gelatina marcata con la sonda FITC, in seguito ad incubazione con i sistemi SPIONs/Doxo@Col o con un quantitativo equivalente di collagenasi usato come controllo positivo (Figura 18b). I risultati indicano che la collagenasi in forma attiva è stata efficientemente rilasciata da SPIONs/Doxo@Col seguendo un profilo di rilascio sostenuto. Infatti, il quantitativo di collagene degradato ad opera della collagenasi libera, dopo soli 10 minuti a 37°C, è risultato 3 volte maggiore rispetto al valore osservato per SPIONs/Doxo@Col, suggerendo che la collagenasi possa essere liberata dal sistema in maniera prolungata e duratura.

Per verificare ulteriormente l'integrità funzionale dell'enzima proteolitico caricato nei sistemi, sono stati effettuati degli studi reologici atti a valutare se l'incorporazione all'interno dei nanogeli superparamagnetici possa o meno compromettere l'attività proteolitica della collagenasi. Considerato che l'idrolisi delle catene di collagene comporta un collasso della struttura del gel e dunque una variazione del suo comportamento viscoelastico, gli studi reologici rappresentano un ottimo metodo di misurazione indiretta dell'attività litica della collagenasi incorporata.

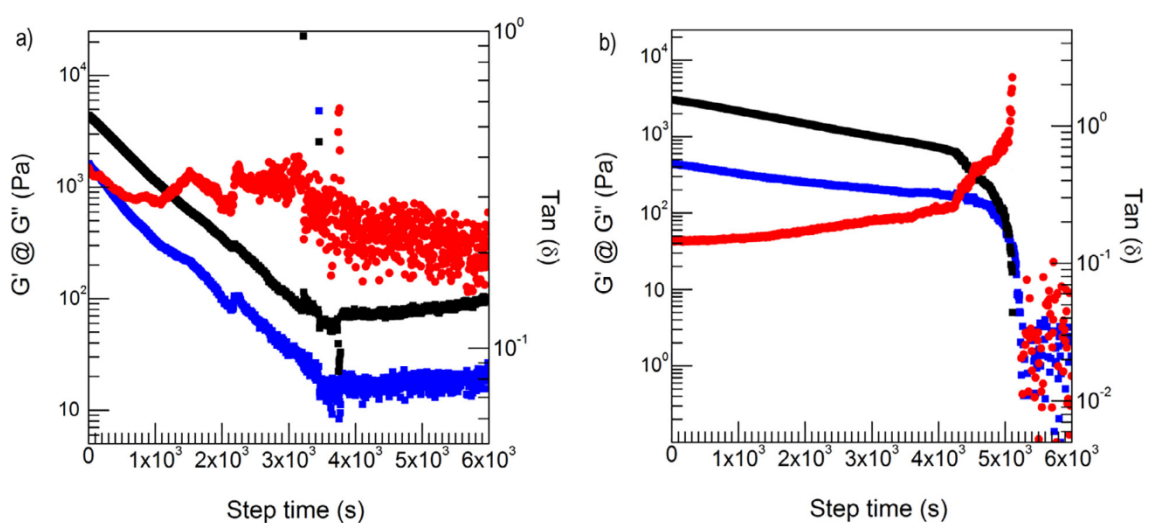


Figura 19. Modulo elastico G' (nero), modulo dissipativo G'' (blu) e $\tan \delta$ (rosso) di spugne di collagene in funzione del tempo di incubazione con collagenasi (1.4 $\mu\text{g/ml}$) (A) e SPIONs/Doxo@Col (contenuto in collagenasi 1.4 $\mu\text{g/ml}$) (B).

Nello specifico è stato indagato il comportamento viscoelastico di spugne di collagene, usate come modello sperimentale di stroma tumorale, in funzione del tempo di incubazione con una dispersione di SPIONs/Doxo@Col o con un quantitativo equivalente di sola collagenasi, valutandone i moduli elastici (G') ed i moduli dissipativi (G'') (Figura 19).

Si può notare che il modulo elastico, il modulo dissipativo delle spugne di collagene poste ad incubare con la sola collagenasi (Figura 19a) decrescono entrambi abbastanza rapidamente, indicando la repentina degradazione del gel. Il collasso completo si raggiunge dopo 1h, registrando valori di G' pari a 100Pa ascrivibili alla formazione di una semplice dispersione colloidale di collagene. Diversamente, le spugne poste in contatto con i sistemi SPIONs/Doxo@Col (Figura 19b) mostrano una riduzione di G' e G'' più graduale, che porta al disfacimento delle maglie del gel dopo 1.5h. In questo caso la degradazione appare più controllata, riportando una riduzione in G' di un solo ordine di grandezza (da 10^4 a 10^3 Pa) che precede il vero e proprio collasso della struttura 3D. I dati ottenuti indicano che la collagenasi presente nei sistemi risulta attiva ed è capace di esercitare la propria azione litica in maniera protratta nel tempo, riflettendo la capacità dei nanogeli di modificare il microambiente tumorale.

3.1.3 Studi *in vitro*

La citotossicità dei nanogeli carichi prodotti è stata indagata mediante studi *in vitro* su fibroblasti (HDFa) e su due linee cellulari di cancro alla mammella umano. A tale scopo sono state utilizzate le linee tumorali MCF-7 e le MDA-MB-231, scelte rispettivamente come modello di citotipo di adenocarcinoma mammario estrogeno positivo (con prognosi favorevole) e triplo negativo (con prognosi sfavorevole) (Figura 20).

La vitalità cellulare è stata valutata mediante saggio MTS dopo 24 e 48h di incubazione con i nanogeli caricati con molecole bioattive. La doxorubicina libera in concentrazioni equivalenti a quelle presenti nei campioni è stata usata come controllo, mentre le SPIONs@rPHEAPA sono risultate citocompatibili a tutte le concentrazioni utilizzate (dati non mostrati).

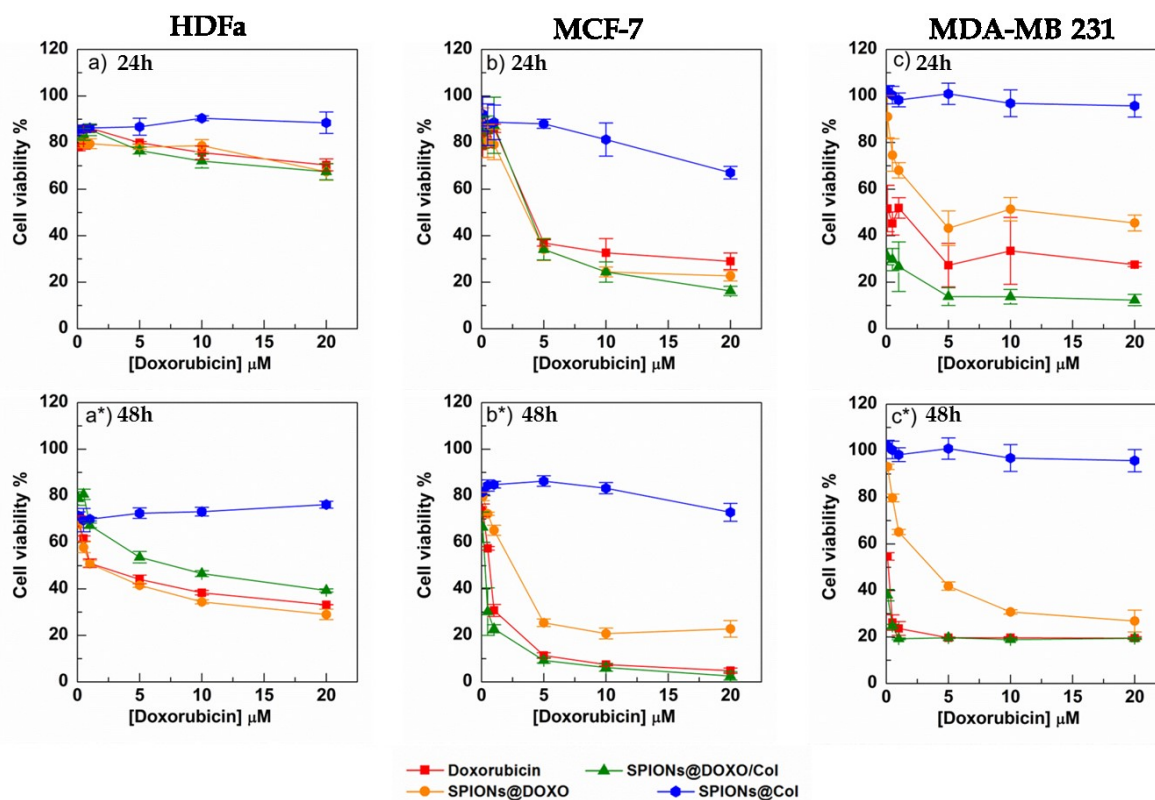


Figura 20. Vitalità cellulare di HDFa (colonna di sinistra), MCF-7 (colonna di centro), MDA-MB-231 (colonna di destra) dopo 24h e 48h di incubazione con doxorubicina·HCl (quadrato rosso), SPIONs/Doxo (cerchio arancione), SPIONs/Col (cerchio blu), SPIONs/Doxo@Col (triangolo verde.)

I sistemi SPIONs/Col mostrano un effetto citotossico molto blando, eccezion fatta per la linea cellulare di cancro al seno triplo negativo. Questo decremento della vitalità cellulare risulta essere in accordo con il lieve potenziale antineoplastico della collagenasi, già riportato in letteratura. (Soria-Valles et al., 2014) La doxorubicina ed entrambi i costrutti contenenti il farmaco risultano efficaci sulle linee cellulari tumorali già dopo 24h di incubazione, ma in seguito a 48h è possibile apprezzare una differenza tra SPIONs/Doxo e SPIONs/Doxo@Col. Infatti, i nanogeli che incorporano contestualmente doxorubicina e collagenasi appaiono più citotossici rispetto a SPIONs/Doxo, esibendo un'efficacia paragonabile a quella del farmaco libero.

Al fine di analizzare la citotossicità dei sistemi su un modello *in vitro* più complesso è stato progettato un ulteriore studio servendosi di *Transwell Systems*. In particolare, l'esperimento ha previsto la semina di fibroblasti sullo strato di collagene che ricopre il fondo dell'inserito dei *Transwell* (rivestimento già presente all'acquisto) e la loro coltura in mezzo cellulare per un tempo prolungato (una settimana), con lo scopo di permettere la produzione di componenti tipici della matrice cellulare. Successivamente si è proceduto alla semina ed alla

coltura sino a confluenza della linea cellulare MDA-MB-231 sul fondo del pozzetto accettore. Dispersioni di doxorubicina, SPIONs/Doxo, SPIONs/Doxo@Col sono state dunque immerse nel pozzetto donatore e incubate per 24h e 48h, dopo le quali è stata indagata la vitalità cellulare delle cellule MDA-MB-231 tramite saggio MTS (Figura 21).

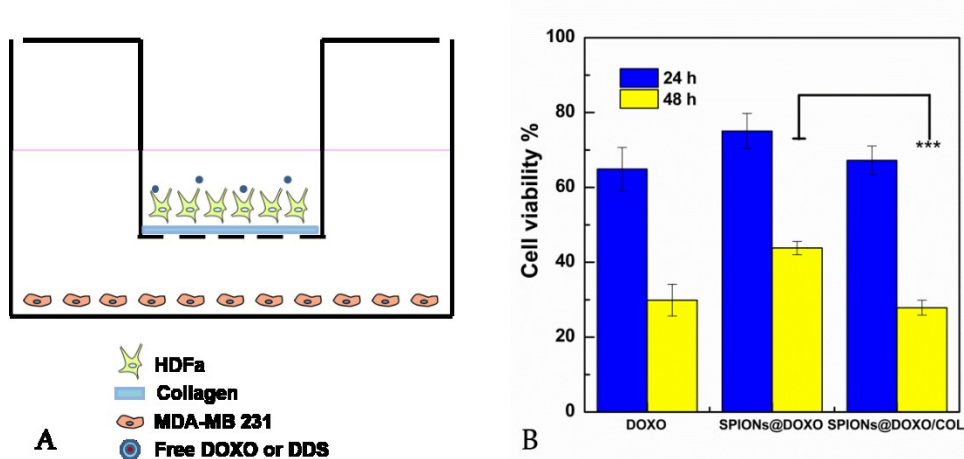


Figura 21. Schema dell'esperimento di valutazione della citotossicità su Transwell (A); vitalità cellulare di MDA-MB-231 dopo 24h e 48h di incubazione con doxorubicina·HCl, SPIONs/Doxo, SPIONs/Doxo@Col (B).

In Figura 21 è possibile osservare che i sistemi SPIONs/Doxo@Col presentano un effetto citotossico quasi sovrapponibile a quello apprezzato per la doxorubicina libera. Inoltre, i costrutti contenenti collagenasi mostrano una maggiore efficacia rispetto a SPIONs/Doxo, differenza che appare significativa dopo 48h di incubazione. In base ai dati registrati si può supporre che la collagenasi presente nei sistemi preservi la propria attività enzimatica esercitando un effetto idrolitico sui i componenti della matrice cellulare prodotta dai fibroblasti, nonché sul film di collagene che riveste gli inserti, consentendo una maggiore penetrazione del farmaco e/o del nanosistema attraverso lo strato di HDFa seminate.

Per valutare la capacità di SPIONs/Doxo@Col di limitare la migrazione delle cellule cancerose e dunque le loro capacità di invadere i tessuti, è stato analizzato il comportamento delle linee cellulari HDFa, MCF-7 e MDA-MB-231 tramite *scratch assay*. Nello specifico, l'esperimento è stato messo a punto scalfendo il fondo dei pozzetti contenenti uno strato adeso di cellule a confluenza ed incubando con SPIONs/Doxo@Col alla concentrazione in farmaco di 5µM per 24h. La rimarginazione della "ferita" (*gap recovery*) è stata quindi quantificata tramite microscopia ed espressa come percentuale di chiusura dell'area interessata dal trauma (Figura 22).

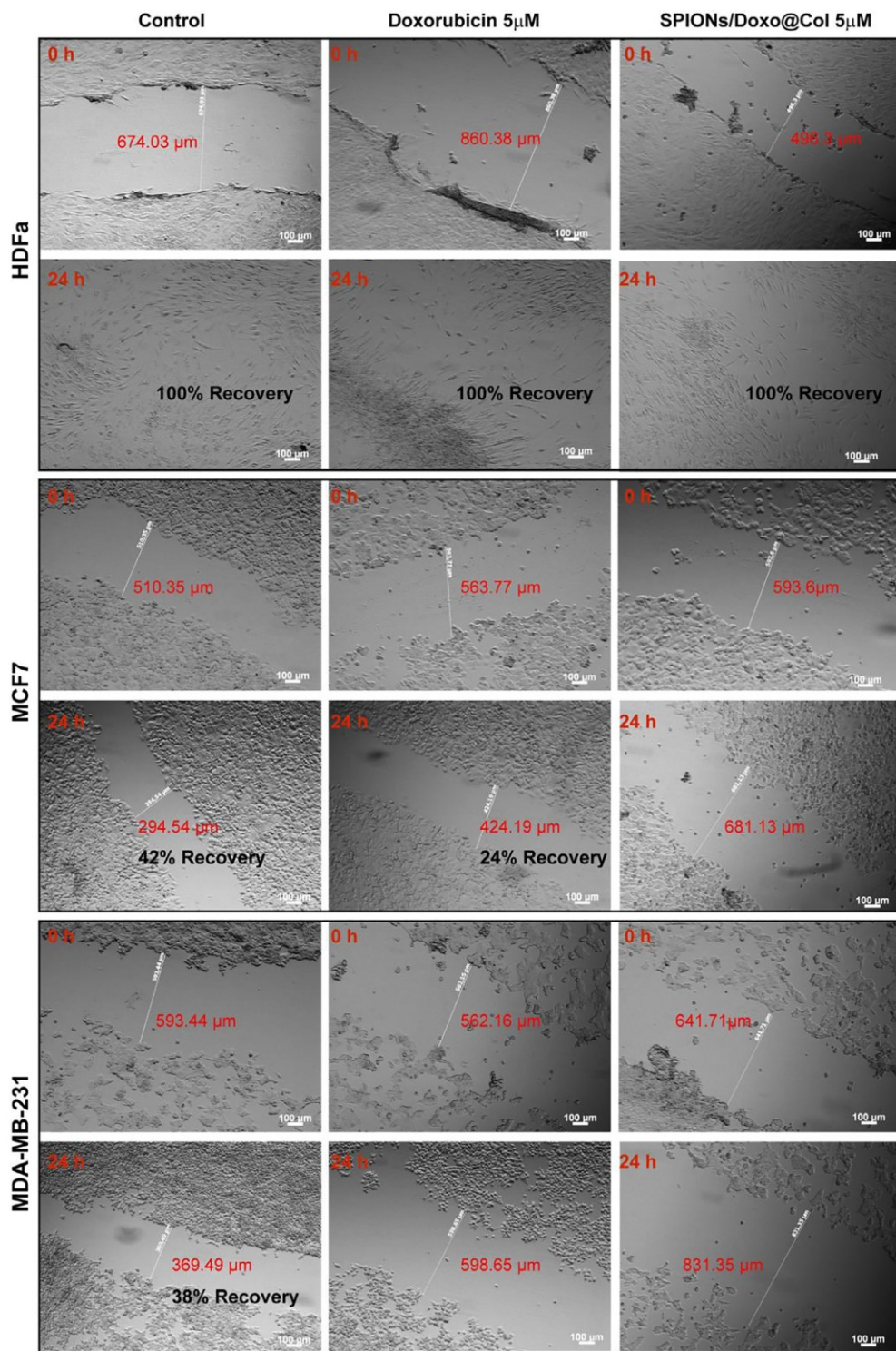


Figura 22. Scratch assay su colture di HDFa (alto), MCF-7 (centro), MDA-MB-231 (basso) prima e dopo incubazione di 24h con DMEM (sinistra), SPIONs/Doxo@Col (centro), doxorubicina (destra).

Sia la doxorubicina che i nanogel hanno permesso la chiusura della ferita generata nelle colture di HDFa, mentre non hanno consentito la rimarginazione del danno indotto in

entrambe le linee cellulari di tumore al seno analizzate. È interessante notare come SPIONs/Doxo@Col sembri in grado di diminuire l'invasività e le capacità di migrare della linea MCF-7, addirittura in misura superiore rispetto alla sola doxorubicina. Questo ritrovamento sottolinea una possibile relazione tra l'esposizione alla collagenasi e la riduzione dell'invasività delle cellule tumorali.

Infine, SPIONs/Doxo@Col è stato testato su sferoidi di cancro alla mammella, investigando l'efficacia di nanogeli proposti su un modello tridimensionale complesso.

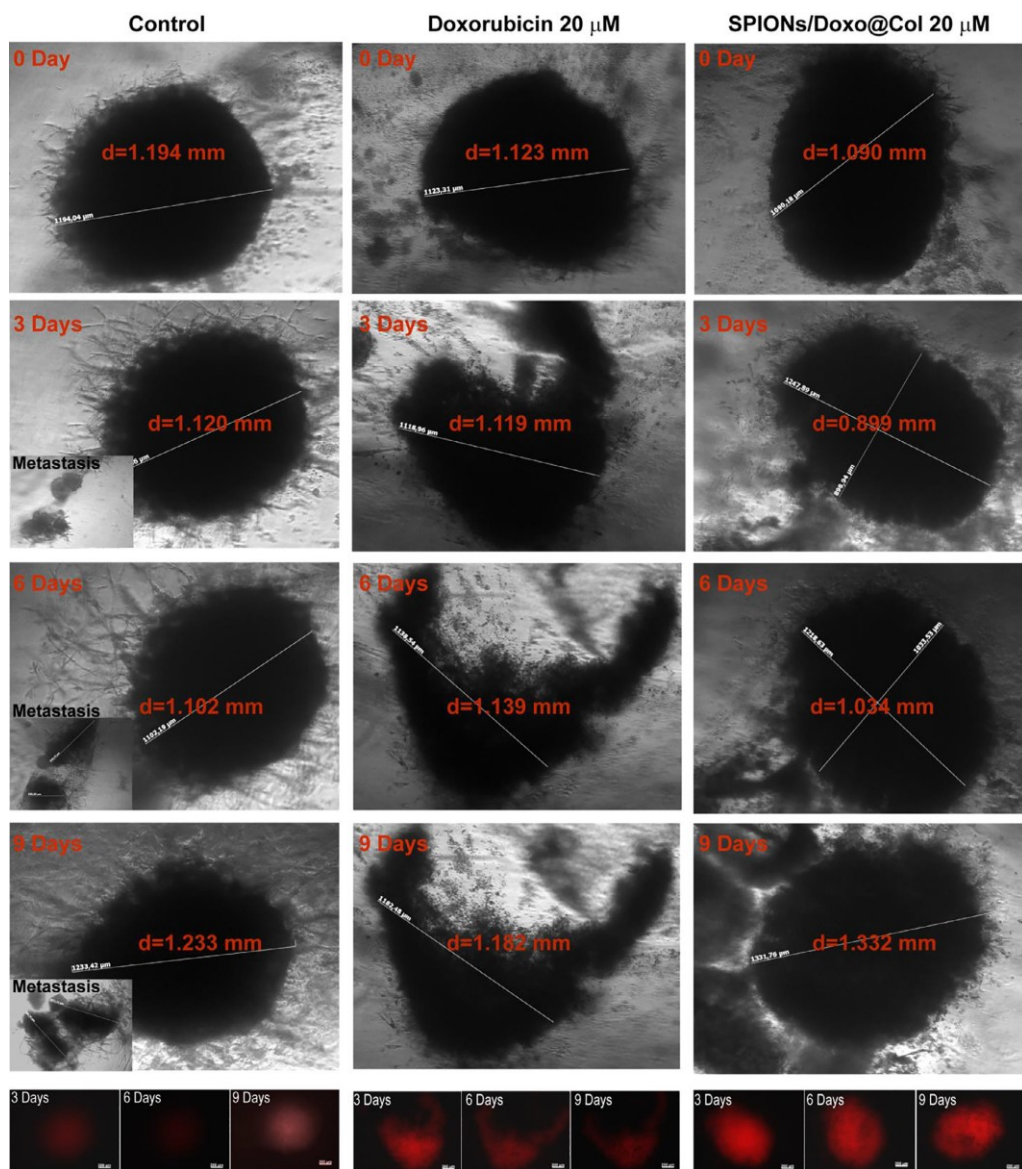


Figura 23. Sferoidi di tumore alla mammella (linea tumorale: MDA-MB-231) non trattati (sinistra) e incubati con doxorubicina (centro) o SPIONs/Doxo@Col (destra) fino a 9 giorni. Monitoraggio dell'internalizzazione della doxorubicina tramite microscopia a fluorescenza degli sferoidi (in basso).

Gli sferoidi prodotti sono composti da una fitta matrice di collagene, elastina e proteoglicani che contiene CAFs (Cancer Associated Fibroblasts) e cellule MDA-MB-231, organizzati in una struttura sferoide che mima la massa cancerosa.

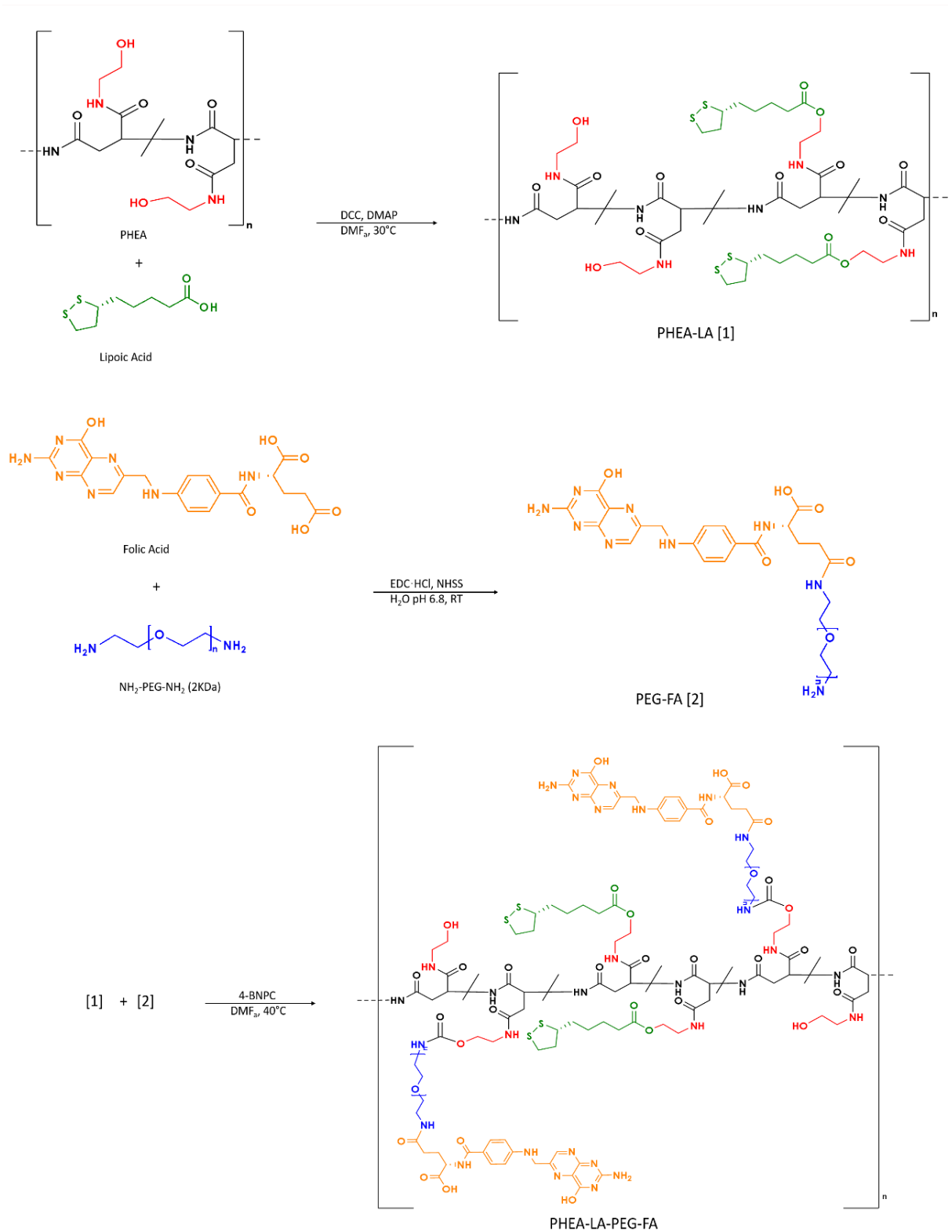
Ad una prima osservazione, lo sferoide non trattato mantiene inalterate le dimensioni durante il periodo di analisi di 9 giorni (Figura 23). Già a partire dal terzo giorno è stata però riscontrata la formazione di una massa satellite, indice del fatto che in assenza di alcun trattamento la massa sferoidale ha mantenuto la capacità di migrazione cellulare ed il potenziale di invasività. Gli sferoidi trattati con sola doxorubicina o SPIONs/Doxo@Col mostrano invece dei risultati positivi, ma con le dovute differenze. In particolare, lo sferoide incubato con doxorubicina appare sfaldarsi dal sesto giorno, mentre l'incubazione con SPIONs/Doxo@Col ha dimostrato di evitare lo *sprouting* cellulare, impedendo la formazione di masse satelliti. Inoltre, tramite immagini acquisite con microscopio a fluorescenza, è stato possibile confermare che la doxorubicina sia stata veicolata con successo negli sferoidi in seguito ad esposizione con SPIONs/Doxo@Col, suggerendo che l'azione della collagenasi possa aver facilitato l'internalizzazione dei sistemi in seguito alla parziale degradazione della capsula di connettivo dei modelli 3D.

3.3. Gold nanorods con rivestimento polimerico poliamminoacidico per la terapia termoablative del cancro al colon

3.3.1. Sintesi e caratterizzazione del copolimero PHEA-LA-PEG-FA

Per assicurarne la stabilità in ambiente acquoso, l'oro colloidale necessita un opportuno rivestimento (Turkevich et al., 1951). Come riportato in letteratura (Cavallaro et al., 2013), l'utilizzo di polimeri idrofilici è particolarmente adatto a tale scopo, consentendo inoltre di aumentare la citocompatibilità dei colloidali di oro e permettendone quindi il loro impiego *in vivo*. Per ottenere un rivestimento con adeguata stabilità è inoltre fondamentale che i materiali proposti contengano gruppi funzionali in grado di stabilire interazioni forti con la superficie dell'oro, come ad esempio tioli o ammine (Kumar et al., 2003; Xue et al., 2014). Per tali ragioni, il copolimero utilizzato in questo studio è stato progettato in modo da soddisfare i suddetti requisiti.

In particolare, il derivato PHEA-LA-PEG-FA è stato ottenuto tramite sintesi convergente articolata in 3 step con isolamento degli intermedi (Schema 3) apportando qualche modifica ad un'operazione già riportata in letteratura (Li Volsi et al., 2018). Il primo step è consistito nell'inserzione di molecole di acido lipoico sul backbone polimerico della α , β -poli (N-2-idrossietil) -D, L-aspartammide (PHEA) mediante attivazione dei gruppi carbossilici dell'acido lipoico e conseguente esterificazione a carico dei gruppi ossidrilici del PHEA, dando origine al polimero PHEA-LA. L'acido lipoico è stato innestato con lo scopo di introdurre ponti disolfuro capaci di interagire stabilmente con la superficie del metallo nobile. Durante il secondo step, la pegylazione delle molecole di acido folico è stata ottenuta tramite formazione di legami ammidici tra le catene di bis-ammino-PEG e le funzioni carbossiliche dell'acido folico previamente attivate, ottenendo il derivato denominato PEG-FA. Per ridurre la possibilità che due molecole di acido folico potessero legarsi ad una sola catena di PEG, impegnando entrambi i legami amminici, questo step è stato condotto utilizzando un rapporto molare tra molecole di acido folico e catene di bis-ammino-PEG pari a 0.75. Il terzo e ultimo step ha previsto infine l'innesto del PEG-FA a carico dei gruppi ossidrilici del PHEA-LA precedentemente attivati con bis(4-nitrofenil) carbonato (BNPC), con formazione di un legame uretanico. La presenza del PEG ha migliorato l'idrofilia del derivato, mentre i pendenti di acido folico hanno permesso di ottenere un derivato polimerico con capacità di targeting attivo verso il sito tumorale.



Schema 3. Schema di sintesi di PHEA-LA-PEG-FA

In seguito a liofilizzazione, il polimero è stato caratterizzato mediante analisi ¹H NMR per investigare i gradi di derivatizzazione (DD%) ottenuti. La percentuale di funzionalizzazione in LA è stata calcolata pari a 6.36 mol/mol%, integrando i picchi attribuibili ai 10H

dell'acido lipoico (δ 0.9÷2.6). Il picco intenso a δ 3.6, tipicamente riconducibile ai 2H delle unità ripetitive di PEG, è stato utilizzato per determinare il grado di derivatizzazione in catene di PEG, corrispondente a 5mol/mol%. Infine, un DD% pari a 4mol/mol% è stato stimato per l'acido folico, prendendo in considerazione gli integrali dei picchi con *chemical shift* 7 e 7.5.

3.3.2. Preparazione e caratterizzazione degli AuNRs rivestiti vuoti e carichi di Irinotecano

Per la sintesi dei nanorods d'oro è stata adottata una procedura assistita dal surfactante CTAB, che porta alla formazione di nanoparticelle cilindriche molto stabili con una stretta distribuzione dimensionale. Tuttavia, la presenza del tensioattivo cationico come stabilizzante non ne consente l'uso in applicazioni biomediche, a causa della sua tossicità. Il rivestimento polimerico è in grado di sostituire il CTAB sulla superficie AuNRs riducendo così effetti tossici e contemporaneamente agendo come protezione verso l'aggregazione. Per questo motivo, il derivato PHEA-LA-PEG-FA è stato utilizzato come agente di rivestimento, sfruttando l'affinità tra ponti disolfuro e oro. Le unità dell'acido lipoico innestate sul backbone polimerico sono infatti responsabili della forte interazione tra il polimero di rivestimento e i nanorods d'oro, consentendo la formulazione di colloidi di oro stabili in dispersioni acquose ed aumentandone la citocompatibilità.

Il farmaco antitumorale irinotecano rappresenta uno tra i chemoterapici più utilizzati nel trattamento di differenti tipologie di neoplasie, tra cui il tumore al colon ed il carcinoma polmonare a piccole cellule. Per ottenere un sistema di *Drug Delivery*, l'irinotecano è stato incorporato nello *shell* polimerico dei nanorods rivestiti mediante incubazione a temperatura ambiente. La spettroscopia VIS-NIR degli AuNRs contenenti irinotecano non ha rivelato differenze significative rispetto ai sistemi privi di farmaci (dati non mostrati). Entrambi i sistemi sono apparsi stabili in mezzo acquoso, senza alcun segno di aggregazione. La stabilità di PHEA-LA-Fol-AuNRs/Iri in seguito a caricamento del farmaco è stata valutata attraverso l'analisi spettroscopica UV-VIS.

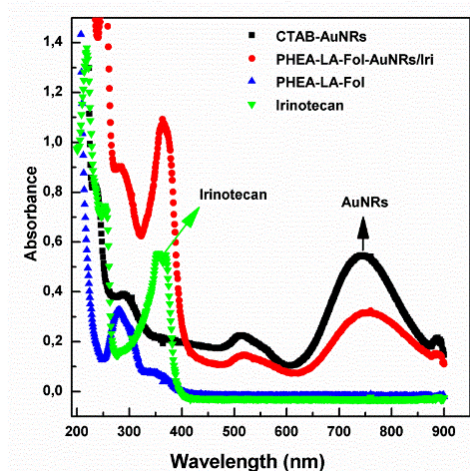


Figura 24. Spettri UV-VIS di: irinotecano base libera, PHEA-LA-PEG-FA, PHEA-LA-Fol-AuNRs/Iri

Come mostrato nella Figura 24, lo spettro di assorbimento UV-NIR di PHEA-LA-Fol-AuNRs/Iri disperso in acqua Milli-Q, non mostra segni di aggregazione, in quanto non vi è alcun significativo *red shift* o allargamento della banda di assorbimento SPR, rispetto a CTAB-AuNRs. Inoltre, è possibile apprezzare l'avvenuta incorporazione di Irinotecano, osservando il picco a 350 nm.

Il contenuto percentuale in farmaco (*drug loading%*) è stato valutato tramite analisi HPLC ed è risultato essere del 12,86% (p/p). I sistemi dotati di rivestimento polimerico sono risultati in grado di caricare una notevole quantità di farmaco, suggerendo che Il PHEA-LA-PEG-FA possiede il giusto equilibrio idrofobico-idrofilico per stabilire interazioni con il farmaco (sotto forma di base libera), così come con l'ambiente acquoso, stabilizzando così gli AuNRs. Il diametro medio idrodinamico e le misurazioni di potenziale ζ (Tabella 5) hanno mostrato che sia i sistemi vuoti che quelli con irinotecano sono nanometrici. Inoltre, l'elevato e negativo il potenziale ζ registrato, dimostra che il surfactante cationico è stato rimosso con successo dalla superficie dei nanorods garantendo contestualmente un'elevata stabilità verso l'aggregazione e la riduzione degli effetti tossici imputabili al CTAB. Non vi sono state variazioni significative tra i sistemi vuoti e quelli caricati, sia in termini di diametro medio idrodinamico che di potenziale ζ , suggerendo che l'irinotecano è presumibilmente caricato nella parte interna del rivestimento, in prossimità del nucleo d'oro, mentre le catene polimeriche agiscono come colloidali protettori idrofili, saldamente ancorati alla superficie d'oro.

Tabella 5. Diametro medio idrodinamico, potenziale ζ , contenuto in irinotecano e oro (percentuale p/p) di CTAB-AuNRs, PHEA-LA-Fol-AuNRs e PHEA-LA-Fol-AuNRs/Iri.

Campione	Z-Average (nm)	PdI	ζ potential	DL % (p/p)	Au % (p/p)
CTAB-AuNRs	78.6	0.511	14.6 \pm 3.21	-	-
PHEA-LA-Fol-AuNRs	101.6	0.469	-13.9 \pm 4.76	-	8.2
PHEA-LA-Fol-AuNRs/Iri	99.38	0.5	-21.6 \pm 5.52	12.86	4

PHEA-LA-Fol-AuNRs e PHEA-LA-Fol-AuNRs/Iri sono stati caratterizzati anche in termini di contenuto d'oro, espresso in percentuale p/p. Come illustrato nella Tabella 5, gli AuNRs vuoti e con irinotecano possiedono un contenuto d'oro sufficientemente alto da consentire una terapia fototermica efficace.

L'analisi morfologica SEM effettuata sui nanorods recanti irinotecano ha confermato la loro forma cilindrica e la loro dimensione nanometrica. La Figura 25 illustra che le dimensioni effettive di PHEA-LA-Fol-AuNRs/Iri sono inferiori al diametro idrodinamico registrato. Questi dati sono coerenti con la presenza di un guscio polimerico che circonda le particelle d'oro, stabilendo interazioni con la fase disperdente acquosa e aumentando così il diametro idrodinamico misurato mediante DLS.

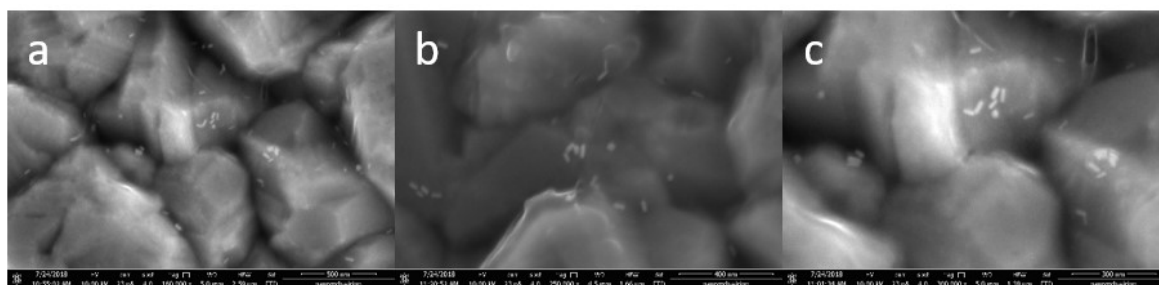


Figura 25. Microscopia SEM su PHEA-LA-Fol-AuNRs/Iri: ingrandimenti 160000X (a), 250000X (b), 300000X (c).

La valutazione della stabilità nel tempo dei sistemi contenenti irinotecano dispersi in acqua ultrapura (Figura 26), non ha mostrato segni di aggregazione, anche dopo lo stoccaggio per un mese a temperatura ambiente. In particolare, l'assenza di *red shift* e le variazioni trascurabili della larghezza della banda SPR nella regione NIR hanno dimostrato una buona stabilità chimico-fisica fino ad almeno un mese.

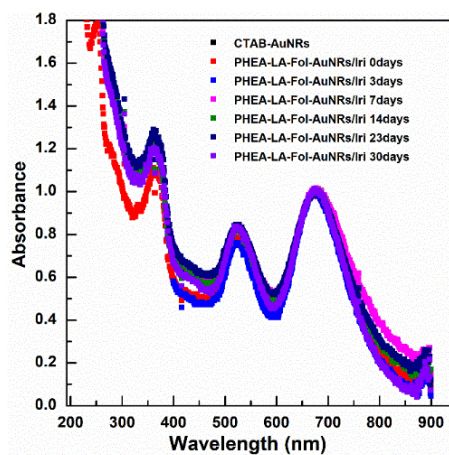


Figura 26. Studio di stabilità di PHEA-LA-Fol-AuNRs/Iri attraverso l'analisi UV-NIR nel tempo.

La capacità di PHEA-LA-Fol-AuNR/Iri di rilasciare il farmaco caricato è stata valutata utilizzando due diversi mezzi di rilascio, simulando differenti compartimenti dell'ambiente tumorale. Gli studi di rilascio sono stati effettuati in PBS pH 7.4 che simula fluidi extracellulari e citoplasmici e in tampone acetato a pH 5,5 che mima il pH leggermente acido riscontrabile in alcune zone del tumore solido, nonché nei lisosomi. La quantità di irinotecano rilasciata in ogni mezzo di rilascio è stata quantificata a intervalli di tempo stabiliti. La Figura 27 mostra la percentuale cumulativa di rilascio di irinotecano riferita alla quantità totale di farmaco caricato nei sistemi, in funzione del tempo di incubazione. È interessante notare che il sistema non ha mostrato una chiara differenza nel rilascio di chemioterapico nei due mezzi a pH differente, raggiungendo un plateau dopo 10h dopo aver liberato tra l'80-90% del farmaco, in entrambi i tamponi utilizzati. Il rilascio dell'irinotecano sembra dunque non mostrare una pH dipendenza, consentendo al sistema di liberare grandi quantità di farmaco nel sito tumorale sia nei pressi di un ambiente neutro che leggermente acido.

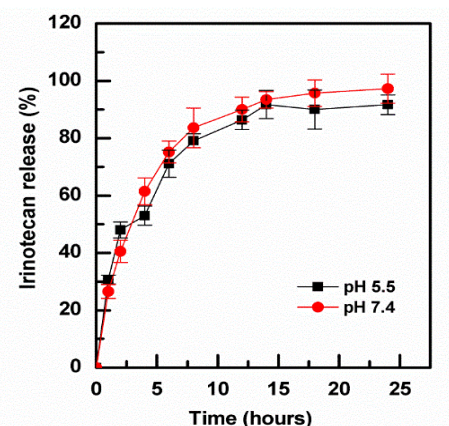


Figura 27. Rilascio irinotecano da PHEA-LA-Fol-AuNRs/Iri in PBS pH 7.4 e tampone di acetato pH 5.5.

Sfruttando la famigerata capacità degli AuNRs di convertire la luce laser NIR in calore, sono state valutate le proprietà ipertermiche dei nanostrutti preparati. Pertanto, la capacità dei sistemi rivestiti di indurre un aumento termico locale è stata studiata dopo l'irradiazione con un raggio laser a diodi, con una lunghezza d'onda vicina alla banda SPR degli AuNRs (810 nm). Sono state testate tre diverse concentrazioni di sistema per studiare la dipendenza tra la quantità di oro e la temperatura raggiunta.

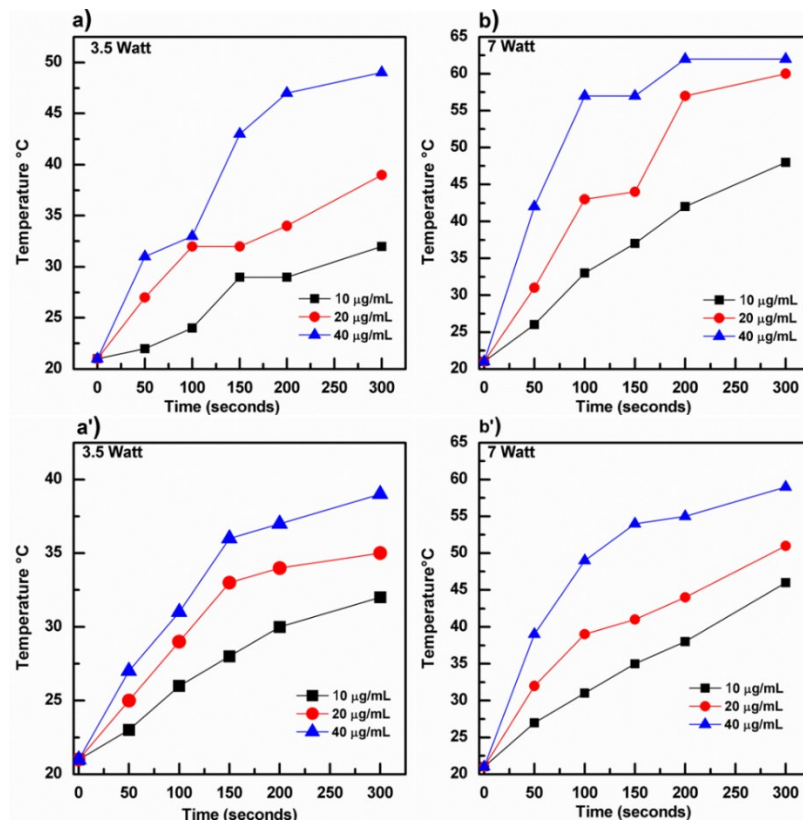


Figura 28. Studi di ipertermia in funzione del tempo di irradiazione e della concentrazione di PHEA-LA-Fol-AuNRs(a-b), PHEA-LA-Fol-AuNRs/Iri(a'-b'), usando due diverse potenze laser: 3,5 W (a-a') e 7 W (b-b').

Come riportato in Figura 28, è possibile osservare che tutti i sistemi analizzati sono in grado di causare un sostanziale aumento della temperatura dell'ambiente circostante, che raggiunge valori fino a 63 °C, generando quindi un effetto ipertermico che è funzione del tempo di irradiazione. Considerando i dati raccolti, è plausibile affermare che l'aumento della temperatura mostri entità diverse a seconda di diversi fattori. Innanzitutto, i valori di temperatura registrati sembrano aumentare all'aumentare della potenza di irraggiamento. Una tendenza analoga si osserva anche in conseguenza dell'aumento della concentrazione dei sistemi e quindi della quantità di oro impiegato. Quest'ultimo fenomeno è dovuto alla natura additiva dei contributi di ciascuna particella che porta ad un'amplificazione della risonanza plasmonica di superficie. Sebbene entrambi i sistemi mostrino un'elevata capacità ipertermica, è da notare che i nanorods PHEA-LA-Fol-AuNRs/Iri generino un aumento

termico inferiore rispetto ai sistemi vuoti, presumibilmente a causa di un effetto schermante esercitato dal farmaco contro la penetrazione dell'irradiazione o l'eccitazione dei sistemi.

3.3.3. Caratterizzazione biologica e studi *in vivo*

Studi biologici in vitro

Al fine di indagare la citotossicità dei nanosistemi preparati, è stato effettuato un test colorimetrico MTS sulla linea cellulare del cancro del colon umano HCT116. La vitalità delle cellule coltivate è stata valutata dopo 24 o 48h di incubazione con PHEA-LA-Fol-AuNRs, PHEA-LA-Fol-AuNRs/Iri e irinotecano base libera, testando concentrazioni di farmaco comprese tra 3 e 36g mL⁻¹. Come mostrato nella Figura 29, i sistemi privi di irinotecano hanno conservato la propria citocompatibilità dopo 24 ore di incubazione, con percentuali di vitalità $\geq 75\%$ per tutte le concentrazioni testate, mentre, è stato riscontrato un lieve effetto citotossico dopo incubazione di 48h, esclusivamente per le concentrazioni maggiori. Nel complesso, i nanorods recanti irinotecano hanno indotto una riduzione della vitalità cellulare leggermente più intensa rispetto all'irinotecano base libera, raggiungendo valori paragonabili dopo 48ore di incubazione con i campioni a più alta concentrazione (Figura 29b). Questa tendenza è stata confermata dal calcolo della IC50 dopo 24 e 48h e delle percentuali massime di inibizione, riportate nella Tabella 6. Sarebbe possibile supporre che la citotossicità superiore visualizzata dal PHEA-LA-Fol-AuNRs/Iri sia dovuta alla presenza del rivestimento polimerico, che potrebbe essere in grado di promuovere la permeazione del farmaco all'interno della cellula, esaltando l'efficacia dell'irinotecano.

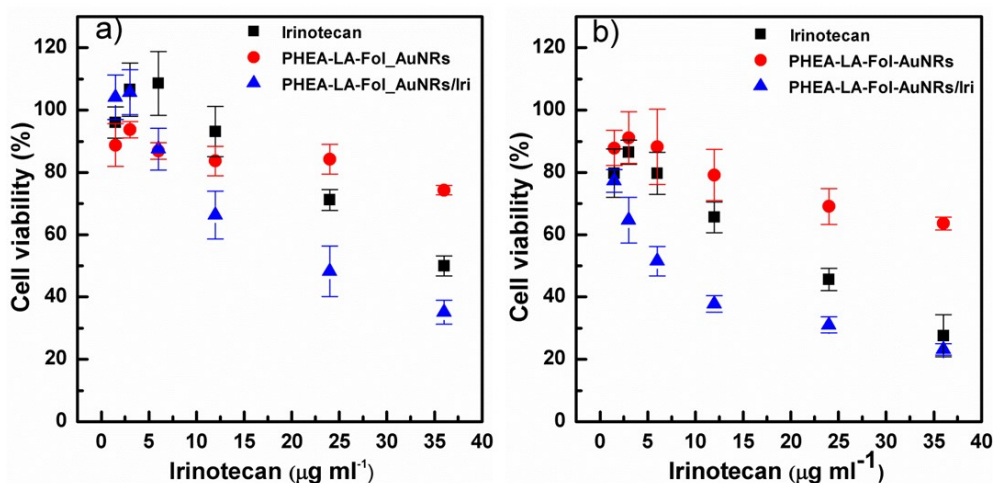


Figura 29. Vitalità% della linea cellulare HCT116 incubata con irinotecano base libera (quadrati), PHEA-LA-Fol-AuNRs (cerchi), PHEA-LA-Fol-AuNRs/Iri (triangoli) dopo 24h (a), 48h (b)

Tabella 6. Irinotecano e PHEA-LA-Fol-AuNRs/Iri IC50 dopo teste 24h e 48h sulla linea cellulare HCT116.

Campione	IC50 ^{24h} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	I% ^{24h}	IC50 ^{48h} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	I% ^{48h}
Irinotecan	35	50 \pm 1.9	21	72.5 \pm 2.1
PHEA-LA-Fol-AuNRs/Iri	21	65 \pm 3.2	7.1	76.8 \pm 1.6

Attività antitumorale in vivo e biodistribuzione

L'attuale chemioterapia manifesta costantemente la necessità di trattamenti selettivi al fine di ridurre al minimo gli effetti collaterali correlati alla somministrazione degli antineoplastici. L'uso di nanotecnologie capaci di targeting attivo, insieme all'impiego di terapie locali innovative, si promette di superare questi inconvenienti e quindi di migliorare gli esiti del trattamento. Così, l'efficacia *in vivo* dei nanorods vuoti e caricati con farmaco è stata testata, con o senza irradiazione laser, su gruppi di topi nudi atimici con innesti eterologhi (*xenografts*) di tumore al colon umano, come riassunto nella Tabella 7.

Tabella 7. Suddivisione in gruppi dei modelli animali per gli studi in vivo.

Gruppo	Campione	Via di somministrazione	Trattamento laser	Dose (mg mL^{-1})
1	Soluzione fisiologica	Intratumorale	-	-
2	Soluzione fisiologica	Intratumorale	X	-
3	PHEA-LA-Fol-AuNRs	Intratumorale	-	25*
4	PHEA-LA-Fol-AuNRs	Intratumorale	X	25*
5	PHEA-LA-Fol-AuNRs	Intraperitoneale	X	25*
6	Irinotecano	Intratumorale	-	6.5 [#]
7	Irinotecano	Intratumorale	X	6.5 [#]
8	PHEA-LA-Fol-AuNRs/Iri	Intratumorale	-	50* [#]
9	PHEA-LA-Fol-AuNRs/Iri	Intratumorale	X	50* [#]
10	PHEA-LA-Fol-AuNRs/Iri	Intraperitoneale	X	50* [#]

*Equivalente a 4 mg Kg^{-1} di nanorods di oro. [#]Equivalente a 12.8 mg Kg^{-1} di irinotecano.

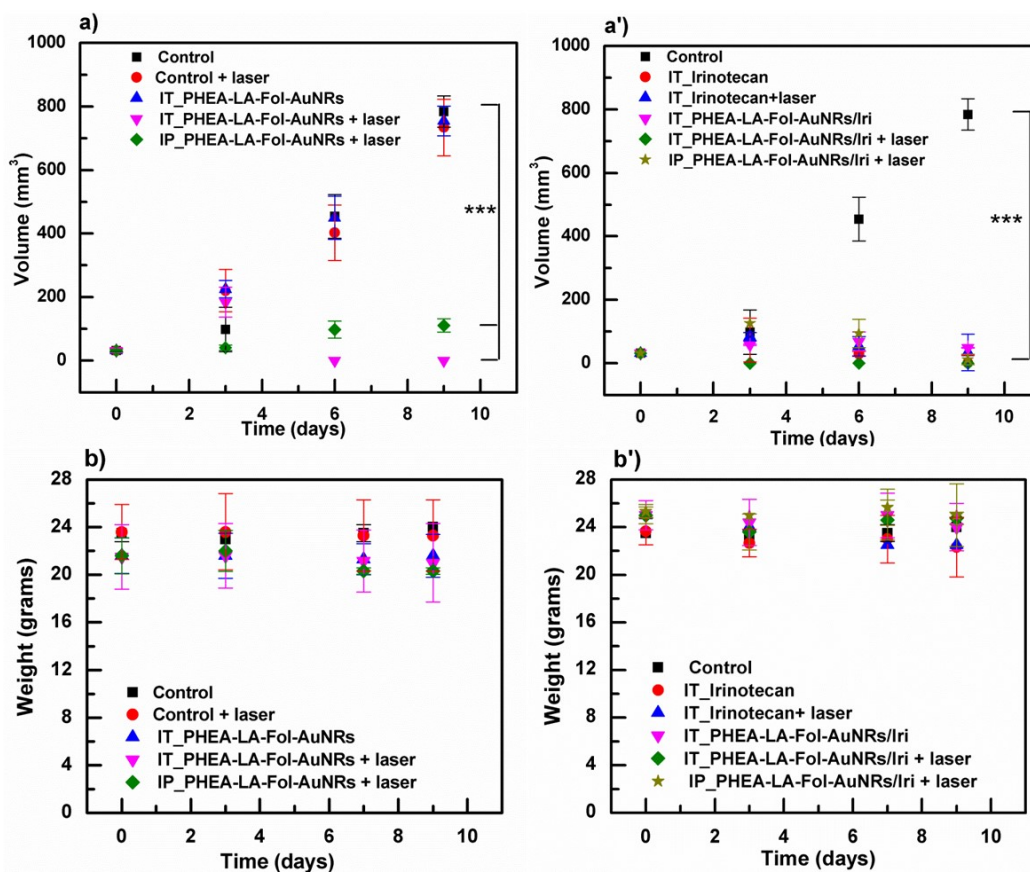


Figura 30. Volumi degli xenografts (a-a') e pesi corporei (b-b') dei topi dopo trattamento con nanorods senza irinotecano (a-b) e nanorods con irinotecano (a'-b')

La risposta al trattamento è stata monitorata registrando i pesi corporei e i volumi tumorali dei topi per l'intera durata degli esperimenti.

È interessante notare che tutti i gruppi studiati non hanno mostrato alcun cambiamento significativo nel peso corporeo (Figura 30b-b'), indicando l'assenza di tossicità grave acuta durante l'intero esperimento. La Figura 30a illustra un aumento dei volumi del tumore misurato in tutti i gruppi di controllo, compresi i topi trattati con nanorods privi di farmaci, ma senza irradiazione laser. Al contrario, è stata osservata una diminuzione della crescita tumorale statisticamente significativa in entrambi i gruppi trattati con i sistemi a base di oro (somministrazione intratumorale ed intraperitoneale) che hanno ricevuto il trattamento laser, ottenendo l'eradicazione completa del tumore al giorno 6, dopo l'iniezione intratumorale di PHEA-LA-Fol-AuNRs.

Tali dati dimostrano che i sistemi rivestiti possono esercitare un effetto terapeutico considerevolmente rilevante, anche senza farmaco chemioterapico. Questi risultati, non solo sottolineano le straordinarie proprietà ipertermiche PHEA-LA-Fol-AuNRs, ma suggeriscono anche il loro potenziale uso nel trattamento del cancro del colon evitando

effetti collaterali correlati ai farmaci. Inoltre, una sostanziale decelerazione nella progressione del tumore è stata registrata dopo il trattamento laser dei topi che hanno ricevuto l'iniezione intratumorale, così come la somministrazione intraperitoneale. L'efficacia ipertermica dei nanorods privi di irinotecano dopo la somministrazione parenterale, indica la capacità delle nanostrutture di raggiungere il sito bersaglio. Questo ritrovamento è probabilmente attribuibile ad un contributo di due fattori principali. In primo luogo, la dimensione nanometrica dei sistemi proposti sarebbe in grado di consentire un targeting passivo. In secondo luogo, le molecole di folato introdotte nel polimero di rivestimento potrebbero fornire un targeting attivo verso il sito tumorale. Tutti i sistemi caricati con l'irinotecano testati sono stati in grado di contrastare la crescita dello xenograft, come mostrato nella Figura 30a', ottenendo ancora una volta l'eradicazione completa della massa cancerosa al giorno 3, dopo l'iniezione intratumorale di PHEA-LA-Fol-AuNRs/Iri. Tuttavia, non sono state registrate differenze significative nei volumi tumorali tra il gruppo trattato esclusivamente con irinotecano ed i gruppi che hanno ricevuto la somministrazione PHEA-LA-Fol-AuNRs/Iri. Inoltre, i nanorods caricati con farmaco sembrano avere un'efficacia simile, indipendentemente dal trattamento laser, mostrando risultati paragonabili a quelli ottenuti con il farmaco libero. Entrambe queste prove potrebbero suggerire che il dosaggio irinotecano scelto per questi studi fosse già sufficiente per promuovere un massiccio rallentamento nell'espansione del tumore, e per tale ragione non è stato possibile verificare il potenziale effetto sinergico della chemioterapia e ipertermia in base ai dati ottenuti.

Per confermare ulteriormente l'efficacia della termoblazione assistita dal laser, la riduzione del volume dei tumori è stata seguita qualitativamente attraverso risonanza magnetica nucleare (MRI). La Figura 31 mostra le scansioni MRI in sezione trasversale di un topo utilizzato nello studio, mostrando lo xenograft e la sua diminuzione di volume nel tempo. Al termine dell'iniezione intratumorale di PHEA-LA-Fol-AuNRs/Iri (freccie rosse nel pannello B), i topi sono stati trattati per 20 secondi con un raggio laser da 7Watt, irradiando con attenzione l'area tumorale colpita, come illustrato nel pannello C. Le scansioni MRI sono state poi acquisite 1 e 4 giorni dopo il trattamento laser (rispettivamente Figure 31D e 31E).

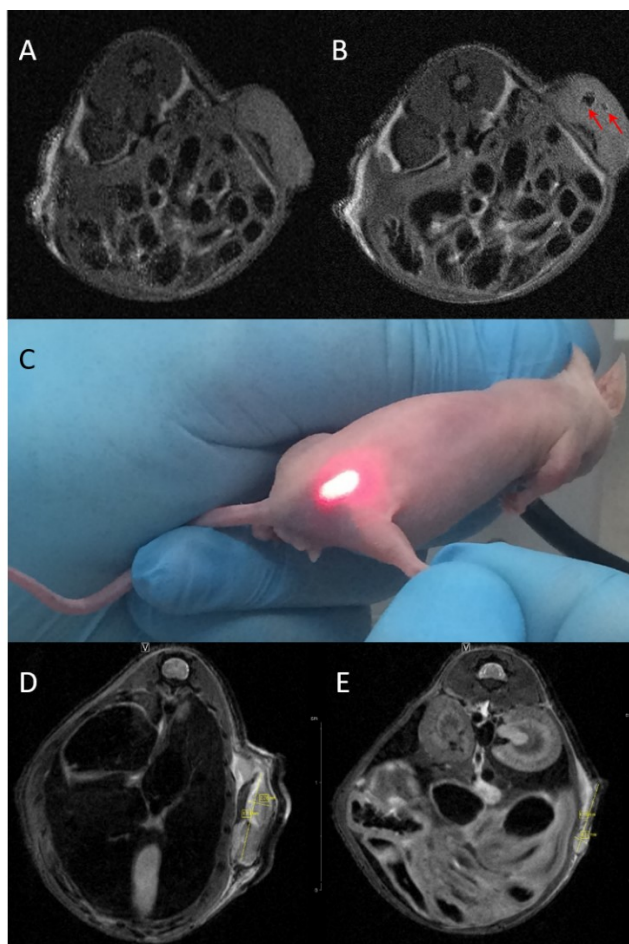


Figura 31. Scansioni T2-weighted di un topo recante xenograft di cancro al colon prima del trattamento (A), dopo iniezione intratumorale di PHEA-LA-Fol-AuNRs/Iri (B), 1 giorno dopo irradiazione laser (D) e 4 giorni dopo irradiazione laser (E). Il pannello C mostra la procedura del trattamento laser effettuato in seguito a somministrazione dei nanosistemi.

Una significativa e progressiva riduzione delle dimensioni del tumore è chiaramente visibile dal primo giorno dopo l'irradiazione laser, con volumi tumorali in netto calo alla fine dell'esperimento.

Infine, sono stati condotti studi di biodistribuzione dell'irinotecano libero e dei nanorods caricati con irinotecano per studiare il loro destino del farmaco 24h e 48h dopo la somministrazione intraperitoneale. La quantità di irinotecano in cuore, reni, polmoni, milza, fegato e tumore è stata esplorata attraverso l'analisi HPLC ed espressa come nanogrammi di farmaco per grammo di organo (Figura 32).

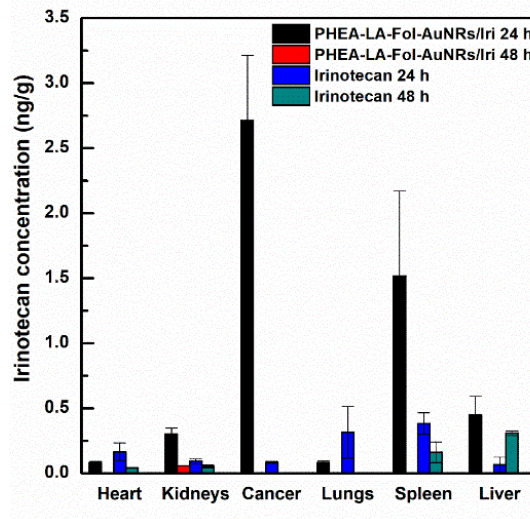


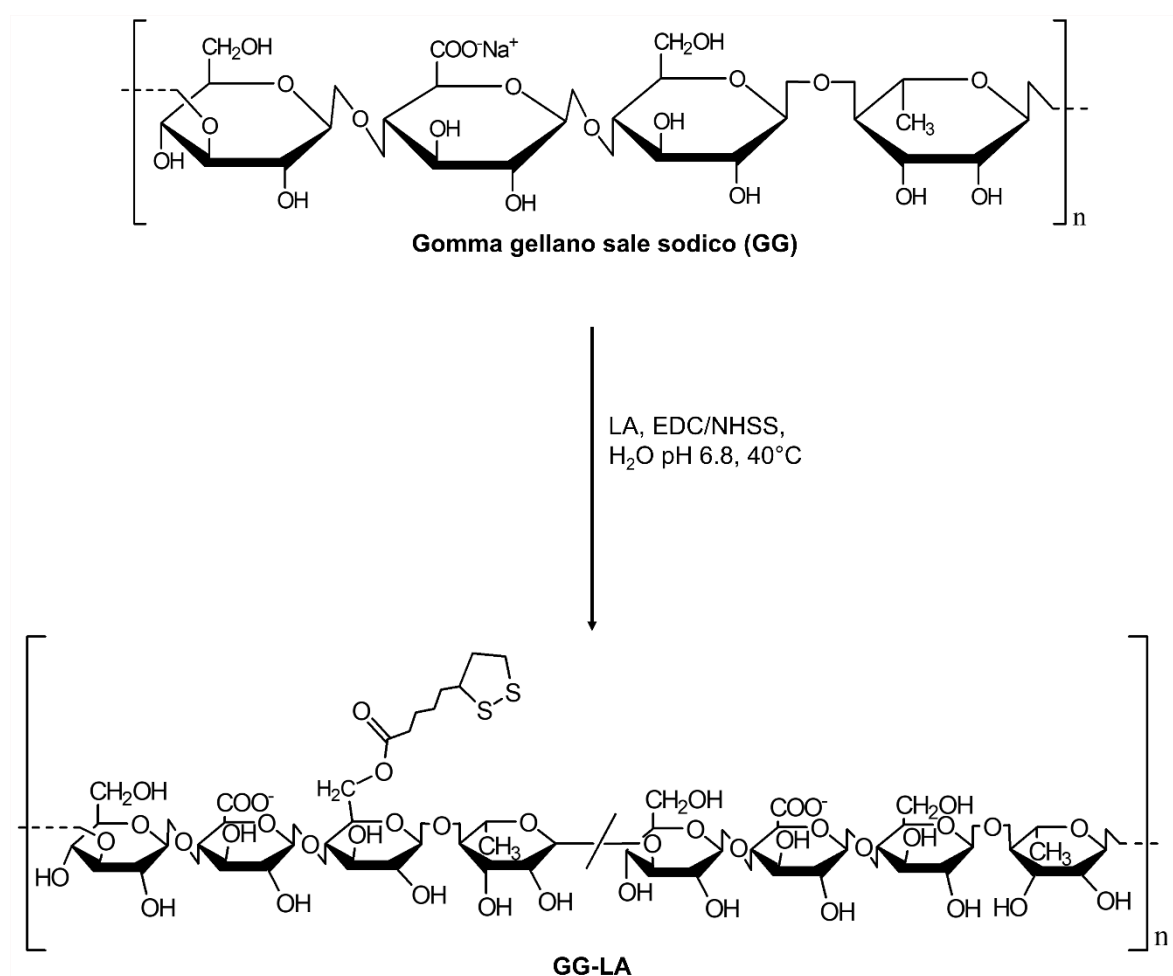
Figura 32. Biodistribuzione dell'irinotecano 24h e 48h dopo l'iniezione intraperitoneale di Irinotecano e PHEA-LA-Fol-AuNRs/Iri.

Come previsto, la più alta quantità di farmaco (2,7 ng/g) è stata ritrovata nel tumore, 24 h dopo l'iniezione di PHEA-LA-Fol-AuNRs/Iri, sottolineando la capacità dei nanorods di accumularsi preferibilmente negli xenograft tumorali. Come atteso, la biodistribuzione dopo 24h ha registrato valori considerevoli anche in milza e fegato. Questi due risultati suggeriscono fortemente che PHEA-LA-Fol-AuNRs/Iri potrebbe essere in grado di liberare irinotecano nei distretti corporei in seguito a direccionamento passivo. In particolare, i siti di biodistribuzione più rilevanti coincidono con quelli che presentano una vascolatura discontinua, che è nota per consentire la permeazione passiva delle particelle nanometriche. D'altra parte, basse concentrazioni di farmaco sono state rilevate nei tumori escissi 24 ore dopo l'iniezione di irinotecano, mentre milza e polmoni sono risultati i principali siti di accumulo. L'irinotecano non è stato rilevato a 48h dopo somministrazione di PHEA-LA-Fol-AuNRs/Iri, in qualsiasi campione analizzato, tranne che nei reni. Una possibile spiegazione potrebbe essere l'insorgenza di idrolisi del farmaco mediata da carbossilesterasi. Come riportato altrove (Sanghani et al., 2003; Wang et al., 2018) gli enzimi carbossilesterasi non si trovano esclusivamente nel fegato e sono ampiamente espressi in altri distretti come il colon, il cuore, i reni e il tessuto tumorale del colon umano. È ragionevole supporre che l'elevata quantità di irinotecano rilevata nel tumore al primo giorno sia stata rapidamente idrolizzata da tali enzimi durante le 24 ore successive. Una tendenza simile è apprezzabile nel resto degli organi analizzati.

3.4. Gold nanorods con rivestimento polimerico polisaccaridico per la terapia fototermica del cancro al colon

3.4.1. Sintesi e caratterizzazione di GG-LA

Per poter ottenere un confronto tra le caratteristiche chimico-fisiche e l'efficacia ipertermica di nanorods di oro stabilizzati mediante diversi agenti di rivestimento, è stato innanzitutto sintetizzato il derivato estereo GG-LA a partire dal polisaccaride naturale gomma gellano (GG; 50KDa) sotto forma di sale sodico.



Schema 4. Schema di sintesi del derivato GG-LA

La sintesi del derivato GG-LA è stata condotta in ambiente acquoso a temperatura e pH controllati (Schema 4).

Per disperdere il GG in acqua bidistillata sono stati effettuati 3 cicli di sonicazione/agitazione alla temperatura di 40°C. La dispersione del GG ad alto peso molecolare richiede di norma temperature medio-elevate (90°C), ma in questo caso, il peso molecolare ridotto del

polimero di partenza ne ha aumentato la maneggevolezza, consentendone la dispersione in condizioni più blande. L'acido lipoico (LA) è stato posto in acqua bidistillata e la sua solubilizzazione è stata incentivata aumentando il pH fino al valore di 6.8. La scelta del rapporto molare tra LA e unità ripetitive di GG pari a 0.3, è stata effettuata in modo da garantire un adeguato quantitativo di ponti disolfuro disponibili a stabilire un legame con la superficie dell'oro. L'attivazione dei gruppi carbossilici dell'acido lipoico è stata condotta via carbodiimmide, tramite l'aggiunta dei reattivi EDC·HCl e NHSS e la formazione del legame estereo è avvenuta quindi a pH 6.8, mantenendo il pallone di reazione a 40°C per 18h.

Le sostanze non reagite sono state allontanate per mezzo di dialisi contro acqua e la purificazione del prodotto è stata ultimata tramite cromatografia di permeazione su gel mediante resina Sephadex. Il derivato GG-LA, recuperato in seguito a freeze-drying, è stato caratterizzato mediante spettroscopia ^1H NMR (Figura 33).

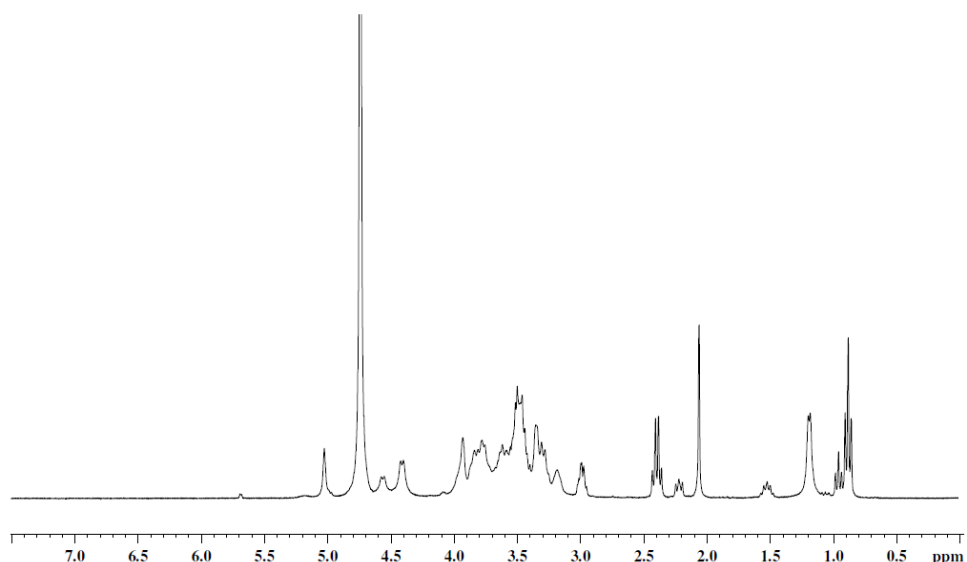


Figura 33. Spettro ^1H NMR del derivato GG-LA, $\text{D}_2\text{O}/\text{NaOD}$, 300MHz.

Il campione è stato solubilizzato in acqua deuterata addizionata di NaOD per permettere al derivato di assumere una conformazione più dispiegata e facilitare la risonanza di protoni delle funzionalità di acido lipoico innestate. Il calcolo del rapporto tra gli integrali dei picchi relativi ai 2H dell'acido lipoico (δ 1.97 -cCH-CH₂-CH₂-S-S-) e ai 3H del GG (δ 1.2, CH₃ ranmosio) ha restituito un grado di funzionalizzazione percentuale molare pari al 20%.

Il peso molecolare medio del copolimero GG-LA è stato valutato mediante analisi SEC in fase mobile acquosa tamponata a pH 9 (Tabella 8).

Tabella 8. Dati analisi SEC relativi al GG sale sodico e al derivato GG-LA

Campione	Mw (Da)	Mn (Da)	PDI
GG sale sodico	43600	31500	1.38
GG-LA	70600	54412	1.3

I valori registrati risultano in accordo con l'avvenuta funzionalizzazione delle catene di GG sale sodico.

3.4.2. Preparazione e caratterizzazione dei AuNRs rivestiti

Come detto in precedenza, il tensioattivo cationico CTAB utilizzato nella sintesi dei nanorods possiede un'elevatissima azione stabilizzante nei confronti di tali colloidali liofobi, ma la sua tossicità ne esclude l'utilizzo nel *drug delivery*. Da qui nasce l'esigenza di rivestire i nanosistemi di oro con molecole e macromolecole in grado di stabilizzarli fisicamente ed al contempo migliorarne le caratteristiche di citocompatibilità, consentendone un utilizzo in ambito biomedico.

Il primo agente di rivestimento impiegato in questo studio è rappresentato dall'acido lipoico, molecola naturale la cui struttura è caratterizzata dalla presenza di un ponte disolfuro intraciclico e di un gruppo funzionale carbossilico. La procedura di preparazione dei sistemi AuNRs/LA ha previsto l'incubazione dei AuNRs sintetizzati e lavati dal tensioattivo, con acido lipoico (rapporto molare Au/LA 1:2), in presenza di un ambiente riducente per aggiunta di glucosio. La coppia redox tiolo/disolfuro è stata in questo caso adoperata per ottenere un'interazione stabile con la superficie di oro.

Secondo dati riportati in letteratura (Picone et al., 2011), i geli di gomma gellano preparati in ambiente basico presentano un ridotto numero di zone di giunzione. Tale affermazione equivale a dire che le maglie dei geli prodotti risultano più lasse con l'aumentare del pH, effetto dovuto alla maggiore forza repulsiva elettrostatica esercitata dalle catene di GG. Per queste ragioni, si è indagata la possibilità di effettuare il rivestimento dei nanorods in ambiente basico, in modo da consentire un aumento della mobilità delle catene del polisaccaride e ridurre al minimo i fenomeni di aggregazione.

Pertanto, in vista del successivo rivestimento con GG, sono stati effettuati degli studi sul sistema AuNRs/LA in presenza o in assenza di tampone TRIS e a due diversi pH. Questo studio ha avuto come scopo la delineazione delle condizioni di rivestimento con acido

lipoico in grado di preservare la stabilità dei nanosistemi e che, allo stesso tempo, possano permettere al GG di mantenere una conformazione dispiegata durante la fase di *coating*. I profili UV-NIR dei CTAB-NRs acquisiti in dispersione a pH 5, 7, 9.5 ed usati come controllo, non hanno segnalato alcun segno di variazione, risultando sovrapponibili per tutte le analisi condotte (dati non mostrati). Partendo da questo studio preliminare, si è proceduto alla preparazione di AuNRs/LA a vari pH (Figura 34).

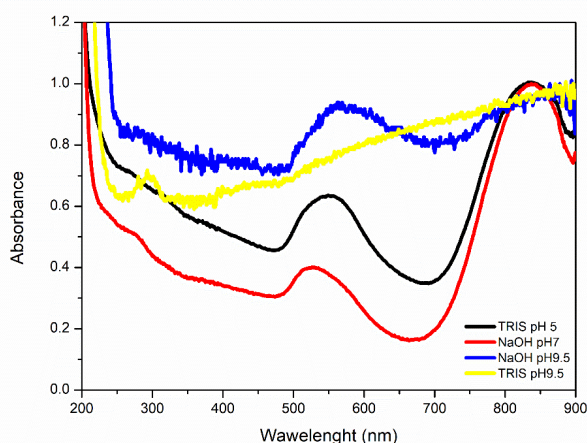


Figura 34. Confronto tra gli spettri VIS-NIR di AuNRs/LA dispersi in TRIS a pH 5, NaOH pH 7, NaOH a pH 9.5 e TRIS a pH 9.5.

I dati spettroscopici hanno indicato che i AuNRs/LA si mantengono stabili in dispersione acquosa neutra, mentre registrano solo un lieve decremento della stabilità in dispersione acidula tamponata per mezzo di TRIS a pH 5, non mostrando però evidenti segni di aggregazione o appiattimento del picco plasmonico. Al contrario, la destabilizzazione risulta evidente a pH 9.5, sia in tampone TRIS che in acqua basificata tramite NaOH. I risultati ottenuti hanno spinto a scartare la possibilità di impostare la procedura di rivestimento a pH basici, orientando la conduzione degli esperimenti successivi ad un pH di compromesso (pH 7), in modo da minimizzare la destabilizzazione dei sistemi.

Per calcolare il quantitativo di acido lipoico che ha interagito con la superficie dei nanorods di oro è stata effettuata una preparazione di AuNRs/LA utilizzando LA marcato con la sonda fluorescente TexasRed Hydrazide (TRH).

È stata eseguita dunque una procedura di preparazione analoga a quella appena descritta, ma condotta tramite l'impiego del derivato LA-TRH, ottenuto mediante reazione via carbodiimmide tra il gruppo carbossilico dell'acido lipoico e il gruppo idrazidico della

sonda. Il sistema ottenuto, siglato AuNRs/LA-TRH è stato utilizzato per la quantificazione in fluorescenza delle funzionalità di LA, confrontando i valori di intensità registrati con una curva di calibrazione ottenuta con standard di TRH. Il contenuto di acido lipoico calcolato è risultato pari al 20% in peso rispetto all'oro.

Il sistema AuNRs/LA così ottenuto a pH 7 è stato rivestito ulteriormente con gomma gellano, sfruttandone i numerosi gruppi ossidrilici per stabilire interazioni fisiche con l'acido lipoico e la superficie dell'oro. La funzionalizzazione del sistema AuNRs/LA con gomma gellano è stata condotta tramite semplice incubazione di AuNRs/LA con una dispersione polimerica acquosa a pH 7 portando alla formazione dei sistemi AuNRs/LA,GG. L'aggiunta della gomma gellano al sistema è nata dall'intento di stabilizzare ulteriormente il sistema, di migliorarne il profilo di citocompatibilità e di consentire un eventuale caricamento di molecole bioattive per il raggiungimento di una terapia combinata.

I sistemi AuNRs/GG-LA sono stati invece preparati direttamente tramite incubazione del pellet di nanorods ottenuto in seguito a rimozione del CTAB, con una dispersione polimerica di GG-LA in acqua bidistillata a pH 7 ed in presenza di glucosio.

Uno studio sul corretto stoccaggio dei sistemi è stato condotto effettuando dei test di liofilizzazione/ridispersione in acqua bidistillata dei sistemi prodotti e valutandone la stabilità mediante analisi UV-NIR (Figura 35)

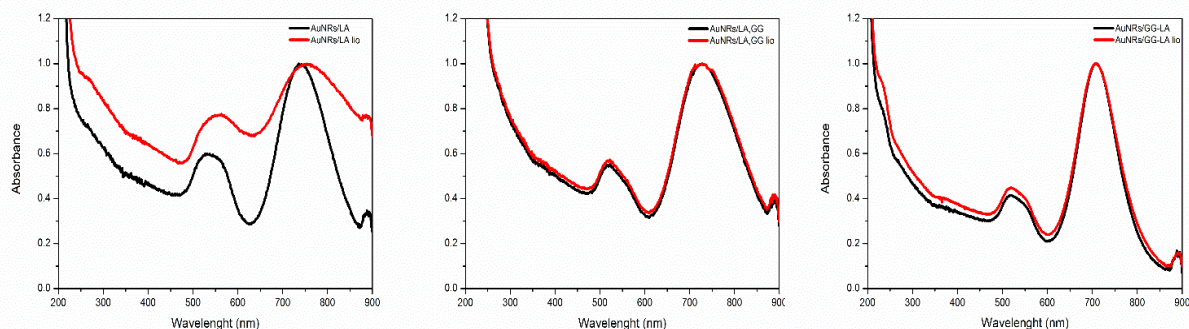


Figura 35. Spettri VIS-NIR prima (nero) e dopo freeze-drying (rosso) dei sistemi in dispersione acquosa AuNRs/LA (sinistra), AuNRs/LA,GG (centro) e AuNRs/GG-LA (destra).

I sistemi AuNRs/LA hanno mostrato una destabilizzazione evidente in seguito a liofilizzazione e ridispersione in mezzo acquoso, indicando l'impossibilità di conservazione allo stato secco. Invece, è possibile notare come entrambi i sistemi contenenti gomma gellano, sia in forma immodificata che derivatizzata, presentino un'ottima stabilità in seguito a ridispersione del prodotto liofilizzato. Questi ritrovamenti indicano che la presenza di gomma gellano possa agire da agente crioprotettore nei confronti dei costrutti proposti. Di conseguenza si può affermare che AuNRs/LA,GG e AuNRs/GG-LA possono essere

agevolmente conservati allo stato secco, caratteristica che ne incrementa la maneggevolezza e garantisce una facile somministrazione in seguito a ridispersione estemporanea.

La stabilità in dispersione acquosa dei sistemi AuNRs/LA, AuNRs/LA,GG e AuNRs/GG-LA è stata valutata tramite analisi UV ad intervalli di 7 giorni e per la durata totale di un mese.

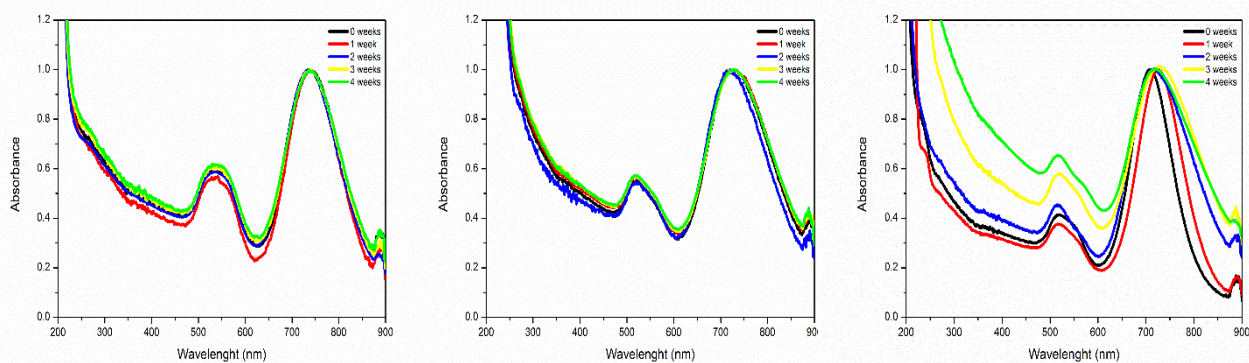


Figura 36. Spettri VIS-NIR acquisiti ogni 7 giorni per un periodo di un mese dei sistemi in dispersione acquosa AuNRs/LA (sinistra), AuNRs/LA,GG (centro) e AuNRs/GG-LA (destra).

Dalla Figura 36 si nota come i sistemi AuNRs/LA e AuNRs/LA,GG risultino stabili durante tutto il tempo di analisi, non registrando variazioni significative in termini di spostamento o allargamento del picco plasmonico longitudinale. Al contrario, i nanostrutture AuNRs/GG-LA mostrano segni di destabilizzazione già al termine della prima settimana di incubazione. L'aggregazione dei sistemi appare sempre più pronunciata con il trascorrere del tempo, segnalando un allargamento della banda plasmonica contestuale alla diminuzione del rapporto di assorbanza tra il picco di risonanza plasmonica longitudinale (circa 700nm) e quello trasversale (circa 516nm), confermando la progressiva destabilizzazione del sistema. Questo ritrovamento denota l'impossibilità di conservare il sistema AuNRs/GG-LA in dispersione.

I nanorods prodotti sono stati successivamente caratterizzati in termini di diametro idrodinamico e potenziale ζ (Tabella 9).

I valori dei diametri idrodinamici risultano in accordo con le previsioni. Si nota come la serie CTAB-AuNRs, AuNRs/LA, AuNRs/LA,GG, AuNRs/GG-LA presenti dimensioni crescenti, con diametri concordi al progressivo rivestimento. Dal confronto tra i sistemi AuNRs/LA,GG, AuNRs/GG-LA, si è visto che il sistema rivestito con il derivato GG-LA presenta un diametro idrodinamico superiore. Questo risultato è probabilmente da attribuire

alla lieve tendenza all'autoaggregazione del copolimero GG-LA, il quale può portare ad un aumento di dimensioni del sistema.

Tabella 9. Misure di DLS e potenziale ζ di CTAB-AuNRs, AuNRs/LA, AuNRs/LA,GG e AuNRs/GG-LA

Campione	Size (nm)	PDI	Potenziale ζ (mV)
CTAB-AuNRs	61.1	0.55	41 ± 12.1
AuNRs/LA	97.5	0.64	19.5 ± 6.76
AuNRs/LA,GG	146.7	0.50	-17.1 ± 4.96
AuNRs/GG-LA	173	0.47	-25.6±5.77

I dati di potenziale ζ confermano le ipotesi formulate. Infatti, si nota come il potenziale elettrico di superficie diminuisca in accordo con il rivestimento, passando da valori fortemente positivi per il sistema rivestito da tensioattivo cationico, e diminuendo in seguito a funzionalizzazione dei AuNRs con LA. Con il successivo rivestimento ad opera di gomma gellano, si riporta infine un'inversione di segno del potenziale ζ , che aumenta in valore assoluto per il costruito AuNRs/GG-LA. I dati raccolti indicano che i nanorods di partenza sono stati rivestiti con successo.

È stato condotto uno studio sistematico per valutare le capacità ipertermiche dei nanorods di oro in seguito a rivestimento. Per tale scopo, sono state registrate le variazioni di temperatura di dispersioni di AuNRs/LA, AuNRs/LA,GG e AuNRs/GG-LA in seguito a trattamento con luce laser fredda (810nm), in funzione del tempo di irradiazione. Lo studio ha preso in esame 3 diverse concentrazioni di nanosistemi (10, 20, 35 $\mu\text{g/ml}$ di oro) sottoposte ad irraggiamento con luce laser impostata a 3 differenti potenze (3,5 $\times 10^{-3}$, 7 $\times 10^{-3}$, 14 $\times 10^{-3}$ W/mm³), al fine di analizzare l'innalzamento termico anche in funzione della concentrazione di oro e dell'energia somministrata (Figura 37)

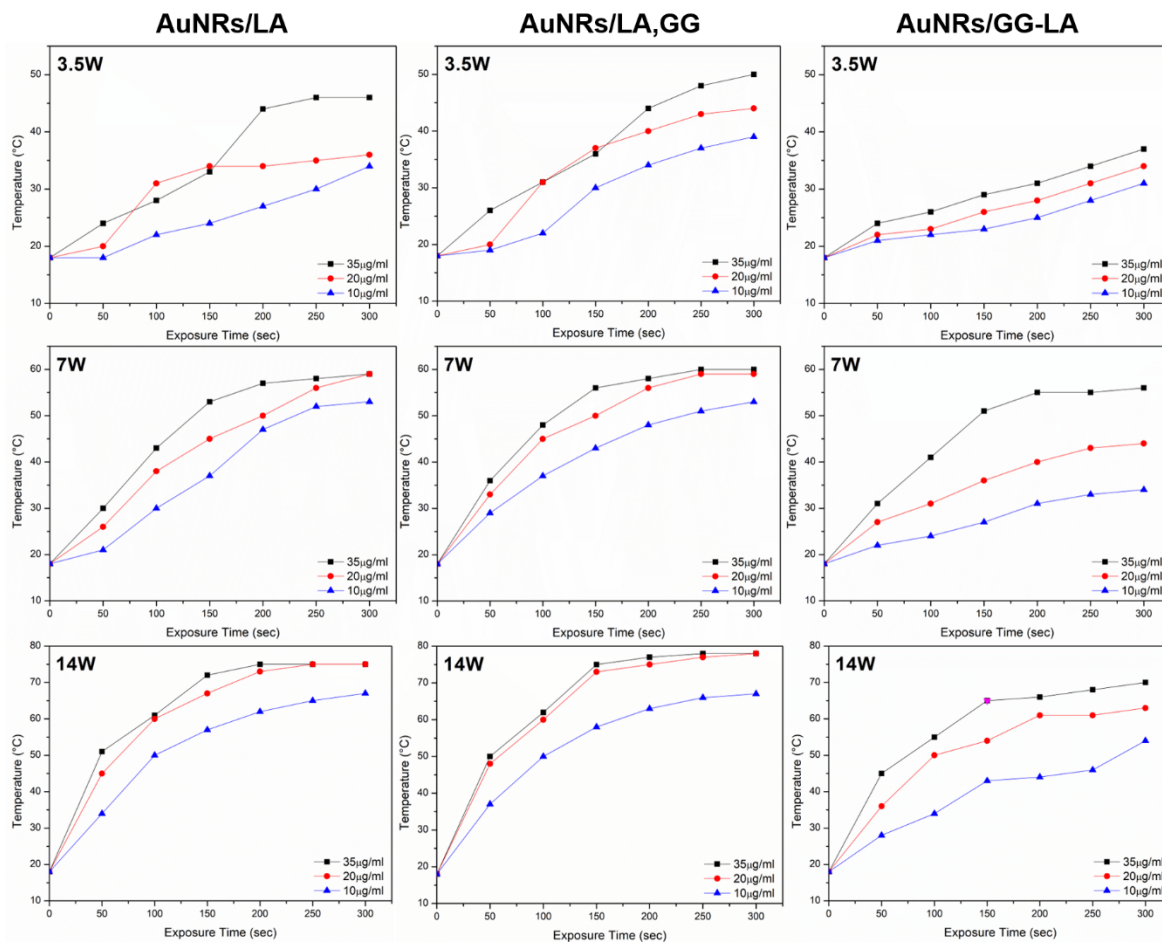


Figura 37. Curve di rialzo termico tempo-dipendente di dispersioni acquose di AuNRs/LA (sinistra), AuNRs/LA,GG (centro), AuNRs/GG-LA (destra) alle concentrazioni di 35, 20 e 10 µg/ml, esposte a una sorgente laser di 810 nm con $3,5 \times 10^{-3}$, 7×10^{-3} e 14×10^{-3} W/mm² di potenza fino ad un tempo di esposizione di 300 secondi.

In linea generale, le curve di innalzamento termico di AuNRs/LA e AuNRs/LA,GG si rivelano abbastanza simili a parità di concentrazione e potenza impostata. I campioni AuNRs/GG-LA, seppur in grado di raggiungere temperature appropriate all'utilizzo in ipertermia oncologica per potenze $\geq 7 \times 10^{-3}$ W/mm², registrano una capacità di aumentare la temperatura del mezzo circostante lievemente inferiore. Tale ritrovamento potrebbe essere spiegato dalla presenza di GG-LA, potenzialmente in grado di assumere una conformazione meno dispiegata rispetto al sale sodico del GG, fungendo da schermo nei confronti dell'irraggiamento laser. Questo ridurrebbe l'energia assorbita dai sistemi, diminuendo di conseguenza la sua trasformazione in energia termica.

Si può affermare che al termine delle analisi effettuate a $3,5 \times 10^{-3}$ W/mm², solo i sistemi AuNRs/LA e AuNRs/LA,GG a più alta concentrazione hanno mostrato di raggiungere temperature utili per la terapia fototermica (45°C e 50°C, rispettivamente per i due costrutti),

al contrario di ciò che avviene per AuNRs/GG-LA, i quali raggiungono la temperatura massima di 37°C. Le temperature registrate durante le analisi condotte a $7 \times 10^{-3} \text{ W/mm}^3$ si rivelano invece ottimali per il trattamento ipertermico per AuNRs/LA e AuNRs/LA,GG a tutte le concentrazioni testate, e per la sola concentrazione di 35µg/ml nel caso dei AuNRs/GG-LA. Infine, la massima potenza indagata ($14 \times 10^{-3} \text{ W/mm}^3$) ha restituito valori di innalzamento termico fin troppo elevati per AuNRs/LA e AuNRs/LA,GG, attestandosi tra i 75 e gli 80°C. Ancora una volta, AuNRs/GG-LA ha dimostrato un effetto ipertermico più blando, toccando i 70°C alla concentrazione massima analizzata e mantenendosi nel range adatto al trattamento ipertermico per le restanti concentrazioni. Alla luce dei dati raccolti, si è dedotto che la potenza di $7 \times 10^{-3} \text{ W/mm}^3$ sia la più adeguata all'ottenimento un trattamento efficace alle concentrazioni utilizzate, senza incorrere in possibili effetti collaterali dovuti all'eccessivo innalzamento termico indotto.

3.4.3. Studi *in vitro*

La citocompatibilità dei sistemi prodotti è stata testata sulla linea cellulare di cancro al colon umano (HCT116) mediante il saggio MTS. In particolare, è stata misurata l'attività metabolica delle cellule in seguito ad incubazione per 24h (Figura 38a) o 48h (Figura 38b) con le tre tipologie di nanorods rivestiti.

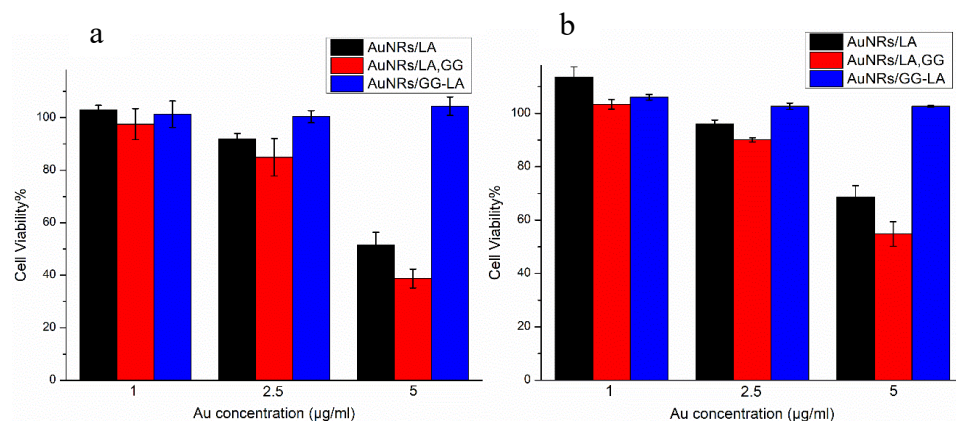


Figura 38. Vitalità cellulare della linea HCT116 incubata per 24 o 48h con AuNRs/LA (nero), AuNRs/LA,GG (rosso), AuNRs/GG-LA (blu) alle concentrazioni di oro pari a 1, 2,5 e 5µg/ml.

Tutti i nanorods testati appaiono citocompatibili alle concentrazioni di 1 e 2,5µg/ml e per entrambi i tempi indagati. I campioni AuNRs/LA e AuNRs/LA,GG mostrano una tossicità medio-moderata alla concentrazione di 5µg/ml, registrando il valore minimo di vitalità cellulare dopo incubazione di 24h con AuNRs/LA,GG, pari a circa il 40% rispetto al

controllo di cellule non trattate. Del tutto diverso è l'effetto esercitato dal campione rivestito con il derivato GG-LA per il quale non si apprezzano variazioni significative della vitalità cellulare per ognuna delle concentrazioni testate, sia dopo 24h che dopo 48h, registrando costantemente alti valori di citocompatibilità. Questo ritrovamento potrebbe essere attribuibile alla tipologia del rivestimento di questi carrier. Si potrebbe ipotizzare che il derivato che riveste AuNRs/GG-LA, sia in grado di formare uno *shell* compatto sulle nanoparticelle, che porta ad una riduzione delle interazioni con le cellule e conduce a valori di vitalità cellulare quasi sovrapponibili ai valori di controllo. Il confronto tra AuNRs/LA e AuNRs/LA,GG, ha restituito valori comparabili che si attestano tra l'85% ed il 110% rispetto al controllo di cellule non trattate, alle concentrazioni di 1 e 2,5µg/ml e per tutta la durata di analisi. Un risultato interessante è stato però evidenziato durante l'analisi dopo 48h di incubazione. La tossicità incipiente riscontrata dopo 24h di incubazione sembra subire un calo nelle 24h ore successive, anche per i campioni a concentrazione maggiore. Infatti, i dati raccolti dopo 48h mostrano come tutte le vitalità cellulari appaiano in ascesa rispetto al primo tempo di analisi. I risultati ottenuti potrebbero suggerire che al momento del contatto con i costrutti, le cellule possano subire uno shock che viene manifestato attraverso un calo dell'attività metabolica. Questa fase di assestamento appare però passeggera, in quanto successivamente, le cellule in coltura sembrano avviare una fase ripresa dell'attività metabolica che tende al ripristino delle condizioni iniziali. I dati di citocompatibilità raccolti risultano incoraggianti poiché suggeriscono che si possano minimizzare gli effetti collaterali a carico delle popolazioni cellulari che non sono bersaglio della terapia, in seguito ad un'eventuale somministrazione parenterale.

Gli studi di ipertermia terapeutica sono stati condotti per una durata totale di 100 secondi fissando la potenza del laser a diodi a $10 \times 10^{-3} \text{ W/mm}^3$ su campioni alle concentrazioni di 2.5 e 5µg/ml di oro. Tali valori sono stati selezionati facendo riferimento al precedente studio di ipertermia con lo scopo massimizzare l'efficacia ipertermica, minimizzando al contempo gli effetti indesiderati che potrebbero scaturire in seguito a un innalzamento termico eccessivo. Pertanto, al fine di verificare l'adeguatezza dei parametri operativi scelti e di registrare le temperature effettive raggiunte, sono stati eseguiti nuovi studi di ipertermia riproducendo l'assetto dell'esperimento cellulare, ma in assenza di colture cellulari. In particolare, i campioni AuNRs/LA, AuNRs/LA,GG e AuNRs/GG-LA (2.5 e 5µg/ml di oro) sono stati posti in piastre da 24 pozzetti e irradiati tramite laser (100 sec, $10 \times 10^{-3} \text{ W/mm}^3$)

monitorando le temperature di ciascun pozzetto ogni 20 secondi, mediante l'utilizzo di una termocamera ad infrarossi (Figura 39, Tabella 10).

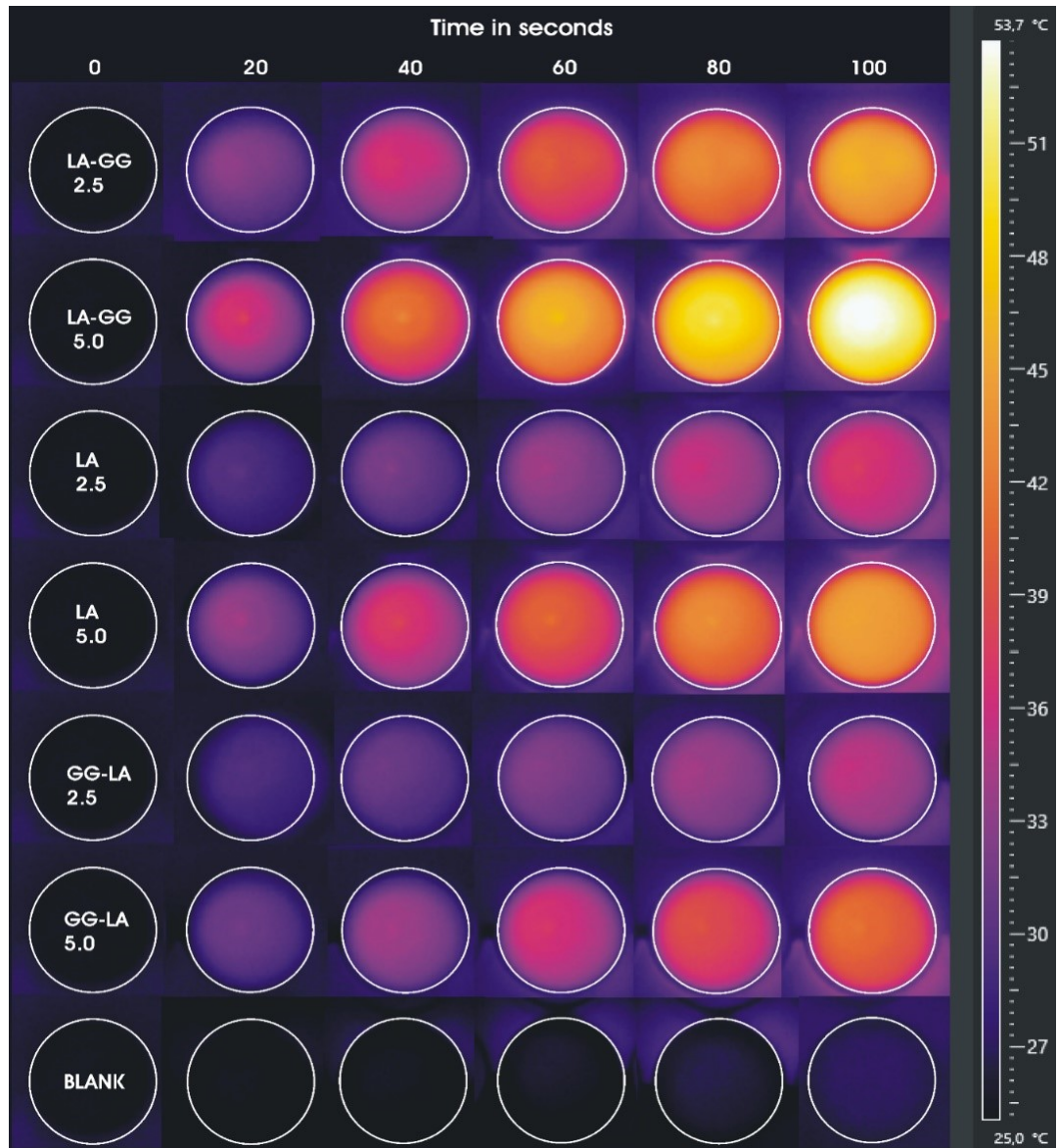


Figura 39. Immagini IR acquisite mediante termocamera durante gli studi di ipertermia in piastre da 24 pozzetti dei campioni AuNRs/LA,GG, AuNRs/LA, AuNRs/GG-LA alle concentrazioni di oro pari a 2,5 e 5 μ g/ml

Tabella 10. Temperature massime registrate tramite termocamera durante gli studi di ipertermia in piastre da 24 pozzetti dei campioni AuNRs/LA,GG, AuNRs/LA, AuNRs/GG-LA alle concentrazioni di oro pari a 2,5 e 5µg/ml.

Campione	T (°C) per tempo di esposizione (sec)					
	0 sec	20sec	40sec	60sec	80sec	100sec
AuNRs/LA,GG 2.5 mg/ml Au	25°C	33°C	36.9°C	40.3°C	43.4°C	46.4°C
AuNRs/LA,GG 5 mg/ml Au	25°C	37.7°C	42.6°C	47.1°C	51°C	54.5°C
AuNRs/LA 2.5 mg/ml Au	25°C	30.3°C	32.5°C	24.5°C	36.2°C	37.6°C
AuNRs/LA 5 mg/ml Au	25°C	34.5°C	38°C	41.2°C	43.9°C	45.6°C
AuNRs/GG-LA 2.5 mg/ml Au	25°C	29.9°C	31.6°C	32.9°C	34.4°C	35.6°C
AuNRs/GG-LA 5 mg/ml Au	25°C	31.5°C	34.3°C	37.1°C	39.3°C	41.5°C
Acqua	25°C	26°C	26°C	27.1°C	28.7°C	29.8°C

Le temperature riportate e le immagini acquisite tramite termocamera (Tabella 10 e Figura 40) confermano gli studi effettuati in precedenza, ma con alcune differenze. Il campione AuNRs/LA,GG si dimostra ancora una volta il più efficace. Il confronto tra le temperature massime raggiunte da AuNRs/LA,GG e AuNRs/LA evidenzia una differenza di circa 10°C in favore dei primi (rispettivamente 54.5°C e 45.6°C). Il maggiore scarto registrato in questo studio rispetto al precedente è attribuibile in prima istanza al metodo di rilevazione della temperatura. Nell'esperienza effettuata impostando tre diverse potenze del trattamento laser, la misurazione dell'innalzamento termico tramite fibra ottica ha consentito di ricavare il valore di temperatura medio raggiunto in ciascun pozzetto. Al contrario, le temperature acquisite tramite termocamera e riportate in Tabella 10, rappresentano le temperature massime rilevate, e non una media che tiene conto delle zone del pozzetto che non hanno ancora raggiunto l'equilibrio termico. Un'ulteriore causa delle differenze riscontrate può essere l'utilizzo di concentrazioni inferiori. Infatti, tenendo conto della considerevole dipendenza tra concentrazione di oro ed innalzamento termico, è possibile che l'impiego di basse concentrazioni di campione consenta l'osservazione più dettagliata del divario tra i

due comportamenti ipertermici. Non stupisce invece il fatto che il campione AuNRs/GG-LA mostri l'effetto ipertermico più blando, toccando la temperatura massima di 41.5°C alla concentrazione di 5 µg/ml.

I dati raccolti sono stati utilizzati come temperature di riferimento per l'esperimento di ipertermia su linea cellulare tumorale.

Lo studio di ipertermia oncologica in vitro ha quindi previsto l'incubazione di cellule di cancro al colon umano HCT116 con i tre tipi di sistemi alla concentrazione di 5 µg/ml. La vitalità cellulare in seguito a trattamento laser (810 nm, 10×10^{-2} W/mm³, 100 secondi). è stata dunque valutata ad intervalli di 20 secondi mediante saggio colorimetrico MTS ed espressa come percentuale rispetto al controllo di cellule non trattate.

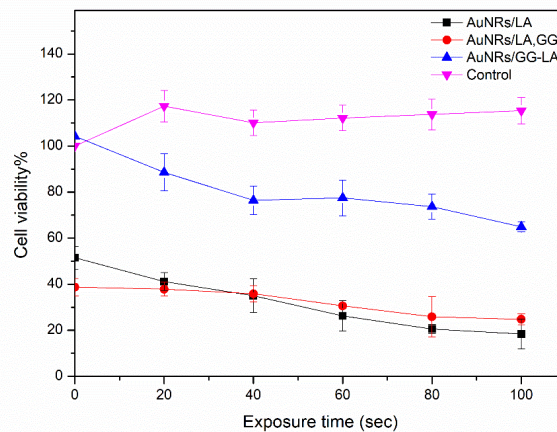


Figura 40. Vitalità cellulare della linea HCT116 incubata AuNRs/LA (nero), AuNRs/LA,GG (rosso), AuNRs/GG-LA (blu) (5µg/ml) e con solo mezzo cellulare (fucsia) in seguito a trattamento laser (810 nm, 10×10^{-2} W/mm³, 100 secondi), in funzione del tempo di irradiazione.

Come illustrato in Figura 40, il confronto tra i tre tipi di nanostrutture ha rilevato efficienza di eradicazione cellulare in accordo con i dati degli studi di ipertermia.

A conferma dell'inefficacia del solo trattamento laser in assenza dei nanosistemi a base di oro, sono stati riportati i dati di vitalità del controllo non trattato con nanorods. Appare evidente che il trattamento laser non risulti affatto dannoso, permettendo di rilevare una vitalità addirittura superiore a quella misurata per il controllo in assenza di qualsivoglia trattamento.

Ancora una volta, si nota che AuNRs/LA e AuNRs/LA,GG sono in grado di indurre un ingente decremento nella vitalità, di entità paragonabile, nonostante la differenza di temperatura massima registrata negli studi di ipertermia con termocamera. Al contrario, i dati di attività metabolica in seguito a trattamento con AuNRs/GG-LA si dimostrano

decisamente alti, attestandosi su valori che indicano la citocompatibilità del sistema proposto per tutti i tempi analizzati. Anche in questo caso, è ipotizzabile che lo *shell* di GG-LA sia in grado di schermare l'energia somministrata sotto forma di luce laser, suggerendo l'inefficacia di AuNRs/GG-LA nell'ipertermia oncologica.

I nanorods AuNRs/LA e AuNRs/LA,GG hanno invece mostrato un'ottima efficacia nel ridurre la vitalità cellulare. La morte cellulare indotta dall'ipertermia risulta consistente, registrando valori di eradicazione percentuale pari all'82 ed al 75%, rispettivamente per AuNRs/LA e AuNRs/LA,GG.

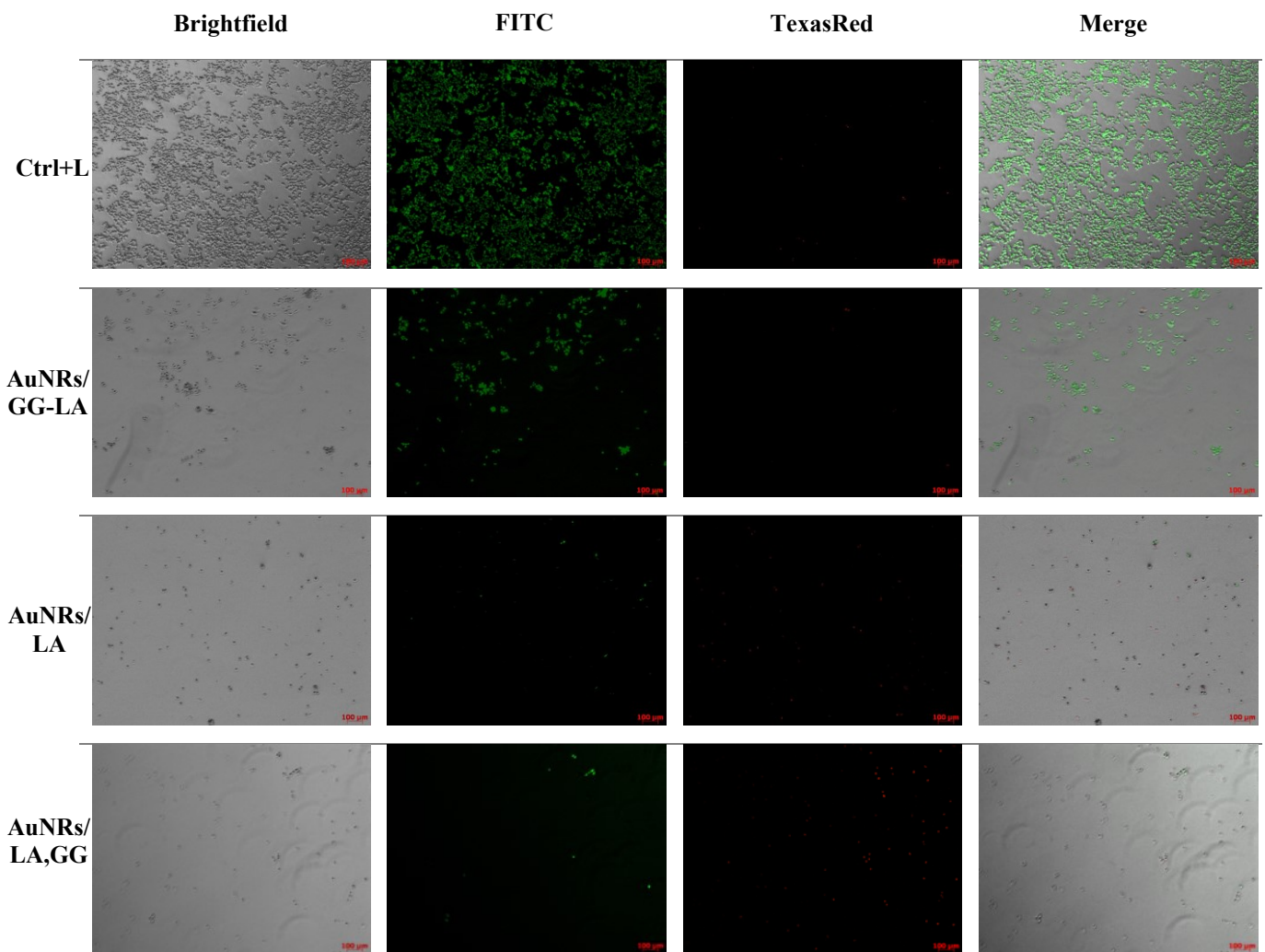


Figura 41. Immagini di microscopia a fluorescenza saggio Live&Dead sulla coltura cellulare HCT116 trattata con laser laser (810 nm, 10×10^{-2} W/mm³, 100 secondi). Acquisizioni immagini con ingrandimento 5x di: controllo+laser, AuNRs/GG-LA, AuNRs/LA, AuNRs/LA,GG (dall'alto verso il basso). Canali di acquisizione: brightfield, FITC, TexasRed, merge (da sinistra verso destra).

Infine, la vitalità cellulare residua dopo irradiazione laser è stata confermata mediante saggio Live & Dead. Dopo trattamento di durata 100 sec, il contenuto dei pozzetti è stato incubato

con le sonde fluorescenti calceina AM ed etidio omodimero-1, in grado di discriminare rispettivamente le cellule vive (in verde) da quelle che presentano danni irreparabili alla membrana cellulare (in rosso). Le immagini sono state dunque acquisite tramite microscopio a fluorescenza utilizzando un ingrandimento 5x.

Le immagini in Figura 41 sono in pieno accordo con i risultati del saggio MTS, sottolineando l'efficacia dei sistemi AuNRs/LA e AuNRs/LA,GG. I risultati ottenuti appaiono decisamente promettenti, indicando un possibile utilizzo di questi due nanostrutture per l'ipertermia fototermica *in vivo*.

Incorporazione del farmaco Verteporfin negli AuNRs/LA,GG

Dal confronto tra le caratteristiche chimico-fisiche e dai risultati ottenuti sulla linea cellulare HCT116, i nanorods AuNRs/LA,GG appaiono i sistemi terapeutici migliori poiché stabili per almeno un mese in dispersione acquosa, liofilizzabili e facilmente ricostituibili su richiesta, con ottime capacità ipertermiche anche *in vitro*. Per queste ragioni, si è deciso di sfruttare ulteriormente questo promettente nanostruttura come *drug delivery system*, incorporando il farmaco verteporfin. La molecola a struttura porfirinica verteporfin è un farmaco attualmente in uso nella terapia fotodinamica (PDT) di alcune patologie oftalmiche ed in maniera principale della degenerazione maculare legata all'età. Nello specifico, il suo meccanismo di azione si esplica in seguito a foto-attivazione mediante eccitazione con radiazione elettromagnetica avente lunghezza d'onda adeguata ($\approx 690\text{nm}$) che conduce alla produzione di specie radicaliche dell'ossigeno (soprattutto ossigeno singoletto – $^1\text{O}_2$). Il danno cellulare e tissutale che ne consegue trova particolare efficacia sulle neoformazioni vascolari ed è espletato su scala strettamente locale a causa della bassa emivita delle specie radicaliche prodotte. In virtù delle sue proprietà citotossiche, ma soprattutto grazie alla possibilità di esercitare il proprio meccanismo di azione *in loco* e solo dopo attivazione tramite sorgenti laser a bassa intensità e lunghezza d'onda ai confini tra il visibile ed il NIR, il verteporfin è stato proposto negli ultimi anni per utilizzi *off-label* tra cui spicca la PDT nel trattamento del cancro (Wei et al., 2017; Eales et al., 2018; Lui et al., 2019).

Queste motivazioni hanno spinto al caricamento del farmaco verteporfin nel sistema AuNRs/LA,GG allo scopo di ottenere un agente terapeutico multifunzionale che possa consentire la terapia fototermica e fotodinamica simultaneamente, incrementando le possibilità di successo della terapia antineoplastica.

La molecola foto-attivabile è stata dunque incorporata negli AuNRs/LA,GG tramite semplice incubazione in dispersione acquosa per 5h ed il costrutto ottenuto, siglato AuNRs/LA,GG_VP, è stato analizzato mediante indagine spettrofotometrica (Figura 42)

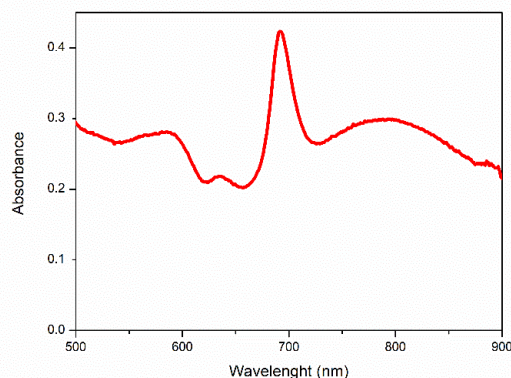


Figura 42. Spettro VIS-NIR del costrutto AuNRs/LA,GG_VP

Lo spettro UV del campione mostra la presenza del verteporfin, visualizzabile come picco di lunghezza d'onda massima pari a 690nm. I NRs appaiono in parte destabilizzati, dimostrando un allargamento della banda plasmonica attribuibile ad un'avvenuta aggregazione. La caratterizzazione è dunque proseguita valutando le dimensioni, il potenziale ζ ed il contenuto in farmaco. (Tabella 11)

Tabella 11. Dimensioni, PDI, potenziale ζ e contenuto in farmaco espresso come percentuale del peso del verteporfin sul peso totale del sistema.

Campione	Size (nm)	PdI	Potenziale ζ (mV)	DL% p/p Verteporfin (HPLC)	DL% p/p Verteporfin (UV)
AuNRs/LA,GG_VP	140	0.45	-20.3±4.5	1.82	1.76

Gli AuNRs/LA,GG_VP hanno mantenuto le loro dimensioni nanometriche in seguito al caricamento del farmaco ed inoltre presentano un potenziale ζ alto e negativo. L'incorporazione del verteporfin è avvenuta con successo e ha mostrato valori di DL% adeguati agli scopi prefissati, nonché altamente affidabili in quanto doppiamente verificati sia tramite cromatografia HPLC, sia mediante spettroscopia UV.

Per valutare se l'incorporazione del farmaco abbia alterato le capacità ipertermiche degli AuNRs, è stato effettuato uno studio registrando le temperature di una dispersione di AuNRs/LA,GG_VP alla concentrazione di 5 μ g/ml di oro in seguito ad irraggiamento con

laser fisioterapico per una durata totale di 100 secondi e fissandone la potenza a 10×10^{-3} W/mm³ (Figura 43).

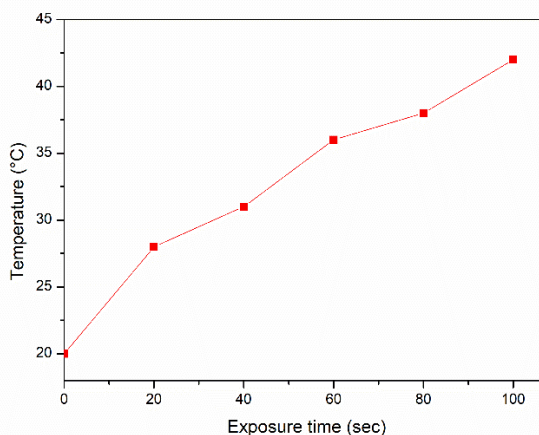


Figura 43. Temperature di una dispersione di AuNRs/LA,GG_VP alla concentrazione in oro pari a 5µg/ml, registrate con fibra ottica ed espresse in funzione del tempo di trattamento laser (810 nm, 10×10^{-2} W/mm³, max 100 secondi)

Come possibile notare, le temperature registrate in funzione del tempo di esposizione appaiono inferiori rispetto a quelle riportate per il sistema privo di farmaco alla stessa concentrazione (Tabella 10). Questo risultato, riscontrato anche nel lavoro precedente (PHEA-LA-Fol-AuNRs vs PHEA-LA-Fol-AuNRs/Iri), potrebbe essere dovuto ad un effetto schermo del farmaco nei confronti della radiazione incidente. A maggior ragione, questa ipotesi sembra acquisire più forza considerando che, trattandosi di una molecola foto-attivabile, il verteporfin potrebbe presumibilmente assorbire parte dell'energia somministrata per innescare la sua conversione ed esplicitare il suo meccanismo d'azione. Tale supposizione deve però essere testata e valutata ulteriormente mediante studi di citotossicità *in vitro*. Ad ogni modo, seppur inferiori, le temperature registrate possono considerarsi nel range del trattamento terapeutico della terapia fototermica. I presenti risultati suggeriscono che il sistema AuNRs/LA,GG_VP sia potenzialmente utilizzabile per la terapia combinata fototermica e fotodinamica del cancro.

3.5. Nanostrutture a base di copolimeri a blocchi di neosintesi per potenziali usi in teranostica

La Reversible Addition-Fragmentation chain Transfer (RAFT) fa parte delle cosiddette polimerizzazioni radicaliche controllate (CRP), tra cui si annoverano anche la nitroxide-mediated polymerization (Craig J. Hawker et al., 2001) e la atom transfer radical polymerization (ATRP)(Matyjaszewski et al., 2001; Nguyen et al., 2017). Tra tutte le CRP, la RAFT risulta probabilmente tra le più versatili, richiedendo condizioni simili alla polimerizzazione radicalica classica ed essendo compatibile con una larga varietà di monomeri. Inoltre, consente di ottenere un buon controllo del peso molecolare ottenuto ed un basso indice di polidispersità, solitamente compreso tra 1.1 e 1.2 (Chiefari et al., 1998). Per tali ragioni, la RAFT si configura uno strumento prezioso per la sintesi di derivati polimerici complessi che possono dare vita a nanostrutture omogenee con dimensioni facilmente modulabili.

Tenendo conto delle potenzialità di questa metodica, in questo studio è stata prodotta una serie di copolimeri a blocchi che hanno previsto l'utilizzo della polimerizzazione RAFT.

In particolare, questo lavoro è stato incentrato sulla la produzione di polimeri a blocchi che presentano una porzione idrofilica, costituita da PEG 5000 (corona idrofilica), una sezione intermedia che reca molecole di deferoxamina (agente chelante) ed un ultimo blocco a cui sono legate molecole di fenetilammina (core idrofobico). Le molecole di deferoxamina (DFO) hanno la funzione di chelare ioni utilizzabili come agenti di contrasto per MRI (es. DFO-Fe³⁺)(Mino et al., 1998) o per Positron Emission Tomography PET (zirconio-89)(Holland et al., 2010), mentre le unità di fenetilammina sono utilizzate per rafforzare il core idrofobico, permettendo il caricamento di farmaci sfruttando il π - π stacking (Shi et al., 2013) (Figura 44).

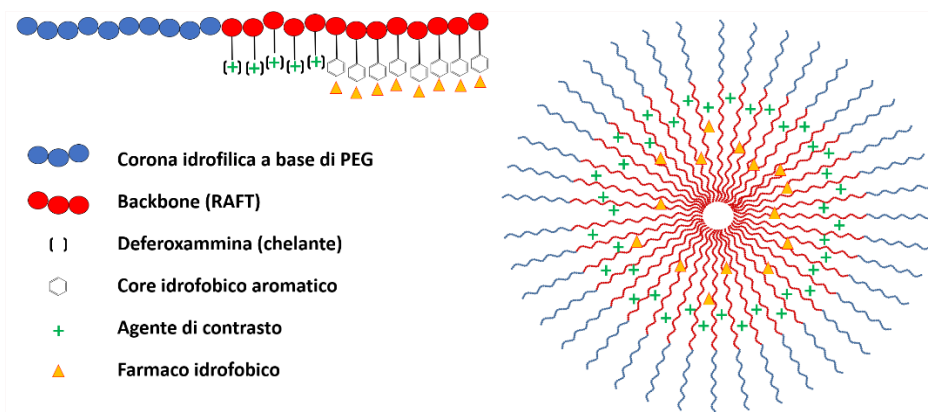


Figura 44. Rappresentazione schematica dello scopo del lavoro

Per la sintesi del backbone polimerico principale sono stati usati monomeri di N-acrilossisuccinimide (NAS), polimerizzati a partire da un macroiniziatore a base di PEG 5000 (PEG-DDMAT), in presenza di iniziatore radicalico AIBN. In una polimerizzazione tipica, i reattivi sono solubilizzati in DMSO anidro e sottoposti a cicli di *freeze-pump-thaw* al fine di rimuovere l'ossigeno disciolto all'interno della miscela, il quale inficerebbe la procedura di polimerizzazione. L'innalzamento della temperatura fino a 70°C dà quindi avvio alla reazione.

Al fine di indagare l'andamento della polimerizzazione in funzione del tempo, sono stati innanzitutto condotti studi preliminari di cinetica fissando i rapporti molari tra macroiniziatore: monomero: iniziatore radicalico pari a 1:100:0.2 ed utilizzando una concentrazione in monomero pari a 2.5M in DMSO anidro a 70°C (Figura 45).

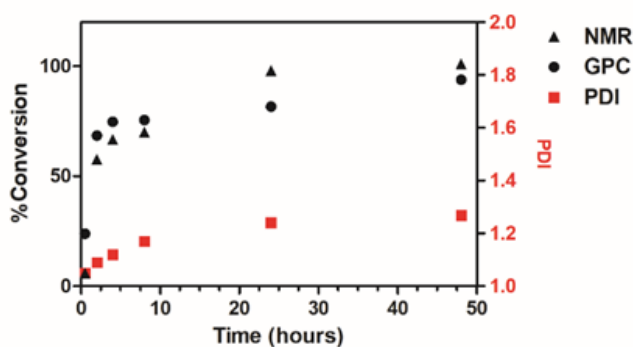


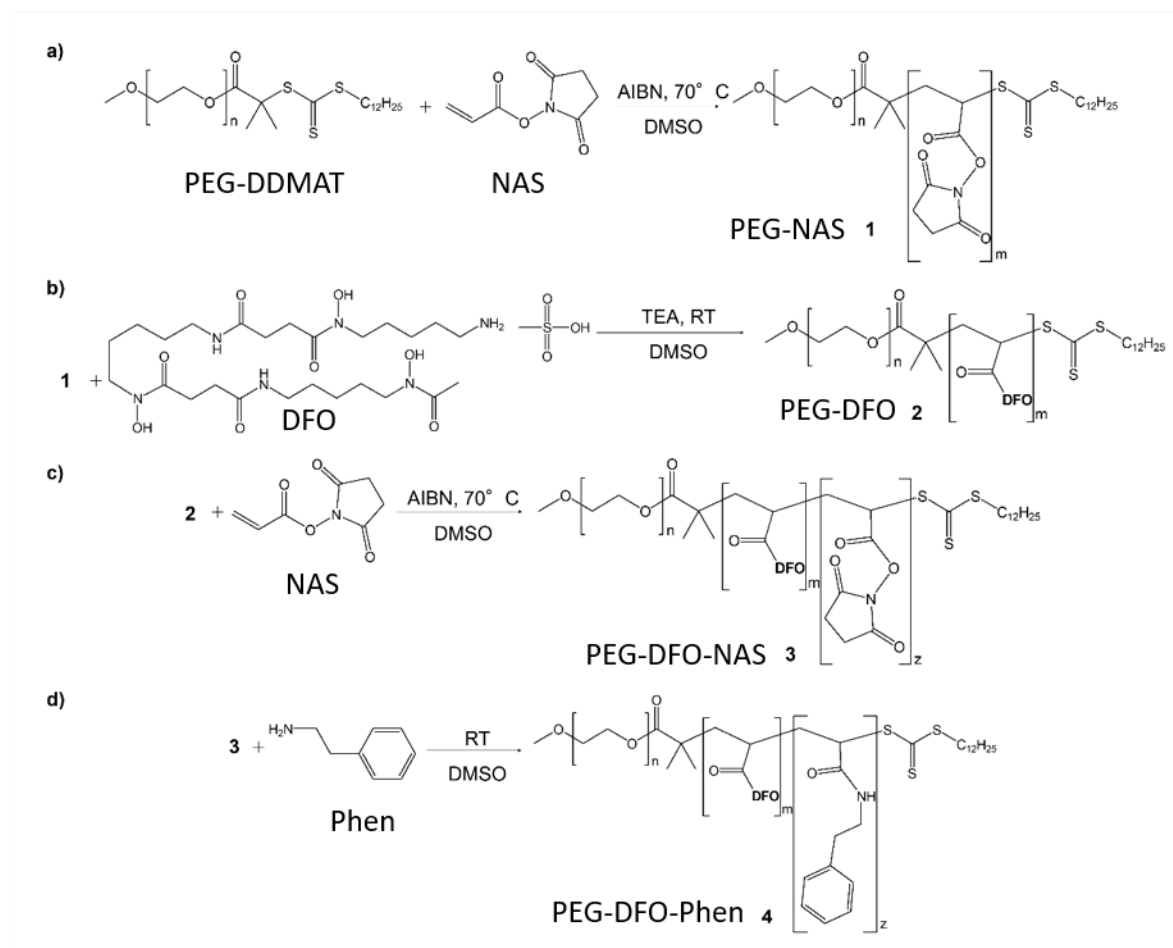
Figura 45. Studi di cinetica RAFT. Percentuale di conversione e PDI in funzione del tempo di reazione: dati NMR (triangoli), dati GPC (cerchi) e PDI (quadrati).

Il processo di polimerizzazione raggiunge un plateau dopo 24 ore, con una percentuale di conversione pari all'89% (dati ^1H NMR) e un PDI pari a 1.24. Sulle basi di questi studi di cinetica, sono state progettate di volta in volta le successive sintesi.

La sintesi dei copolimeri anfifilici a blocchi oggetto di questo studio ha previsto una procedura in 4 step con isolamento degli intermedi in cui le fasi di polimerizzazione sono state condotte tramite RAFT (Schema 5).

Seguendo questo schema generale, sono stati prodotti diversi derivati, modificando di volta in volta i rapporti molari utilizzati e la durata di reazione. Tipicamente, il primo step prevede la polimerizzazione mediante RAFT di monomeri di N-acrilossisuccinimide (NAS) partendo da un macroiniziatore a base di PEG 5000 (PEG-DDMAT), condotta in DMSO anidro, a 70°C, in presenza di AIBN come iniziatore radicalico (Schema 5a). Durante il

secondo passaggio si ottiene l'innesto di molecole di DFO tramite sostituzione nucleofila degli anelli succinimmidici del backbone polimerico, in presenza di base organica, a temperatura ambiente. Il terzo step prevede nuovamente una polimerizzazione RAFT con l'utilizzo di monomeri di NAS, per ottenere la terza porzione polimerica alla quale, nel quarto step, si innestano molecole di feniletilammina tramite sostituzione nucleofila. Ciascun polimero così prodotto è stato siglato PEG-DFO-Phen.



Schema 5. Schema di sintesi del polimero PEG-DFO-Phen

I copolimeri prodotti sono stati caratterizzati tramite analisi ^1H NMR (Figura 46) per valutare i gradi di funzionalizzazione, riportati in Tabella 12. Il calcolo della derivatizzazione in DFO e feniletilammina è stato eseguito prendendo in esame rispettivamente gli integrali δ 1.90 (3H DFO, $-\text{CH}_3\text{-CO-NOH-CH}_2\text{-}$) e δ 7.00–7.35 (5H Phen, gruppo fenilico) e confrontandoli con il segnale di risonanza del macroiniziatore a base di PEG (δ 3.50 420H PEG-DDMAT 5000, $-(\text{O-CH}_2\text{-CH}_2)_{44}\text{-O-CH}_3$)

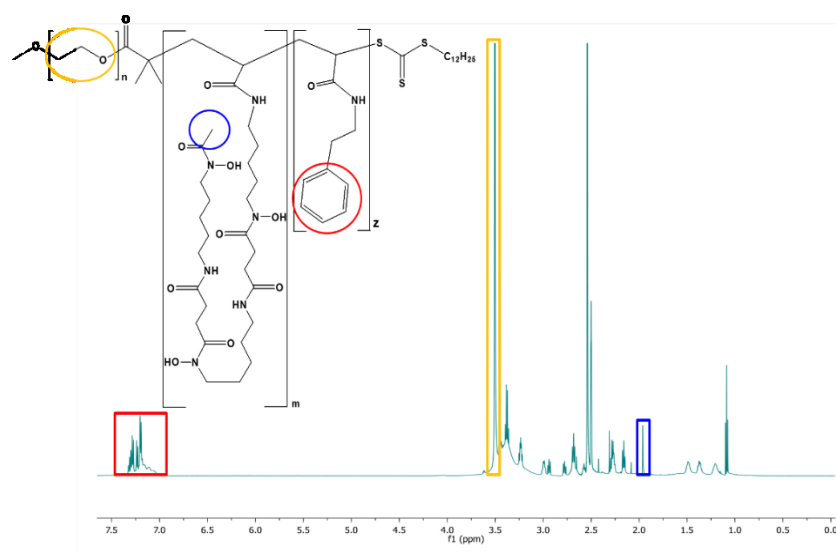


Figura 46. Tipico spettro NMR di PEG-DFO-Phen acquisito in DMSO-d6 a 600MHz

I derivati prodotti sono stati utilizzati per la preparazione di nanostrutture mediante la tecnica della nanoprecipitazione, che ha previsto la dissoluzione del polimero in tetraidrofurano e la precipitazione di questo in seguito a lento gocciolamento tramite siringa in acqua bidistillata, sotto agitazione vorticoso, a 40°C. Dopo l'avvenuta evaporazione del solvente organico, le nanostrutture prodotte sono state caratterizzate in termini di dimensioni e potenziale Z (Tabella 12). Nello specifico, per la formazione di nanostrutture sono stati scelti 6 derivati, suddivisi in due gruppi da 3. Il gruppo A è composto da 3 copolimeri che presentano derivatizzazioni crescenti in DFO e porzione idrofobizzante approssimativamente costante (unità di feniltilammina); per il gruppo B si è invece deciso di mantenere costante in numero di DFO per catena polimerica, aumentando la lunghezza della porzione che reca le funzionalità di fenilettilammina.

Tabella 12. Diametri idrodinamici, PDI e potenziale Z delle nanostrutture generate da polimeri con quantità di DFO e fenilettilammina variabili.

Gruppo	Campione	DFO	Phen	Size (nm)	PDI	Z-Potential (mV)
		per catena*	per catena*			
A	a	2.8	48	85	0.278	-22.3±5.3
	b	4.4	50	106	0.116	-24.1±6.4
	c	9	46	162	0.121	-21.2±5.1
B	a	1	68	130	0.132	-20.1±6.1
	b	1	78	138	0.093	-21.5±5.4
	c	1	89	146	0.146	-23.7±7.2

*Dati ¹H NMR

I dati raccolti in Tabella 12 dimostrano che è possibile ottenere nanostrutture di dimensione modulabile in base alle unità presenti nella catena polimerica. Infatti, si nota come le dimensioni aumentino in entrambi i gruppi, in seguito all'incremento delle unità di agente chelante (Gruppo A) e all'aumentare delle unità fenetilamminiche (Gruppo B) mantenendo costante il numero di unità della controparte. Inoltre, si riscontra un contributo maggiore del DFO nell'incremento di dimensioni per il Gruppo A, dovuto probabilmente al *folding* di tale molecola durante la formazione delle nanostrutture.

Per investigare la capacità del DFO presente nelle nanostrutture di chelare ioni metallici, queste sono state incubate con una soluzione di FeCl_3 mantenendo il rapporto tra ione ferrico ed agente chelante pari a 1. L'avvenuta chelazione è stata confermata tramite analisi visiva ed analisi UV-VIS (Figura 47).

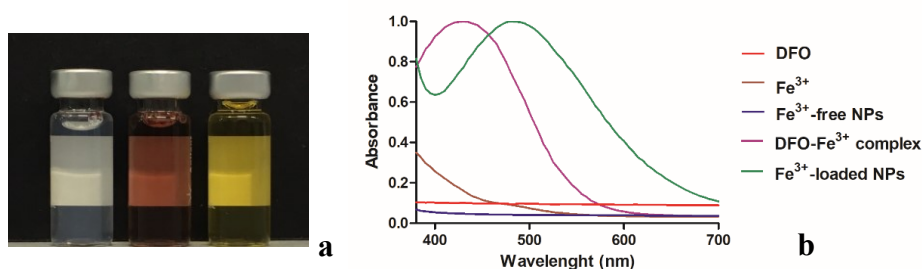


Figura 47 Test di chelazione dello ione ferrico. a) Analisi visiva di nanostrutture in assenza di Fe^{3+} (sinistra), dispersione di nanoparticelle in seguito a chelazione di Fe^{3+} (centro), soluzione di FeCl_3 . b) Analisi UV-VIS delle nanoparticelle in seguito ad incubazione con Fe^{3+} e confronto con il controllo positivo di DFO- Fe^{3+} ed i controlli negativi (DFO, FeCl_3 , nanostrutture native).

La chelazione del Fe^{3+} da parte del DFO genera un picco con λ_{max} di 430nm. Nel caso del sistema nanostrutturato si osserva invece uno shift di tale picco, dovuto presumibilmente al fatto che il DFO non si trova in questo caso in soluzione, bensì facente parte del core della nanostruttura.

In ultimo, per provare l'efficacia del complesso DFO- Fe^{3+} presente nel backbone polimerico quale mezzo di contrasto positivo per la risonanza magnetica, sono state effettuate analisi MRI sui polimeri ottenuti dopo il secondo step di sintesi (PEG-DFO) e i risultati delle analisi qualitative sono riportati in Figura 48.

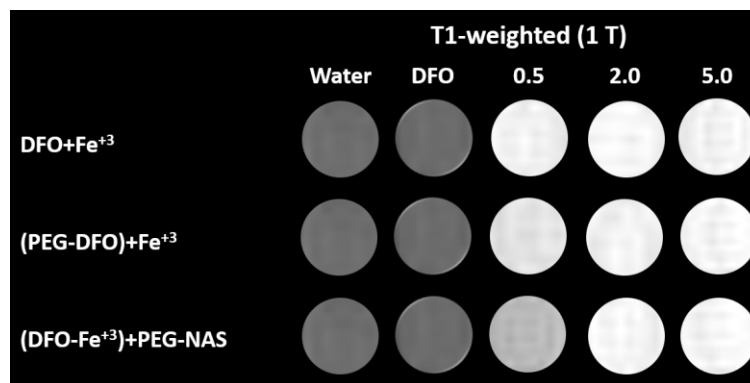


Figura 48. Immagini MRI acquisite in T1 per il complesso DFO-Fe³⁺, per il polimero PEG-DFO incubato con Fe³⁺ e per il polimero ottenuto tramite grafting di unità di DFO già complessate con ione ferrico.

In particolare, sono state testate dispersioni di complesso DFO-Fe³⁺, di copolimero PEG-DFO incubato con Fe³⁺ (sintesi in Schema 5 interrotta dopo il secondo step) e di copolimero ottenuto tramite *grafting* di unità di DFO già complessate con ione ferrico (utilizzo di complesso DFO-Fe³⁺ durante il secondo step sintetico in Schema 5). I tre campioni sono stati analizzati a tre differenti concentrazioni in ferro, pari a 0.5, 2 e 5 mg/ml. Nonostante si possa osservare una lieve riduzione nelle capacità di contrasto positivo nei campioni (PEG-DFO)+ Fe³⁺ e (DFO- Fe³⁺)+ PEG-NAS, se confrontati col complesso DFO-Fe³⁺ puro, dall'analisi qualitativa delle immagini appare che il DFO sia in grado di chelare efficientemente il Fe³⁺ anche quando innestato sul backbone polimerico e che i complessi così ottenuti risultano fungere da agenti di contrasto positivo per risonanza magnetica nucleare.

Il lavoro è stato condotto in collaborazione con Seyed Mohammadali Dadfar e sotto la supervisione del Prof. Dr. Dr. Twan Lammers presso il dipartimento di Nanomedicina e Teranostica dell'università RWTH di Aachen (Germania) e risulta ancora in corso.

La ricerca proseguirà focalizzandosi principalmente sull'ulteriore caratterizzazione dei derivati a blocchi ottenuti e sulla chelazione di zirconio-89 tramite DFO presente nel backbone con lo scopo di formulare strutture teranostiche per PET imaging. Per ultimo, lo studio si incentrerà sul caricamento di un farmaco chemioterapico altamente idrofobico e aromatico, come ad esempio il paclitaxel o il docetaxel che possa stabilire interazioni con il core idrofobico.

4. CONCLUSIONI

In questo progetto di dottorato sono stati prodotti, caratterizzati e testati differenti sistemi nanometrici per un possibile utilizzo nel campo della teranostica antineoplastica, sfruttando le proprietà e le potenzialità di diversi agenti di contrasto per ottenere una multiterapia nel trattamento dei tumori solidi.

Il filone di ricerca che ha avuto come oggetto di studio le particelle superparamagnetiche di ossido di ferro ha portato innanzitutto alla produzione di SPIONs rivestite da carbosimetildestrano mediante tecnica di co-precipitazione controllata di ossidi di ferro che consente di ottenere nanoparticelle di ossidi di ferro con dimensioni altamente modulabili. È stato inoltre messo a punto un semplice ed efficace metodo di classificazione di nanoparticelle superparamagnetiche tramite centrifugazioni seriali in grado di suddividere le SPIONs prodotte in popolazioni delle dimensioni desiderate in base alle esigenze e con basso indice di polidispersità. Le SPIONs prodotte potrebbero essere utilizzate immoificate come agenti di contrasto per *Magnetic Particle Imaging* (MPI) o per risonanza magnetica (MRI), o ancora come materiale di partenza per la messa a punto di *Drug Delivery Systems* teranostici.

In un secondo lavoro le SPIONs sono state impiegate per la produzione di veri e propri nanogeli teranostici con core magnetico, ottenuti mediante rivestimento con un derivato polimerico di neosintesi in grado di reticolare mediante *click chemistry* e successiva incorporazione del farmaco antitumorale doxorubicina e dell'enzima proteolitico collagenasi. Il sistema proposto si è mostrato in grado di rilasciare adeguatamente le molecole bioattive caricate e la collagenasi liberata ha mantenuto la sua attività proteolitica nei confronti di spugne di collagene, utilizzate come modello. Inoltre, i nanogeli sono risultati efficaci nel ridurre la vitalità di linee cellulari di cancro alla mammella ed hanno consentito l'efficiente internalizzazione della doxorubicina all'interno di modelli 3D di tumore alla mammella.

Lo studio delle nanoparticelle cilindriche di oro ha portato alla realizzazione di nanorods con rivestimento poliamminoacidico e polisaccaridico. Nel primo studio, è stato sintetizzato un polimero anfifilico con innesti di molecole che presentano ponti disolfuro (acido lipoico) e di un agente di direzionamento tumorale (acido folico). Questo derivato è stato utilizzato per rivestire *nanorods* a base di oro e per consentire il caricamento del farmaco chemioterapico irinotecano. I sistemi ottenuti risultano stabili per oltre un mese e sono in grado di rilasciare il farmaco in ambiente fisiologico. Inoltre, grazie al *core* a base di *nanorods* di oro, le

formulazioni hanno mostrato eccellenti proprietà ipertermiche *in vivo*, consentendo, anche in assenza di farmaco, la termoablazione di xenograft murini ottenuti per inoculo della linea cellulare HCT116 di cancro al colon umano. I costrutti preparati possono potenzialmente fungere da agenti di contrasto per microscopia di luminescenza a due fotoni o per l'*optical imaging*.

Il secondo studio che ha previsto l'impiego di nanoparticelle cilindriche di oro, è consistito nel confronto tra tre tipi di nanorods rivestiti con piccole molecole solforate (acido lipoico), con catene polisaccaridiche di gomma gellano e con il derivato covalente ottenuto dalla funzionalizzazione della gomma gellano con l'acido lipoico e siglato GG-LA. Di questi sistemi sono stati valutati le dimensioni e il potenziale di superficie, la stabilità in dispersione acquosa, la possibilità di conservazione allo stato secco e le capacità ipertermiche mostrate in seguito ad irradiazione tramite laser NIR ad uso fisioterapico. Successivamente, dopo l'indagine sull'efficacia del trattamento ipertermico su linee cellulari di cancro al colon umano, è stato dimostrato che il candidato rivestito con acido lipoico e gomma gellano (AuNRs/LA,GG) non legati chimicamente, presenta le migliori caratteristiche chimico-fisiche e capacità ipertermiche, che ne suggeriscono un possibile utilizzo per successivi studi *in vivo*. In ultimo, il sistema AuNRs/LA,GG.è stato impiegato per incorporare il farmaco verteporfin, agente utilizzato nella terapia fotodinamica, al fine di ottenere un sistema potenzialmente sfruttabile nella terapia combinata PTT/PDT.

Infine, durante il soggiorno all'estero, è stato sintetizzato un copolimero a blocchi tramite polimerizzazione RAFT e sostituzione nucleofila degli anelli succinimmidici appartenenti ai monomeri di N-acrilossisuccinimide. Le unità di deferoxamina e fenilettilamina sono state innestate con successo sul backbone polimerico. I derivati prodotti sono in grado di generare nanostrutture le cui dimensioni possono essere modulate in fase di sintesi polimerica. La porzione fenetilamminica è potenzialmente in grado di incorporare farmaci idrofobici, mentre, il DFO presente ha dimostrato un'ottima capacità di complessare lo ione ferrico, aprendo la strada ai sistemi prodotti per utilizzi in risonanza magnetica come sistemi teranostici.

5. PARTE SPERIMENTALE

5.1. Produzione e classificazione di SPIONs come agenti di contrasto

5.1.1. Materiali

Il cloruro ferrico ($\geq 99.9\%$), l'idrossido d'ammonio ed il carbossimetil destrano (CM-DEX) (Mw 10-20KDa) sono stati acquistati presso Sigma-Merck. Il cloruro ferroso tetraidrato (99.5%) è stato acquistato da Alfa Aesar. Le membrane da dialisi SpectaPor sono state acquistate da Spectrum Laboratories, Inc.

5.1.2. Sintesi delle nanoparticelle di ossido di ferro

La preparazione di nanoparticelle di ossido di ferro rivestite con CM-DEX ha previsto una procedura di co-precipitazione multistep condotta in atmosfera inerte. Tipicamente, 0.5mmol di $\text{FeCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (in 1.5ml di acqua deionizzata) sono stati aggiunti ad una soluzione di FeCl_3 (1mmol in 3 ml di acqua deionizzata) ed il pallone di reazione è stato posto in bagno di acqua e ghiaccio a 0°C . A miscelazione avvenuta, una soluzione di idrossido di ammonio è stata aggiunta alla soluzione previamente ottenuta ed il tutto è stato mantenuto sotto agitazione vorticoso per 2, 15, 60 o 360 minuti a 0°C . In seguito al tempo di incubazione con idrossido di ammonio, è stata aggiunta una dispersione di CM-DEX (250mg/ml in 4 ml di acqua deionizzata) e la temperatura è stata innalzata gradualmente fino ad 80°C in 50 minuti. Dopo ulteriori 60 minuti a 80°C , le particelle di ossido di ferro sono state purificate tramite membrana da dialisi con cut-off 25KDa.

5.1.3. Classificazione delle nanoparticelle di ossido di ferro

Una parte del contenuto della dialisi è stato collezionato e classificato come campione crudo. La restante parte è stata sottoposta ad un processo di centrifugazioni seriali. Il primo step di classificazione ha previsto la centrifugazione del campione per 20 minuti a 14000 rpm. La frazione surnatante è stata raccolta e siglata campione D1. Il restante pellet è stato sospeso in acqua deionizzata e centrifugato nuovamente per 10 minuti a 7000 rpm. Ancora una volta il surnatante è stato raccolto e siglato campione D2, il pellet è stato invece scartato.

5.1.4. Caratterizzazione delle nanoparticelle di ossido di ferro

Analisi di Dynamic Light Scattering delle nanoparticelle di ossido di ferro

In seguito a classificazione le nanoparticelle ottenute sono state caratterizzate in termini di diametri medi idrodinamici (Z-Average), PDI e potenziale Zeta, mediante Malvern Zetasizer NanoZS, dotato di laser a 532 nm con angolo fisso di 173°. Ciascun campione è stato analizzato in dispersione acquosa a 25°C. Il diametro medio idrodinamico e l'indice di polidispersità (PDI) sono stati ottenuti tramite analisi dei cumulanti della funzione di correlazione. Il potenziale Zeta (mV) stato calcolato dalla mobilità elettroforetica usando la relazione di Smoluchowsky e assumendo $Ka \gg 1$ (dove K e a sono rispettivamente il parametro di Debye-Hückel ed il raggio particellare).

5.2. SPIONs contenenti collagenasi per la veicolazione di farmaci antineoplastici

5.2.1. Materiali

La polisuccinimide (PSI) è stata sintetizzata mediante procedura riportata in letteratura. (Giammona et al., 1987; Mauro et al., 2016) 3-azido-1-propanammina (90%), 4-pentin-1-ammina (95%), etanolammina (99%), solfato di rame (II) (99%), nanoparticelle superparamagnetiche di ossido di ferro (I, II) (10±1 nm), doxorubicina cloridrato (DOXO-HCl), ossido di deuterio (99.9 atom % D), Tris base (99.9%), acido cloridrico (37%), idrossido di sodio (99%), collagenasi-2 (Col), ferrozina [3-(2-piridil)-5,6-bis(acido fenil solfonico)-1,2,4-triazina] e neocuproina [2,9-dimetil(1,10-fenantrolina)], sono stati acquistati presso Sigma-Aldrich (Milano, Italia). Le spugne di collagene I sono state acquistate da ANTEMA[®]. Le membrane da dialisi SpectaPor sono state acquistate da Spectrum Laboratories, Inc. (Italia). La resina per cromatografia a permeazione di gel Sephadex G-25 è stata acquistata da Fluka (Svizzera). La gelatina di pelle di maiale marcate con fluoresceina (DQ[™]) sono state acquistate presso Thermo Fisher. Tutti i reagenti sono di grado analitico, salvo diversa specificazione.

Le cellule di carcinoma mammario umano (MCF-7 e MDA-MB-231) (ottenute da Sigma Aldrich, Italia) e le i fibroblasti di derma umano (HDFa) (ottenute da Life Technologies) sono state coltivate in DMEM, contenente il 10% (v/v) di siero bovino fetale (FBS, Euroclone), 100 unità per ml di penicillina G, 100 mg/ml di streptomina (Euroclone) e 2 mM di L-glutammina (Euroclone, Celbar) a 37 ° C, in atmosfera umidificata al 5% di CO₂.

5.2.2. Sintesi polimerica e preparazione dei nanogeli

Sintesi α,β -poli(N-idrossietil, azidopropil, pentin)-D,Laspartammide (PHEAPA)

La sintesi del derivato della polisuccinimide denominato PHEAPA ha richiesto una procedura articolata in due step senza isolamento degli intermedi.

Nel primo passaggio, le ammine 3-azido-1-propanammina (0.204 mmol) e 4-pentin-ammina (0.206 mmol) sono state aggiunte sotto agitazione ad una soluzione di polisuccinimide (PSI) in DMF_a (2.026 mmol in 4 ml) e mantenute a reagire per 48h in bagno di ghiaccio. La completezza della reazione è stata saggiata mediante corsa cromatografica su strato sottile (TLC) utilizzando isopropanolo/metanolo/acido acetico 1%_{p/v} 60:30:10 come miscela eluente. In un secondo step, condotto a 22-28°C per 3h, è stata aggiunta etanolammina (10.31 mmol) sotto agitazione vorticoso al pallone di reazione. Il *work up* della reazione ha previsto

la precipitazione del copolimero in etere dietilico, la dissoluzione del solido (separato tramite centrifugazione) in H₂O bidistillata e la successiva purificazione tramite dialisi esaustiva (cut-off 25 kDa). Al termine della procedura di purificazione, il prodotto è stato congelato e sottoposto a freeze-drying. La resa del copolimero ottenuto, calcolata in %p/p rispetto alla PSI di partenza, è risultata dell'82% p/p.

I gradi di derivatizzazione in 3-azido-1-propanammina e i 4-pentin-1-ammina sono stati calcolati mediante analisi ¹H-NMR (D₂O, 300 MHz): δ 1.62 (2H_{PA}, -CH₂-CH₂-CH₂-C≡CH), 1.70 (2H_{AP}, -CH₂-CH₂-CH₂-N₃), 2.16 (2H_{PA}, -CH₂-CH₂-CH₂-C≡CH), 2.28 (2H_{AP}, -CH₂-CH₂-CH₂-N₃), 2.68 (2H_{PHEA}, -CH₂-CO-NH-; 1H_{PA}, -CH₂-CH₂-CH₂-C≡CH), 3.20 (2H_{PA}, -CH₂-CH₂-CH₂-C≡CH; 2H_{AP}, -CH₂-CH₂-CH₂-N₃), 3.25 (2H_{Et}, -CO-NH-CH₂-CH₂-OH), 3.6 (2H_{Et}, -CO-NH-CH₂-CH₂-OH), 4.53 (1H_{PHEA}, -NH-CH-CO-NH₂)

Cromatografia ad esclusione dimensionale (SEC)

Le analisi SEC sono state effettuate usando una colonna Phenomenex PolySep-GFC-P3000 (California, USA) connessa ad un detector di light scattering (LALS, 15° and RALS, 90°) ed un detector di indice di rifrazione (Agilent 1260 Infinity). Il tampone salino TRIS a pH 8.1, 0.2M NaCl è stato usato come fase mobile ed il flusso è stato impostato a 1ml/min. Ciascun campione è stato preparato tramite dispersione in fase mobile (15mg/ml) e filtrazione attraverso filtro per siringa con cut-off 0.45 µm.

Preparazione dei nanogeli superparamagnetici vuoti reticolati (SPIONs@rPHEAPA)

Una dispersione acquosa di SPIONs non rivestite (6ml, 5mg/ml) è stata aggiunta goccia a goccia ad una dispersione di PHEAPA in H₂O bidistillata (300ml, 6.5mg/ml) agitando la miscela tramite vortex. Dopo sonicazione di 40minuti in bagno di ghiaccio, la dispersione è stata mantenuta al riparo dalla luce per 48h a temperatura ambiente ed agitata occasionalmente mediante vortex. Al termine delle 48h, la miscela è stata purificata tramite dialisi (cut-off 100 kDa) contro H₂O bidistillata ottenendo SPIONs rivestite da PHEAPA non reticolato. Il prodotto è stato filtrato tramite filtro per siringa con 0.8µm di cut-off e sottoposto a freeze-drying (Resa: 78%). Successivamente, il cross-linking polimerico è stato effettuato aggiungendo acido ascorbico (50mg) e rame solfato pentaidrato (10 mg) alle SPIONs ridisperse in acqua (200mg, 6.5mg/ml), sottoponendo il tutto a sonicazione di 40minuti in bagno di ghiaccio. La reticolazione è stata condotta per 1h a 37°C, al riparo dalla luce. Il prodotto è stato disperso in acqua acidificata a pH 5, purificato tramite resina

Sephadex G-25 e recuperato dopo freeze-drying ottenendo le SPIONs rivestite da PHEAPA reticolato (SPIONs@rPHEAPA).

Preparazione di nanogeli superparamagnetici reticolati carichi di doxorubicina e/o collagenasi

Le SPIONs rivestite cariche di doxorubicina (SPIONs/Doxo) sono state preparate incubando doxorubicina (10mg) insieme ad una dispersione acquosa di SPIONs@rPHEAPA (25mg in 5ml) per 2h, agitando occasionalmente con vortex. Dopo purificazione in dialisi (cut-off 25 kDa) sino ad ottenimento di acque reflue incolori, il prodotto è stato sottoposto a freeze-drying e conservato sotto atmosfera inerte a -20°C. Resa: 92%_{p/p} rispetto a SPIONs@rPHEAPA.

Analogamente, la preparazione di SPIONs rivestite cariche di collagenasi (SPIONs/COL) ha previsto l'incubazione 10mg di collagenasi tipo IV (soluzione acquosa 2mg/ml) con una dispersione acquosa di SPIONs@rPHEAPA (25mg in 5ml) sotto sonicazione (15min, 3 volte). La purificazione è avvenuta tramite lavaggi con H₂O bidistillata e centrifugazione ed il prodotto è stato recuperato tramite liofilizzazione. Resa: 80%_{p/p} rispetto a SPIONs@rPHEAPA.

Infine, le SPIONs rivestite cariche di doxorubicina e collagenasi (SPIONs/Doxo@Col) sono state prodotte seguendo la stessa procedura per la preparazione di SPIONs/Doxo, ma utilizzando come materiale di partenza SPIONs/COL.

5.2.3. Caratterizzazione chimico-fisica

Determinazione del diametro idrodinamico medio e del potenziale ζ

Il diametro idrodinamico medio, l'indice di polidispersità e il potenziale ζ dei sistemi sono stati ricavati tramite analisi di Dynamic Light Scattering (DLS) utilizzando il Malvern NanoZS dotato di laser con un angolo di scattering di 173 °. Le dispersioni acquose di SPIONs (0.1 mg/ml) sono state analizzate dopo filtrazione attraverso filtri in cellulosa acetato (cut-off 5 μ m). Il potenziale ζ è stato ottenuto tramite misure di mobilità elettroforetica utilizzando la relazione di Smoluchowsky e supponendo che $K \times a \gg 1$, dove K e a sono, rispettivamente, il parametro di Debye-Hückel e il raggio della nanoparticella.

Quantificazione del contenuto in ferro di SPIONs@rPHEA-AP-PA

La determinazione del contenuto in ferro è stata effettuata tramite saggio colorimetrico alla ferrozina. Le SPIONs@rPHEAPA sono state disperse in HCl 1.4 M (1mg/ml) e mantenute

a 60°C per 2h. Dopo raffreddamento, 1ml di reattivo per la determinazione del ferro (ferrozina 6.5mM, neocuproina 6.5mM e acido ascorbico 1M in tampone acetato pH4.5) è stato aggiunto al campione digerito in acido e la miscela è stata incubata per 30 min a temperatura ambiente. Il contenuto in ferro è stato valutato tramite spettrofotometro Shimadzu UV-2401PC, comparando l'assorbanza a $\lambda=560$ nm del campione con una retta di calibrazione ottenuta con standard di FeCl (0.5-5 $\mu\text{g/ml}$) ed espresso come % p/p Fe/sistema.

Determinazione del contenuto di collagenasi e doxorubicina dei tre sistemi e studi di rilascio di SPIONs/Doxo@Col

La collagenasi presente nei sistemi SPIONs/Cole SPIONs/Doxo@Col è stata quantificata tramite saggio colorimetrico enzimatico (Thermo Fisher Scientific, EnzChek Gelatinase/Collagenase Assay). In particolare, aliquote da 100 μl di dispersioni di sistema a concentrazione note (0.01-0.5 $\mu\text{g/ml}$) sono state incubate in piastre Eppendorf V Black a 96 pozzetti contenenti 20 μl di soluzione di gelatina in H₂O deionizzata (1mg/ml) e 80 μl di tampone pH 7.6 (TRIS·HCl 0.5M, NaCl 1.5M, CaCl₂ 50mM, NaN₃ 2mM). La fluorescenza del campione è stata misurata tramite un lettore multiplastra Eppendorf utilizzando i seguenti settaggi sperimentali: $\lambda_A=495$ nm, $\lambda_E=520$ nm, lettura ogni 30 minuti per 6 ore. Le analisi sono state confrontate con un controllo positivo costituito da standard di collagenasi di tipo IV da *Clostridium histolicum* 500U.

Il contenuto in doxorubicina dei sistemi SPIONs/Doxo e SPIONs/Doxo@Col è stato determinato tramite spettrometria UV misurando l'assorbanza a $\lambda=480$ di una dispersione acquosa di campione a concentrazione nota e paragonandola ad una retta di calibrazione ottenuta con standard di doxorubicina·HCl. Le DL% per le due molecole caricate sono state espresse come rapporto percentuale tra il peso dell'entità incapsulata e il peso del sistema.

Gli studi di rilascio di doxorubicina dai sistemi SPIONs/Doxo@Col sono stati effettuati disperdendo il campione (equivalente a 1.80 mg di doxorubicina) in PBS pH 7.4 e ponendolo in dialisi (cut-off 25 kDa) utilizzando il medesimo tampone come mezzo esterno. Gli esperimenti sono stati incubati a 37°C sotto agitazione orbitale (100 rpm) in un Benchtop 808C Incubator Orbital Shaker, modello 420, per 24h. Ad intervalli prestabiliti sono stati prelevati 400 μl di mezzo esterno, immediatamente rimpiazzati da un equal volume di mezzo fresco e le aliquote prelevate sono state analizzate tramite spettrometria UV, $\lambda=480$. Tutti i dati di rilascio sono stati paragonati con il profilo di diffusione della sola doxorubicina·HCl alla medesima concentrazione (0.18 mg/ml) ottenuto utilizzando la stessa procedura.

Caratterizzazione cinetica dell'attività proteolitica di SPIONs/Doxo@Col

L'attività della collagenasi rilasciata da SPIONs/Doxo@Col è stata studiata paragonando le cinetiche di idrolisi di gelatina marcata con fluoresceina in seguito ad incubazione con Col (0.7mg/ml) e con un quantitativo equivalente di SPIONs/Doxo@Col. 80µl di tampone fosfato a pH7.4 sono stati addizionati alla gelatina DQ™ (20µl). Successivamente, 100µl di SPIONs/Doxo@Col (0.1mg/ml) sono stati aggiunti alla soluzione. A tempi stabiliti è stata misurata la fluorescenza ($\lambda_{ex}=495\text{nm}$, $\lambda_{em}=520\text{nm}$) utilizzando un plate reader Eppendorf ed in seguito riportata in funzione del tempo.

Studi reologici SPIONs/Doxo@Col

Una spugna di collagene di tipo I (diametro: 8mm; lunghezza: 2.5cm) è stata posta ad incubare con una dispersione di SPIONs/Doxo@Col in tampone fosfato 50 mM a pH 6.7 (equivalente a collagenasi 1.4 µg/ml). Le misure reologiche sono state condotte tramite reometro DH-R2 (TA Instruments) impostando i seguenti parametri operativi: Axial force 0, Gap 6 mm, geometria in acciaio a piatti piani ϕ 8 mm, deformazione 1%, frequenza 2 Hz. Tutti i test sono stati effettuati a 37°C applicando un *pre-shear* di 0.1Hz per 120 secondi. Le stesse misure sono state effettuate incubando le spugne di collagene con una soluzione di collagenasi alla medesima concentrazione (1.4 µg/ml) e tampone puro.

5.2.4. Caratterizzazione biologica

Studi di citotossicità

La citotossicità dei sistemi prodotti è stata testata sulle tre linee cellulari HDFa (fibroblasti), MCF-7 (adenocarcinoma mammario umano) e MDA-MB-231 (adenocarcinoma mammario metastatico umano). Le cellule sono state seminate in piastre a 96 pozzetti ad una densità di $2.5 \cdot 10^4$ cellule per pozzetto e coltivate in Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM) con il 10% di siero bovino fetale e l'1% di penicillina/streptomicina (10,000 U/mL penicillina; 10 mg/mL streptomicina), in atmosfera umidificata, con il 5% di CO₂. Dopo 24h il mezzo è stato sostituito con una dispersione di doxorubicina libera, SPIONs/Doxo, SPIONs/Cole SPIONs/Doxo@Col adoperando equivalenti in doxorubicina·HCl compresi tra 0.1 e 20 µM e la citotossicità è stata valutata su tutte le linee cellulari dopo 24h e 48h di incubazione tramite saggio MTS (Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation assay, Promega).

Ulteriori studi di citotossicità sono stati effettuati su sistemi Transwell®-COL (Corning®), rivestiti all'acquisto con collagene. In particolare, le cellule HDFa ($2 \cdot 10^4$ cellule per pozzetto) sono state seminate sul fondo dell'inserito dei Transwell e mantenute in coltura per una settimana. Al termine dei 7 giorni, le cellule MDA-MB-231 sono state seminate ($2.5 \cdot 10^4$ cellule per pozzetto) e coltivate sul fondo del pozzetto ricevente fino a confluenza. La citotossicità sulla linea cellulare MDA-MB-231 è stata indagata mediante saggio MTS dopo 24h e 48h dall'aggiunta di doxorubicina libera, SPIONs/Doxo e SPIONs/Doxo@Col (equivalenti doxorubicina $5 \mu\text{M}$) nel compartimento donatore. Per entrambi gli studi, la vitalità è stata calcolata tramite lettura dell'assorbanza a 492nm usando un microplate reader (Eppendorf AF2200). I risultati sono stati espressi come percentuale di vitalità rispetto ad un controllo di cellule incubate con il solo DMEM.

Studio di migrazione ed invasione cellulare in vitro tramite scratch assay

La capacità di SPIONs/Doxo@Col di ridurre la migrazione cellulare è stata valutata tramite *scratch assay*. Mediante puntale per pipette p200, è stato praticato un graffio (*scratch*) sul fondo di piastre da 48 pozzetti su cui erano state coltivate linee cellulari HDFa, MCF7 o MDA-MB-231 a confluenza. Le cellule sono state lavate con DMEM per rimuovere i detriti e quindi incubate con doxorubicina $5 \mu\text{M}$ o con un quantitativo equivalente di SPIONs/Doxo@Col per 24h. Cellule non trattate sono state usate come controllo. In seguito al tempo di incubazione, le cellule sono state lavate con PBS pH 7.4 e analizzate tramite microscopio equipaggiato con videocamera digitale (Axio Cam MRm Zeiss). La distanza tra le zone a confluenza (*gap*) è stata misurata in ciascun campione utilizzando il software di acquisizione Zeiss, confrontata con quella calcolata prima del trattamento ed espressa come percentuale di rimarginazione della ferita

Efficacia antitumorale su modelli di sferoidi 3D

Gli sferoidi composti da un core di cellule MDA-MB-231 ed una capsula di fibroblasti, sono stati prodotti seguendo una procedura riportata altrove (Tanaka et al., 2016). In breve, $200 \mu\text{l}$ di gel ECM sono stati depositati nella camera superiore di un sistema Transwell®-COL rivestito all'acquisto da una membrana di collagene. Le cellule MDA-MB-231 e HDFa sono state miscelate (1.5×10^5 cellule per ciascuna linea cellulare) in $150 \mu\text{l}$ di DMEM arricchito con lo 0.2% di siero bovino fetale (FBS) e la sospensione cellulare concentrata è stata posta sul gel di ECM. Il compartimento inferiore dei sistemi transwell è stato riempito con $700 \mu\text{l}$ di DMEM arricchito con il 10% di FBS. Le cellule sono state coltivate per una settimana

rimpiazzando quotidianamente il mezzo in entrambi i compartimenti con mezzo fresco. L'ottavo giorno, il mezzo del compartimento superiore è stato rimosso e sostituito da 200 μ l di DMEM contenenti doxorubicina o SPIONs/Doxo@Col alla concentrazione in farmaco pari a 20 μ M. Gli sferoidi non trattati sono stati usati come controllo negativo. Dopo incubazione ed ogni 24h, il DMEM contenente il farmaco o i nanogeli è stato rimpiazzato con mezzo fresco (per tre volte). A tempi stabiliti (1,2,3,6 e 9 giorni), gli sferoidi sono stati osservati tramite microscopio e le loro dimensioni sono state misurate tramite il software di acquisizione Zeiss. Inoltre, per valutare l'internalizzazione della doxorubicina negli sferoidi, questi sono stati osservati con un microscopio a fluorescenza.

5.3. Gold nanorods con rivestimento polimerico poliamminoacidico per la terapia termoablattiva del cancro al colon

5.3.1. Materiali

α,β -poli(N-2-idrossietil)-D,L-aspartammide (PHEA) e ammino-polietilenglicole-folatoammide (PEG-FA) sono stati sintetizzati come descritto altrove. (Giammona et al., 1987; Mendichi et al., 2003; Licciardi et al., 2013) (\pm)- α -acido lipoico (LA), N,N'-dicicloesilcarbodiimmide (DCC), 4-(dimetilammino)piridina (DMAP), esadeciltrimetilammonio bromuro (CTAB $\geq 96\%$), argento nitrato, L-acido ascorbico, sodio boroidruro ed acido cloroaurico sono stati acquistati da Sigma-Aldrich. La resina per cromatografia a permeazione di gel Sephadex G-25 è stata acquistata da Fluka (Svizzera). Le membrane da dialisi SpectraPor sono state acquistate da Spectrum Laboratories, Inc. (UK). Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando acqua ultrapura Milli-Q (resistività 18.2 M Ω ·cm a 25°C). Tutti i reagenti impiegati sono di grado analitico, se non altrimenti specificato.

Le cellule di carcinoma al colon umano (HCT116) (ottenute da Sigma Aldrich, Italia) sono state coltivate in DMEM, contenente il 10% (v/v) di siero bovino fetale (FBS, Euroclone), 100 unità per ml di penicillina G, 100 mg/ml di streptomina (Euroclone) e 2 mM di L-glutamina (Euroclone, Celbar) a 37 ° C, in atmosfera umidificata al 5% di CO₂.

5.3.2. Sintesi e preparazione

Sintesi di CTAB-AuNRs

La preparazione degli AuNR è stata effettuata seguendo una procedura di crescita a partire da *seeds* di oro, in presenza di ioni argento e assistita dal tensioattivo cationico CTAB. (Li Volsi et al., 2017) I *seeds* di oro sono stati sintetizzati tramite dispersione di 25 μ l di soluzione di HAuCl₄ 0.05M in CTAB 0.1M (4.7ml) a cui è seguita una rapida riduzione per aggiunta di 300 μ l di NaBH₄ 0.01M, sotto agitazione vorticoso. In un tipico protocollo sintetico, 500 μ l di soluzione di HAuCl₄ 0.05M e 950 μ l di HCl 1M sono aggiunti in 50 ml di CTAB 0.1M e mantenuti ad equilibrare per pochi minuti. La susseguente aggiunta di 600 μ l di AgNO₃ 0.01M, 400 μ l di acido ascorbico 0.1M e di 120 μ l di *seeds* di oro appena preparati, conduce infine alla formazione di AuNRs rivestiti e stabilizzati da CTAB.

Sintesi di PHEA-LA-PEG-FA

La sintesi del copolimero PHEA-LA-PEG-FA è stata condotta modificando una procedura in due step, precedentemente riportata in letteratura. (Li Volsi et al., 2018) Durante il primo step, PHEA-LA è stato sintetizzato dissolvendo acido lipoico (LA) in DMF (39.14mg, 0.19mmol in 1.5ml) e mantenendolo a reagire in presenza di DCC (47.46mg, 0.23mmol) e DMAP (28.1mg, 0.23mmol), solubilizzati in 1ml dello stesso solvente. Dopo 1h a 25°C sotto agitazione, la miscela di reazione è stata aggiunta goccia a goccia ad una soluzione di PHEA in DMF (200mg, 1.265mmol di unità ripetitive in 2.5ml) e posta a reagire per 18h a 30°C in presenza di agitazione magnetica. Il contenuto del pallone di reazione è stato quindi filtrato ed il solvente rimosso a pressione ridotta a 30°C tramite Rotavapor. La precipitazione e i lavaggi del derivato sono stati effettuati impiegando una miscela di acetone/dietiletere 1:1 ed il copolimero PHEA-LA è stato recuperato come polvere secca (resa: 223mg). Il secondo step ha portato alla sintesi di PHEA-LA-PEG-FA. In particolare, l'attivante BPNC (38.33mg, 0.126mmol) dissolto in 1ml DMF è stato aggiunto goccia a goccia ad una soluzione di PHEA-LA (200mg in 2.5ml DMF) e mantenuto per 2.5h a 40°C sotto agitazione. Successivamente, PEG-FA (Licciardi et al., 2013) (302.4mg, 0.126mmol in 1.5ml DMF) è stato addizionato lentamente alla miscela di reazione e posto a reagire per 18h a 25°C sotto agitazione. Il prodotto è stato precipitato in acetone, lavato in miscela acetone/metanolo 1:1 ed essiccato sottovuoto. La polvere raccolta è stata solubilizzata in 2ml di acqua e la purificazione è stata ultimata tramite cromatografia a permeazione di gel, usando la resina Sephadex G25. In seguito a *freeze-drying* PHEA-LA-PEG-FA è stato recuperato come liofilizzato giallo, con una resa del 152.5% in base al peso di PHEA-LA utilizzato in partenza. ¹H NMR (300MHz, DMF-d7, 25°C, δ): 2.82 (m, 2H PHEA, -CH-CH₂-CONH-), 3.36 (t, 2H PHEA, -NH-CH₂-CH₂-OH), 3.66 (t, 2H PHEA, -CH₂-CH₂-OH), 4.72 (m, 1H PHEA, -NH-CH-CO-CH₂-), δ 1.39 (m, 2H LA, -HO-CO-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-cCH₂-CH₂-CH₂-S-S-), 1.59 (4H LA, -HO-CO-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-cCH-CH₂-CH₂-S-S-), 1.97 (m, 2H LA, -HO-CO-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-cCH-CH₂-CH₂-S-S-), 2.23 (m, 2H LA-HO-CO-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-cCH-CH₂-CH₂-S-S-), 2.54 (m, 2H LA-HO-CO-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-cCH-CH₂-CH₂-S-S-), 3.70 (m, 176H PEG2000, -NH-CH₂-CH₂-(O-CH₂-CH₂)₄₄-), δ 7.52–6.69 4H FA, gruppo fenilico.

Preparazione di PHEA-LA-Fol AuNRs e PHEA-LA-Fol/Iri AuNRs

La preparazione degli PHEA-LA-Fol-AuNRs ha richiesto la rimozione dell'eccesso di surfactante cationico dai CTAB-AuNRs (20mg di Au) tramite due lavaggi con acqua bidistillata e recupero del pellet di oro dopo centrifugazione (8500rpm, 20min, 23°C). Il rivestimento degli AuNRs è stato quindi effettuato gocciolando una dispersione di PHEA-LA-PEG-FA (200mg in 20ml di acqua bidistillata) agli AuNRs nudi e incubando la miscela per 18h a 37°C in Orbital Shaker. I sistemi carichi di farmaco PHEA-LA-Fol-AuNRs-IT sono stati prodotti seguendo un protocollo analogo, eccetto che per l'aggiunta di irinotecano alla dispersione polimerica di rivestimento. Nello specifico, una soluzione di irinotecano cloridrato in acqua ultrapura (40mg, 0.642mmol in 20ml) è stato trattato con trietilammina (6.42mmol) in modo da ottenere irinotecano come base libera (IT). Il farmaco è stato quindi aggiunto goccia a goccia ad una dispersione di PHEA-LA-PEG-FA (200mg in 20ml in acqua ultrapura) e mantenuto per 1h a 25°C. Tale miscela è stata dunque aggiunta agli AuNRs lavati, incubata per 18h a 37°C e purificata dall'eccesso di irinotecano tramite membrana da dialisi (12-14KD MWCO), ottenendo PHEA-LA-Fol-AuNRs/Iri in seguito a freeze-drying.

5.3.3. Caratterizzazione chimico-fisica

Analisi di Dynamic Light Scattering, misure di potenziale Zeta e determinazione del contenuto in oro

PHEA-LA-Fol-AuNRs e PHEA-LA-Fol-AuNRs/Iri sono stati caratterizzati in termini di diametri medi idrodinamici (Z-Average), PDI e potenziale Zeta, utilizzando lo strumento Malvern Zetasizer NanoZS, dotato di laser a 532 nm con angolo fisso di 173°. Ciascun campione è stato disperso in acqua MilliQ alla concentrazione di 0.25 mg/ml e analizzato a 25°C. Il diametro medio idrodinamico e l'indice di polidispersità (PDI) sono stati ottenuti tramite analisi dei cumulanti della funzione di correlazione. Il potenziale Zeta (mV) stato calcolato dalla mobilità elettroforetica usando la relazione di Smoluchowsky e assumendo $Ka \gg 1$ (dove K e a sono rispettivamente il parametro di Debye-Hückel ed il raggio particellare). Il contenuto in oro dei sistemi vuoti e carichi di farmaco è stato determinato in seguito a completa ossidazione del campione in miscela HCl 37%/HNO₃ 69.5% 3:1 v/v mediante Spectroquant® Gold Test (Merck) ed espresso come percentuale p/p.

Microscopia a scansione elettronica (SEM)

La morfologia e le dimensioni degli PHEA-LA-Fol-AuNRs-IT sono state analizzate tramite microscopio a scansione elettronica ESEM Philips XL30. Una goccia di PHEA-LA-Fol-

AuNRs/Iri in dispersione acquosa (10 μ l, 0.001mg/ml) è stata adagiata su una griglia TEM in rame e lasciata ad essiccare per una notte.

La microscopia SEM è stata effettuata in seguito a deposizione della griglia in rame su supporto biadesivo applicato su stub in acciaio.

Drug loading% di PHEA-LA-Fol-AuNRs/Iri e studio di stabilità

Il contenuto in irinotecano nei PHEA-LA-Fol-AuNRs/Iri è stato investigato tramite HPLC Agilent Infinity 1290 equipaggiata con colonna Gemini® 5 μ m C6-Phenyl (Phenomenex), seguendo un protocollo già descritto in letteratura (Fiorica et al., 2017), con qualche variazione. Le analisi sono state condotte a 25°C usando una miscela ternaria composta da PBS pH 2.7/acetonitrile/metanolo 60:20:20 v/v/ come fase mobile con flusso 1ml/min e detector a serie di diodi (DAD) fissato a 254nm. I campioni sono stati preparati estraendo il farmaco libero da un quantitativo esattamente pesato di PHEA-LA-Fol-AuNRs/Iri, impiegando come solvente di estrazione la fase mobile, mantenendo i campioni ad incubare per 3h sotto agitazione vorticoso. Le miscele ottenute sono state filtrate con filtri 0.22 μ m RC prima di essere iniettate (25 μ l volume di iniezione). La *drug loading* è stata calcolata come percentuale p/p di irinotecano rispetto al peso totale dei sistemi, comparando i cromatogrammi con una curva di calibrazione ottenuta con standard di irinotecano base libera (range di linearità= 10⁻⁴- 0.5 mg/ml; R² = 0.99998).

Gli studi di stabilità degli PHEA-LA-Fol-AuNRs/Iri sono stati effettuati mediante analisi UV, utilizzando uno spettrofotometro Shimadzu UV-240. 5mg di prodotto liofilizzato sono stati dispersi in 10 ml di acqua bidistillata e gli spettri UV sono stati acquisiti ogni settimana, dopo diluizione 1:5 v/v, controllando la stabilità in dispersione nell'arco di un mese.

Studi di rilascio di PHEA-LA-Fol-AuNRs/Iri

Gli studi di liberazione del farmaco dal sistema terapeutico sono stati condotti usando come mezzi di rilascio PBS pH 7.4 e tampone acetato a pH 5.5. PHEA-LA-Fol-AuNRs/Iri (7.8mg) o un quantitativo equivalente di irinotecano base libera (1mg), sono stati posti in tubi da dialisi (SpectraPor 2KD MWCO), immersi in soluzione tampone (20ml) e mantenuti a 37°C sotto agitazione orbitale a 100 rpm (Benchtop 808C Incubator Orbital Shaker model 420) per 24h. Ad intervalli di tempo stabiliti, è stato prelevato 1ml di mezzo esterno, rimpiazzando con lo stesso volume di tampone fresco. Il contenuto in irinotecano presente nelle aliquote prelevate è stato calcolato in seguito ad analisi HPLC ed i profili di rilascio sono stati

delineati riportando la quantità cumulativa di farmaco rilasciato (percentuale p/p sul peso totale di farmaco caricato) contro i tempi di incubazione.

Studi di ipertermia

Dispersioni di PHEA-LA-Fol-AuNRs e PHEA-LA-Fol-AuNRs/Iri a differente concentrazione di oro (10, 20, 40 $\mu\text{g/ml Au}$) sono state poste in una piastra a 24 pozzetti e trattate con un laser chirurgico a diodi GBox 15A/B di GIGA Laser (lunghezza d'onda: 810nm), impostando le potenze di $3 \times 10^{-3} \text{ W/mm}^3$ o $7 \times 10^{-3} \text{ W/mm}^3$. Le temperature sono state registrate a tempi prestabiliti nell'intervallo da 0 a 300 secondi, usando un rilevatore di temperatura a fibra ottica ($\pm 1^\circ\text{C}$ sensibilità) e riportate in funzione del tempo di esposizione.

5.3.4. Caratterizzazione biologica e studi *in vivo*

Studi di citotossicità

Gli studi di citotossicità sono stati condotti mediante saggio MTS (sale di tetraziolo), utilizzando il kit Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation assay (Promega), disponibile in commercio. Per gli esperimenti è stata impiegata la linea cellulare di cancro al colon umano (HCT116). Le cellule sono state seminate alla densità di $2.5 \cdot 10^4$ cellule/pozzetto in piastre a 96 pozzetti, addizionate di mezzo cellulare arricchito (DMEM) e mantenute per 24h in incubazione (37°C , 5% CO_2) per consentirne l'adesione. In seguito, le cellule sono state incubate per 24 e 48h con PHEA-LA-Fol-AuNRs, PHEA-LA-Fol-AuNRs/Iri e irinotecano libero, usato come controllo positivo, alla concentrazione di farmaco per pozzetto pari a 3, 6, 12, 24, 36 $\mu\text{g/ml}$. Le cellule non trattate sono state usate come controllo negative. Dopo 24 e 48h di incubazione, il contenuto dei pozzetti è stato rimpiazzato con 100 μl di mezzo fresco e 20 μl di una soluzione di MTS sono stati aggiunti a ciascun pozzetto. Le piastre sono state incubate per ulteriori 2h a 37°C . Infine, è stata misurata l'assorbanza a 492nm tramite lettore UV per piastre cellulari (PlateReader AF2200, Eppendorf) e la vitalità cellulare è stata espressa come percentuale del rapporto tra l'assorbanza di ciascun campione e del controllo di cellule non trattate (100% di vitalità). A tutti i valori di assorbanza ottenuti è stato sottratto il bianco di MTS in DMEM (rapporto v/v 1:5) in assenza di cellule.

Xenografts di cancro al colon

Tutti gli esperimenti sugli animali sono stati effettuati seguendo i protocolli "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" pubblicati dal National Institutes of Health. I topi

maschi atimici (Fox1nu/nu) sono stati acquistati da Envigo (Udine). I topi sono stati mantenuti ad acclimatarsi per una settimana prima dell'inizio di questi studi. Gli animali sono stati posti in un ambiente con luce e temperatura controllate, fornendo acqua e cibo *ad libitum*. Tutti gli esperimenti descritti in questa sezione sono stati condotti presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A.Mirri" (Palermo).

Per la formazione degli *xenografts* tumorali, $5 \cdot 10^6$ cellule di cancro al colon umano (HCT116) in 200 μ l di PBS sono state iniettate nel tessuto sottocutaneo della parte bassa della schiena di topi di 4 settimane di età.

Attività antitumorale in vivo

In seguito a comparsa di tumori palpabili (circa 180mm³), i topi sono stati divisi in maniera casuale in 10 gruppi, ciascuno composto da 5 topi (Tabella 7 in *Risultati e Discussione*). Nello specifico, agli animali nei gruppi 1 e 2 è stata somministrata soluzione fisiologica tramite iniezione intratumorale (0.05 ml). Agli animali nei gruppi 3 e 4 è stata somministrata una dispersione di PHEA-LA-Fol-AuNRs (0.05 ml, 25mg/ml di nanoparticelle senza farmaco in soluzione salina, corrispondenti a 4mg/Kg di nanorods di oro), via iniezione intratumorale. Il gruppo 5 è stato trattato con iniezione intraperitoneale di PHEA-LA-Fol-AuNRs (0.05ml, 25mg/ml di nanoparticelle senza farmaco in soluzione salina, corrispondenti a 4mg/Kg di nanorods di oro). Gli animali nei gruppi 6 e 7 hanno ricevuto iniezione intratumorale di irinotecano (0.05ml, 6.5mg/ml di farmaco disperso in soluzione salina, corrispondente a 12.8mg/Kg di irinotecano). Ai gruppi 8 e 9 è stata somministrata una dispersione di PHEA-LA-Fol-AuNRs (0.05ml, 50mg/ml di nanoparticelle caricate con farmaco in soluzione salina, corrispondenti a 4 mg/Kg di nanorods di oro e 12.8mg/Kg di irinotecano). Gli animali nel gruppo 10 hanno ricevuto iniezione intraperitoneale di PHEA-LA-Fol-AuNRs (0.05ml, 50mg/ml di nanoparticelle caricate con farmaco in soluzione salina, corrispondenti a 4 mg/Kg di nanorods di oro e 12.8mg/Kg di irinotecano). Gli animali appartenenti ai gruppi 2,4,5,7,9 e 10 sono stati trattati per tre volte (ogni 3 giorni, fino al termine degli esperimenti) per 20 secondi con un raggio laser a luce fredda (810nm) impostato alla potenza di 7W, allo scopo di valutare la capacità dei nanorods di oro di eradicare la massa tumorale mediante effetto ipertermico. Ogni 3 giorni, è stato registrato il peso corporeo di ciascun topo, i tumori sono stati misurati tramite *caliper* esterno e il volume di ciascun tumore è stato calcolato tramite la formula $V = L \cdot W^2 / 2$. Dove L è il diametro maggiore (in mm) del tumore e W è il diametro perpendicolare maggiore (in mm), rispetto ad L. Dopo 9 giorni, gli animali sono stati sacrificati e ciascun tumore è stato esciso e

conservato in paraffina per i successivi studi di istopatologia ed immunoistochimica. Questi studi sono stati autorizzati dal Ministero della Salute e condotti a cura del medico veterinario Roberto Puleio presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A.Mirri" (Palermo).

Risonanza magnetica nucleare

La risonanza magnetica nucleare è stata condotta impiegando un apparecchio PharmaScan 70/16 US scanner 7Tesla con alloggiamento orizzontale (Bruker, Ettlingen, Germania), equipaggiato con una bobina volumetrica di trasmissione/ricezione di 23mm. Prima di ciascuna analisi, i topi sono stati anestetizzati con isoflurano al 2% e protetto dall'ipotermia tramite una coperta termica a circolazione di acqua calda. La respirazione degli animali è stata monitorata durante l'esperimento. In seguito all'acquisizione di scansioni di controllo, dispersioni di PHEA-LA-Fol-AuNRs/Iri alle quantità specificate in precedenza, sono state iniettate per via intratumorale e le immagini di risonanza magnetica T2 sono state acquisite impostando TE = 35.0 ms e una sequenza T2_Turbo RARE.

Biodistribuzione dei nanosistemi

Per determinare la biodistribuzione delle nanoparticelle, PHEA-LA-Fol-AuNRs/Iri ed irinotecano sono stati iniettati per via intraperitoneale negli animali da esperimento. I topi sono stati raggruppati in 2 gruppi composti da 6 individui. Il gruppo 1 è stato trattato con 6.5mg/ml di irinotecano disperso in soluzione salina sterile. Il gruppo 2 ha ricevuto iniezione intraperitoneale di PHEA-LA-Fol-AuNRs/Iri (50mg/ml in soluzione salina, corrispondenti a 6.5mg/ml di irinotecano). Dopo 24 e 48h, 3 topi per gruppo sono stati sacrificati tramite dislocazione cervicale e cuore, reni, fegato, polmoni, milza e tumore sono stati raccolti. Gli organi e i tumori prelevati sono stati pesati e conservati a -20°C. In seguito a scongelamento sino a temperatura ambiente, da ogni campione è stato estratto il contenuto in irinotecano. Per l'estrazione dell'irinotecano, gli organi ed i tumori sono stati dapprima lavati due volte con PBS per rimuovere il sangue residuo, posti in 5ml tampone fosfato a pH 2.6 e omogenizzati per 5 minuti. I campioni sono stati dunque centrifugati e i surnatanti sono stati analizzati tramite HPLC per quantificarne il contenuto in irinotecano. Gli organi ed i tumori dei topi non trattati sono stati usati come controllo negativo.

5.4. Gold nanorods con rivestimento polimerico polisaccaridico per l'ipertermia oncologica

5.4.1. Materiali

L'acido tetracloroauricotriidrato ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), l'argento nitrato ($\text{AgNO}_3 \geq 99.0\%$), l' α -acido lipoico (LA), l'esadeciltrimetilammonio bromuro (CTAB $\geq 96\%$), l'acido ascorbico (AA $\geq 99\%$), il sodio boroidruro (NaBH_4 99%), la trietilammina (TEA), N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimmide cloridrato (EDC·HCl), N-idrossisulfosuccinimide sale sodico (NHSS) ed il tampone salino fosfato (DPBS) sono stati acquistati presso Sigma-Aldrich. Il Gold Test utilizzato per la determinazione della concentrazione di oro è stato acquistato da Spectroquant. Il Gellan Gum ($M_w \approx 50\text{KDa}$) utilizzato è stato ottenuto a partire da GELZAN (Sigma-Aldrich) mediante un processo di degradazione in catalisi basica già noto in letteratura. (Agnello et al., 2018). La sonda Texas Red Hydrazide Invitrogen ed il kit LIVE/DEAD per cellule di mammifero sono stati acquistati presso Thermo Fisher. Il mezzo cellulare Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) è stato acquistato da Euroclone. Il reattivo MTS 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-5-(3-carbossimetossifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolio] (CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation,) è stato acquistato da PROMEGA e utilizzato seguendo le istruzioni del produttore. L' H_2O Milli-Q (resistività $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ a 25°C) è stata usata in tutti gli esperimenti. Tutti i reagenti e solventi sono di grado analitico ove non indicato diversamente. Le cellule di carcinoma al colon umano (HCT116) (ottenute da Sigma Aldrich, Italia) sono state coltivate in DMEM, contenente il 10% (v/v) di siero bovino fetale (FBS, Euroclone), 100 unità per ml di penicillina G, 100 mg/ml di streptomina (Euroclone) e 2 mM di L-glutamina (Euroclone, Celbar) a 37°C , in atmosfera umidificata al 5% di CO_2 .

5.4.2. Sintesi e caratterizzazione dei derivati e dei sistemi rivestiti

Sintesi del derivato GG-LA

La sintesi del derivato GG-LA è stata condotta in ambiente acquoso a pH e temperatura controllati. 100mg di gomma gellano sale sodico (GG $M_w \approx 50\text{KDa}$) sono stati posti a solubilizzare in 3ml di H_2O bidistillata. L'acido lipoico (rapporto molare tra LA ed unità ripetitive di GG pari a 0.3) è stato solubilizzato in H_2O bidistillata portando il pH a 6.8 tramite aggiunta di TEA. L'attivazione dell'acido lipoico è avvenuta in seguito ad aggiunta di EDC·HCl e NHSS (mol EDC·HCl/NHSS: mol LA pari a 1.2:1) e il pH è stato nuovamente

aggiustato a 6.8. La miscela di reazione è stata mantenuta ad agitare a 40°C per 18h, controllando il pH per le prime 2 ore. Il prodotto è purificato tramite membrana da dialisi (cut-off 12-14KDa) e sottoposto a freeze-drying. La purificazione è stata ultimata mediante cromatografia di permeazione su gel utilizzando resina Sephadex G-15 come fase stazionaria ed H₂O bidistillata come fase mobile. Il recupero del prodotto è avvenuto in seguito a freeze-drying (resa: 85% sul GG di partenza). ¹H NMR (300MHz, D₂O/NaOD, 25°C, δ): 3.1-4.1 (GG, gruppi piranosidici delle unità ripetitive del GG), 1.2 (3H GG, anello ramnosidico), 1.55 e 2.2 (4H LA, -HO-CO-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-cCH-CH₂-CH₂-S-S-), 1.97 (2H LA, -HO-CO-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-cCH-CH₂-CH₂-S-S-), 2.23 (2H LA-HO-CO-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-cCH-CH₂-CH₂-S-S-).

Cromatografia ad esclusione dimensionale (SEC)

Le analisi SEC sono state effettuate usando una colonna Phenomenex PolySep-GFC-P4000 (California, USA) connessa ad un detector di light scattering (LALS, 15° and RALS, 90°) ed un detector di indice di rifrazione (Agilent 1260 Infinity). Il tampone TRIS a pH 9 0.15mM è stato usato come fase mobile ed il flusso è stato impostato a 0.8ml/min. Ciascun campione è stato preparato tramite dispersione in fase mobile (15mg/ml) e filtrazione attraverso filtro per siringa con cut-off 0.45 µm.

Preparazione degli AuNRs rivestiti (AuNRs/LA, AuNRs/LA,GG, AuNRs/GG-LA)

Per la produzione dei sistemi rivestiti sono stati utilizzati CTAB-AuNR sintetizzati come descritto in precedenza nella sezione 5.2.2.

In una tipica preparazione di AuNRs/LA, sono stati lavati 20 ml di CTAB-AuNR per 3 volte con H₂O Milli-Q e recuperati mediante centrifugazione (10000rpm, 5', 24°C). Successivamente, alla dispersione di AuNRs lavati sono stati aggiunti sotto agitazione lieve acido lipoico e glucosio in quantità da rispettare rapporti molari Au:LA:glucosio pari a 1:2:2. La dispersione è stata addizionata di NaOH fino a neutralizzazione. Il tutto è stato mantenuto ad incubare per una notte, lavato un'ultima volta con H₂O Milli-Q per rimuovere l'acido lipoico in eccesso e riportato al volume iniziale con lo stesso solvente.

I sistemi AuNRs/LA,GG sono stati prodotti a partire da AuNRs/LA tramite incubazione in presenza di gomma gellano (GG). In particolare, in seguito all'ultimo lavaggio degli AuNRs/LA, il pellet è stato gocciolato lentamente e sotto agitazione in una dispersione polimerica di GG (50KDa) in H₂O bidistillata (1mg/ml) neutra e posto ad incubare per una

notte sotto agitazione. Per il rivestimento con GG è stato impostato un rapporto in peso Au:GG di 1:10.

Infine, per la preparazione di AuNRs/GG-LA 20 ml di CTAB-AuNRs sono stati lavati 4 volte e recuperati tramite centrifugazione (10000rpm, 5', 24°C). Il pellet è stato aggiunto goccia a goccia ad una dispersione di GG-LA in H₂O bidistillata (1mg/ml) e glucosio (rapporti mol/mol Au/glucosio pari a 1:2) neutralizzata con NaOH ed incubato per una notte a temperatura ambiente sotto agitazione. Per il rivestimento con GG-LA è stato impostato un rapporto in peso Au:GG-LA di 1:10.

La concentrazione di Au di CTAB-AuNR è stata calcolata mediante l'analisi UV-VIS valutando l'assorbanza del campione alla lunghezza d'onda di 400nm (Hendel et al., 2014).

Spettroscopia VIS-NIR e studi di stabilità

I sistemi AuNRs/LA, AuNRs,/LA,GG, AuNRs/GG-LA sono stati analizzati tramite spettrometro Shimadzu VIS-NIR 2400. Gli spettri dei campioni in dispersione acquosa sono stati acquisiti impostando un range di lunghezze d'onda compreso tra 200 e 900 nm a temperatura ambiente. Alle medesime condizioni, sono stati registrati gli spettri di assorbimento dei campioni per 30 giorni ad intervalli di una settimana, al fine di valutarne la stabilità in funzione del tempo. Per le prove di ricostituzione del liofilizzato 7 ml di campione (AuNRs/LA, AuNRs,/LA,GG, AuNRs/GG-LA) sono stati liofilizzati e ridispersi in un uguale volume di acqua bidistillata, poi analizzati allo spettrometro UV come descritto sopra.

Analisi di Dynamic Light Scattering, misure di potenziale ζ e determinazione del contenuto in oro

AuNRs/LA, AuNRs,/LA,GG, AuNRs/GG-LA e AuNRs/LA,GG_VP sono stati caratterizzati in termini di diametri medi idrodinamici, PDI e potenziale ζ , utilizzando lo strumento Malvern Zetasizer NanoZS, dotato di laser a 532 nm con angolo fisso di 173°. Ciascun campione è stato analizzato in dispersione acquosa alla concentrazione di 0.025 mg/ml di Au e analizzato a 25°C. Il diametro medio idrodinamico e l'indice di polidispersità (PDI) sono stati ottenuti tramite analisi dei cumulanti della funzione di correlazione. Il potenziale ζ (mV) stato calcolato dalla mobilità elettroforetica usando la relazione di Smoluchowsky e assumendo $Ka \gg 1$ (dove K e a sono rispettivamente il parametro di Debye-Hückel ed il raggio particellare). Il contenuto in oro dei sistemi è stato determinato in seguito

a completa ossidazione del campione in miscela HCl 37%/HNO₃ 69.5% 3:1 v/v, mediante Spectroquant® Gold Test (Merck) ed espresso come concentrazione (mg/ml).

Sintesi del derivato LA-TRH e determinazione del contenuto in LA nei sistemi AuNRs/LA-TRH

Una dispersione di acido lipoico in acqua bidistillata (0.49 mg/ml) è stata portata a pH 6 per garantirne la solubilizzazione. Successivamente, EDC·HCl e NHSS sono stati addizionati solidi, in rapporti molari di EDC·HCl/NHSS:LA pari a 1.2:1. Una soluzione della sonda Texas Red Hydrazide (TRH) in H₂O/DMF 8:2 è stata aggiunta goccia a goccia alla dispersione precedentemente preparata, impostando un rapporto molare tra TRH e di LA pari a 1.13. Dopo aver portato a pH 4.5, la miscela è stata mantenuta a reagire a temperatura ambiente per una notte. Il prodotto marcato ottenuto, siglato LA-TRH, è stato addizionato di glucosio (in quantità equimolare). Una dispersione di CTAB-AuNRs è stata lavata 3 volte con H₂O ultrapura ed il pellet, recuperato in seguito a centrifugazione (10000rpm, 5', 24°C), è stato gocciolato nella dispersione di LA-TRH contenente glucosio. Il tutto è stato portato a neutralità per aggiunta di NaOH e mantenuto a reagire per una notte. I nanosistemi marcati ottenuti (AuNRs/LA-TRH) sono stati purificati tramite centrifugazione (10000rpm, 5', 24°C) e riportati al volume originario con acqua bidistillata.

Il quantitativo di TRH-LA è stato determinato valutando la fluorescenza del campione preparato. Il campione marcato è stato analizzato mediante uno spettrofotometro Eppendorf PlateReader AF2200 (ex: 530 nm (25); em: 590nm (10)) e confrontando i valori registrati con una curva di taratura ottenuta da soluzioni di standard di sonda TRH (range di linearità: 0,0005-0,00001mg/ml; R²= 0.998).

Valutazione dell'effetto ipertermico

I campioni AuNRs/LA, AuNRs/LA,GG, AuNRs/GG-LA a differenti concentrazioni di oro (10, 20, 35 µg/ml Au) sono state poste in una piastra a 24 pozzetti e trattate con un laser chirurgico a diodi GBox 15A/B di GIGA Laser (lunghezza d'onda: 810nm), impostando le potenze di 3.5×10^{-3} W/mm³, 7×10^{-3} W/mm³ e 14×10^{-3} W/mm³. Le temperature sono state registrate a tempi prestabiliti nell'intervallo da 0 a 300 secondi, usando un rilevatore di temperatura a fibra ottica ($\pm 1^\circ\text{C}$ sensibilità) e riportate in funzione del tempo di esposizione. Un ulteriore studio di ipertermia è stato effettuato utilizzando una termocamera ad infrarossi Flir T250 Infra-Red con risoluzione di 240 x 180 pixel, sensibilità di 80mK NETD/0.08°C ed intervallo di temperatura misurabile -20°C:350°C. Per tale studio, dispersioni di

AuNRs/LA, AuNRs,/LA,GG, AuNRs/GG-LA alle concentrazioni in oro pari a 2.5 e 5 µg/ml sono state trattate con il laser fisioterapico di cui sopra, fissandone la potenza a 10×10^{-3} W/mm³. Ad intervalli di tempo di 20 secondi e per un totale di 100 secondi, sono state acquisite le immagini IR e registrate le temperature raggiunte. La stessa prova è stata condotta sul medesimo quantitativo di acqua bidistillata per confronto.

Infine, per studiare il comportamento ipertermico del campione AuNRs/LA,GG_VP, una dispersione di sistema alla concentrazione in oro pari a 5 µg/ml è stato posto in una piastra a 24 pozzetti e trattato mediante lo stesso laser fisioterapico già descritto per 100 secondi ad una potenza di 10×10^{-3} W/mm³. Le temperature raggiunte sono state registrate ogni 20 secondi di esposizione tramite rilevatore di temperatura a fibra ottica.

5.4.3. Studi biologici

Saggio di citocompatibilità

La citotossicità dei sistemi LA/AuNRs, LA,GG/AuNRs, GG-LA/AuNRs è stata indagata tramite il saggio di vitalità MTS su cellule di cancro al colon umano (HCT116). Le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti alla densità di 2×10^4 cellule per pozzetto in presenza di DMEM e messe ad incubare (37°C, 24h, 5% CO₂), per garantirne l'adesione. Il mezzo cellulare è stato dunque rimpiazzato con 200 µl di LA/AuNRs, LA,GG/AuNRs, GG-LA/AuNRs dispersi in DMEM alle concentrazioni pari a 1, 2,5 e 5 µg/ml, e le piastre poste nuovamente ad incubare. Dopo 24h o 48h, le dispersioni dei nanosistemi sono state rimosse, i pozzetti lavate con DPBS sterile ed addizionati di 100 µl di DMEM e 20 µl di soluzione di MTS. In seguito ad ulteriore incubazione per 2 ore a 37°C, l'assorbanza dei campioni è stata letta utilizzando uno spettrofotometro per piastre cellulari (Eppendorf PlateReader AF2200) impostato alla lunghezza d'onda di 492nm. La vitalità cellulare è stata espressa come percentuale di vitalità rispetto ai controlli di cellule non trattate. A tutti i valori di assorbanza ottenuti è stato sottratto il bianco di MTS in DMEM (rapporto v/v 1:5) in assenza di cellule.

Valutazione in vitro dell'effetto ipertermico su linea cellulare HCT116

La linea cellulare HCT116 è stata seminata in piastre a 24 pozzetti alla densità di 8×10^4 cellule per pozzetto, in presenza di DMEM e mantenuta ad incubare (37°C, 5% CO₂) per 24h. Ad adesione compiuta, le cellule sono state addizionate di AuNRs/LA, AuNRs,/LA,GG, AuNRs/GG-LA dispersi in DMEM alle concentrazioni pari a 2,5 e 5 µg/ml e poste ad incubare nuovamente per 24h. Successivamente, si è proceduto con il trattamento con laser fisioterapico avente lunghezza d'onda 810 nm e fissato alla potenza di 10×10^{-3}

W/mm³ per tempi di esposizione di 20, 40, 60, 80 e 100 secondi. Dopo il trattamento, il surnatante è stato eliminato dai pozzetti, è stato effettuato un lavaggio in DPBS sterile ed infine sono stati aggiunti 450 µl di DMEM e 50 µl di soluzione di MTS. Le cellule sono state quindi incubate per due ore a 37°C e l'assorbanza a 492nm è stata letta in ciascun pozzetto mediante spettrofotometro per piastre cellulari (Eppendorf PlateReader AF2200). L'esperimento ha previsto la messa a punto di due tipologie di campioni controllo. Nello specifico, la stessa procedura descritta è stata eseguita su cellule addizionate di solo DMEM, in assenza o in presenza di trattamento laser. La vitalità cellulare dei campioni è stata calcolata come valore percentuale rispetto al controllo di cellule che non hanno subito alcun trattamento. A tutti i valori di assorbanza ottenuti è stato sottratto il valore del bianco di MTS in DMEM (rapporto v/v 1:5) in assenza di cellule.

L'efficacia dei sistemi testati è stata inoltre valutata qualitativamente eseguendo il saggio LIVE/DEAD per poter discriminare le cellule vive da quelle gravemente danneggiate o morte. In particolare, il saggio è stato effettuato su campioni cellulari incubati con AuNRs/LA, AuNRs/LA,GG, AuNRs/GG-LA e trattati per 100 secondi con laser fisioterapico avente lunghezza d'onda 810 nm e fissato alla potenza di 10×10^{-3} W/mm³. I pozzetti analizzati sono stati lavati con DPBS e successivamente sottoposti a saggio LIVE/DEAD seguendo le specifiche del produttore.

Produzione dei nanosistemi contenenti verteporfin AuNRs/LA,GG_VP

La preparazione dei campioni AuNRs/LA,GG_VP ha previsto una procedura analoga alla produzione dei campioni senza farmaco a meno dell'aggiunta del verteporfin durante lo step di rivestimento con GG. In particolare, sono stati preparati AuNRs/LA ed il farmaco (2% p/p) è stato posto ad incubare unitamente alla dispersione polimerica di GG (rapporto in peso Au:GG di 1:10) per 5h. Il prodotto è stato recuperato come liofilizzato e conservato al riparo dalla luce (Resa p/p%: 94%).

Determinazione del contenuto in verteporfin di AuNRs/LA,GG_VP

La quantità di verteporfin presente negli AuNRs/LA,GG_VP è stata calcolata mediante cromatografia HPC ed analisi spettroscopica UV.

La determinazione tramite cromatografia ha previsto l'utilizzo di un sistema HPLC Agilent Infinity 1290 equipaggiato con colonna Luna® 5 µm C18 (Phenomenex). Le analisi sono state eseguite a 25°C usando una miscela binaria composta da acetonitrile con 0.1% H₃PO₄/0.1% H₃PO₄ 95:5 v/v come fase mobile con flusso 0.6ml/min e detector a serie di diodi (DAD) fissato a 435nm. I campioni sono stati preparati estraendo il farmaco libero da

un quantitativo esattamente pesato di AuNRs/LA,GG_VP, impiegando come solvente di estrazione DMSO e mantenendo i campioni ad incubare per 3h sotto agitazione vorticoso. Le miscele ottenute sono state filtrate con filtri 0.22 μ m RC prima di essere iniettate (10 μ l volume di iniezione). La *drug loading* è stata calcolata come percentuale p/p di verteporfin rispetto al peso totale dei sistemi, comparando i cromatogrammi con una curva di calibrazione ottenuta con standard di verteporfin in DMSO (range di linearità= 10⁻⁴- 0.05 mg/ml; R² = 0.9998).

La quantificazione di verteporfin mediante spettrometria UV (spettrometro Shimadzu VIS-NIR 2400) è stata effettuata analizzando l'assorbanza a 435nm di soluzioni di verteporfin ottenute in seguito ad estrazione dai campioni AuNRs/LA,GG_VP in DMSO (procedura di estrazione come sopra) e confrontando i valori ottenuti con una retta di calibrazione di verteporfin in DMSO (range di linearità= 10⁻⁴- 0.01 mg/ml; R² = 0.99998).

Nanostrutture a base di copolimeri a blocchi di neosintesi per potenziali usi in teranostica

5.4.4. Materiali

Poli(etilenglicole) metiltere 2-(dodeciltiocarbonotioiltio)-2-metilpropionato (PEG-DDMAT; Mw=5000), dimetilsolfossido anidro, dimetilsolfossido deuterato (DMSO-D6), fenetilamina (Phen), 2,2-Azobis(2-metilpropionitrile) (AIBN), cloroformio, dietiltere, tetraidrofurano (THF), dimetilformammide di grado HPLC (DMF), cloruro di litio e cloruro ferrico ($\geq 99.9\%$), sono stati acquistati presso Sigma-Merck. L'iniziatore radicalico AIBN è stato utilizzato in seguito a ricristallizzazione da una soluzione sovrassatura a caldo in metanolo, filtrazione su carta e recupero dei cristalli dal filtrato dopo lento raffreddamento. N-acrilossi succinimide (NAS) è stata acquistata da TCI Chemicals. La deferoxamina mesilato Desferal® è stata acquistata da Novartis.

5.4.5. Sintesi dei derivati polimerici PEG-DFO-Phen

Studi di cinetica della polimerizzazione del derivato PEG-NAS

La cinetica della polimerizzazione RAFT che ha permesso l'ottenimento dei polimeri PEG-NAS è stata effettuata impiegando monomeri di N-acrilossisuccinimide (NAS) ed utilizzando come macroiniziatore PEG-DDMAT (5000 Da). NAS e PEG-DDMAT sono stati dissolti in DMSOa, facilitandone la solubilizzazione tramite agitazione e riscaldamento (40°C). A dissoluzione avvenuta, il tutto è stato trasferito in un pallone Schlenk munito di ancora magnetica. Una soluzione in DMSOa di AIBN appena cristallizzato è stata aggiunta al pallone di reazione ed i gas contenuti nella miscela sono stati rimossi mediante 6 cicli di *freeze-pump-thaw*. I rapporti molari molari tra macroiniziatore: monomero: iniziatore radicalico sono stati fissati pari a 1:100:0.2, con concentrazione 2.5M in monomero. La reazione è stata mantenuta a 70°C sotto agitazione per 48h, effettuando di volta in volta prelievi del contenuto del pallone di reazione (1, 2, 4, 8, 24, 48h) in atmosfera inerte, sotto flusso di azoto. La miscela prelevata è stata posta immediatamente in azoto liquido per bloccare la polimerizzazione e poi precipitata e lavata in etere dietilico. Ciascun campione essiccato sottovuoto è stato analizzato tramite spettrometria ^1H NMR in DMSO-d6 e analisi SEC.

Sintesi dei derivati PEG-DFO-Phen

La serie di copolimeri anfifilici a blocchi denominati PEG-DFO-Phen è stata sintetizzata tramite 4 step con isolamento degli intermedi. Il primo step ha previsto la polimerizzazione

RAFT di monomeri di N-acrilossisuccinimide (NAS) utilizzando come macroiniziatore PEG-DDMAT (5000 Da) seguendo la procedura sintetica utilizzata per gli studi di cinetica alla temperatura di 70°C per 24h sotto agitazione (rapporti molari tra NAS e macroiniziatore pari a 5, 8, 10 e 20). L'intermedio PEG-NAS è stato recuperato in seguito a precipitazione e lavaggi in etere dietilico. Nel secondo step sintetico PEG-NAS è stato solubilizzato in DMSOa ed è stato addizionato di deferoxamina mesilato (DFO) (mol DFO /mol NAS: 1) solida. A dissoluzione completa, è stata aggiunta trietilammina (TEA) (mol TEA /mol DFO: 1.2) ed il tutto è stato mantenuto a 45°C per 24h. Al termine della reazione, il prodotto è stato precipitato in etere dietilico e lavato in etere dietilico per due volte. Il prodotto è stato ulteriormente purificato tramite dissoluzione in cloroformio, filtrazione dell'eccesso di DFO (filtro per siringa in PTFE; cut-off: 0.22µm) e riprecipitato in etere dietilico. Il PEG-NAS-DFO è stato infine recuperato dopo essiccamento sottovuoto, in forma di polvere secca. Il terzo step ha previsto la polimerizzazione RAFT di nuovi monomeri di NAS, usando come macroiniziatore il derivato PEG-DFO. La procedura sintetica è stata sovrapponibile a quella eseguita durante il primo step a meno dei rapporti molari utilizzati, che in questo caso sono stati impostati nelle proporzioni macroiniziatore:monomero impostati pari a 1:100 e dei tempi di reazione (2, 10, 16, 24h) ottenendo i derivati PEG-DFO-NAS. Infine, il quarto ed ultimo step è stato condotto gocciolando fenetilammina (mol Phen /mol NAS: 2) in una dispersione di PEG-DFO-NAS in DMSOa e mantenendo a reagire per 24h a 45°C. Il derivato PEG-DFO-Phen è stato recuperato dopo precipitazione in etere dietilico, 2 lavaggi in etere dietilico ed essiccamento sottovuoto. ¹H NMR (600MHz, DMSO-d₆, 25°C, δ): 1.90 (s, 3H DFO, -CH₃-CO-NOH-CH₂-), 3.50 (m, 420H PEG-DDMAT 5000, -(O-CH₂-CH₂)₄₄-O-CH₃), δ 7.00–7.35 5H Phen, gruppo fenilico.

Cromatografia ad esclusione dimensionale (SEC)

Le analisi SEC sono state effettuate tramite apparecchiature Agilent usando precolonna PLgel 5µm 50x7,5mm una colonna PLgel 5µm MIXED-D 300x7,5mm connessa ad un detector di indice di rifrazione (Agilent 1260 Infinity). DMF addizionata di LiCl (0,1%) è stata usata come fase mobile ed il flusso è stato impostato a 1ml/min. L'analisi è stata condotta a 55°C con un volume di iniezione di 50µl ed un tempo di corsa di 30minuti. Ciascun campione è stato preparato tramite dispersione in fase mobile (3mg/ml) e filtrazione attraverso filtro per siringa con cut-off 0.45 µm.

Determinazione della concentrazione di ferro nei campioni

Per la quantificazione del contenuto in ferro delle nanoparticelle ottenute è stato seguito il protocollo del saggio alla fenantrolina. A ciascun campione, diluito 1:50 con acqua deionizzata (totale 1ml), è stato aggiunto HCl 37% (0.5ml) ed il tutto è stato posto a scaldare fino ad ebollizione incipiente, in modo da garantire la degradazione degli ossidi di ferro. In seguito a raffreddamento a temperatura ambiente, una soluzione di idrossilammina cloridrato (10%p/v) è stata addizionata per permettere la riduzione del Fe (III) a Fe (II). Dopo 15 minuti di agitazione, sono stati immessi in successione una soluzione di 1,10-fenantrolina (0.5% p/v; 1ml), NaOH 12M (0.5ml) e 5.9ml di tampone acetato a pH 4.3. Le assorbanze dei campioni, incubati per ulteriori 10 minuti, sono state registrate alla lunghezza d'onda di 510nm tramite spettrofotometro per piastre (TECAN Infinite M200PRO) e confrontate con una curva di calibrazione ottenuta con standard di FeCl₃. Il quantitativo in ioni ferro è stato espresso in mg/ml.

5.4.6. Preparazione e caratterizzazione dei nanosistemi

Preparazione dei nanostrutti

I derivati prodotti sono stati dispersi in THF (20mg in 1ml) e gocciolati lentamente sotto agitazione vorticoso in 1ml di acqua distillata alla temperatura di 40°C. Sotto le medesime condizioni di temperatura ed agitazione, il pallone contenente la miscela è stato mantenuto aperto per 30 minuti permettere la graduale evaporazione del THF. Il quantitativo residuo di solvente organico è stato rimosso tramite evaporazione sotto cappa a temperatura ambiente per le successive 24h.

Analisi di Dynamic Light Scattering e misure di potenziale Zeta

Le nanoparticelle ottenute sono state caratterizzate in termini di diametri medi idrodinamici (Z-Average), PDI e potenziale Zeta, mediante Malvern Zetasizer NanoZS, dotato di laser a 532 nm con angolo fisso di 173°. Ciascun campione è stato analizzato in dispersione acquosa alla concentrazione di 0.4 mg/ml 25°C. Il diametro medio idrodinamico e l'indice di polidispersità (PDI) sono stati ottenuti tramite analisi dei cumulanti della funzione di correlazione. Il potenziale Zeta (mV) stato calcolato dalla mobilità elettroforetica usando la relazione di Smoluchowsky e assumendo $Ka \gg 1$ (dove K e a sono rispettivamente il parametro di Debye-Hückel ed il raggio particellare).

Test di chelazione dello ione ferrico

20mg di PEG-DFO-Phen sono stati dispersi in 1.8ml di acqua distillata. Il campione disperso è stato addizionato di una soluzione di FeCl₃ in acqua distillata in modo da ottenere il rapporto molare tra DFO e Fe³⁺ pari a 1. Dopo aggiunta della soluzione di FeCl₃ goccia a goccia e sotto agitazione, il volume è stato portato a 2ml ed in tutto è stato posto ad incubare per una notte a temperatura ambiente. Allo stesso modo è stato preparato un campione contenente il chelante DFO ed il sale FeCl₃ in rapporti equimolari ed usato come controllo positivo. Gli spettri del campione così preparato sono stati acquisiti tramite spettrofotometro per piastre (TECAN Infinite 200) e confrontato con dispersioni di PEG-DFO-Phen, Fe³⁺ e DFO, utilizzati come controllo negativo.

Studi di risonanza magnetica nucleare

Gli studi di risonanza magnetica sono stati condotti con uno scanner RM clinico 7T (PHILIPS Achieva, Olanda) e le immagini sono state acquisite utilizzando la bobina SENSE-flex-M (PHILIPS, Olanda). Le immagini pesate in T2 sono state acquisite in sequenza multi-slice, turbo spin echo (TSE) [tempo di ripetizione (TR) = 846 ms, tempo di eco (TE) = 100 ms, angolo di inversione (FA) = 90 °, spessore della fetta = 2 mm e campo visivo (FOV) = 180 mm] e immagini pesate in T1 sono state acquisite in sequenza TSE [TR = 500 ms, TE = 15 ms, FA = 75 °, spessore fetta = 5 mm e FOV = 150 mm].

I dati di rilassometria T1 ponderati sono stati ottenuti dalla sequenza di eco turbo field (TFE) in modalità di scansione 2D [TR = 7 ms, TE = 3 ms, FA = 10 °, spessore fetta = 5 mm e FOV = 170 mm].

Finanziamenti

Questo lavoro è stato finanziato dal Fondo Sociale Europeo Sicilia 2020, avviso 5/2016 per il finanziamento di borse regionali di dottorato di ricerca in Sicilia, I finestra A.A 2016/2017 (CIP: 2014.IT.05.SFOP.014/3/10.5/9.2.02/0005; CUP: G77E16000030009).

Ringraziamenti

Si ringraziano il Dr. Roberto Puleio e lo staff dell'Istituto Zooprofilattico della Sicilia "A. Mirri" di Palermo per aver curato gli studi *in vivo*.

Si ringraziano il Prof. Dr. Dr. Twan Lammers e Seyed Mohammadali Dadfar del Dipartimento di Nanomedicina e Teranostica dell'università RWTH di Aachen (Germania) per l'accoglienza e la collaborazione fornita durante il soggiorno all'estero.

6. BIBLIOGRAFIA

- Abdalla, A. M. E.; Xiao, L.; Ullah, M. W.; Yu, M.; Ouyang, C.; Yang, G., 2018: Current challenges of cancer anti-angiogenic therapy and the promise of nanotherapeutics. *Theranostics*.
- Aggarwal, P.; Hall, J. B.; McLeland, C. B.; Dobrovolskaia, M. A.; McNeil, S. E., 2009, June 21: Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Advanced Drug Delivery Reviews*.
- Agnello, S.; Palumbo, F. S.; Pitarresi, G.; Fiorica, C.; Giammona, G., 2018: Synthesis and evaluation of thermo-rheological behaviour and ionotropic crosslinking of new gellan gum-alkyl derivatives. *Carbohydrate Polymers.*, **185**, 73–84.
- Albanese, A.; Tang, P. S.; Chan, W. C. W., 2012: The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems. *Annual Review of Biomedical Engineering.*, **14**, 1–16.
- Alcantara, D.; Josephson, L., 2012: Magnetic Nanoparticles for Application in Biomedical Sensing, pp. 269–289.
- Alexis, F.; Pridgen, E.; Molnar, L. K.; Farokhzad, O. C., 2008: Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics.*, Vol. 5pp. 505–515.
- Aliakbari, M.; Mohammadian, E.; Esmacili, A.; Pahlevanneshan, Z., 2019: Differential effect of polyvinylpyrrolidone-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles on BT-474 human breast cancer cell viability. *Toxicology in Vitro.*, **54**, 114–122.
- Alpsoy, L.; Baykal, A.; Amir, M.; Ülker, Z.; Nawaz, M., 2018: SPION@APTES@FA-PEG@Usnic Acid Bionanodrug for Cancer Therapy. *Journal of Superconductivity and Novel Magnetism.*, **31**, 1395–1401.
- Amendola, V.; Pilot, R.; Frascioni, M.; Maragò, O. M.; Iati, M. A., 2017, April 20: Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: A review. *Journal of Physics Condensed Matter*.
- Armstrong, G., 2008: Nanoparticles return to the fold. *Nature Chemistry*.
- Babes, L.; Denizot, B.; Tanguy, G.; Le Jeune, J. J.; Jallet, P., 1999: Synthesis of iron oxide nanoparticles used as MRI contrast agents: A parametric study. *Journal of Colloid and Interface Science.*, **212**, 474–482.
- Bañobre-López, M.; Teijeiro, A.; Rivas, J., 2013: Magnetic nanoparticle-based hyperthermia for cancer treatment. *Reports of Practical Oncology and Radiotherapy*.
- Bast, R. C.; Croe, C. M.; Hait, W. N.; Hong, W. K.; Piccart-Gebhart, M.; Pollock, R. E.; Yang, H.; Holland, J. F., 2017: *Holland-Frei Cancer Medicine*. John Wiley & Sons, Incorporated.
- Beik, J.; Abed, Z.; Ghoreishi, F. S.; Hosseini-Nami, S.; Mehrzadi, S.; Shakeri-Zadeh, A.; Kamrava, S. K., 2016, August 10: Nanotechnology in hyperthermia cancer therapy: From fundamental principles to advanced applications. *Journal of Controlled Release*.
- Berry, E.; Bulpitt, A. J., 2008: *Fundamentals of MRI. Fundamentals of MRI*. CRC Press.

Bhowmick, N. A.; Neilson, E. G.; Moses, H. L., 2004, November 18: Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*.

Bini, R. A.; Marques, R. F. C.; Santos, F. J.; Chaker, J. A.; Jafelicci, M., 2012: Synthesis and functionalization of magnetite nanoparticles with different amino-functional alkoxy silanes. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials.*, **324**, 534–539.

Bissell, M. J.; Labarge, M. A., 2005: Context, tissue plasticity, and cancer: are tumor stem cells also regulated by the microenvironment? *Cancer cell.*, **7**, 17–23.

Blanco, E.; Shen, H.; Ferrari, M., 2015, September 8: Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nature Biotechnology*.

Buschow, K. H. J., 2001: *Encyclopedia of materials : science and technology*. Elsevier.

Butler, R. F.; Banerjee, S. K., 1975: Theoretical single-domain grain size range in magnetite and titanomagnetite. *Journal of Geophysical Research.*, **80**, 4049–4058.

Buzug, T. M.; Bringout, G.; Erbe, M.; Gräfe, K.; Graeser, M.; Grüttner, M.; Halkola, A.; Sattel, T. F.; Tenner, W.; Wojtczyk, H.; Haegele, J.; Vogt, F. M.; Barkhausen, J.; Lüdtker-Buzug, K., 2012: Magnetic particle imaging: Introduction to imaging and hardware realization. *Zeitschrift für Medizinische Physik.*, **22**, 323–334.

Caldorera-Moore, M. E.; Liechty, W. B.; Peppas, N. A., 2011: Responsive theranostic systems: Integration of diagnostic imaging agents and responsive controlled release drug delivery carriers. *Accounts of Chemical Research.*, **44**, 1061–1070.

Cao, J.; Sun, T.; Grattan, K. T. V., 2014: Gold nanorod-based localized surface plasmon resonance biosensors: A review. *Sensors and Actuators, B: Chemical*.

Carenza, E.; Barceló, V.; Morancho, A.; Levander, L.; Boada, C.; Laromaine, A.; Roig, A.; Montaner, J.; Rosell, A., 2014: In vitro angiogenic performance and in vivo brain targeting of magnetized endothelial progenitor cells for neurorepair therapies. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine.*, **10**, 225–234.

Cavallaro, G.; Triolo, D.; Licciardi, M.; Giammona, G.; Chirico, G.; Sironi, L.; Dacarro, G.; Donà, A.; Milanese, C.; Pallavicini, P., 2013: Amphiphilic Copolymers Based on Poly[(hydroxyethyl)-d, l -aspartamide]: A Suitable Functional Coating for Biocompatible Gold Nanostars. *Biomacromolecules.*, **14**, 4260–4270.

Chang, S. S.; Shih, C. W.; Chen, C. D.; Lai, W. C.; Wang, C. R. C., 1999: The Shape Transition of Gold Nanorods. *Langmuir.*, **15**, 701–709.

Chatterjee, D. K.; Diagaradjane, P.; Krishnan, S., 2011: Nanoparticle-mediated hyperthermia in cancer therapy. *Therapeutic Delivery.*, **2**, 1001–1014.

Chelluri, L. K.; Verma, V. K.; Kamaraju, S. R.; Kancherla, R.; Kona, L. K.; Beevi, S. S.; Debnath, T.; Usha Shalini, P.; Arbab, S. A.; Vadapalli, R. M., 2015: Fluorescent magnetic iron oxide nanoparticles for cardiac precursor cell selection from stromal vascular fraction and optimization for magnetic resonance imaging. *International Journal of Nanomedicine.*, 711.

Chicheł, A.; Skowronek, J.; Kubaszewska, M.; Kanikowski, M., 2007: Hyperthermia - Description of a method and a review of clinical applications. *Reports of Practical Oncology and Radiotherapy*.

Chiefari, J.; Chong, Y. K. (Bill); Ercole, F.; Krstina, J.; Jeffery, J.; Le, T. P. T.; Mayadunne, R. T. A.; Meijs, G. F.; Moad, C. L.; Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang, S. H., 1998: Living Free-Radical Polymerization by Reversible Addition–Fragmentation Chain Transfer: The RAFT Process.

Macromolecules., **31**, 5559–5562.

Cho, K.; Wang, X.; Nie, S.; Chen, Z.; Shin, D. M., 2008, March 1: Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clinical Cancer Research*.

Choi, W. Il; Kim, J. Y.; Kang, C.; Byeon, C. C.; Kim, Y. H.; Tae, G., 2011: Tumor regression in vivo by photothermal therapy based on gold-nanorod-loaded, functional nanocarriers. *ACS Nano.*, **5**, 1995–2003.

Choi, K. Y.; Liu, G.; Lee, S.; Chen, X., 2012, January 21: Theranostic nanoplatfoms for simultaneous cancer imaging and therapy: Current approaches and future perspectives. *Nanoscale*.

Craig J. Hawker, *; Anton W. Bosman, and; Harth, E., 2001: New Polymer Synthesis by Nitroxide Mediated Living Radical Polymerizations.

Crawley, N.; Thompson, M.; Romaschin, A., 2014: Theranostics in the Growing Field of Personalized Medicine: An Analytical Chemistry Perspective. *Analytical Chemistry.*, **86**, 130–160.

De Palma, M.; Lewis, C. E., 2013, March 18: Macrophage regulation of tumor responses to anticancer therapies. *Cancer Cell*.

den Ouden, C. J. J.; Thompson, R. W., 1991: Analysis of the formation of monodisperse populations by homogeneous nucleation. *Journal of Colloid And Interface Science.*, **143**, 77–84.

Dewey, W. C., 2009: Arrhenius relationships from the molecule and cell to the clinic. *International Journal of Hyperthermia.*, **25**, 3–20.

Dewhurst, M. W.; Secomb, T. W., 2017, December 1: Transport of drugs from blood vessels to tumour tissue. *Nature Reviews Cancer*.

Ding, C.; Tong, L.; Feng, J.; Fu, J., 2016, December 1: Recent advances in stimuli-responsive release function drug delivery systems for tumor treatment. *Molecules*.

Du, Y.; Lai, P.; Leung, C.; Pong, P.; Du, Y.; Lai, P. T.; Leung, C. H.; Pong, P. W. T., 2013: Design of Superparamagnetic Nanoparticles for Magnetic Particle Imaging (MPI). *International Journal of Molecular Sciences.*, **14**, 18682–18710.

Durr, N. J.; Larson, T.; Smith, D. K.; Korgel, B. A.; Sokolov, K.; Ben-Yakar, A., 2007: Two-photon luminescence imaging of cancer cells using molecularly targeted gold nanorods. *Nano Letters.*, **7**, 941–945.

Eales, K. L.; Wilkinson, E. A.; Cruickshank, G.; Tucker, J. H. R.; Tennant, D. A., 2018: Verteporfin selectively kills hypoxic glioma cells through iron-binding and increased production of reactive oxygen species. *Scientific Reports.*, **8**.

Edelman, R. R.; Hesselink, J. R., 1990: *Clinical magnetic resonance imaging*. Saunders.

Egeblad, M.; Nakasone, E. S.; Werb, Z., 2010: Tumors as Organs: Complex Tissues that Interface with the Entire Organism. *Developmental Cell.*, **18**, 884–901.

Etheridge, M. L.; Campbell, S. A.; Erdman, A. G.; Haynes, C. L.; Wolf, S. M.; McCullough, J., 2013: The big picture on nanomedicine: the state of investigational and approved nanomedicine products. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.*, **9**, 1–14.

Fei, L.; Perrett, S., 2009: Effect of Nanoparticles on Protein Folding and Fibrillogenesis. *International Journal of Molecular Sciences.*, **10**, 646.

- Fiorica, C.; Mauro, N.; Pitarresi, G.; Scialabba, C.; Palumbo, F. S.; Giammona, G., 2017: Double-Network-Structured Graphene Oxide-Containing Nanogels as Photothermal Agents for the Treatment of Colorectal Cancer. *Biomacromolecules.*, **18**, 1010–1018.
- Foss, C. A.; Hornyak, G. L.; Stockert, J. A.; Martin, C. R., 1994: Template-synthesized nanoscopic gold particles: Optical spectra and the effects of particle size and shape. *Journal of Physical Chemistry.*, **98**, 2963–2971.
- Frank, N. Y.; Schatton, T.; Frank, M. H., 2010, January 4: The therapeutic promise of the cancer stem cell concept. *Journal of Clinical Investigation.*
- Fu, A.; Wilson, R. J.; Smith, B. R.; Mullenix, J.; Earhart, C.; Akin, D.; Guccione, S.; Wang, S. X.; Gambhir, S. S., 2012: Fluorescent magnetic nanoparticles for magnetically enhanced cancer imaging and targeting in living subjects. *ACS Nano.*, **6**, 6862–6869.
- Gao, J.; Huang, X.; Liu, H.; Zan, F.; Ren, J., 2012: Colloidal stability of gold nanoparticles modified with thiol compounds: Bioconjugation and application in cancer cell imaging. *Langmuir.*, **28**, 4464–4471.
- Giammona, G.; Carlisi, B.; Palazzo, S., 1987: Reaction of α,β -poly(N-hydroxyethyl)-DL-aspartamide with derivatives of carboxylic acids. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry.*, **25**, 2813–2818.
- Gillich, T.; Acikgöz, C.; Isa, L.; Schlüter, A. D.; Spencer, N. D.; Textor, M., 2013: PEG-stabilized core-shell nanoparticles: Impact of linear versus dendritic polymer shell architecture on colloidal properties and the reversibility of temperature-induced aggregation. *ACS Nano.*, **7**, 316–329.
- Gleich, B.; Weizenecker, J., 2005: Tomographic imaging using the nonlinear response of magnetic particles. *Nature.*, **435**, 1214–1217.
- Goldie, J. H.; Coldman, A. J., 1979: A mathematic model for relating the drug sensitivity of tumors to their spontaneous mutation rate. *Cancer Treatment Reports.*, **63**, 1727–1733.
- Gole, A.; Murphy, C. J., 2004: Seed-mediated synthesis of gold nanorods: Role of the size and nature of the seed. *Chemistry of Materials.*, **16**, 3633–3640.
- Golombek, S. K.; May, J. N.; Theek, B.; Appold, L.; Drude, N.; Kiessling, F.; Lammers, T., 2018, May 1: Tumor targeting via EPR: Strategies to enhance patient responses. *Advanced Drug Delivery Reviews.*
- Golovin, Y. I.; Zhigachev, A. O.; Efremova, M. V.; Majouga, A. G.; Kabanov, A. V.; Klyachko, N. L., 2018: Ways and Methods for Controlling Biomolecular Structures Using Magnetic Nanoparticles Activated by an Alternating Magnetic Field. *Nanotechnologies in Russia.*, **13**, 295–304.
- Gossuin, Y.; Gillis, P.; Hocq, A.; Vuong, Q. L.; Roch, A., 2009: Magnetic resonance relaxation properties of superparamagnetic particles. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology.*, **1**, 299–310.
- Gottesman, M. M.; Fojo, T.; Bates, S. E., 2002: Multidrug resistance in cancer: Role of ATP-dependent transporters. *Nature Reviews Cancer.*
- Graeser, M.; Thieben, F.; Szwargulski, P.; Werner, F.; Gdaniec, N.; Boberg, M.; Griese, F.; Möddel, M.; Ludewig, P.; van de Ven, D.; Weber, O. M.; Woywode, O.; Gleich, B.; Knopp, T., 2019: Human-sized magnetic particle imaging for brain applications. *Nature Communications.*, **10**.
- Greaves, M.; Maley, C. C., 2012, January 19: Clonal evolution in cancer. *Nature.*

- Grönbeck, H.; Curioni, A.; Andreoni, W., 2000: Thiols and disulfides on the Au(111) surface: The headgroup-gold interaction. *Journal of the American Chemical Society.*, **122**, 3839–3842.
- Gupta, A. K.; Gupta, M., 2005: Cytotoxicity suppression and cellular uptake enhancement of surface modified magnetic nanoparticles. *Biomaterials.*, **26**, 1565–1573.
- Häkkinen, H., 2012, June: The gold-sulfur interface at the nanoscale. *Nature Chemistry.*
- Hamley, I. W., 2003, April 17: Nanotechnology with soft materials. *Angewandte Chemie - International Edition.*
- Hao, E.; Bailey, R. C.; Schatz, G. C.; Hupp, J. T.; Li, S., 2004: Synthesis and Optical Properties of ‘Branched’ Gold Nanocrystals. *Nano Letters.*, **4**, 327–330.
- Hauck, T. S.; Jennings, T. L.; Yatsenko, T.; Kumaradas, J. C.; Chan, W. C. W., 2008: Enhancing the toxicity of cancer chemotherapeutics with gold nanorod hyperthermia. *Advanced Materials.*, **20**, 3832–3838.
- Hayashi, K.; Ono, K.; Suzuki, H.; Sawada, M.; Moriya, M.; Sakamoto, W.; Yogo, T., 2010: High-frequency, magnetic-field-responsive drug release from magnetic nanoparticle/organic hybrid based on hyperthermic effect. *ACS Applied Materials and Interfaces.*, **2**, 1903–1911.
- Hayashi, K.; Nakamura, M.; Sakamoto, W.; Yogo, T.; Miki, H.; Ozaki, S.; Abe, M.; Matsumoto, T.; Ishimura, K., 2013: Superparamagnetic nanoparticle clusters for cancer theranostics combining magnetic resonance imaging and hyperthermia treatment. *Theranostics.*, **3**, 366–376.
- Hendel, T.; Wuithschick, M.; Kettemann, F.; Birnbaum, A.; Rademann, K.; Polte, J., 2014: In Situ Determination of Colloidal Gold Concentrations with UV–Vis Spectroscopy: Limitations and Perspectives. *Analytical Chemistry.*, **86**, 11115–11124.
- Hildebrandt, B.; Wust, P.; Ahlers, O.; Dieing, A.; Sreenivasa, G.; Kerner, T.; Felix, R.; Riess, H., 2002: The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Critical reviews in oncology/hematology.*, **43**, 33–56.
- Hodson, R., 2016: Precision medicine. *Nature* 2016 537:7619.
- Holland, J. P.; Divilov, V.; Bander, N. H.; Smith-Jones, P. M.; Larson, S. M.; Lewis, J. S., 2010: ⁸⁹Zr-DFO-J591 for ImmunoPET of Prostate-Specific Membrane Antigen Expression In Vivo. *Journal of Nuclear Medicine.*, **51**, 1293–1300.
- Hoshiar, A. K.; Le, T. A.; Amin, F. U.; Kim, M. O.; Yoon, J., 2018: A novel magnetic actuation scheme to disaggregate nanoparticles and enhance passage across the blood–brain barrier. *Nanomaterials.*, **8**.
- Huang, S.; Ingber, D. E., 2006: A non-genetic basis for cancer progression and metastasis: Self-organizing attractors in cell regulatory networks. *Breast Disease.*, **26**, 27–54.
- Hujaya, S. D.; Lorite, G. S.; Vainio, S. J.; Liimatainen, H., 2018: Polyion complex hydrogels from chemically modified cellulose nanofibrils: Structure-function relationship and potential for controlled and pH-responsive release of doxorubicin. *Acta Biomaterialia.*, **75**, 346–357.
- Iyer, A. K.; Khaled, G.; Fang, J.; Maeda, H., 2006: Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug discovery today.*, **11**, 812–818.
- Jain, P. K.; Lee, K. S.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A., 2006: Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: applications in biological imaging and biomedicine. *The journal of physical chemistry. B.*, **110**, 7238–7248.

- Jain, R. K., 1994: Barriers to Drug Delivery in Solid Tumors. *Scientific American.*, **271**, 58–65.
- Jain, R. K., 2012, December: Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors. *Advanced Drug Delivery Reviews.*
- Jain, S.; Hirst, D. G.; O’Sullivan, J. M., 2012, February: Gold nanoparticles as novel agents for cancer therapy. *British Journal of Radiology.*
- Jana, N. R.; Gearheart, L.; Murphy, C. J., 2001, May 17: Wet chemical synthesis of high aspect ratio cylindrical gold nanorods. *Journal of Physical Chemistry B.*
- Jang, S. H.; Wientjes, M. G.; Lu, D.; Au, J. L. S., 2003: Drug delivery and transport to solid tumors. *Pharmaceutical research.*, **20**, 1337–1350.
- Jeelani, S.; Jagat Reddy, R. C.; Maheswaran, T.; Asokan, G. S.; Dany, A.; Anand, B., 2014: Theranostics: A treasured tailor for tomorrow. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences.*
- Jin, Y.; Song, L.; Su, Y.; Zhu, L.; Pang, Y.; Qiu, F.; Tong, G.; Yan, D.; Zhu, B.; Zhu, X., 2011: Oxime linkage: A robust tool for the design of pH-sensitive polymeric drug carriers. *Biomacromolecules.*, **12**, 3460–3468.
- Jokerst, J. V.; Lobovkina, T.; Zare, R. N.; Gambhir, S. S., 2011, June: Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. *Nanomedicine.*
- Jones, V. S.; Huang, R. Y.; Chen, L. P.; Chen, Z. S.; Fu, L.; Huang, R. P., 2016, April 1: Cytokines in cancer drug resistance: Cues to new therapeutic strategies. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer.*
- Jun, Y. W.; Lee, J. H.; Cheon, J., 2007: Nanoparticle Contrast Agents for Molecular Magnetic Resonance Imaging. *Nanobiotechnology II: More Concepts and Applications.* John Wiley and Sons, pp. 321–346.
- Kelly, K. L.; Coronado, E.; Zhao, L. L.; Schatz, G. C., 2003: The optical properties of metal nanoparticles: The influence of size, shape, and dielectric environment. *Journal of Physical Chemistry B.*, **107**, 668–677.
- Khot, M. I.; Andrew, H.; Svavarsdottir, H. S.; Armstrong, G.; Quyn, A. J.; Jayne, D. G., 2019, June 1: A Review on the Scope of Photothermal Therapy–Based Nanomedicines in Preclinical Models of Colorectal Cancer. *Clinical Colorectal Cancer.*
- Kijima, T.; Maulin, G.; Ma, P. C.; Madhiwala, P.; Schaefer, E.; Salgia, R., 2008: Fibronectin enhances viability and alters cytoskeletal functions (with effects on the phosphatidylinositol 3-kinase pathway) in small cell lung cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine.*, **7**, 157–164.
- Kittel, C., 2004: *Introduction to solid state physics.* *Journal of the Mechanics and Physics of Solids.* John Wiley & Sons, Inc., Vol. 6.
- Kodama, R. H., 1999: Magnetic Nanomaterials [1 ed.]. *J. Magn. Magn. Mater.*, **200**, 359–372.
- Kovacic, P.; Osuna Jr., J., 2005: Mechanisms of Anti-Cancer Agents Emphasis on Oxidative Stress and Electron Transfer. *Current Pharmaceutical Design.*, **6**, 277–309.
- Krasia-Christoforou, T.; Georgiou, T. K., 2013: Polymeric theranostics: Using polymer-based systems for simultaneous imaging and therapy. *Journal of Materials Chemistry B.*, **1**, 3002–3025.
- Krishnan, K. M., 2010: Biomedical nanomagnetism: A spin through possibilities in imaging, diagnostics, and therapy. *IEEE Transactions on Magnetics.*, **46**, 2523–2558.

- Kumar, A.; Mandal, S.; Selvakannan, P. R.; Pasricha, R.; Mandale, A. B.; Sastry, M., 2003: Investigation into the interaction between surface-bound alkylamines and gold nanoparticles. *Langmuir.*, **19**, 6277–6282.
- Kumar, P.; Agnihotri, S.; Roy, I., 2018: Preparation and characterization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles for magnetically guided drug delivery. *International Journal of Nanomedicine.*, **13**, 43–46.
- Kuriyama, N.; Kuriyama, H.; Julin, C. M.; Lamborn, K. R.; Israel, M. A., 2001: Protease pretreatment increases the efficacy of adenovirus-mediated gene therapy for the treatment of an experimental glioblastoma model. *Cancer Research.*, **61**, 1805–1809.
- Kyle, A. H.; Huxham, L. A.; Yeoman, D. M.; Minchinton, A. I., 2007: Limited tissue penetration of taxanes: A mechanism for resistance in solid tumors. *Clinical Cancer Research.*, **13**, 2804–2810.
- Lagendijk, J. J. W., 2000, May: Hyperthermia treatment planning. *Physics in Medicine and Biology.*
- Lamer, V. K.; Dinegar, R. H., 1950: Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols. *Journal of the American Chemical Society.*, **72**, 4847–4854.
- Lammers, T.; Kiessling, F.; Hennink, W. E.; Storm, G., 2010: Nanotheranostics and Image-Guided Drug Delivery: Current Concepts and Future Directions. *Molecular Pharmaceutics.*, **7**, 1899–1912.
- LaRocque, J.; Bharali, D. J.; Mousa, S. A., 2009: Cancer detection and treatment: the role of nanomedicines. *Molecular biotechnology.*, **42**, 358–366.
- Laurent, S.; Forge, D.; Port, M.; Roch, A.; Robic, C.; Vander Elst, L.; Muller, R. N., 2008: Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations and biological applications. *Chemical Reviews.*, **108**, 2064–2110.
- Lee, J. H.; Jang, J. T.; Choi, J. S.; Moon, S. H.; Noh, S. H.; Kim, J. W.; Kim, J. G.; Kim, I. S.; Park, K. I.; Cheon, J., 2011: Exchange-coupled magnetic nanoparticles for efficient heat induction. *Nature Nanotechnology.*, **6**, 418–422.
- Li Volsi, A.; Scialabba, C.; Vetri, V.; Cavallaro, G.; Licciardi, M.; Giammona, G., 2017: Near-Infrared Light Responsive Folate Targeted Gold Nanorods for Combined Photothermal-Chemotherapy of Osteosarcoma. *ACS Applied Materials & Interfaces.*, **9**, 14453–14469.
- Li Volsi, A.; Fiorica, C.; D'Amico, M.; Scialabba, C.; Palumbo, F. S.; Giammona, G.; Licciardi, M., 2018: Hybrid Gold/Silica/Quantum-Dots supramolecular-nanostructures encapsulated in polymeric micelles as potential theranostic tool for targeted cancer therapy. *European Polymer Journal.*, **105**, 38–47.
- Li, W.; Chen, X., 2015, January 1: Gold nanoparticles for photoacoustic imaging. *Nanomedicine.*
- Licciardi, M.; Scialabba, C.; Cavallaro, G.; Sangregorio, C.; Fantechi, E.; Giammona, G., 2013: Cell uptake enhancement of folate targeted polymer coated magnetic nanoparticles. *Journal of biomedical nanotechnology.*, **9**, 949–964.
- Licciardi, M.; Scialabba, C.; Puleio, R.; Cassata, G.; Cicero, L.; Cavallaro, G.; Giammona, G., 2019: Smart copolymer coated SPIONs for colon cancer chemotherapy. *International Journal of Pharmaceutics.*, **556**, 57–67.
- Liechty, W. B.; Kryscio, D. R.; Slaughter, B. V.; Peppas, N. A., 2010: Polymers for Drug Delivery Systems. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering.*, **1**, 149–173.
- Liu, Z.; Yang, K.; Lee, S. T., 2011: Single-walled carbon nanotubes in biomedical imaging. *Journal*

of Materials Chemistry., **21**, 586–598.

Loessner, D.; Stok, K. S.; Lutolf, M. P.; Hutmacher, D. W.; Clements, J. A.; Rizzi, S. C., 2010: Bioengineered 3D platform to explore cell-ECM interactions and drug resistance of epithelial ovarian cancer cells. *Biomaterials.*, **31**, 8494–8506.

Louie, A., 2010: Multimodality imaging probes: Design and challenges. *Chemical Reviews.*, **110**, 3146–3195.

Ludewig, P.; Gdaniec, N.; Sedlacik, J.; Forkert, N. D.; Schwargulski, P.; Graeser, M.; Adam, G.; Kaul, M. G.; Krishnan, K. M.; Ferguson, R. M.; Khandhar, A. P.; Walczak, P.; Fiehler, J.; Thomalla, G.; Gerloff, C.; Knopp, T.; Magnus, T., 2017: Magnetic Particle Imaging for Real-Time Perfusion Imaging in Acute Stroke. *ACS Nano.*, **11**, 10480–10488.

Lui, J. W.; Xiao, S.; Ogomori, K.; Hammarstedt, J. E.; Little, E. C.; Lang, D., 2019: The efficiency of verteporfin as a therapeutic option in pre-clinical models of melanoma. *Journal of Cancer.*, **10**, 1–10.

Maeda, H.; Matsumura, Y., 1989: Tumoritropic and lymphotropic principles of macromolecular drugs. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems.*

Maeda, H., 2015, August 30: Toward a full understanding of the EPR effect in primary and metastatic tumors as well as issues related to its heterogeneity. *Advanced Drug Delivery Reviews.*

Mahmoudi, M.; Sant, S.; Wang, B.; Laurent, S.; Sen, T., 2011, January: Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews.*

Maier, S. A., 2007: Electromagnetics of Metals. *Plasmonics: Fundamentals and Applications.* Springer US, New York, NY, pp. 5–19.

Massart, R., 1981: Preparation of Aqueous Magnetic Liquids in Alkaline and Acidic Media. *IEEE Transactions on Magnetics.*

Matsumura, Y.; Maeda, H., 1986: A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumoritropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. *Cancer Research.*, **46**, 6387–6392.

Matyjaszewski, K.; Xia, J., 2001: Atom transfer radical polymerization. *Chem. Rev.*, **101**, 2921–2990.

Mauro, N.; Campora, S.; Adamo, G.; Scialabba, C.; Ghersi, G.; Giammona, G., 2016: Polyaminoacid–doxorubicin prodrug micelles as highly selective therapeutics for targeted cancer therapy. *RSC Advances.*, **6**, 77256–77266.

McDonald, D. M.; Choyke, P. L., 2003: Imaging of angiogenesis: From microscope to clinic. *Nature Medicine.*, **9**, 713–725.

McMillin, D. W.; Negri, J. M.; Mitsiades, C. S., 2013: The role of tumour–stromal interactions in modifying drug response: challenges and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery.*, **12**, 217–228.

Mendichi, R.; Giacometti Schieron, A.; Cavallaro, G.; Licciardi, M.; Giammona, G., 2003: Molecular characterization of α,β -poly(N-2-hydroxyethyl)-dl-aspartamide derivatives as potential self-assembling copolymers forming polymeric micelles. *Polymer.*, **44**, 4871–4879.

Minchinton, A. I.; Tannock, I. F., 2006, August: Drug penetration in solid tumours. *Nature Reviews*

Cancer.

Mino, Y.; Kitagaki, H.; Sasaki, M.; Ishii, K.; Mori, T.; Yamada, K.; Nagasawa, O., 1998: Characterization of Fe(III)-deferoxamine and Mn(II)-pectin as magnetic resonance imaging contrast agents. *Biological & pharmaceutical bulletin.*, **21**, 1385–1388.

Mitchell, M. J.; King, M. R., 2013: Fluid shear stress sensitizes cancer cells to receptor-mediated apoptosis via trimeric death receptors. *New Journal of Physics.*, **15**.

Moghimi, S. M.; Hunter, A. C.; Murray, J. C., 2005: Nanomedicine: current status and future prospects. *The FASEB Journal.*, **19**, 311–330.

Muhamad, N.; Plengsuriyakarn, T.; Na-Bangchang, K., 2018, July 4: Application of active targeting nanoparticle delivery system for chemotherapeutic drugs and traditional/herbal medicines in cancer therapy: A systematic review. *International Journal of Nanomedicine.*

Murphy, C. J.; Sau, T. K.; Gole, A. M.; Orendorff, C. J.; Gao, J.; Gou, L.; Hunyadi, S. E.; Li, T., 2005: Anisotropic metal nanoparticles: Synthesis, assembly, and optical applications. *Journal of Physical Chemistry B.*, **109**, 13857–13870.

Muthiah, M.; Vu-Quang, H.; Kim, Y. K.; Rhee, J. H.; Kang, S. H.; Jun, S. Y.; Choi, Y. J.; Jeong, Y. Y.; Cho, C. S.; Park, I. K., 2013: Mannose-poly(ethylene glycol)-linked SPION targeted to antigen presenting cells for magnetic resonance imaging on lymph node. *Carbohydrate Polymers.*, **92**, 1586–1595.

Netti, P. A.; Berk, D. A.; Swartz, M. A.; Grodzinsky, A. J.; Jain, R. K., 2000: Role of Extracellular Matrix Assembly in Interstitial Transport in Solid Tumors Role of Extracellular Matrix Assembly in Interstitial Transport in Solid Tumors 1, 2497–2503.

Nguyen, T. K.; Lam, S. J.; Ho, K. K.; Kumar, N.; Qiao, G. G.; Egan, S.; Boyer, C.; Wong, E. H., 2017: Rational Design of Single-Chain Polymeric Nanoparticles That Kill Planktonic and Biofilm Bacteria. *ACS Infectious Diseases.*, **3**, 237–248.

Nikoobakht, B.; El-Sayed, M. A., 2003: Preparation and growth mechanism of gold nanorods (NRs) using seed-mediated growth method. *Chemistry of Materials.*, **15**, 1957–1962.

Owens, D. E.; Peppas, N. A., 2006, January 3: Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics.*

Palumbo, F. S.; Fiorica, C.; Pitarresi, G.; Zingales, M.; Bologna, E.; Giammona, G., 2018: Multifibrillar bundles of a self-assembling hyaluronic acid derivative obtained through a microfluidic technique for aortic smooth muscle cell orientation and differentiation. *Biomaterials science.*, **6**, 2518–2526.

Palumbo, F. S.; Agnello, S.; Fiorica, C.; Pitarresi, G.; Giammona, G., 2019: Chemical stiffening of constructs between polymeric microparticles based on a hyaluronic acid derivative and mesenchymal stem cells: rheological and *in vitro* viability studies. *Polymer International.*, **68**, 394–399.

Pasquier, J.; Gosset, M.; Geyl, C.; Hoarau-Véchet, J.; Chevrot, A.; Pocard, M.; Mirshahi, M.; Lis, R.; Raffii, A.; Touboul, C., 2018: CCL2/CCL5 secreted by the stroma induce IL-6/PYK2 dependent chemoresistance in ovarian cancer. *Molecular Cancer.*, **17**.

Picone, C. S. F.; Cunha, R. L., 2011: Influence of pH on formation and properties of gellan gels. *Carbohydrate Polymers.*, **84**, 662–668.

Pitt, W. G.; Husseini, G.; Staples, B. J., 2004, November: Ultrasonic drug delivery - A general review. *Expert Opinion on Drug Delivery.*

Price, D. N.; Stromberg, L. R.; Kunda, N. K.; Muttill, P., 2017: In Vivo Pulmonary Delivery and Magnetic-Targeting of Dry Powder Nano-in-Microparticles. *Molecular Pharmaceutics.*, **14**, 4741–4750.

Pysz, M. A.; Gambhir, S. S.; Willmann, J. K., 2010, July: Molecular imaging: current status and emerging strategies. *Clinical Radiology*.

Qin, B.; Liu, L.; Wu, X.; Liang, F.; Hou, T.; Pan, Y.; Song, S., 2017: mPEGylated solanesol micelles as redox-responsive nanocarriers with synergistic anticancer effect. *Acta Biomaterialia.*, **64**, 211–222.

Qu, Q.; Wang, Y.; Zhang, L.; Zhang, X.; Zhou, S., 2016: A Nanoplatform with Precise Control over Release of Cargo for Enhanced Cancer Therapy. *Small.*, **12**, 1378–1390.

Rafii, A.; Mirshahi, P.; Poupot, M.; Faussat, A. M.; Simon, A.; Ducros, E.; Mery, E.; Couderc, B.; Lis, R.; Capdet, J.; Bergalet, J.; Querleu, D.; Dagonnet, F.; Fournié, J. J.; Marie, J. P.; Pujade-Lauraine, E.; Favre, G.; Soria, J.; Mirshahi, M., 2008: Oncologic trogocytosis of an original stromal cells induces chemoresistance of ovarian tumours. *PLoS ONE.*, **3**.

Raghunand, N.; Gillies, R. J., 2000: pH and drug resistance in tumors. *Drug Resistance Updates.*, **3**, 39–47.

Ramanujan, S.; Pluen, A.; McKee, T. D.; Brown, E. B.; Boucher, Y.; Jain, R. K., 2002: Diffusion and convection in collagen gels: Implications for transport in the tumor interstitium. *Biophysical Journal.*, **83**, 1650–1660.

Raouf, M.; Cisneros, B. T.; Corr, S. J.; Palalon, F.; Curley, S. A.; Koshkina, N. V, 2013: Tumor selective hyperthermia induced by short-wave capacitively-coupled RF electric-fields. *PloS one.*, **8**, e68506.

Reddel, C. J.; Tan, C. W.; Chen, V. M., 2019, January 1: Thrombin generation and cancer: Contributors and consequences. *Cancers*.

Reinhold, H. S.; Endrich, B., 1986: Tumour microcirculation as a target for hyperthermia. *International Journal of Hyperthermia.*, **2**, 111–137.

Ritchie, H.; Roser, M., 2018: Causes of Death, Our World in Data. *Our World in Data*.

Robinson, J. T.; Perkins, F. K.; Snow, E. S.; Wei, Z.; Sheehan, P. E., 2008: Reduced graphene oxide molecular sensors. *Nano Letters.*, **8**, 3137–3140.

Rohwer, N.; Cramer, T., 2011: Hypoxia-mediated drug resistance: Novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways. *Drug Resistance Updates.*, **14**, 191–201.

Roti Roti, J. L., 2004: Introduction: radiosensitization by hyperthermia. *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group.*, **20**, 109–114.

Saengruengrit, C.; Ritprajak, P.; Wanichwecharungruang, S.; Sharma, A.; Salvan, G.; Zahn, D. R. T.; Insin, N., 2018: The combined magnetic field and iron oxide-PLGA composite particles: Effective protein antigen delivery and immune stimulation in dendritic cells. *Journal of Colloid and Interface Science.*, **520**, 101–111.

Sakulkhu, U.; Mahmoudi, M.; Maurizi, L.; Salaklang, J.; Hofmann, H., 2014: Protein corona composition of superparamagnetic iron oxide nanoparticles with various physico-Chemical properties and coatings. *Scientific Reports.*, **4**.

Sanghani, S. P.; Quinney, S. K.; Fredenburg, T. B.; Sun, Z.; Davis, W. I.; Murry, D. J.; Cummings, O. W.; Seitz, D. E.; Bosron, W. F., 2003: Carboxylesterases expressed in human colon tumor tissue and their role in CPT-11 hydrolysis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.*, **9**, 4983–4991.

Sanna, V.; Pala, N.; Sechi, M., 2014, January 15: Targeted therapy using nanotechnology: Focus on cancer. *International Journal of Nanomedicine.*

Santoro, M.; Lamhamedi-Cherradi, S. E.; Menegaz, B. A.; Ludwig, J. A.; Mikos, A. G., 2015: Flow perfusion effects on three-dimensional culture and drug sensitivity of Ewing sarcoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, **112**, 10304–10309.

Schulz, V.; Straub, M.; Mahlke, M.; Hubertus, S.; Lammers, T.; Kiessling, F., 2015: A Field Cancellation Signal Extraction Method for Magnetic Particle Imaging. *IEEE Transactions on Magnetics.*, **51**, 1–4.

Shi, Y.; van Steenberg, M. J.; Teunissen, E. A.; Novo, L.; Gradmann, S.; Baldus, M.; van Nostrum, C. F.; Hennink, W. E., 2013: Π - Π Stacking Increases the Stability and Loading Capacity of Thermosensitive Polymeric Micelles for Chemotherapeutic Drugs. *Biomacromolecules.*, **14**, 1826–1837.

Shi, Z.; Neoh, K. G.; Kang, E. T.; Shuter, B.; Wang, S. C.; Poh, C.; Wang, W., 2009: (Carboxymethyl)chitosan-modified superparamagnetic iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging of stem cells. *ACS Applied Materials and Interfaces.*, **1**, 328–335.

Shiao, Y. S.; Chiu, H. H.; Wu, P. H.; Huang, Y. F., 2014, December 24: Aptamer-functionalized gold nanoparticles as photoresponsive nanoplatfor for Co-drug delivery. *ACS Applied Materials and Interfaces.*

Siegel, R. L.; Miller, K. D.; Jemal, A., 2016: Cancer statistics, 2016. *CA: A Cancer Journal for Clinicians.*, **66**, 7–30.

Siegel, R. L.; Miller, K. D.; Jemal, A., 2018: Cancer statistics, 2018. *CA: a cancer journal for clinicians.*, **68**, 7–30.

Silva, C. O.; Pinho, J. O.; Lopes, J. M.; Almeida, A. J.; Gaspar, M. M.; Reis, C., 2019, January 1: Current trends in cancer nanotheranostics: Metallic, polymeric, and lipid-based systems. *Pharmaceutics.*

Sminia, P.; Zee, J. Van Der; Wondergem, J.; Haveman, J., 1994: Effect of hyperthermia on the central nervous system: A review. *International Journal of Hyperthermia.*

Sodipo, B. K.; Aziz, A. A., 2018: One minute synthesis of amino-silane functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles by sonochemical method. *Ultrasonics Sonochemistry.*, **40**, 837–840.

Soria-Valles, C.; Gutiérrez-Fernández, A.; Guiu, M.; Mari, B.; Fueyo, A.; Gomis, R. R.; López-Otín, C., 2014: The anti-metastatic activity of collagenase-2 in breast cancer cells is mediated by a signaling pathway involving decorin and miR-21. *Oncogene.*, **33**, 3054–3063.

Streffler, C., 1995: Molecular and Cellular Mechanisms of Hyperthermia, pp. 47–74.

Strehl, C.; Maurizi, L.; Gaber, T.; Hoff, P.; Broschard, T.; Poole, A. R.; Hofmann, H.; Buttgerit, F., 2016, November 8: Modification of the surface of superparamagnetic iron oxide nanoparticles to enable their safe application in humans. *International Journal of Nanomedicine.*

Sun, X.; Liu, Z.; Welsher, K.; Robinson, J. T.; Goodwin, A.; Zaric, S.; Dai, H., 2008: Nano-graphene

- oxide for cellular imaging and drug delivery. *Nano Research.*, **1**, 203–212.
- Tannock, I. F.; Lee, C. M.; Tunggal, J. K.; Cowan, D. S. M.; Egorin, M. J., 2002: Limited penetration of anticancer drugs through tumor tissue: A potential cause of resistance of solid tumors to chemotherapy. *Clinical Cancer Research.*, **8**, 878–884.
- Tari, A.; Chantrell, R. W.; Charles, S. W.; Popplewell, J., 1979: The magnetic properties and stability of a ferrofluid containing Fe₃O₄ particles. *Physica B+C.*, **97**, 57–64.
- Taurin, S.; Almomen, A. A.; Pollak, T.; Kim, S. J.; Maxwell, J.; Peterson, C. M.; Owen, S. C.; Janát-Amsbury, M. M., 2018, August 9: Thermosensitive hydrogels a versatile concept adapted to vaginal drug delivery. *Journal of Drug Targeting.*
- Tay, Z. W.; Goodwill, P. W.; Hensley, D. W.; Taylor, L. A.; Zheng, B.; Conolly, S. M., 2016: A High-Throughput, Arbitrary-Waveform, MPI Spectrometer and Relaxometer for Comprehensive Magnetic Particle Optimization and Characterization. *Scientific Reports.*, **6**.
- Thakur, G.; Rodrigues, F. C.; Singh, K., 2018: Crosslinking Biopolymers for Advanced Drug Delivery and Tissue Engineering Applications. *Advances in Experimental Medicine and Biology.* Springer New York LLC, Vol. 1078pp. 213–231.
- Tian, Q.; Price, N. D.; Hood, L., 2012: Systems cancer medicine: Towards realization of predictive, preventive, personalized and participatory (P4) medicine. *Journal of Internal Medicine.*, Vol. 271pp. 111–121.
- Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J., 1951: A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society.*, **11**, 55.
- Van Der Zande, B. M. I.; Böhmer, M. R.; Fokkink, L. G. J.; Schönenberger, C., 2000: Colloidal dispersions of gold rods: Synthesis and optical properties. *Langmuir.*, **16**, 451–458.
- Van der Zee, J., 2002, August: Heating the patient: A promising approach? *Annals of Oncology.*
- Vaupel, P. W.; Kelleher, D. K., 1995: Metabolic Status and Reaction to Heat of Normal and Tumor Tissue, pp. 157–176.
- Velaei, K.; Samadi, N.; Barazvan, B.; Soleimani Rad, J., 2016, December: Tumor microenvironment-mediated chemoresistance in breast cancer. *Breast.*
- Wahajuddin; Arora, S., 2012: Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Magnetic nanoplatforms as drug carriers. *International Journal of Nanomedicine.*
- Wang, D.; Zou, L.; Jin, Q.; Hou, J.; Ge, G.; Yang, L., 2018: Human carboxylesterases: a comprehensive review. *Acta Pharmaceutica Sinica B.*, **8**, 699–712.
- Wang, W.; Kryczek, I.; Dostál, L.; Lin, H.; Tan, L.; Zhao, L.; Lu, F.; Wei, S.; Maj, T.; Peng, D.; He, G.; Vatan, L.; Szeliga, W.; Kuick, R.; Kotarski, J.; Tarkowski, R.; Dou, Y.; Rattan, R.; Munkarah, A. et al., 2016: Effector T Cells Abrogate Stroma-Mediated Chemoresistance in Ovarian Cancer. *Cell.*, **165**, 1092–1105.
- Wei, H.; Wang, F.; Wang, Y.; Li, T.; Xiu, P.; Zhong, J.; Sun, X.; Li, J., 2017: Verteporfin suppresses cell survival, angiogenesis and vasculogenic mimicry of pancreatic ductal adenocarcinoma via disrupting the YAP-TEAD complex. *Cancer science.*, **108**, 478–487.
- Weissleder, R., 2001: A clearer vision for in vivo imaging. *Nature Biotechnology.*, **19**, 316–317.
- Wicki, A.; Witzigmann, D.; Balasubramanian, V.; Huwyler, J., 2015: Nanomedicine in cancer

therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications. *Journal of Controlled Release.*, **200**, 138–157.

Wu, X. L. C.; Zhang, X. Y.; Steinberg, X. G.; Qu, X. H.; Huang, X. S.; Cheng, X. M.; Bliss, X. T.; Du, X. F.; Rao, X. J.; Song, X. G.; Pisani, X. L.; Doyle, X. T.; Conolly, X. S.; Krishnan, X. K.; Grant, X. G.; Wintermark, X. M., 2019, February 1: A review of magnetic particle imaging and perspectives on neuroimaging. *American Journal of Neuroradiology.*

Wust, P.; Hildebrandt, B.; Sreenivasa, G.; Rau, B.; Gellermann, J.; Riess, H.; Felix, R.; Schlag, P., 2002: Hyperthermia in combined treatment of cancer. *Lancet Oncology.*

Xia, Y.; Halas, N. J., 2005: Shape-Controlled Synthesis and Surface Plasmonic Properties of Metallic Nanostructures. *MRS Bulletin.*, **30**, 338–348.

Xiao, L.; Qiao, Y.; He, Y.; Yeung, E. S., 2010: Three dimensional orientational imaging of nanoparticles with darkfield microscopy. *Analytical Chemistry.*, **82**, 5268–5274.

Xiao, Z.; Ji, C.; Shi, J.; Pridgen, E. M.; Frieder, J.; Wu, J.; Farokhzad, O. C., 2012: DNA Self-Assembly of Targeted Near-Infrared-Responsive Gold Nanoparticles for Cancer Thermo-Chemotherapy. *Angewandte Chemie International Edition.*, **51**, 11853–11857.

Xie, J.; Huang, J.; Li, X.; Sun, S.; Chen, X., 2009: Iron Oxide Nanoparticle Platform for Biomedical Applications. *Current Medicinal Chemistry.*, **16**, 1278–1294.

Xue, Y.; Li, X.; Li, H.; Zhang, W., 2014: Quantifying thiol-gold interactions towards the efficient strength control. *Nature Communications.*, **5**.

Yamamoto, Y.; Nagasaki, Y.; Kato, Y.; Sugiyama, Y.; Kataoka, K., 2001: Long-circulating poly(ethylene glycol)-poly(D,L-lactide) block copolymer micelles with modulated surface charge. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society.*, **77**, 27–38.

Yang, K.; Zhang, S.; Zhang, G.; Sun, X.; Lee, S. T.; Liu, Z., 2010: Graphene in mice: Ultrahigh in vivo tumor uptake and efficient photothermal therapy. *Nano Letters.*, **10**, 3318–3323.

Young, A.; Chapman, O.; Connor, C.; Poole, C.; Rose, P.; Kakkar, A. K., 2012, August: Thrombosis and cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology.*

Yu, Y. Y.; Chang, S. S.; Lee, C. L.; Wang, C. R. C., 1997: Gold nanorods: electrochemical synthesis and optical properties. *Journal of Physical Chemistry B.*, **101**, 6661–6664.

Zhang, C.; Pan, D.; Li, J.; Hu, J.; Bains, A.; Guys, N.; Zhu, H.; Li, X.; Luo, K.; Gong, Q.; Gu, Z., 2017: Enzyme-responsive peptide dendrimer-gemcitabine conjugate as a controlled-release drug delivery vehicle with enhanced antitumor efficacy. *Acta Biomaterialia.*, **55**, 153–162.

Zhang, J.; Li, C.; Zhang, X.; Huo, S.; Jin, S.; An, F. F.; Wang, X.; Xue, X.; Okeke, C. I.; Duan, G.; Guo, F.; Zhang, X.; Hao, J.; Wang, P. C.; Zhang, J.; Liang, X. J., 2015: In vivo tumor-targeted dual-modal fluorescence/CT imaging using a nanoprobe co-loaded with an aggregation-induced emission dye and gold nanoparticles. *Biomaterials.*, **42**, 103–111.

Zhao, T.; Shen, X.; Li, L.; Guan, Z.; Gao, N.; Yuan, P.; Yao, S. Q.; Xu, Q. H.; Xu, G. Q., 2012: Gold nanorods as dual photo-sensitizing and imaging agents for two-photon photodynamic therapy. *Nanoscale.*, **4**, 7712–7719.