



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTÀ DI SCIENZE MM.FF.NN.

Laurea Magistrale in Chimica

Dipartimento di Scienze Chimiche

TESI DI LAUREA

**DRUG DELIVERY DI DOXORUBICINA
MEDIANTE NANOPARTICELLE DI ORO
FUNZIONALIZZATE PER TARGETING E
IMAGING**

Relatore: Chiar.mo Prof. Moreno Meneghetti

Correlatore: Prof.ssa Marina Gobbo

Controrelatore: Dott. Alessandro Moretto

Laureando: Lucio Litti

ANNO ACCADEMICO 2010-2011

SOMMARIO

SOMMARIO

ABSTRACT	1
1.IL CANCRO, IL NOSTRO TARGET	3
1.1. NATURA DELLE CELLULE NEOPLASTICHE.....	3
1.2. FORMAZIONE DEL TUMORE, CRESCITA E METASTASI.....	4
1.3. INCIDENZA, SINTOMI, DIAGNOSI.....	6
1.4. CHEMIOTERAPIA E RIMOZIONE CHIRURGICA.....	7
1.5. <i>TARGETING</i> CON ANTICORPI.....	8
1.5.1. Cosa sono.....	9
1.5.2. Come funzionano.....	10
1.5.3. Gli antigeni bersaglio.....	11
1.5.4. Problemi legati alla terapia con anticorpi.....	11
1.6. <i>IMAGING</i> MEDIANTE SCATTERING RAMAN.....	12
2.DRUG DELIVERY, OBIETTIVO SELETTIVITÀ	15
2.1. QUANDO, DOVE, COME.....	15
2.2. PROPRIETÀ FISICOCHEMICHE, UN FATTORE CHIAVE.....	16
2.3. PROGETTARE UN PROFARMACO.....	18
2.3.1. Concetti base.....	18
2.3.2. Agire sui vari gruppi funzionali.....	19
2.3.3. Il rilascio del farmaco.....	21
2.4. UTILIZZO DI ULTRASUONI PER IL DRUG DELIVERY.....	23
2.5. I PROFARMACI DELLE ANTRACICLINE.....	24
2.5.1. Molecole leggere.....	25
2.5.2. ADEPT e PDEPT.....	26
2.5.3. Molecole pesanti.....	27
3.NANOSISTEMI DI ORO, I NOSTRI CARRIER	29
3.1. DAL MATERIALE MASSIVO ALLA NANOPARTICELLA.....	30
3.2. RAMAN SCATTERING, SERS E SERRS.....	33
3.3. SINTESI DI AUNPs, METODI DI <i>BOTTOM UP</i>	34
3.4. SINTESI DI AUNPs, METODI DI <i>TOP DOWN</i>	36
3.5. CARATTERIZZAZIONE DI AUNPs CON SPETTROSCOPIA DI ASSORBIMENTO UV-VIS.....	39
3.6. AGGREGARE E FUNZIONALIZZARE LE AUNPs.....	41
3.7. AUNPs IN MEDICINA, BIOCOMPATIBILITÀ E TOSSICITÀ.....	46
4.LA DOXORUBICINA, IL FARMACO	47
4.1. BIOSINTESI DELLE ANTRACICLINE.....	48
4.2. LE ANTRACICLINE NELLA CURA DEL CANCRO.....	49
4.3. DOXORUBICINA, RELAZIONI DI STRUTTURA & ATTIVITÀ.....	51
4.4. DOXORUBICINA PER <i>IMAGING</i> , PREGI E DIFETTI.....	53
4.5. LETTERATURA RECENTE SULLA DOXORUBICINA.....	55
5.L'OBIETTIVO DEL PROGETTO E LE STRATEGIE PER RAGGIUNGERLO	57
5.1. IL <i>TARGETING</i> E L' <i>IMAGING</i> UNITI AL <i>DRUG DELIVERY</i>	57
5.2. IL REATTIVO DI <i>TRAUT</i>	60
5.3. PREPARAZIONE DEL PEPTIDE, SINTESI IN FASE SOLIDA.....	61
5.4. ANCORARE LA DOXORUBICINA AL PEPTIDE.....	63
5.5. STRUMENTI E TECNICHE DI CARATTERIZZAZIONE.....	66
5.5.1. Spettroscopia UV-vis-NIR.....	66
5.5.2. Spettroscopia Raman.....	67
5.5.3. High Performance Liquid Chromatography.....	68
5.5.4. Spettrometri di massa ESI-TOF.....	69

SOMMARIO

5.5.5. Citofluorimetria.....	70
5.5.6. Analisi di citotossicità.....	71
6.PROTOCOLLI SPERIMENTALI	73
6.1. <i>LASIS</i> E FORMAZIONE DI AGGREGATI DI AUNPS	73
6.2. LUCDOX1, LEGAME COVALENTE DOXO-AUNPS	74
6.3. LUCDOX2, ADSORBIMENTO DOXO-AUNPS.....	76
6.4. AOÀ-PEP, PREPARAZIONE DEL <i>CLIVABLE PEPTIDE</i>	78
6.5. DOXO-PEP, DOXO- <i>CLIVABLE PEPTIDE</i>	81
6.6. LUCDOX3, <i>CLIVABLE PEPTIDE</i> DOXO-AUNPS.....	88
6.7. SERIE ABDOX, <i>DELIVERY</i> E <i>TARGETING</i>	91
7.RISULTATI E DISCUSSIONE.....	97
8.CONCLUSIONI	119
9.BIBLIOGRAFIA	121

Abstract

Il lavoro di tesi oggetto del presente elaborato, svolto nel periodo tra settembre 2010 e luglio 2011, vuole focalizzarsi sulla ricerca di sistemi nanostrutturati adatti al trasporto di farmaci per chemioterapie antitumorali, che mostrino selettività per le cellule malate rispetto a quelle sane e che presentino caratteristiche tali da favorire l'analisi diagnostica e/o la tracciabilità delle nanostrutture in matrici biologiche.

Gli agenti chemioterapeutici utilizzati nella cura del cancro, hanno spesso la caratteristica di essere molto efficaci, ma altresì ricchi di effetti collaterali. La Doxorubicina è un farmaco con proprietà intercalanti tra le basi della doppia elica del DNA ed è attualmente utilizzato e studiato per le sue proprietà antitumorali. Uno tra i suoi più rilevanti effetti collaterali è la cardiotossicità, dovuta principalmente alle capacità leganti verso il Ferro e i metalli alcalini.

Utilizzando nanoparticelle di Oro funzionalizzate con un anticorpo monoclonale come mezzo per il trasporto della doxorubicina, si cerca di limitarne gli effetti collaterali indirizzandola specificatamente verso le cellule tumorali. L'anticorpo (D2B) utilizzato in questo lavoro di tesi, mostra specificità per un antigene situato sulla membrana cellulare delle cellule tumorali della prostata, il *PSMA*.

Per la sintesi dei nanosistemi di Oro si sfrutta la tecnica di produzione di particelle per *Laser Ablation Synthesis in Solution (LASiS)*. Questa tecnica è relativamente recente e si propone come semplice strumento di produzione di nanoparticelle di Oro (AuNPs) che sono stabili in soluzione acquosa senza l'utilizzo di surfattanti, essendo prodotte con una carica superficiale. Le soluzioni colloidali prodotte si dimostrano però molto reattive a causa della superficie libera delle particelle che risultano essere perciò facilmente funzionalizzabili.

La tecnica spettroscopica scelta per gli *imaging* è la *Surface Enhanced Resonance Raman Spectroscopy (SERRS)*. Essa si basa sulla presenza di un colorante posto a stretto contatto con la superficie metallica delle particelle. Il segnale rilevato è caratteristico del colorante e corrisponde ad uno spettro Stokes di scattering Raman.

Si presentano, infine, le prime prove di citotossicità dei campioni sintetizzati e dei test che confermano l'attività di *targeting* dell'anticorpo legato alle nanoparticelle.

Abstract

The subject of this thesis, carried out in the period between September 2010 and July 2011, focuses on the research of nanostructured systems, suitable for the transport of drugs for cancer chemotherapy, which also show more selectivity for cancer cells and with characteristics that allow the diagnostic analysis and/or traceability of the nanostructures in biological matrices.

The chemotherapeutic agents used in cancer treatments, often have the characteristic of being efficient, but also full of side effects. Doxorubicin is a drug that works by intercalating between the bases of the DNA double helix and is currently used and studied for its anticancer properties. One of its most important side effect is cardiotoxicity, mainly due to its binding properties towards alkali metals and iron.

Using gold nanoparticles functionalized with a monoclonal antibody as a bus for doxorubicine, we try to limit its side effects, by targeting the tumor cells specifically. The antibody (D2B) used in present thesis, shows specificity for an antigen located on the cell membrane of prostate tumor cells, PSMA.

The synthesis of gold nanoparticles is obtained by the technique of *Laser Ablation Synthesis in Solution (LASiS)*. This technique is relatively recent and provides an easy way of synthesizing gold nanoparticles (AuNPs) which are stable in aqueous solutions without the need of surfactants, since the nanoparticles are charged. The colloidal solutions shows however, high reactivity because of the free surface of the nanoparticles which can be easily functionalized.

The spectroscopic technique for imaging purposes is the *Surface Enhanced Resonance Raman is the Spectroscopy (SERRS)*. It is based on the presence of a dye placed in close contact with the metal surface of the particles. The detected signal is characteristic of the dye spectrum and corresponds to a Stokes Raman scattering.

We have, finally, the first evidence of cytotoxicity of the synthesized samples and tests that confirm the activity of targeted nanoparticles bound to the antibody.

1. Il cancro, il nostro *target*

Il cancro non è una singola malattia, ma un termine generico usato per racchiudere un gruppo di oltre duecento malattie che manifestano dei tratti comuni.

Il cancro, o carcinoma, è caratterizzato da una crescita irregolare di cellule e dalla possibilità della loro diffusione in altre parti del corpo ⁽³⁾.

Come era noto anche agli antichi Egizi, molti tumori si sviluppano durante la fase di invecchiamento della vita di una persona ma, fino a che l'aspettativa di vita non iniziò ad allungarsi verso la metà del XIX secolo in poi, le persone che sopravvivevano fino a questa età erano relativamente poche. Ora che le malattie infettive, la maggior causa di morte in passato, sono in gran parte sotto controllo grazie al progresso della salute pubblica e delle cure mediche, la percentuale di popolazione a rischio di cancro è notevolmente aumentata ⁽¹⁾.

Almeno una persona ogni tre sviluppa un cancro durante la sua vita e uno ogni quattro uomini, o una ogni cinque donne, ne muore ⁽¹⁾.

In realtà, il cancro non è una malattia solamente umana, e neppure caratteristica dei mammiferi ma può contagiare quasi tutti gli organismi multicellulari, siano essi piante o animali.

Il tumore è una massa di cellule malate di cancro, è l'espressione visibile di un processo di formazione del tessuto neoplastico che può essersi sviluppato per anni ⁽¹⁾.

Come umani, siamo formati da molti milioni di cellule. Alcune di queste sono specifiche per certi tessuti, per esempio le cellule epiteliali si possono trovare nel tratto gastrointestinale, nella vescica, nei polmoni, nel seno, nella pelle. Questo gruppo di cellule comprende circa il 70% dei tumori, ma ogni cellula può essere un potenziale bersaglio per lo sviluppo di un carcinoma.

In questo capitolo sono introdotti alcuni concetti di base utili per la comprensione dei meccanismi sottesi a questa importante classe di malattie.

1.1. Natura delle cellule neoplastiche

Le cellule del nostro corpo si possono suddividere in quattro grandi categorie:

- le mesenchime: che costituiscono il tessuto connettivo, i fibroblasti, le ossa, la cartilagine, i muscoli, i vasi sanguigni e linfatici;
- le epiteliali: sono cellule specifiche e specializzate per ogni tipo di organo, come la pelle, l'intestino, i polmoni;
- le emato-linfatiche: raggruppano una larga varietà, per la maggior parte derivate dal midollo spinale, come i globuli rossi o bianchi, e i macrofagi o i linfociti, che vanno ad accumularsi nei linfonodi;
- il sistema nervoso: costituito dai neuroni del sistema nervoso centrale o periferico.

Organi differenti si contraddistinguono da una differente organizzazione delle cellule mesenchime e dalla struttura delle cellule epiteliali specifiche.

Quando sopraggiunge un danno ad un tessuto, le cellule sopravvissute adiacenti iniziano a proliferare fino a ristabilire le condizioni normali, dopodiché il processo si

1. Il cancro, il nostro *target*

arresta. Sebbene quasi tutte le cellule in stato embrionale abbiano la capacità di proliferare, questa non si mantiene nelle cellule adulte ⁽¹⁾.

In molti organi persiste una speciale riserva di cellule staminali che rimane in grado di dividersi e riparare eventuali danni. In generale, maggiore è la differenziazione di una cellula, minore sarà la sua capacità di proliferazione ⁽¹⁾.

Le cellule tumorali spesso sono meno differenziate di quelle sane, istologicamente possono assomigliare più a tessuti embrionali che a tessuti adulti ^(1,3).

Si pensa che il susseguirsi di mutazioni genetiche e selezioni naturali porti allo sviluppo del cancro, e che la probabilità di avere due mutazioni simultanee, che non portino alla necrosi cellulare, sia tanto bassa da essere esclusa ⁽¹⁾.

Il tumore è quindi lo sviluppo di una selezione naturale di mutazioni, pressoché stocastiche, del DNA di cellule che proliferano per molti cicli e per lunghi periodi.

Le cellule tumorali si differenziano dalle sane per il fatto di mostrare un'anormale proliferazione, dovuta alla latenza nella risposta dei meccanismi intracellulari di controllo ⁽¹⁾. Questo può causare un'anomala vascolarizzazione dei tessuti cancerogeni se è abbinata a una disordinata organizzazione cellulare ^(1,9).

Una larga parte dei tumori si sviluppa nelle persone anziane, che non muoiono direttamente per la malattia, ma per altre cause accessorie o incidentali come arresti cardiaci o infezioni.

I tumori sono in grado di provocare la morte direttamente o indirettamente secondo il sito nel quale si trovano, come nel caso di organi vitali invasi dal tumore o nei quali avviene metastasi. Raramente, la morte sopraggiunge per emorragia, piuttosto la malattia può causare anemia o indebolire la resistenza alle infezioni ⁽¹⁾.

Una caratteristica importante legata ai tumori è la presenza dei cosiddetti *markers*, chiamati anche *biomarkers*.

Questi sono sostanze che possono essere trovate nel sangue, in qualche fluido corporeo o nei tessuti e dimostrano la presenza di qualche tipo di cancro nell'organismo.

Giacché taluni di questi markers sono proporzionali alla massa tumorale, l'indice del loro livello di concentrazione può essere uno strumento accessorio per fini diagnostici o per il monitoraggio delle terapie in corso ⁽³⁾.

I marker tumorali esistono come il risultato di eventi legati allo sviluppo del tumore. Essi possono essere sintetizzati dalle stesse cellule cancerose, attraverso specifici geni (*tumor marker*), o dall'organismo in risposta alla presenza del cancro o di certe altre condizioni non patologiche, che concorrono alla produzione di un'anormale concentrazione di sostanze biochimiche (*tumor-associated marker*) ⁽³⁾.

In molti casi i markers tumorali sono sostanze embrionali che non sono più espresse nei tessuti adulti e differenziati.

1.2. Formazione del tumore, crescita e metastasi

Carcinogenesi è definito come il processo che porta allo sviluppo del cancro.

In un animale, l'applicazione di un agente cancerogeno non porta a un immediato sviluppo di tumore, ma è un processo che comporta lunghi periodi di latenza e, soprattutto, più trattamenti con il cancerogeno risultano più efficaci di una singola applicazione ⁽¹⁾.

Esperimenti su cavie hanno evidenziato tre principali fasi di formazione di un tumore alla pelle: la prima coinvolge effetti mutageni del cancerogeno sulle cellule staminali della pelle; il secondo è la fase detta di promozione, attraverso cicli successivi si

1. Il cancro, il nostro *target*

sviluppano le mutazioni favorevoli alla crescita di un tumore benigno; il terzo è la progressione, nella quale questo tumore benigno acquisisce la capacità di invadere il sistema linfatico/circolatorio e si trasforma in invasivo e maligno ⁽¹⁾.

In sostanza emerge la necessità di un trasferimento ereditario delle mutazioni durante la proliferazione cellulare, come schematizzato in figura 1.2.1.

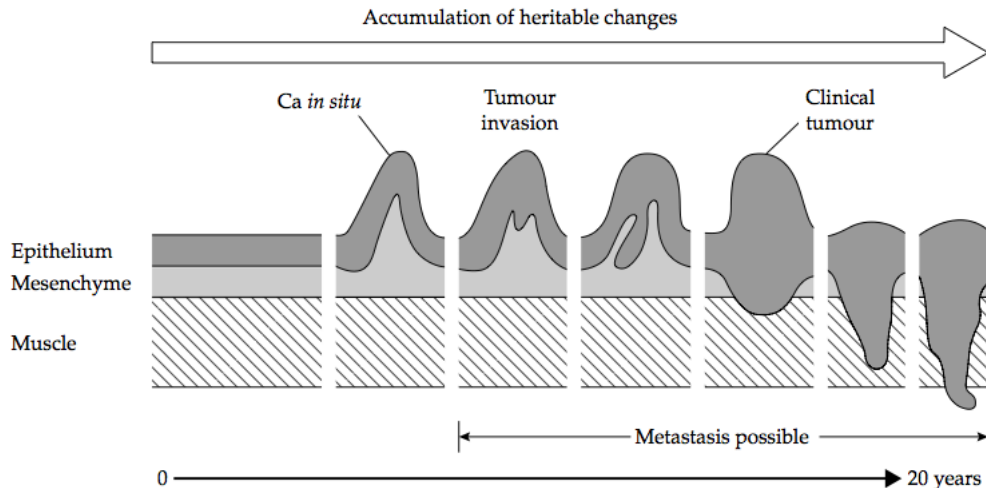


Figura 1.2.1, illustrazione dello sviluppo di un tumore.

*Nell'uomo, dopo esposizione a cancerogeni industriali, occorrono più di 20 anni per sviluppare un tumore.
Tratto da Rif 1*

In un tumore che riesce a emergere, molti cambiamenti genetici sono clonali ed è quindi possibile riconoscere un ceppo di origine, anche se non in tutte le casistiche. Questa caratteristica è utile nell'individuare il sito di origine in tumori sviluppati per metastasi, sebbene possa capitare di individuare, in uno stesso sito, diversi ceppi parentali, corrispondenti, ad esempio, ad uno pervenuto per metastasi e ad uno originario del sito locale ⁽¹⁾.

Questo ruolo genetico nella formazione del cancro, ha posto l'attenzione su alcuni geni che possono influire la carcinogenesi se espressi non appropriatamente o mutati. Ad esempio, nelle cellule normali, il meccanismo per un'efficiente riparazione dei danni al DNA richiama l'utilizzo di enzimi espressi dallo stesso corredo genetico. Se questo meccanismo di riparazione viene danneggiato, il rischio di sviluppare mutazioni che possono persistere a lungo fino alla duplicazione cellulare, aumenta considerevolmente ⁽¹⁾.

È possibile che delle mutazioni si presentino anche in assenza di stimoli esterni. Durante la replicazione del DNA, l'ultimo tratto di Okazaki che non può venire legato nella nuova catena nucleotidica (a causa della direzione di sintesi delle DNA polimerasi), viene tagliato e il corredo genetico si accorcia progressivamente. Le parti di DNA che si perdono sono dei telomeri, apposite sequenze ripetitive che non codificano niente e servono appunto a rimediare a questo inconveniente della replicazione. Quando i telomeri iniziano a finire, il DNA è stato replicato in numero sufficiente di volte (limite di Hyflick) e la cellula inizia il processo di apoptosi. In questa fase, i telomeri residui possono dare vita a legami chimici tra le catene di DNA di altri cromosomi e portare a mutazioni ^(1,3).

1.3. Incidenza, sintomi, diagnosi

Molti fattori sono coinvolti nello sviluppo della carcinogenesi, tra i quali troviamo fattori endogeni, come alcune predisposizioni, anche se la maggior parte sono legati a contributi esogeni e, specialmente nella società in cui viviamo, i fattori antropici spesso hanno un peso rilevante ^(1,3).

Il consumo di tabacco, una dieta troppo ricca di acidi grassi e povera di fibre, l'elevata esposizione a radiazioni UV, l'inquinamento ambientale e/o del posto di lavoro, sono solo alcune banali cause di accrescimento del rischio di incidenza per la formazione di un carcinoma nei polmoni, nel tratto gastro-intestinale, nella pelle ^(1,3).

Il maggior fattore di rischio resta comunque l'età ^(1,3). I tumori nell'uomo e negli animali possono essere suddivisi in tre principali categorie di incidenza legate all'età:

- tumori embrionali: come il tumore alle cellule nervose embrionali (neuroblastoma)
- tumori trovati predominantemente nei giovani: come le leucemie
- tumori con elevata incidenza in età avanzata: come quello alla prostata o al colon.

I tumori che colpiscono in fase embrionale o giovanile si presume necessitino di solamente poche modificazioni genetiche, e che si manifestino in cellule che contengano già un difetto genetico.

Per il terzo gruppo, quello dell'età avanzata, può esserci un'ampia serie di fattori che concorrono simultaneamente. Ad esempio la continua e prolungata esposizione a bassi livelli di sostanze cancerogene permette lo svolgersi del lungo processo di incubazione di cui si è già trattato nel paragrafo 1.2. Una seconda possibilità sono i processi d'invecchiamento dell'organismo, che lo rende più vulnerabile ad agenti esterni anche a livello cellulare. Infine, la lunga serie di replicazioni cellulari tende a diminuire la capacità di riparazione del DNA, la quale è associata ad una maggiore vulnerabilità alla mutazione.

I tumori sono diagnosticati quando producono certi effetti, in altre parole si esegue una valutazione sintomatica. Tumori alla pelle o al seno possono essere facilmente rivelati per la presenza di macchie o noduli. Tumori al cervello si manifestano con delle encefaliti causate dalla pressione del carcinoma all'interno del cranio. In questi, così come in tutti gli altri casi, il sintomo è strettamente dipendente dal luogo dove si genera il tumore, anche molti tumori possono causare anche altri disagi, come la perdita di appetito ⁽¹⁾.

In definitiva, il tumore si diagnostica come tale quando è sufficientemente differenziato dalle cellule circostanti. Non esiste un metodo univoco per questa determinazione, tutto è affidato all'analisi microscopica del tessuto, anche attraverso l'utilizzo di agenti di contrasto che vanno ad aiutare il riconoscimento e l'individuazione delle cellule malate (quel che si chiama *imaging*).

Il tumore viene quindi classificato in base alla differenziazione e alla sua estensione.

I tumori benigni solitamente rispecchiano i loro tessuti di origine. Essi possono svilupparsi in ogni ambiente, possono crescere, ma non sono invasivi e restano separati dall'ambiente adiacente grazie ad una capsula di tessuto connettivo che li ricopre ⁽¹⁾. Il maggior disagio che possono provocare è legato alle dimensioni che raggiungono, e dalla possibilità di generare pressioni sugli organi limitrofi.

I tumori maligni invece, presentano due importanti caratteristiche distintive: anormalità cellulari rispetto alle cellule vicine sane e l'invasione dei tessuti adiacenti. Quando si riscontrano entrambe queste peculiarità, la diagnosi è facile ⁽¹⁾.

Il primo criterio comprende un locale incremento del numero di cellule, perdita del normale arrangiamento, variazioni nella forma e dimensioni, incremento delle dimensioni del nucleo e della densità di filamenti, incremento dell'attività mitotica (divisione cellulare) e la presenza di anormali mitosi e cromosomi. Malgrado la presenza di tutti questi fattori, la definitiva prova dell'osservazione di un tumore maligno rimane sempre l'invasione dei tessuti adiacenti ⁽¹⁾, al contrario dei tumori benigni, essi non hanno un involucro protettivo e crescono in modo disordinato e disorganizzato, possono quindi penetrare nel sistema linfatico o circolatorio e colonizzare altri siti dell'organismo (metastasi).

1.4. Chemioterapia e rimozione chirurgica

Un ideale trattamento del cancro dovrebbe prevedere la rimozione o la distruzione di tutte le cellule neoplastiche e, idealmente, anche di tutte le aree già predisposte a un nuovo sviluppo della malattia.

Con il termine "chemioterapia" s'intendono tutti i trattamenti terapeutici che hanno come oggetto l'impiego di farmaci, o in linea più generale di specie chimiche.

Il progresso si è evoluto dalla chirurgia, dal trattamento con radiazioni, da una chemioterapia poco mirata, verso nuovi trattamenti con agenti biologici, immunoterapia, e nuove molecole ad alta selettività ⁽¹⁾. Malgrado gli avanzamenti, in molti casi i trattamenti non sono ancora possibili a causa della presenza di organi vitali nell'intorno del sito tumorale o a causa di una eccessiva distribuzione della malattia in tutto l'organismo.

La rimozione chirurgica del tumore resta tuttora il metodo più efficace.

L'utilizzo di radiazione laser è sfruttata in accoppiamento con farmaci che tendono ad accumularsi nei tessuti tumorali. L'effetto è quello di provocare un surriscaldamento della zona irradiata in presenza del farmaco (terapia fototermica) o quello di generare specie altamente reattive catalizzate dalla foto-eccitazione del farmaco stesso (terapia fotodinamica). Il grosso limite a questi approcci è senz'altro la bassa penetrazione della radiazione visibile e ultravioletta attraverso matrici biologiche. La ricerca si sta spostando verso composti che mostrino gli stessi effetti anche eccitati nella zona dell'infrarosso, più penetrante negli organismi.

Mentre la chirurgia resta il trattamento per eccellenza in caso di tumori localizzati, la chemioterapia lo è per i tumori in metastasi.

Il sito di azione di quasi tutti i tradizionali farmaci citotossici è il DNA.

L'effetto può essere quello di danneggiarlo direttamente per intercalazione tra le basi azotate (Doxorubicina, vedi capitolo 4), per modifiche chimiche o strutturali (come le alchilazioni provocate da composti come il cis-platino), dalla sostituzione di una base con un'altra di struttura analoga (come succede per il 5-fluorouracile) ⁽¹⁾.

I farmaci possono altresì operare sui sistemi accessori che si occupano del processamento del genoma, come le topoisomerasi I o II (impiegate nello svolgimento dei filamenti superavvolti durante le fasi di replicazione).

Nonostante tutte queste possibilità, il reale effetto che provocano i farmaci sul DNA non è del tutto chiaro. In oltre, la resistenza ai farmaci è un fenomeno comune e che può anche manifestarsi come resistenza acquisita ⁽¹⁾.

Nel paragrafo 4.3 s'introduce un ulteriore fattore di decremento nell'efficienza di una chemioterapia, ovvero i naturali meccanismi di efflusso di sostanze dannose fuori dall'ambiente cellulare, ad opera di specializzate proteine di trasporto.

1. Il cancro, il nostro *target*

Uno dei più grandi problemi alla base di tutti gli studi su nuovi farmaci e chemioterapie è di certo il manifestarsi di effetti collaterali.

Essenzialmente, tutti i target dei tradizionali agenti citotossici sono espressi anche in cellule sane.

I tipi di bersagli maggiormente colpiti da un trattamento chemioterapico sono quelle cellule che hanno la caratteristica di riprodursi con un'alta frequenza (rapido *turnover*), analogamente a come fanno quelle tumorali. Tra queste le più rilevanti sono quelle del midollo spinale, della pelle, dei follicoli dei capelli e delle mucose gastrointestinali ⁽¹⁾.

L'essenza dell'uso dei tradizionali farmaci citotossici sta nel produrre un effetto che sia maggiore nei bersagli tumorali di quello collaterale che colpisce quelli sani.

Un fattore che gioca a favore è la differenza nell'abilità di riparare i danni che mostra una cellula sana rispetto a una malata.

Un trattamento può essere progettato per una somministrazione intermittente, lasciando un intervallo di tempo sufficiente affinché le cellule sane guariscano maggiormente di quelle maligne, prima del ciclo successivo ⁽¹⁾.

Il bersaglio collaterale più rilevante è il midollo spinale. Le cellule componenti il sangue vengono in larghissima parte prodotte nel midollo, tra queste i globuli bianchi hanno una durata della vita di 1-3 giorni, le piastrine di 10 giorni e i globuli rossi di 120 giorni. Sebbene le trasfusioni siano un rimedio per la mancanza dei globuli rossi, il conteggio delle piastrine e dei globuli bianchi è il fattore determinante la frequenza dei trattamenti chemioterapici in quando direttamente coinvolti nella soppressione del sistema immunitario ⁽¹⁾.

Il traguardo da raggiungere è quello di veicolare il farmaco, con una alta selettività, verso i tessuti bersaglio per i quali mostri un effetto tossico che sia invece latente verso le altre cellule sane.

Una strategia per raggiungere questo obiettivo è l'accoppiamento del farmaco con un anticorpo che mostri una predilezione verso uno specifico antigene bersaglio.

1.5. *Targeting* con anticorpi

Negli ultimi 25 anni, gli anticorpi monoclonali hanno rivoluzionato le tecniche di laboratorio sia per quanto riguarda la diagnostica, sia per la ricerca. Ad ogni modo, solamente una piccola quantità hanno ottenuto l'approvazione ad essere utilizzati in terapie e molte altre centinaia sono al vaglio delle fasi cliniche.

Gli anticorpi, o immunoglobuline, sono delle glicoproteine che svolgono la funzione di localizzare antigeni esterni e adattare il sistema immunitario. Sono sintetizzati nei linfociti B e possono essere espressi sulla loro superficie o creati in forma solubile e rilasciati nell'organismo.

Gli anticorpi solubili nel sistema circolatorio sono i mediatori del sistema immunitario, legano gli antigeni esterni e li neutralizzano segnalandoli al sistema immunitario.

A causa della unicità della loro sintesi, il sistema immunitario è in grado di produrre anticorpi specifici, virtualmente, per qualsiasi antigene. Questa è la caratteristica che li rende tanto interessanti in ambito sperimentale, diagnostico e terapeutico.

1.5.1. Cosa sono

Gli anticorpi sono glicoproteina a forma di una grande “Y”. Sono composti da quattro catene polipeptidiche uguali a due a due: due catene pesanti (*heavy chain*) e due catene leggere (*light chain*), come schematizzato in figura 1.5.1.1 ⁽¹⁾.

I quattro polipeptidi sono legati assieme da una serie di legami disolfurici covalenti e non covalenti.

Le catene pesanti sono costituite da un dominio variabile e tre o quattro domini costanti che rappresentano la regione con relativa costanza nella sequenza di amminoacidi.

Le catene leggere sono invece più piccole e consistono in un dominio variabile e in uno costante.

Nell'uomo sono stati trovati cinque diversi tipi di domini costanti della catena pesante e due della catena leggera.

Ogni tipo di coppia di catena pesante può combinarsi con una qualsiasi altra coppia di catena leggera ⁽¹⁾.

Le due braccia della “Y” sono identiche e vengono indicate come Fab (*fragment, antigen binding*). I vertici dei frammenti Fab, dove risiede la parte variabile della catena leggera e pesante, presentano tre corte sequenze di polipeptidi con una immensa variabilità, che è il fattore determinante la specificità verso il particolare antigene e viene denominata CDR (*complementarity-determining region*) ⁽¹⁾.

La *hinge region* è una zona flessibile nella quale il frammento Fab si congiunge con il frammento Fc (*fragment crystallizable*). La zona Fc è responsabile della mediazione con il sistema immunitario, il quale viene attivato contro la minaccia segnalata dall'anticorpo ⁽¹⁾.

Gli anticorpi prodotti da una popolazione di differenti cloni di linfociti trattati con lo stesso antigene, vengono definiti “anticorpi policlonali” (pAb); quelli prodotti da una unica famiglia di cloni di linfociti avranno tutti una identica specificità verso un antigene e vengono invece chiamati “anticorpi monoclonali” (mAb).

Una tecnica molto sfruttata per la produzione di anticorpi monoclonali è quella di isolare dei linfociti di roditori e trattarli con un linea di mieloma (un tumore immortale dei linfociti B), in modo che essi possano continuare a produrre il loro anticorpo indefinitamente. Questi anticorpi monoclonali prodotti con questo sistema provengono quindi dai topi e sono molto importanti per lo sviluppo di tecniche di diagnosi e per la ricerca scientifica, ma possono incorrere a risposte immunitarie se vengono somministrati agli uomini.

Si ricorre quindi a metodi di ingegnerizzazione genetica per renderli più compatibili. Questo processo viene chiamato “umanizzazione”.

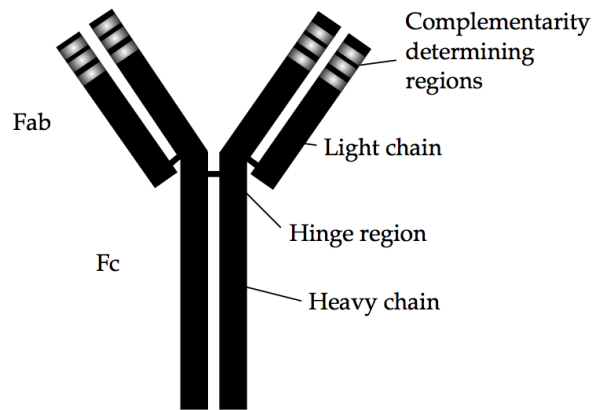


Figura 1.5.1.1, schematizzazione di un anticorpo.
Tratto da Rif 1.

1.5.2. Come funzionano

Come già detto, gli anticorpi sono i mediatori del sistema immunitario. In seguito al riconoscimento del loro antigene, gli anticorpi possono causare una serie di risposte immunologiche.

L'opsonizzazione è il processo mediante il quale una cellula bersaglio che esprime un antigene, viene ricoperta da specifici anticorpi che, a loro volta, attraggono i neutrofili e i macrofagi che la fagocitano. Questo meccanismo è molto importante e efficace contro i batteri, ma non altrettanto per una terapia anticancerogena.

Il CDC (*complement-mediated cytotoxicity*) è l'effetto che viene causato da una serie di glicoproteine presenti nel siero circolatorio le quali, attivate da una serie a cascata di reazioni enzimatiche, promuovono lo sviluppo di una risposta infiammatoria, opsonizzazione della cellula bersaglio e lisi cellulare. La classica via di attivazione del CDC è per riconoscimento della frazione Fc in seguito al legame dell'anticorpo con il suo antigene. Il risultato ultimo può essere l'attivazione e il rilascio di macromolecole, come le MAC (*membrane attack complex*), che possono perforare la membrana cellulare e uccidere la cellula danneggiando la sua stabilità osmotica.

L'ADCC (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*) è un sistema di difesa immunitaria che si basa su cellule come macrofagi, monociti, neutrofili o eosinofili, che portano sulla loro superficie degli antigeni che riconoscono la frazione Fc di un anticorpo. Una volta localizzato il loro bersaglio, queste cellule rilasciano enzimi, fattori di necrosi tumorali o altri agenti citotossici che causano la morte del target.

Insieme alla CDC, l'ADCC è il contributo più sfruttato nella progettazione di una terapia antitumorale basata sugli anticorpi.

In alternativa a questi effetti immunologici, le immunoglobuline hanno la possibilità di mostrare degli effetti anche indipendentemente da altre cellule che giungono a loro supporto. Agendo su recettori di membrana espressi dalle cellule tumorali, gli anticorpi possono bloccare o stimolare i segnali che ne competono. Si riporta l'esempio del Trastuzumab, un anticorpo umanizzato che ha ricevuto l'autorizzazione all'uso terapeutico per la sua azione contro l'EGFR (*epidermal growth factor receptor*) ed è utilizzato per la cura del tumore metastatico al seno.

La branca di applicazioni più interessante per gli ambienti di ricerca è però quella che riguarda la coniugazione degli anticorpi con tossine, agenti radioattivi, farmaci, enzimi e quant'altro e che apre la via all'ingegnerizzazione di sistemi che interagiscano con le cellule per il rilascio di farmaci ad alta citotossicità con la selettività che l'interazione antigene-anticorpo può portare. Esempi di questi sistemi, come l'ADEPT (*antibody-directed enzyme-prodrug therapy*) ed altri ancora sono trattati nel capitolo 2.

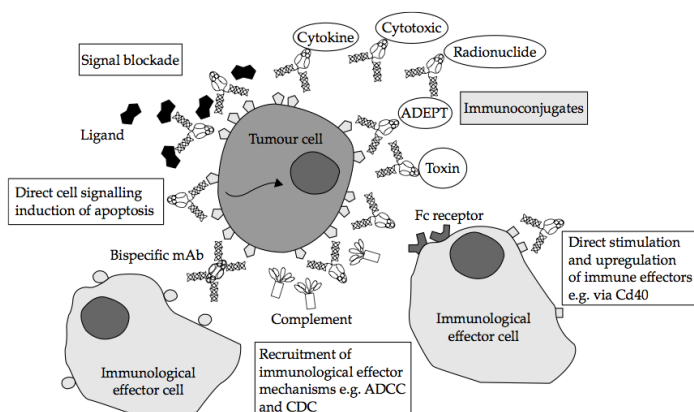


Figura 1.5.2.1, rappresentazione dei sistemi più comuni che portano all'effetto citotossico contro la cellula tumorale bersaglio.
Tratto da Rif 1

1.5.3. Gli antigeni bersaglio

Un grande numero di anticorpi monoclonali è tutt'ora in fase III di sperimentazione, l'ultimo stadio pre-clinico, per le loro caratteristiche terapeutiche antitumorali. Gli antigeni su cui si indirizzano vanno da recettori superficiali, molecole adese sulla superficie cellulare, antigeni oncofetali o associati alla vascolarizzazione tumorale. HER-1 è un recettore membro della famiglia EGFR, ovvero i fattori di crescita. Esso sembra implicato negli effetti invasivi, proliferativi, metastatici e di angiogenesi legati alla malattia.

Gli antigeni carcinoembrionali (CEA), sono una classe ben conosciuta e molto studiata. Sono proteine che vengono espresse temporaneamente durante la fase embrionale di sviluppo di un tessuto e vengono espresse anche sulla superficie di molte cellule maligne. I casi più frequenti sono nei tumori del tratto gastrointestinale, nel qual caso una analisi dei CEA nei sieri corporei sarebbe un utile marker nel monitoraggio dello sviluppo del cancro.

Come avevamo già introdotto in precedenza, i tumori spesso sono soggetti ad una anomala vascolarizzazione. Questo permette la nascita di discriminanti basati sul VEGF (*vascular endothelial grow factor*), un potente fattore pro-angiogenico prodotto da molti tipi di cellule tumorali.

Questi e molti altri possono essere i bersagli delle terapie pilotate da anticorpi, sebbene la difficoltà risieda nell'individuazione di antigeni che siano espressi prevalentemente, o in larga preferenza, o meglio ancora unicamente dalle cellule tumorali.

1.5.4. Problemi legati alla terapia con anticorpi

Sebbene gli anticorpi offrano, come si è visto, una ampia gamma di settori di sviluppo, il loro utilizzo soffre di una serie di problemi che li limitano.

Innanzitutto, le masse tumorali sono spesso molto addensate in involucri di tessuto connettivo (stroma), sono poco vascolarizzate e scarse di circolazione linfatica ⁽¹⁾. Questo rende il trasporto degli mAb fino al target, difficoltoso e poco efficiente.

Gli antigeni possono poi essere internalizzati o sparsi via dalla cellula, risultando in un decremento di quelli espressi sulla superficie del tumore e in aumento di quelli liberi in circolazione. Gli antigeni sparsi sono facili bersagli degli anticorpi in circolo e ne riducono conseguentemente la quantità che può raggiungere il cancro.

Altri fattori limitanti risiedono nella variabilità tra le cellule tumorali o tra tumori istologicamente connessi, ma in individui diversi. Questo limita l'efficacia dell'azione di targeting degli mAb.

Un ultimo elemento, che rientra nella categoria degli effetti collaterali, è l'instaurarsi di risposte immunitarie dovute all'uso di anticorpi non umanizzati, o che l'organismo non riconosce come tali.

Malgrado tutto ciò, la ricerca sta pienamente credendo nelle potenzialità di questo strumento che è il targeting mediato da anticorpi e molti substrati sono già al vaglio dei test clinici per entrare effettivamente nell'armamentario ospedaliero.

1.6. *Imaging* mediante scattering Raman

Molecole coordinate sulla superficie di un metallo mostrano una inusuale sezione d'urto di scattering Raman, questo effetto viene chiamato SERS. La teoria dello scattering Raman e del SERS, così come la strumentazione che occorre per la registrazione di spettri, sono argomenti trattati in altri capitoli (paragrafo 3.2 e 5.2.2 rispettivamente). In questo paragrafo si vuole porre l'attenzione su come questa tecnica sia utilizzata per scopi farmaceutici di indagine e di studio di sistemi biologici.

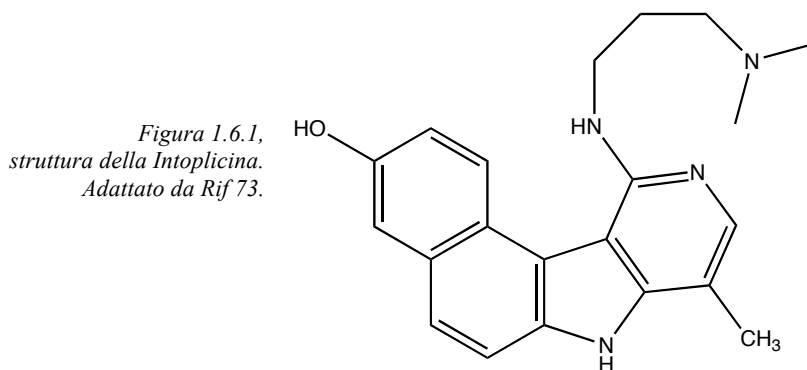
Il gruppo di ricerca di Nabiev e Manfait, già nel 1993 e 1994, pubblicarono interessanti lavori che mostrarono come il SERS potesse essere d'aiuto nella comprensione dei meccanismi sottesi all'azione di farmaci intercalanti al DNA, mostrando anche un primo approccio all'*imaging* della distribuzione del farmaco all'interno dell'ambiente cellulare ^(73,74).

In particolare, la spettroscopia di risonanza Raman viene largamente utilizzata per la sua selettività che permette la visualizzazione delle sole bande corrispondenti al cromoforo in risonanza ⁽⁷⁴⁾ e mostra sensibilità nel passaggio alla struttura complessata del farmaco con il DNA.

Sfortunatamente la spettroscopia Raman dei cromofori in soluzione risente pesantemente dell'interferenza data dalla loro emissione di fluorescenza ⁽⁷²⁾.

La fluorescenza del cromoforo viene però notevolmente *quenched* dall'interazione con il metallo permettendo l'acquisizione di informazioni strutturali non possibili con altre tecniche. A conferma della bontà di questa tecnologia, si riscontra anche una ottima corrispondenza con i risultati ottenuti da misurazioni a raggi-X ad alta risoluzione ⁽⁷³⁾.

In un primo studio, Nabiev e Manfait si prefiggono di studiare l'attività intercalante e la distribuzione intracellulare dell'Intoplicina, il rappresentante di una nuova serie di inibitori delle topoisomerasi. Questo farmaco, in particolare, era già in fase clinica al momento della pubblicazione dell'articolo ⁽⁷³⁾.



Per chiarire il meccanismo d'azione di questo inibitore, lo studio si avvale del confronto degli spettri Raman e SERS dell'Intoplicina messa a contatto con vari substrati, come visibile in figura 1.6.2. Il supporto metallico per il SERS è costituito da una soluzione colloidale di nanoparticelle di argento aggregate per centrifugazione ⁽⁷³⁾.

1. Il cancro, il nostro target

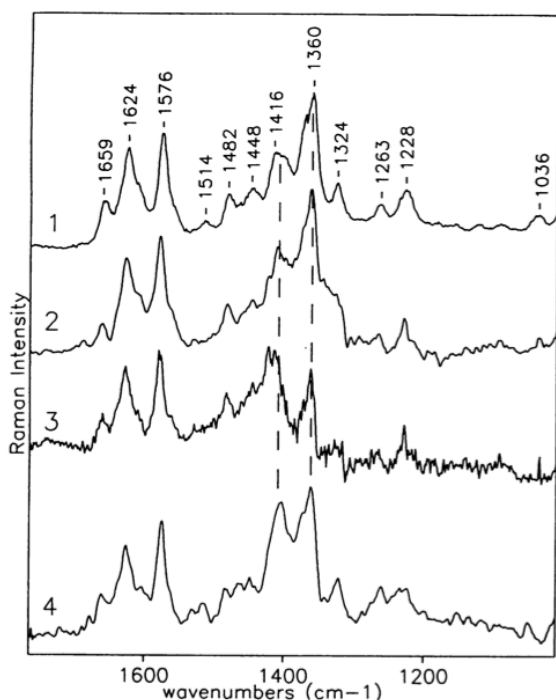


Figura 1.6.2, spettro SERS dell'Intoplicina in forma libera (1), nel complesso ternario di DNA e topoisomerasi II (2), nel citoplasma (3) e nel nucleo (4) di cellule cancerogene K562 vive.

Eccitazione a 514,5nm.

Condizioni sperimentali per (1) e (4): potenza laser 50mW, 25 accumulazioni da 1s.

Condizioni sperimentali per (2) e (3): potenza laser 20μW, 100 accumulazioni da 2s, obiettivo immerso in acqua da 100x.

Notare come il rapporto tra i segnali a 1416cm⁻¹ e 1360cm⁻¹ sia simile per le coppie 1-2 e 3-4.

Tratto da Rif 73.

Si procede quindi con analisi micro-SERS in una singola cellula viva. I risultati evidenziano una differente ambientazione del farmaco secondo la zona di analisi: nel citoplasma l'Intoplicina appare in forma libera, lo spettro ricalca quello di riferimento della molecola in soluzione; nel nucleo il farmaco mostra un rapporto tra i picchi caratteristico della forma complessata con una sequenza di nucleotidi di riferimento, indice della sua coordinazione con il DNA o qualche proteina del nucleo⁽⁷³⁾.

Circa un anno più tardi, lo stesso gruppo pubblica uno studio comparativo sull'attività di altri due farmaci con proprietà citotossiche antitumorali per intercalazione: la Saintopina e la Aclacinomicina⁽⁷⁴⁾.

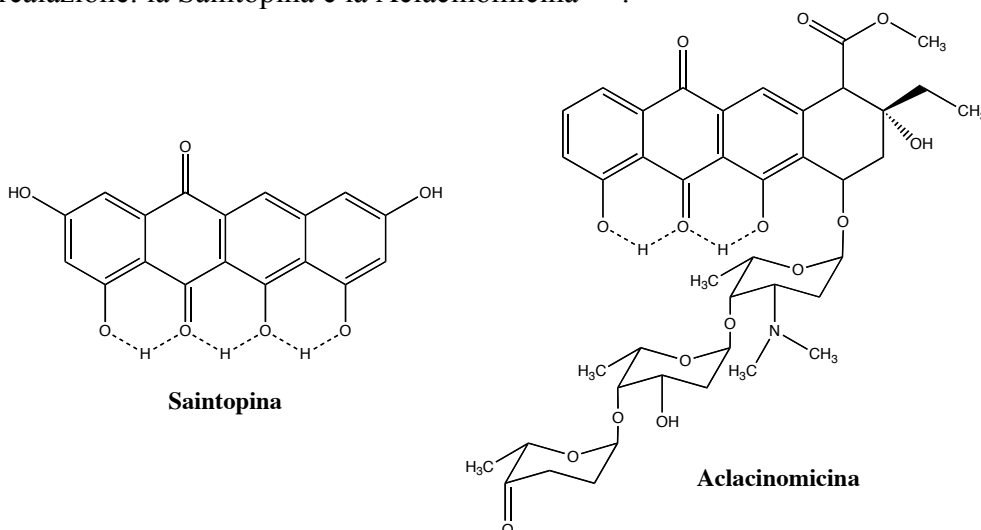


Figura 1.6.3, struttura molecolare dei farmaci utilizzati nello studio di Nabiev e Manfait del 1994. Notare che la Aclacinomicina appartiene alla famiglia delle Antracicline e ha molti caratteri comuni con la Doxorubicina e la Daunorubicina, trattati nel capitolo 4.

Adattato da Rif 74

1. Il cancro, il nostro *target*

Per la Saintopina si riportano lo spettro Raman alla concentrazione di $10^{-4}M$ e lo spettro SERS alla concentrazione di $10^{-7}M$, sebbene le bande caratteristiche del farmaco siano rilevabili anche a $10^{-8}M$ ⁽⁷⁴⁾, come mostrato in figura 1.6.4.

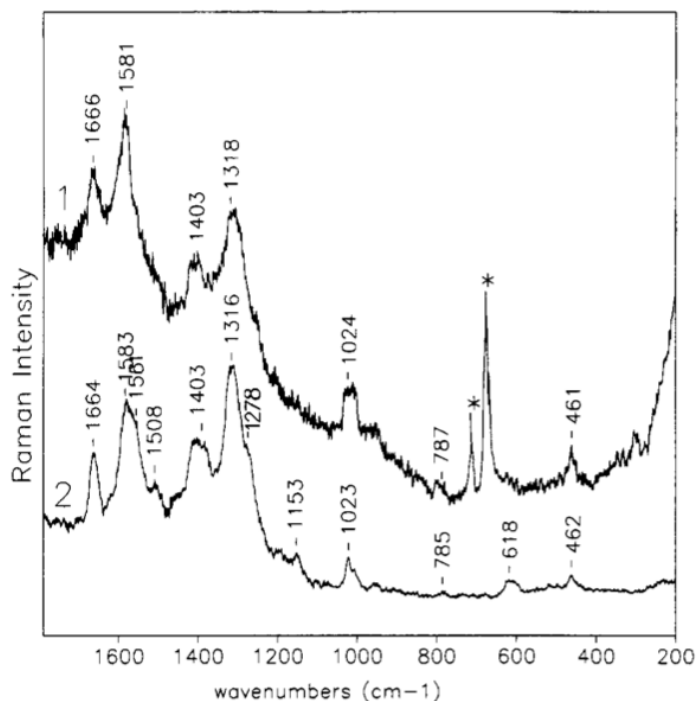


Figura 1.6.4,
spettri Raman e SERS della
Saintopina, eccitazione 514,5nm.
Risonanza Raman (1): potenza laser
200mW, concentrazione $10^{-4}M$, 100
accumulazioni da 1s.
SERS (2): potenza laser 15mW,
concentrazione $10^{-7}M$, 25
accumulazioni da 1s.
Le bande asteriscate si riferiscono al
segnale del DMSO.
Tratto da Rif 74.

Gli autori sono stati in grado di rivelare l'Aclacinomicina legata nel complesso farmaco/DNA utilizzando, ancora una volta, una soluzione colloidale di particelle di argento del diametro medio di 30nm. Lo stesso tipo di rilevazione non avviene però per la Saintopina. Si pensa quindi che i loro meccanismi d'intercalazione siano differenti: la Aclacinomicina è capace di intercalare fortemente ed è attiva già a basse concentrazioni, mentre la Saintopina si coordina con deboli interazioni e superficialmente, mostrando la sua efficacia solo ad alte concentrazioni ⁽⁷⁴⁾.

2. Drug Delivery, obiettivo selettività

Il traguardo per lo studio della formulazione e la somministrazione di un farmaco sono di garantirne una concentrazione terapeutica, in un particolare sito di azione, per un determinato periodo di tempo.

I parametri che vanno considerati comprendono il sito di azione, la concentrazione alla quale il farmaco viene assunto, la quantità di tempo per la quale il farmaco deve rimanere ad una concentrazione terapeutica, nonché una adeguata stabilità chimica che ne garantisca lo stoccaggio e la scelta del metodo di somministrazione, ovvero per via orale, per parenterale (ovvero l'iniezione nel sistema circolatorio), o altro.

Risulta quindi evidente che il farmaco non è formato solamente dal principio attivo, questo anzi potrebbe addirittura risultare dannoso, se non amministrato correttamente. È noto che i principi attivi utilizzati nelle chemioterapie per la cura del cancro, hanno una larga varietà di effetti collaterali, spesso anche molto gravi.

Il grande potenziale di queste sostanze andrebbe perduto se non si ricorresse ad artifici che ne incanalino gli effetti citotossici.

Senza un adeguato studio di drug delivery, i più potenti ed efficaci principi attivi, non solo contro il cancro, non potrebbero certamente comparire negli scaffali delle farmacie.

2.1. Quando, dove, come

Tre importanti domande di cui bisogna tener conto quando ci si appresta allo studio della somministrazione di principi attivi, sono: quando verrà assunto il farmaco? Dove avverrà? Come?

La questione del “quando”, non è affatto banale.

In principio dobbiamo tenere a mente che ogni sostanza, anche quelle considerate più innoche, possono diventare dannose, e poi persino tossiche se assunte in quantità sufficienti. Questa quantità, alla quale una qualsiasi sostanza diventa tossica, dipende chiaramente dal tipo di composto a cui ci riferiamo e dipende anche dal tipo di organismo che la assume.

Per i substrati che mostrano effetti farmacologici, si individuano tre principali zone che spaziano nel dominio delle concentrazioni. In bassa quantità il principio attivo sarà inefficace, e non porterà nessun effetto. Aumentando la concentrazione si giunge ad un livello al quale iniziano per la prima volta a verificarsi conseguenze biologiche derivanti dalla presenza della sostanza assunta, si entra nell'intervallo terapeutico. Aumentando ancora la concentrazione, il farmaco mostra la sua caratteristica attività fino ad un punto nel quale sarà talmente concentrato da portare ad effetti che esulino dai fini terapeutici. Da questo punto in poi, la sostanza diviene maggiormente dannosa che utile, si è sfiorato oltre il limite di tossicità.

La bontà di un principio attivo risiede in un ampio intervallo terapeutico, ovvero una grande differenza di concentrazione dal limite nel quale non si riscontrano effetti a quello nel quale iniziano ad incorrere sintomi di tossicità.

Questa premessa è servita ad inquadrare bene il problema della somministrazione. Una singola dose permette l'immediato raggiungimento dell'intervallo terapeutico, ma la concentrazione di farmaco è destinata a scemare sia a causa del consumo

legato alla sua efficacia, sia per i normali meccanismi di pulizia dell'organismo da sostanze esogene e potenzialmente dannose.

Se la terapia richiede un prolungato tempo di esposizione al farmaco, si dovrà garantire un programma di somministrazione che si mantenga nell'intervallo terapeutico senza oltrepassare il limite di tossicità.

I sistemi che si usano sono di dosi multiple, ovvero somministrazioni periodiche, oppure l'utilizzo di meccanismi di rilascio non immediato. Questi ultimi offrono la possibilità di assumere una grande quantità di principio attivo in una unica soluzione, ma con il vantaggio di garantire un rilascio graduale che permetta il mantenimento della concentrazione per intervalli prolungati. Un esempio di questo tipo di approccio è lo studio di una formulazione solida che si scioglie più lentamente, o di membrane che rilascino la sostanza gradualmente per pressione osmotica.

Lo svantaggio maggiore nell'uso dei rilasci non immediati sta nella perdita della possibilità di interrompere arbitrariamente la somministrazione del principio attivo.

Il problema del sito di applicazione è legato alla natura della malattia. Quando è possibile è comodo preferire l'applicazione locale del farmaco, poiché si riesce a controllare la dose minimizzando gli effetti dovuti ad una distribuzione sistemica. In alternativa si progettano meccanismi di selettività verso il bersaglio o di trasporto su di esso (*targeting*).

I più comuni metodi di somministrazione di farmaci sono per via orale, parenterale, transdermica o per aerosol. I vantaggi e gli svantaggi nella scelta di un sistema piuttosto che di un altro vanno ricercati nel sito che si vuole raggiungere e nelle condizioni che può/deve sopportare il formulato farmaceutico. Per esempio, l'assunzione per via orale sarebbe la migliore, semplice e ben tollerata dai pazienti, ma sottopone il farmaco al passaggio nelle mucose gastriche a bassi pH. La via parenterale è invasiva, come anche la transdermica che, in aggiunta, può portare a irritazioni della pelle causate da farmaci aggressivi. Gli aerosol sono ancora più semplici della somministrazione per via orale, e riescono a garantire la sterilità del dosaggio, ma peccano nel controllo dell'uniformità delle dimensioni delle particelle.

2.2. Proprietà fisicochimiche, un fattore chiave

La solubilità e la stabilità sono due caratteristiche fisicochimiche che devono essere considerate nel momento della progettazione di un formulato di successo.

Un farmaco in stato solido sarebbe spesso preferibile, in seno alle maggiori caratteristiche di stabilità nel tempo e facilità di stoccaggio, manipolazione ed assunzione rispetto alle fasi liquide o alle soluzioni. Ad ogni modo, anche il farmaco in fase solida dovrà poi disciogliersi per avviare i suoi effetti farmacologici e, una volta in soluzione, dovrà essere sufficientemente solubile e stabile.

Lo studio di questi parametri parte spesso da uno screening dei comportamenti del composto sottoposto a variazioni di pH e di temperatura, seguita dall'analisi dei prodotti di degradazione.

Il pH e la temperatura sono, infatti, i fattori principali determinanti la solubilità di farmaci in matrici biologiche, insieme alla loro idrofobicità, alla natura del loro stato solido e alla presenza di agenti complessanti in soluzione.

Per formulati a bassa solubilità deve essere posta una particolare attenzione al loro limite di concentrazione per l'intervallo terapeutico. Potrebbe, infatti, succedere che un principio attivo abbia una bassissima solubilità, ma se il limite inferiore

2. *Drug Delivery*, obiettivo selettività

dell'intervallo terapeutico è altrettanto basso, allora esso potrà ugualmente svolgere la sua azione.

Proporre un farmaco in forma salificata piuttosto che in forma neutra è una strategia che dipende dalle caratteristiche del composto, ma possono essere fatte alcune generalizzazioni. Il gruppo acido più comune nelle molecole di principi attivi è l'acido carbossilico, così come il gruppo basico più diffuso è quello amminico.

In generale la forma acida di un farmaco è sufficientemente solubile negli intervalli di pH fisiologici, mentre per un composto basico è preferibile la forma salificata. Un esempio tipico riguarda la somministrazione per via orale. Il pH delle mucose gastriche è intorno a 1-3, mentre nell'intestino tenue arriva a 6-8, dato che l'assorbimento avviene nell'intestino, risulta preferibile una formulazione molto solubile nei pH neutri o poco basici.

È importante tenere a mente che anche il controione avrà il suo peso nella stabilizzazione e nella solubilità del farmaco salificato.

Il presupposto di stabilità va ricercato in entrambe le caratteristiche chimiche e fisiche del farmaco. La stabilità fisica riguarda mutamenti dello stato fisico del composto e non ne modificano la struttura molecolare. Uno stato solido metastabile, ad esempio, può essere scelto per una rapida velocità di solubilizzazione, ma quando poi si trova in condizioni di poter trasformarsi in una struttura più stabile, lo farà. Questa nuova struttura è diversa dalla precedente e caratterizzata da differenti proprietà fisiche. La presenza di germi cristallini della forma più stabile possono iniziare o accelerare tale processo.

Analogamente il solvente, specialmente l'acqua, è responsabile di mutamenti verso forme idrate, solvate, polimorfe, così come può essere un reagente sempre presente in largo eccesso, con possibilità di dar il via a modificazioni di tipo chimico.

La costante presenza di acqua e ossigeno sono alla base delle considerazioni sulla stabilità chimica dei farmaci. In ambiente fisiologico possono essere degradati, idrolizzati, metabolizzati da enzimi o quant'altro si trovi nella possibilità di reagire.

Le vie di degradazione più comuni sono le idrolisi, ad esempio di esteri o ammidi, le disidratazioni, come nelle chiusure ad anello degli zuccheri, le eliminazioni o decarbossilazioni ad opera di enzimi, le ossidazioni causate dalla permanente presenza di ossigeno, le racemizzazioni per processi di equilibrio sui centri chirali.

Anche per rimediare a queste reazioni collaterali, si usa studiare delle miscele del principio attivo con degli additivi. Questi sono definiti come dei componenti del formulato non attivi farmacologicamente, ma che aiutano per l'efficacia o il mantenimento del principio attivo, o per aumentare l'indice di gradimento del farmaco al paziente.

Considerando che l'uso di additivi è ormai estremamente diffuso, sia in ambito farmaceutico, che alimentare, che in altri numerosissimi campi, la possibilità di reazioni di degradazione dei principi attivi farmaceutici con talune di queste sostanze è sicuramente reale.

2.3. Progettare un profarmaco

Un profarmaco è comunemente una forma modificata di un farmaco al quale è stato aggiunto un gruppo funzionale, o una generale altra struttura che lo aiuti a sopperire in qualche caratteristica in cui è carente, come la solubilità, la biocompatibilità o la selettività di azione.

La frazione aggiunta viene poi rimossa in prossimità del sito dove il farmaco deve mostrare la propria attività, rilasciando la struttura del principio attivo tal quale o con delle piccole modificazioni che non devono alterare considerevolmente la sua azione farmacologica.

2.3.1. Concetti base

Un profarmaco deve essere, in linea di principio, inattivo e deve riconvertirsi con alte rese al principio attivo originale, solamente nel momento in cui abbia raggiunto il bersaglio.

Esso deve essere anche biocompatibile, il che si traduce in una buona capacità di attraversare le membrane biologiche e non attivare il sistema immunitario.

Data la natura di doppio strato lipidico delle membrane, aumentare la lipofilicità di una molecola è generalmente associato ad un aumento della sua capacità penetrativa, fermo restando che una molecola troppo idrofobica non riesce più a distribuirsi adeguatamente bene, in seno alla scarsa solubilità nel flusso circolatorio, prevalentemente acquoso.

La “regola del 5 di Lipinski” è una teoria empirica, avvalorata da osservazioni sperimentali, secondo la quale un farmaco con una buona permeabilità delle membrane deve avere un peso molecolare ≤ 500 Da ed essere relativamente non polare, con un coefficiente di ripartizione acqua/lipidi (P) che favorisca lievemente la fase lipidica, compreso tra $-1 \leq \log P \leq +5$ ⁽⁸⁾.

Altri tipi di modificazioni strutturali dei farmaci possono riguardare la diminuzione degli effetti collaterali associati ad alcuni gruppi funzionali. Un caso particolarmente noto è quello dell'acido salicilico, irritante per le mucose, che viene esterificato per annullare questo inconveniente, pur mantenendo il suo potenziale analgesico. Il nome commerciale di questo farmaco (Aspirin) è divenuto tanto comune da venire ormai utilizzato per indicare l'acido acetilsalicilico.

Altri casi rilevanti riguardano il targeting e l'attivazione sui tessuti bersaglio.

Una classe di farmaci con importanti tossicità e piccoli intervalli terapeutici è quella degli agenti antitumorali, come trattato nel paragrafo 1.4.

Un esempio stimolante per lo sviluppo di profarmaci sono i tumori solidi che presentano rilevanti zone di ipossia. Il fatto dell'eccessiva crescita e proliferazione cellulare porta a zone con importanti carenze di ricircolo di flusso sanguigno. Questa vascolarizzazione ridotta genera il problema della difficile permeazione dei farmaci fino alle zone interne del tumore. Infatti si trova che un trattamento chemioterapico è in grado di colpire, generalmente, solo il 10-20% della popolazione di cellule tumorali. Ebbene, queste zone di ipossia possono essere il bersaglio di agenti attivati in ambienti riducenti. Un composto particolarmente conosciuto di questa categoria è la Mitomicina C.

2. Drug Delivery, obiettivo selettività

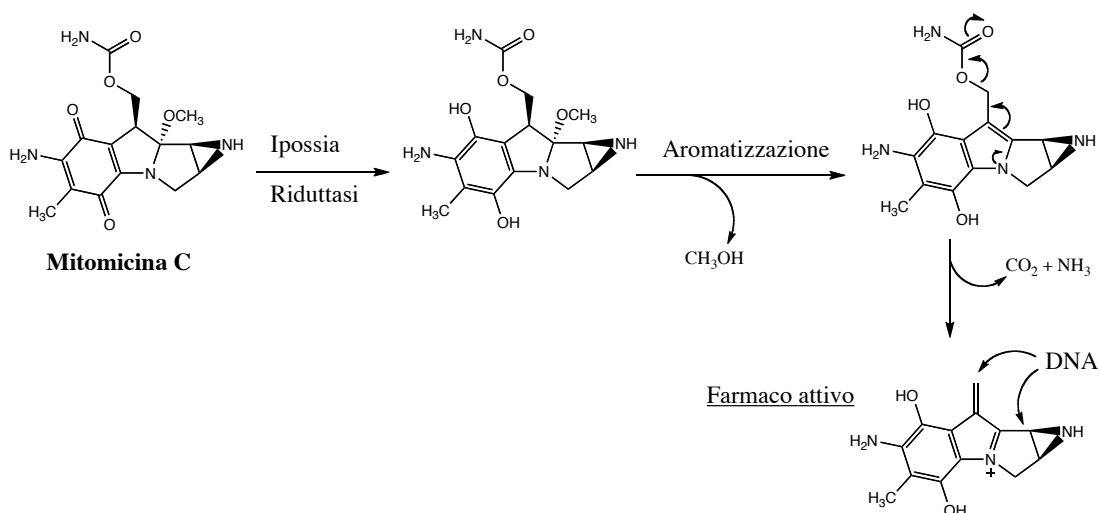


Figura 2.3.1.1, schema dell'attivazione bio-riduttiva della Mitomicina C.

La specie reattiva verso il DNA è l'ultima, dove viene generato il doppio legame coniugato con l'azoto si forma un sito elettrofilo molto reattivo verso l'alchilazione. Un secondo sito di legame con il DNA è rappresentato dal ciclo aziridina, il quale è responsabile dell'attività del farmaco anche in ambiente aerobico.

Adattato da Rif 8.

La possibilità di sintetizzare un profarmaco che risulti in una specie attiva solamente a seguito di reazioni di metabolismo è una scelta vincente, anzi, spesso necessaria. Affinché il profarmaco sia efficace, è però necessario scegliere adeguatamente le zone in cui modificarlo, non trascurando né le caratteristiche del gruppo funzionale che si modifica, né quelle del meccanismo di rilascio del farmaco attivo.

2.3.2. Agire sui vari gruppi funzionali

Data la vasta diffusione di enzimi esterasi nell'organismo e la facilità della preparazione dei substrati, non meraviglia che la maggior parte dei profarmaci siano sintetizzati come esteri.

Dato che sia la porzione carbonilica che la parte alcolica vengono rilasciate dall'idrolisi, un'appropriata esterificazione di composti contenenti alcoli o derivati di acidi carbossilici può portare a prodotti con un'ampia scelta della loro idrofobicità, e labilità.

È noto che l'idrolisi di esteri catalizzata da enzimi ha una serie di prerequisiti elettronici e sterici molto più stringenti di quelli necessari per reazioni non enzimatiche. Quindi capita che dei farmaci troppo ingombrati vengano esterificati con buone rese di rilascio in laboratorio, ma una volta posti a reagire con enzimi, questi non mostrino una buona labilità. Questo problema può essere risolto pianificando meccanismi di reazioni a cascata di substrati contenenti doppi esteri come α -acilossialchili, carbonati o esteri alcossicarbonilossialchilici (figura 2.3.2.1)⁽⁸⁾.

2. Drug Delivery, obiettivo selettività

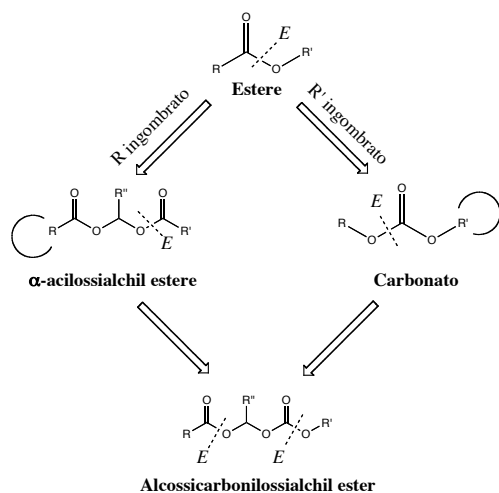


Figura 2.3.2.1,
il farmaco vero e proprio potrebbe essere sia R che R',
a seconda del suo ingombro e del gruppo funzionale
esterificato. Adattato da Rif 8.

Per composti contenenti fenoli o ammidi secondarie (come carbossammidi, carbammati, uree) vengono utilizzati degli O(o N)- α -acilossialchili. Questi substrati vengono rilasciati con una reazione spontanea a seguito dell'idrolisi dell'estere. Lo stesso tipo di reazioni possono aver luogo anche con ammine primarie o secondarie, con l'aggiunta di un ulteriore acile che provvede al rilascio del farmaco originale, come in figura 2.3.2.2.

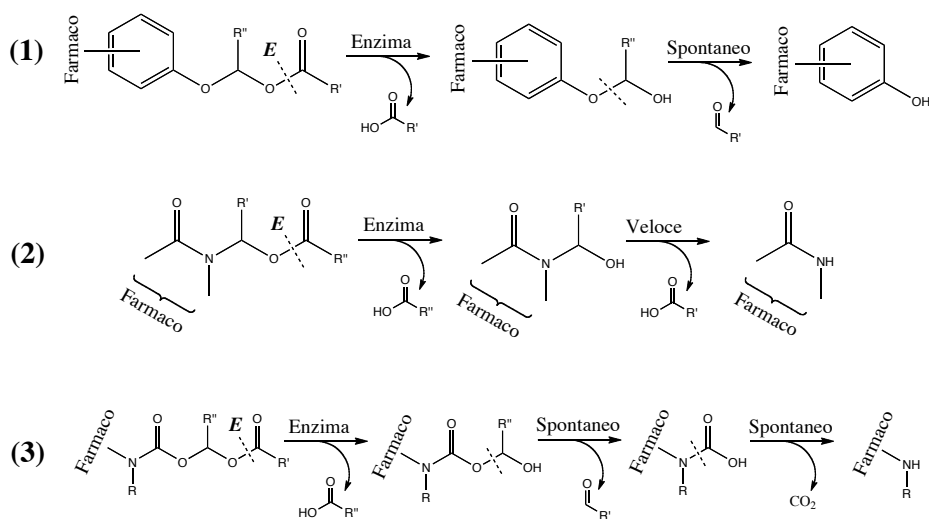
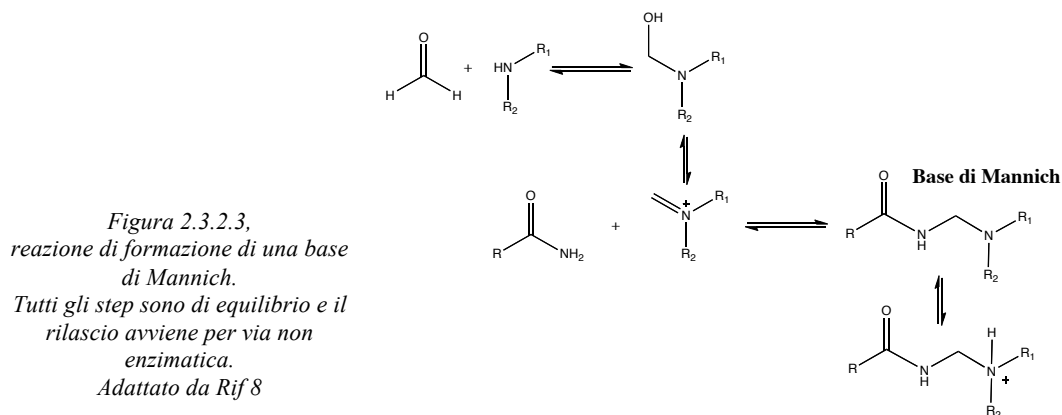


Figura 2.3.2.2, schema del rilascio tramite esterasi di un farmaco
funzionalizzato in un fenolo (1), in un amide secondaria (2) o in una ammina (3).
Adattato da Rif 8

Le ammine rappresentano, in effetti, un particolare problema. La loro presenza come tali può essere problematica per la formazione di sali interni (zwitterioni), che limitano la velocità di trasferimento passivo trans-membrana) o per il riconoscimento di enzimi come le tripsine e le aminopeptidasi, che riconoscono le ammine terminali.

Una soluzione elegante può essere la formazione di basi di Mannich, nel quale il farmaco può risiedere sia nella ammina che nella ammido reagenti (figura 2.3.2.3).

2. Drug Delivery, obiettivo selettività



Le ammine possono formare delle basi di Schiff reversibili se poste a reagire con aldeidi o chetoni. Questo tipo di aggancio è usato per legare delle molecole di una limitata massa molecolare con delle altre macromolecole che abbiano dei carbonili esposti. Questo è l'esempio del farmaco Doxorubicina (vedi anche al capitolo 4) legato tramite immina al polimero PEG (vedi figura 2.3.2.4). Questo legame ha mostrato graduale rilascio del farmaco negli ambienti acidi lisosomiali *in vitro* e un lento rilascio in condizioni fisiologiche. In aggiunta, questo composto ha mostrato una forte citotossicità, comparabile con quella della Doxorubicina libera, contro linfociti di cellule di leucemia *in vitro*.

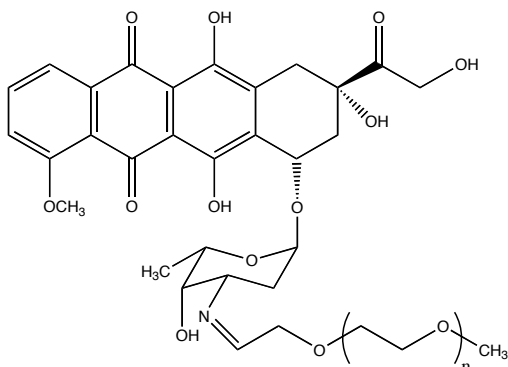


Figura 2.3.2.4,
Doxorubicina legata ad un polimero di polietilenglicole
(PEG) tramite base di Schiff.
Adattato da Rif 8

Questo stesso approccio è stato utilizzato in questo lavoro per coordinare il carbonile della Doxorubicina ad un peptide tramite ossima, per una discussione in merito si rimanda al capitolo 5.

2.3.3. Il rilascio del farmaco

Molti profarmaci incorrono in idrolisi enzimatiche da esterasi o proteasi e, in minor quantità, in idrolisi chimiche. Molti di questi sono processi monostadio, semplici, efficaci e spesso pienamente sufficienti. Ad ogni modo abbiamo visto come, per alcune situazioni, sia più utile la pianificazione di una serie di reazioni a cascata. Queste vengono innescate da una azione enzimatica, ma si propagano spontaneamente portando infine al farmaco attivo.

Un interessante processo di autodegradazione, spesso utilizzato nella progettazione di profarmaci, involve meccanismi elettronici di “push and pull” di anelli aromatici coniugati con un buon gruppo uscente. In questo approccio, un'ammina o un ossidrile elettron donatori sono mascherati da elettron attrattori come gruppi nitro, ammidici o esterei. L'attivazione deve rimuovere la copertura di questi gruppi, che

2. Drug Delivery, obiettivo selettività

ritornano a mostrare la loro attività elettronica originale e promuovono successive reazioni nelle quali verrà generato il farmaco attivo. Questo ed altri meccanismi sono schematizzati in figura 2.3.3.1.

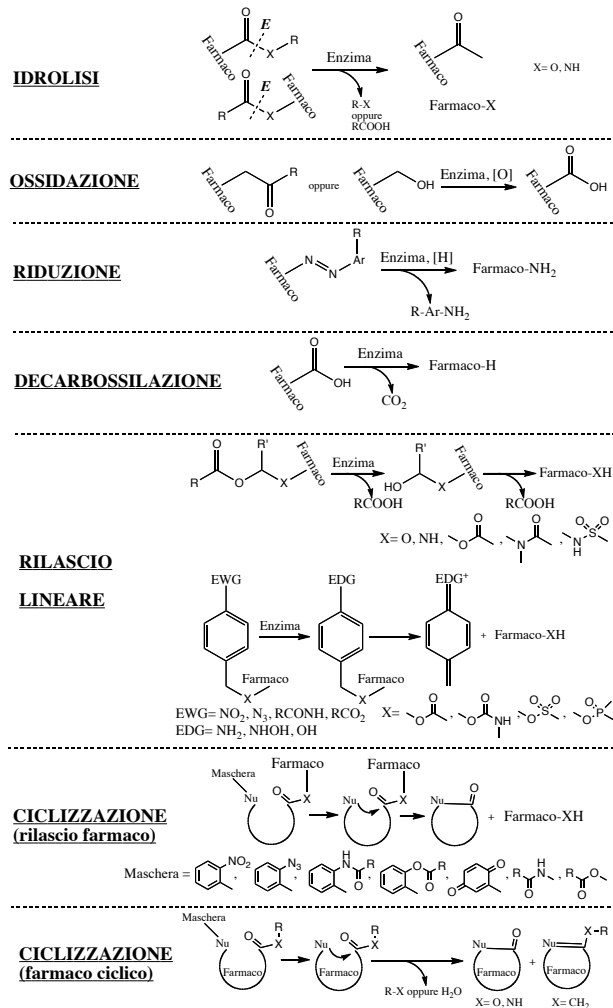


Figura 2.3.3.1, schema dei più comuni meccanismi mono- e multistadio di rilascio/attivazione del principio attivo a partire da un suo profarmaco. Adattato da Rif 8.

Esempi concreti di attivazione del farmaco per processi monostadio o multistadio sono quelli del farmaco Doxorubicina (DOXO) con legato un peptide, una volta, e un nitro gruppo aromatico un'altra.

Nel caso della DOXO legata con un peptide, il traguardo è il riconoscimento da parte dell'enzima serina proteasi PSA (*prostate specific antigen*)^(8,9). Questo è un enzima presente solo nell'ambiente extracellulare delle cellule tumorali della prostata. La struttura del profarmaco è rappresentata in figura 2.3.3.2 e l'azione dell'enzima si manifesta del rilascio del composto DOXO-Leucina, che mantiene le caratteristiche di agente citotossico. Test *in vitro* hanno dimostrato che il preparato uccide il 50% delle cellule umane malate di cancro che esprimono PSA già alla concentrazione di 70nM, mentre non si osserva citotossicità in cellule sane fino oltre 1μM⁽⁸⁾.

2. Drug Delivery, obiettivo selettività

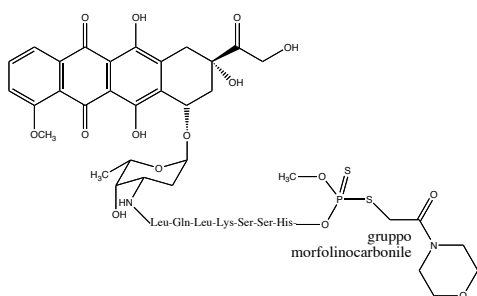


Figura 2.3.3.2, illustrazione del profarmaco DOXO-peptide utilizzato per il targeting su PSA. Adattato da Rif 8 e 9.

Il caso della DOXO liberata per reazioni a cascata multistadio è invece generato da un tipico effetto “push and pull”. Il nitro-gruppo dell’anello aromatico viene ridotto per via enzimatica e l’ammina corrispondente, elettrone donatrice, attiva il rilascio del farmaco (figura 2.3.3.3) ⁽⁸⁾.

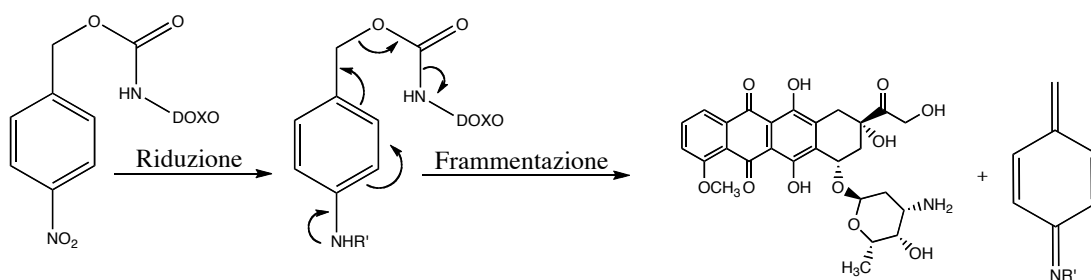


Figura 2.3.3.3, schema del meccanismo di “push and pull” tramite il quale viene rilasciata la DOXO. Adattato da Rif 8.

2.4. Utilizzo di ultrasuoni per il drug delivery

Il suono è la nostra percezione della pressione causata dalla propagazione di onde meccaniche attraverso dei mezzi elastici, come l’aria o un liquido. A causa della natura di trasferimento di energia meccanica nella propagazione dell’onda, l’intensità del suono diminuisce progressivamente a causa del parziale assorbimento di energia del materiale del mezzo di propagazione. Questo assorbimento può causare un sensibile aumento di temperatura ⁽⁸⁾.

La produzione di un suono nasce quindi dalle vibrazioni di un materiale a contatto con un mezzo che permette il propagarsi dell’onda meccanica. Artificialmente, questo può essere prodotto da un piezoelettrico, ovvero un materiale attraversato da un campo elettrico alternante ad una frequenza in risonanza con la sua frequenza di vibrazione.

Gli ultrasuoni sono definiti come onde meccaniche con una frequenza superiore a 20kHz, quindi oltre il limite superiore della percezione del suono nell’udito umano ⁽⁸⁾.

Applicazioni mediche di questa tecnologia si riportano fin dagli anni '20 e, curiosamente, le sue applicazioni terapeutiche anticiparono quelle diagnostiche, che rappresentano il maggior utilizzo al giorno d’oggi.

L’abilità distruttiva di ultrasuoni ad alta intensità viene utilizzata, ad esempio, come strumento in neurochirurgia ⁽⁸⁾.

Per il drug delivery, si trova che l’utilizzo di ultrasuoni può aiutare l’assorbimento di farmaci ad alto peso molecolare attraverso la pelle, questo tipo di utilizzo prende il nome di sonoforesi.

Altri utilizzi sono legati alla presenza di agenti di contrasto che aumentano la risoluzione in fase di studi diagnostici, ma le applicazioni più interessanti su cui ci si vuole soffermare riguardano gli effetti favorevoli che mostra un trattamento ad ultrasuoni sugli agenti chemioterapici.

I meccanismi con cui si ottiene questo tipo di benefici con gli ultrasuoni si possono considerare come effetti termici e effetti non termici.

I primi hanno tipicamente il vantaggio di aiutare la solubilità e la permeazione attraverso le membrane cellulari di alcune classi di farmaci che altrimenti avrebbero una scarsa capacità penetrativa.

I secondi possono riguardare effetti di cavitazione, di pressione dovuta all'onda meccanica o di micromescolamento. La cavitazione è il fenomeno che causa la formazione di piccole bolle d'aria ad altissima pressione, ed è considerato il fattore predominante. Sperimentalmente si riscontra che farmaci come la Doxorubicina o la Daunorubicina mostrano incremento di attività citotossica sia con meccanismi termici che non termici, mentre farmaci come la Mitomicina C (vedi figura 2.3.1.1) soffrono invece di un impoverimento di attività in seguito al trattamento.

Si pensa che la discriminante sia nell'idrofilicità dei composti: i farmaci più idrofobi vengono aiutati nella loro azione e quelli più idrofili vengono svantaggiati.

2.5. I profarmaci delle Antracicline

Una discussione più ampia di cosa siano, da dove vengano e quali effetti producano le Antracicline viene preposta nel capitolo 4.

Qui di seguito si vuole porre l'attenzione su alcune delle soluzioni che i vari gruppi di ricerca di tutto il mondo hanno proposto per far fronte ai problemi di selettività e citotossicità collaterali che questa potente classe di agenti antitumorali porta con sé.

La progettazione di profarmaci con le Antracicline si focalizza sulla ricerca di legami acido sensibili o attaccabili da enzimi per un rilascio del principio attivo nell'ambiente extra- o intracellulare delle cellule tumorali a seguito di riconoscimento e coordinazione sulla loro superficie.

In generale, le macromolecole sono sequestrate dalla cellula per endocitosi mediata da recettori, endocitosi per adsorbimento o endocitosi per fase fluida. Una volta internata, la molecola si trova in un ambiente con un grosso sbalzo di pH rispetto a quello fisiologico, da circa 7 a circa 5, fino ai lisosomi primari o secondari dove scende addirittura a 4 (nei tessuti tumorali si trova un pH ancora più basso di circa 0,5-1 unità di pH) ⁽⁹⁾. In questi ambienti si attivano enzimi quali le fosfatasi, le nucleasi, le proteasi, le esterasi e le lipasi che iniziano il processo di metabolismo del profarmaco ⁽⁹⁾.

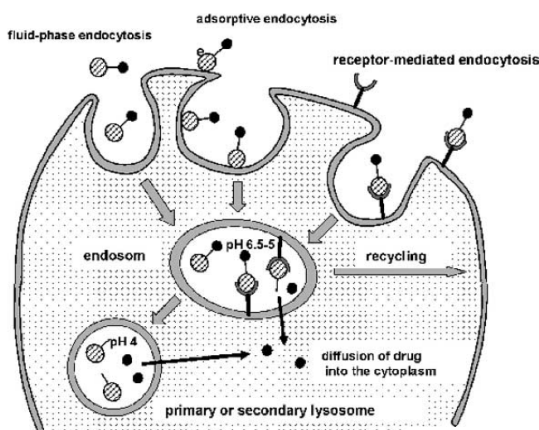


Figura 2.5.0.1, illustrazione dei meccanismi di endocitosi cellulari più frequenti per le Antracicline. Tratto da Rif 9.

2.5.1. Molecole leggere

Con “molecole leggere” viene intesa una porzione legata alla Antraciclina che possa al massimo raggiungere, in media, la massa molecolare di una trentina di amminoacidi.

In questa categoria rientrano tutti i tentativi di riconoscimento del farmaco con una classe particolare di enzimi o recettori presenti in maggioranza nelle cellule tumorali. L’obiettivo si raggiunge con peptidi o con molecole di mono o polisaccaridi, generalmente agganciati tramite un gruppo spaziatore che dovrebbe poi degradarsi spontaneamente. Un tipo di gruppo auto-degradante molto utilizzato è stato già incontrato, in una sua variante, in figura 2.3.3.3.

I recettori e gli enzimi sui quali si punta maggiormente sono le Catepsine, le PSA, le Plasmine e le Metalloproteasi.

Le Catepsine sono una classe di enzimi intracellulari che si attivano nei lisosomi, sono cisteine proteasi e vengono espressi ad alti livelli specialmente nei tumori alla mammella. Le PSA sono state già trattate, esse sono espresse con un alto rapporto di concentrazione nelle cellule tumorali della prostata rispetto che alle cellule sane. Le Plasmine sono serine proteasi con una specificità verso le tripsine, sono presenti in vari tessuti tumorali ed esplicano la loro funzione negli ambienti extracellulari dove sembrano coinvolti nei processi invasivi e di metastasi. Infine le Metalloproteasi sono una famiglia di oltre venti proteasi che giocano un ruolo fondamentale nella degradazione del collagene del tessuto dello stroma che avvolge tutti gli organi, permettendo al tumore di diffondersi. In tutti i casi, per quale che sia l’enzima eletto all’attivazione del farmaco, il substrato è studiato per esporre un sito di riconoscimento, spesso di solo qualche amminoacido.

L’utilizzo di zuccheri legati alle Antracicline ha dato vita ad una grande varietà di composti, quelli più interessanti riguardano l’utilizzo di acido glucuronico, galattosio e glucosio. Questi vengono legati attraverso un gruppo spaziatore auto-degradante all’ammina in posizione 3’ dell’Antraciclina ⁽⁹⁾.

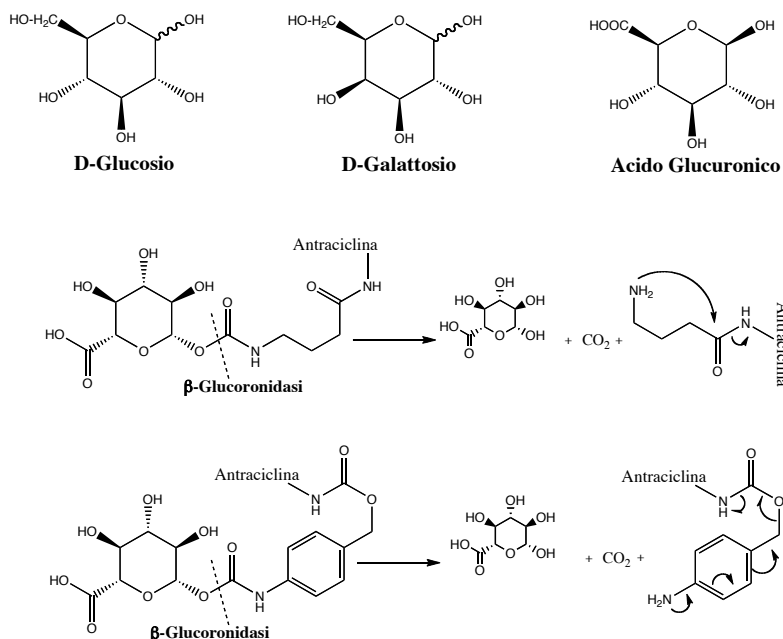


Figura 2.5.1.1, illustrazione dei monosaccaridi maggiormente utilizzati nella sintesi dei profarmaci delle Antracicline con zuccheri ed esempio di meccanismo di attivazione di un profarmaco con un acido glucuronico. Adattato da Rif 9.

I vantaggi di utilizzare questo tipo di profarmaci riguarda l'accresciuta solubilità in acqua, una considerevole riduzione degli effetti collaterali e la possibilità di attivazione nelle vicinanze della cellula tumorale bersaglio, come per il caso dell'enzima β -glucuronidasi, particolarmente presente nei lisosomi che si liberano per infiltrazioni di cellule infiammatorie, nelle aree di necrosi dei tumori solidi, nel fegato, nella flora intestinale e nella milza.

I problemi legati a questa strategia risiedono nella diminuita capacità penetrativa delle membrane cellulari, a causa della diminuita lipofilicità. Per questo motivo, i profarmaci delle Antracicline con gli zuccheri, sono spesso una delle due metà delle terapie per ADEPT o PDEPT.

2.5.2. ADEPT e PDEPT

L'*Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy* (ADEPT) e il *Polymer-Directed Enzyme Prodrug Therapy* (PDEPT) sono due metodologie terapeutiche molto eleganti che sfruttano una programmazione della somministrazione del farmaco in due differenti fasi. Il principio base che li accomuna è il fatto di fornire il profarmaco e l'enzima utile ad attivarlo in tempi diversi.

I vantaggi sono un'alta quantità di principio attivo liberato nelle strette vicinanze delle cellule bersaglio, risultante in un aumento del potenziale citotossico. Rispetto alle attivazioni con enzimi già presenti nelle cellule tumorali, questo approccio permette una permeazione della grande quantità di farmaco libero prodotto anche nelle cellule che non esprimano sufficiente antigene, per il semplice fatto di trovarsi nelle vicinanze di dove viene attivato il profarmaco. Questa stessa caratteristica genera però anche il più importante problema di questa tecnica. Lo scarso potenziale di targeting, lo sviluppo di risposte immunitarie, la diffusione del farmaco attivo lontano dal sito di azione e una complessa pianificazione della tempistica delle somministrazioni possono limitare l'utilizzo di questi sistemi.

Gli enzimi utilizzati devono essere estranei all'organismo che subisce la terapia e deve essere garantito che le due componenti del trattamento si trovino a contatto solamente nel sito bersaglio.

Nell'ADEPT la prima fase consiste nel somministrare un immunoconiugato che comprende un enzima legato ad un anticorpo. Dopo un'attesa che serve a garantire l'espulsione dell'anticorpo non legato al target, si procede con la somministrazione del profarmaco. Esso avrà dei caratteri distintivi che lo rendono particolarmente sensibile all'enzima legato all'anticorpo, il quale è legato alla cellula tumorale bersaglio.

Nel PDEPT la successione nella somministrazione delle due fasi è opposta. Per primo viene assunto il profarmaco, il quale si occupa del targeting, e dopo viene raggiunto dal coniugato con l'enzima. Il maggiore vantaggio del PDEPT rispetto all'ADEPT è il minor tempo richiesto per l'espulsione del substrato non pervenuto sul tumore e la minore probabilità di incorrere in risposte immunitarie, legate per lo più alla presenza dell'anticorpo nella terapia ADEPT.

2. Drug Delivery, obiettivo selettività

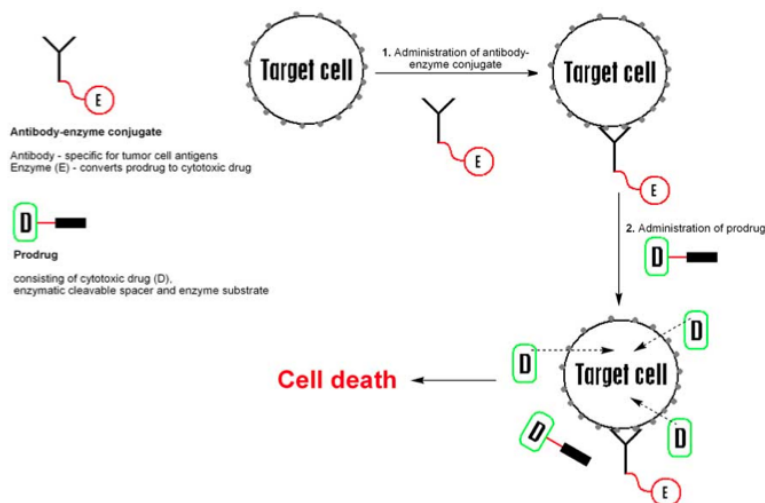


Figura 2.5.2.1, schema dei principi di funzionamento della terapia secondo ADEPT. Tratto da Rif 9.

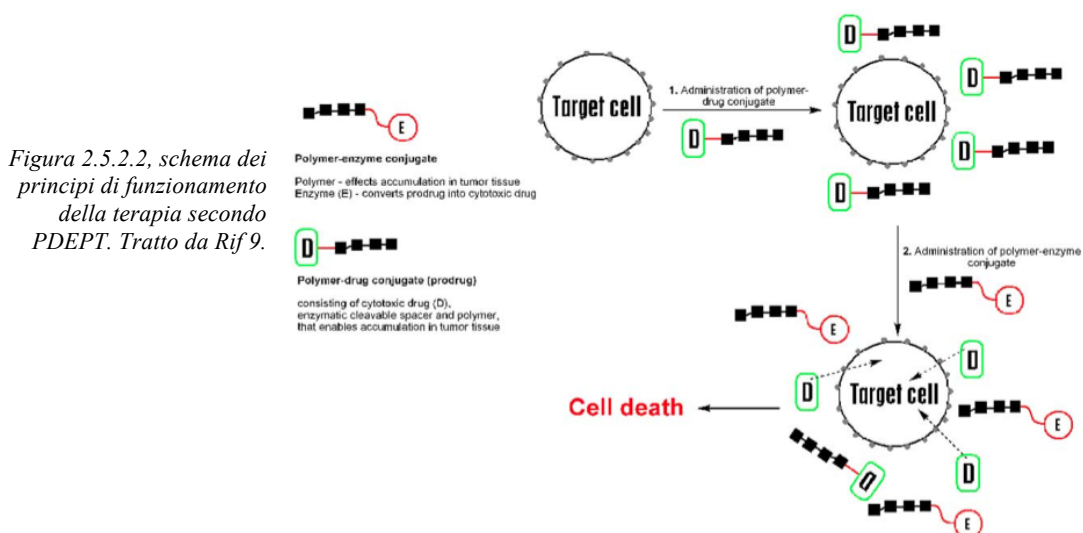


Figura 2.5.2.2, schema dei principi di funzionamento della terapia secondo PDEPT. Tratto da Rif 9.

2.5.3. Molecole pesanti

Per “molecole pesanti” si intendono anticorpi, proteine o polimeri. In generale con questo genere di sistemi si cerca di promuovere un targeting maggiormente attivo fondendo, spesso, anche i principi visti nel paragrafo 2.5.1.

Nel paragrafo 1.5 sono stati trattati gli anticorpi partendo dalla loro natura e giungendo ad alcuni esempi applicativi. Spesso questi vengono congiunti alle Antracicline via legami acido sensibili o tramite peptidi congiunti con un gruppo spaziatore auto-degenerativo. L'ancoraggio del “sistema Antraciclina” con l'anticorpo avviene, nella maggior parte dei casi, sfruttando i gruppi delle catene laterali dei residui, ponendo attenzione a non funzionalizzare le catene leggere dell'anticorpo.

I metodi di legame più utilizzati sono per formazione di un legame peptidico, ma meglio ancora sfruttando la rapida reazione di una maleimmide con un tiolo esposto di una cisteina ⁽⁹⁾.

Una diversa metodologia di provvedere al trasporto del farmaco fino al tessuto tumorale è data dalla coniugazione con le proteine del siero, specialmente l'albumina e la transferina. I vantaggi nell'utilizzo di queste proteine stanno nella facilità di

2. Drug Delivery, obiettivo selettività

ottenere in forma pura con una alta attività biologica, nella loro caratteristica di essere biodegradabili e non provocare risposte immunitarie, oltre al fatto di avere una elevata quantità di recettori espressi nella superficie delle cellule di molti tipi di tumori. Le strategie di rilascio e di ancoraggio sono ancora le stesse che per gli anticorpi.

Un'ultima classe di interessanti macromolecole coniugate alle Antracicline, sono i polimeri sintetici, tra i quali i più usati e sfruttati sono il polidrossipropilmetacrilamide (HPMA) e la polietilenglicole (PEG) ⁽⁹⁾.

Questi sistemi sono contraddistinti dalla presenza di un gruppo a ponte tra l'Antraciclina e il polimero, nella quale sarà previsto un sito di rottura per rilasciare il farmaco.

Altre porzioni che spesso è utile aggiungere riguardano la presenza di gruppi per modulare la solubilità del polimero e altri sistemi per promuovere il riconoscimento sulla superficie del tumore. Questa ultima porzione, quella del targeting, in genere non avviene tramite l'utilizzo di anticorpi, ma piuttosto di polisaccaridi, cluster di monosaccaridi, o altri sistemi con un relativo recettore specifico sulle cellule tumorali.

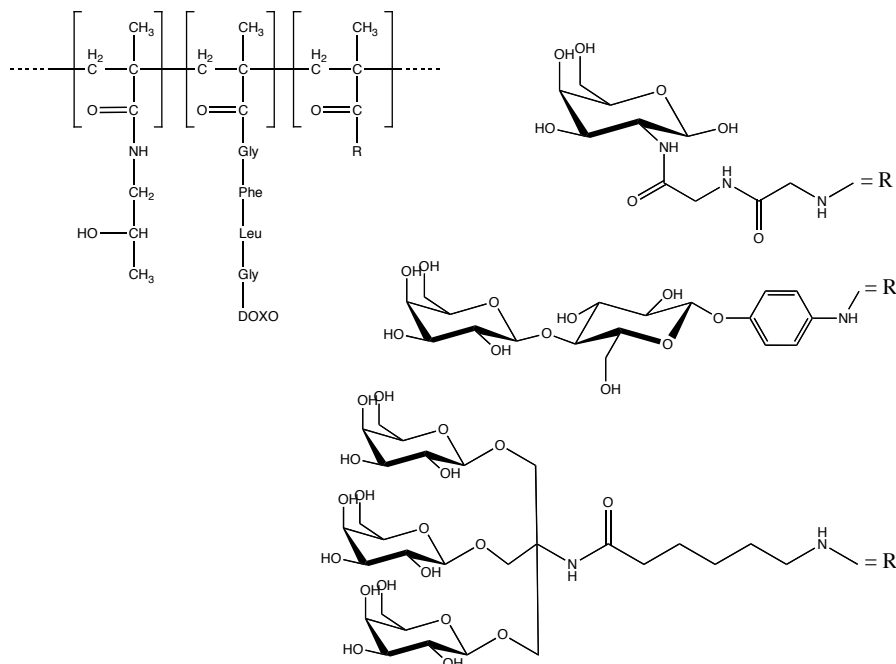


Figura 2.5.3.1, struttura schematica di un sistema HPMA-Doxorubicina nel quale la funzione di targeting è incaricata a gruppi di mono- o polisaccaridi. Adattata da Rif 9.

3. Nanosistemi di Oro, i nostri *carrier*

L'approccio alla nanotecnologia sta riscuotendo un notevole interesse da ormai alcune decine di anni. Non solo la comunità scientifica, ma anche il mondo industriale si sta rendendo conto che la miniaturizzazione delle tecnologie sta ormai raggiungendo il suo limite fisico e l'attenzione va spostata su una differente scelta del materiale, che continui a garantire il connubio tra *performance*, affidabilità e potenzialità di sviluppo.

Dati i presupposti, la scelta di investire su sistemi che si interfaccino tra il "mondo massivo" e il "mondo molecolare" pare che stia incoraggiando delle aspettative promettenti.

L'Oro è un elemento metallico della terza serie di transizione e appartiene alla 9° triade insieme a Rame e Argento. La sua configurazione elettronica, allo stato neutro, gli conferisce una particolare stabilità in quando i suoi 79 elettroni riescono a completare tutti gli orbitali fino al $5d^{10}6s^1$. In effetti, questa inerzia chimica contraddistingue anche altri elementi di quella zona della tavola periodica, si porta l'esempio del Platino, del Mercurio, e dei loro "analoghi leggeri" Palladio e Argento⁽⁵⁶⁾.

Le nanoparticelle di Oro (AuNPs) sono tra le più stabili particelle metalliche conosciute e, sebbene si abbiano prove della conoscenza di Oro "solubile" già dall'Egitto e dalla Cina del 5° o 4° secolo A.C., sono l'oggetto di numerosissimi progetti scientifici da tutto il 20° secolo⁽⁴⁹⁾.

L'uso di AuNPs nell'antichità riguardava per lo più usi ornamentali e medicinali. Si riporta in esempio la *Lycurgus Cup*, un manufatto in vetro del 4° o 5° secolo A.C. che mostrava colorazione rossa in trasmittanza e verde in riflettanza, proprio a causa di particelle di Au disperse nella matrice^(49,24).

Il primo libro scritto sulle particelle di Oro risale al 1618 ad opera del filosofo Francisci Antonii, Il testo contiene informazioni sulla preparazione di soluzioni di Oro colloidale e loro applicazioni mediche, riportando anche qualche caso pratico⁽⁴⁹⁾. Nel 1676 il chimico tedesco Johann Kunckels pubblicò un libro dove teorizzava che l'Oro dovesse essere presente in qualche forma che non era visibile dall'occhio umano⁽⁴⁹⁾.

Da qui fino al 18° secolo si susseguono osservazioni di come queste soluzioni rosse di Oro potessero essere stabilizzate se bollite, ad esempio, con dell'amido. Oppure come il colore potesse variare dal rosa o viola, in caso di particelle suddivise finemente, al giallo quando le particelle fini venivano aggregate⁽⁴⁹⁾.

Solo nel 1857, Michael Faraday riporta la formazione di una soluzione rossa di AuNPs dalla reazione di riduzione del $AuCl_4^-$ con il CS_2 ⁽⁴⁹⁾.

Ad ogni modo, l'utilizzo più diffuso delle soluzioni colloidali di Oro nel Medioevo fu in medicina per la diagnosi della sifilide, un metodo rimasto in uso ancora nel 20° e, talvolta, nel 21° secolo⁽⁴⁹⁾.

3.1. Dal materiale massivo alla nanoparticella

Le bande che caratterizzano la distribuzione elettronica in un materiale metallico sono descrivibili con una combinazione lineare di funzioni d'onda elettroniche degli atomi che lo compongono. Dalla teoria LCAO (*Linear Combination of Atomic Orbital*) sappiamo che combinando linearmente due orbitali atomici uguali, si generano due orbitali molecolari caratterizzati da un'energia minore (orbitale di legame) e maggiore (orbitale di antilegame) rispetto a quella dell'orbitale atomico. Se ora si immagina di combinare linearmente un numero elevato di orbitali atomici, dell'ordine del numero di Avogadro, ne emergerà una serie di orbitali con energie comprese tra l'orbitale di legame e quello di antilegame. Il risultato si può approssimare con un *continuum di stati* che prende il nome di "banda".

Per una data configurazione elettronica, con il termine "livello di Fermi" si indica il livello energetico massimo occupato a 0 K, ossia in assenza di eccitazione termica. Se la banda non è completamente riempita, cioè il livello di Fermi si trova all'interno della banda, il sistema si comporta come un metallo poiché il debole campo elettrico generato da una differenza di potenziale riesce a promuovere gli elettroni dai livelli occupati a quelli vuoti al di sopra del livello di Fermi. In questi livelli la mobilità degli elettroni è molto elevata e a questo corrisponde l'alta conducibilità caratteristica dei metalli.

Ovviamente, anche gli orbitali a numeri quantici più elevati si combinano linearmente per formare delle bande. Se queste non si trovano ad energia troppo elevata, potranno essere oggetto di transizioni elettroniche interbanda, analogamente a come succede per gli orbitali molecolari.

Nella transizione da metallo massivo alle nanoparticelle si assiste ad una progressiva diminuzione del numero di stati tra il massimo e il minimo della banda energetica. Nel caso di un *cluster* con un numero limitato di atomi, come nel complesso $[\text{Au}_{55}(\text{PPh}_3)_{12}\text{Cl}_6]$ si troveranno dei livelli energetici prossimi ma discreti. In questo caso si trovano per esempio livelli separati di 170 meV⁽⁴⁹⁾.

Il presente lavoro di tesi considera AuNPs dell'ordine di circa 20nm di diametro, in maggioranza di forma sferica e con un numero di atomi di Au per particella dell'ordine dei 10^5 . Il dato di atomi di Oro per particella (N_{Au}) è calcolato confrontando il volume di una sfera di diametro $d=20\text{nm}$, con quello riportato per un atomo di Au (V_{Au})⁽⁴⁹⁾ (vedi paragrafo 3.6).

In questo genere di particelle il rapporto tra il numero di atomi superficiali il numero di atomi interni è molto maggiore che per il materiale massivo e questo ne determina importanti caratteristiche come, ad esempio, il minor punto di fusione: 300-400°C per AuNPs contro 1064°C⁽⁴⁹⁾.

In sistemi come questi, quindi, le proprietà ottiche, fisiche e chimiche dipenderanno strettamente non solo dalle dimensioni, ma anche dalla forma, dalla vicinanza reciproca delle particelle e dalla presenza di agenti stabilizzanti coordinati sulla loro superficie o, più in generale, dallo strato che le ricopre^(24,25,26,27,28,30,31,49).

Nel 1908 Mie pubblicò un modello che si applica bene alla comprensione dei fenomeni di estinzione che un campo elettromagnetico subisce nel momento in cui viene a interagire con nanoparticelle sferiche. In accordo con la sua teoria, la sezione d'urto totale è combinazione di effetti di assorbimento e di scattering⁽⁴⁹⁾.

Quando una radiazione colpisce una superficie, metallica nel nostro caso, può penetrare fino ad una profondità che dipende dal materiale stesso e che, per i metalli da conio, il rame e i metalli alcalini, equivale a circa 25nm per tutta la regione ottica

e gran parte della regione infrarossa ⁽²⁴⁾. Radiazione nel visibile può perciò essere trasmessa attraverso particelle di diametro di circa 20 nm.

All'altro estremo, se una particella ha un diametro inferiore all'ipotetica distanza che compierebbe un suo elettrone durante un'oscillazione ottica, questo non può più essere considerato un fenomeno descrivibile con la fisica classica e s'instaurano effetti di tipico confinamento quantistico. Questa dimensione limite è di circa 1nm⁽²⁴⁾. Da un altro punto di vista si può dire che effetti dovuti a confinamento quantico possono essere osservati quando le dimensioni di una particella diventano dell'ordine della lunghezza d'onda di De Broglie associata agli elettroni del livello di Fermi (0,5 nm).

In questo intervallo di dimensioni, 1÷25nm, una radiazione incidente dell'intervallo UV-vis-NIR ($2 \cdot 10^2 \div 2 \cdot 10^3$ nm) è equivalente ad un campo elettrico spazialmente costante e variabile nel tempo. In prima approssimazione, gli elettroni del metallo sono perciò liberi di muoversi coerentemente con l'oscillazione della radiazione. Questo movimento di cariche genera una separazione dipolare transiente che, per effetto dell'attrazione reciproca di cariche opposte, sviluppa una *restoring force* che tende a ristabilire la neutralità. Il risultato è un oscillatore elettronico chiamato plasmon di superficie localizzato (LSP) il quale entra in risonanza con la radiazione incidente ad una frequenza determinata dalla *restoring force* (la tendenza a neutralizzare il dipolo appaiando nuovamente le cariche) e dalla massa effettiva dell'elettrone ⁽²⁴⁾.

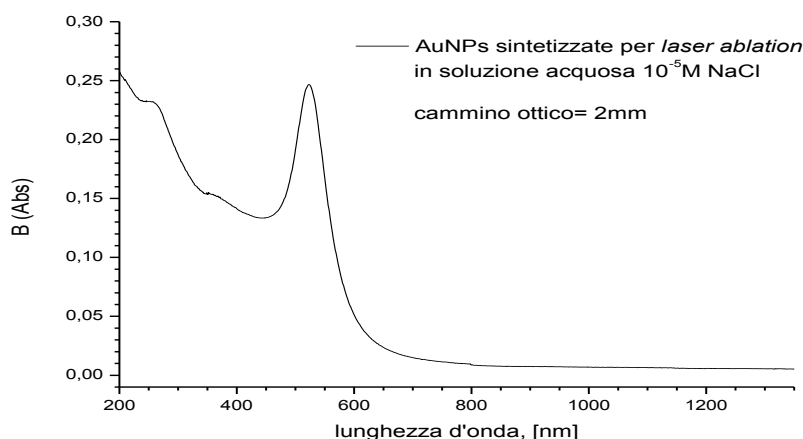
Il modello di Mie nell'approssimazione dipolare ⁽²⁷⁾ (equazione 3.1.1) attribuisce, quindi la banda plasmonica all'oscillazione dipolare degli elettroni al livello di Fermi. La sua frequenza e la sua intensità dipendono, come già detto, dalle dimensioni, dalla forma (anche se il modello di Mie dell'equazione 3.1.1 si applica solo a particelle sferiche) e, in particolare, dalla costante dielettrica del mezzo circostante la particella⁽²⁷⁾.

$$\sigma_{ext} = 9 \frac{\omega}{c} \varepsilon_m^{3/2} V \cdot \frac{\varepsilon_2(\omega, R)}{(2\varepsilon_m + \varepsilon_1(\omega, R))^2 + \varepsilon_2(\omega, R)^2} \dots\dots\dots(Equazione 3.1.1)$$

Dove: σ_{ext} è la sezione d'urto di estinzione, c è la velocità della luce, ω è la frequenza della radiazione, V è il volume di una particella sferica di raggio R e di costante dielettrica $\varepsilon(\omega, R) = \varepsilon_1(\omega, R) + i \varepsilon_2(\omega, R)$ e ε_m è la costante dielettrica del mezzo circostante (vedi paragrafo 3.5. per una trattazione dedicata alla caratterizzazione delle AuNPs tramite spettroscopia UV-vis).

Due delle caratteristiche più importanti del plasmon di superficie sono l'elevata sezione d'urto, che permette analisi di routine con un normale spettrofotometro UV-vis-NIR da banco (vedi *Figura 3.1.2*), e la e la variazione dello spettro nel NIR quando le particelle entrano in stretto contatto tra loro (distanze dell'ordine del nm).

3. Nanosistemi di Oro, i nostri *carrier*



R (nm)	Spheres %	1-RSS	MaxSPA _{520nm} (m ²)	ϵ_{520nm} (cm ⁻¹ M ⁻¹)	AbS _{b=2mm} (520nm)	C (mol/L)
9,3	91,5	9,954E-04	2,638E-16	6,907E+08	0,24504	1,77E-09

Figura 3.1.1, spettro di assorbimento UV-vis-NIR di soluzione colloidale di AuNPs in H₂O e relativi dati ottenuti tramite fitting con SPRFit (vedi paragrafo 3.5) dove: R è il raggio medio; Spheres è al percentuale di sfere rispetto agli sferoidi; 1-RSS è il residual sum of squares del fitting rispetto ai dati sperimentali; MaxSPA è la sezione d'urto per particella a 520nm; ϵ è il coefficiente di estinzione molare a 520nm; Abs è il valore di assorbanza a 520nm; C è la concentrazione delle AuNPs nella soluzione.

A queste variazioni sono associati dei campi elettrici locali molto intensi. Il calcolo di tali campi all'interfaccia tra due o più particelle adiacenti risulta molti ordini di grandezza maggiore rispetto al campo superficiale su una particella sferica calcolato con la teoria di Mie. Le zone in cui si manifesta l'interferenza costruttiva dei plasmoni di superficie è stata chiamata da Stockman et al. *Hot Spot* e, specialmente nelle analisi SERS e SERRS, può portare ad un accrescimento della sensibilità fino a 9 ordini di grandezza⁽²⁴⁾.

Questa proprietà di accrescimento del segnale SERS di un analita che si trovi in un *Hot Spot* viene chiamato "*Enhancement Factor*" (EF) e permette la realizzazione di esperimenti basati sull'osservazione di una singola particella, o di un singolo aggregato di particelle⁽⁵⁴⁾. In una recente review di Van Duyne et al.⁽⁵⁴⁾ si pone l'attenzione sulla possibilità di modulare il picco plasmonico agendo soprattutto sulle dimensioni e sulla forma delle particelle. I loro esperimenti si basano soprattutto su nanoparticelle isolate cresciute su una superficie isolante e mostrano che la banda plasmonica può essere spostata in tutto l'intervallo del visibile e del NIR. Questa possibilità è particolarmente importante per ottimizzare l'EF. Infatti in questi lavori si pone l'attenzione sul fatto che i migliori risultati in termini di EF si ottengano proprio quando il picco plasmonico cade tra la lunghezza d'onda di eccitazione (ovvero la frequenza del raggio laser di eccitazione) e il picco Raman caratteristico dell'analita.

Anche noi, in questo lavoro di tesi, abbiamo deciso di sfruttare il potenziale del LSP per caratterizzare le nostre reazioni di funzionalizzazione delle AuNPs e per ingegnerizzare sistemi di *imaging*, come si può leggere nei capitoli successivi.

3.2. Raman scattering, SERS e SERRS

Nel 1930 Chandrasekhara Venkata Raman vinse il premio Nobel per la fisica per “*his work on the scattering of light and for discovery of the effect named after him*”. Con i suoi occhi e la luce del sole Raman notò quello che oggi sarebbe chiamato “anti-Stoke Raman scattering”, ovvero fotoni scatterati caratterizzati da una energia maggiore di quella che possedevano i fotoni incidenti⁽⁶⁾.

Lo scattering è un fenomeno legato alla polarizzabilità di una specie che viene investita da una radiazione elettromagnetica.

Le funzioni d’onda elettroniche molecolari sono caratterizzate da regioni spaziali in cui vi è maggior probabilità di trovare un elettrone. Questo determina la densità elettronica attorno ai nuclei e, in stato di quiete, essa si struttura per raggiungere un minimo di energia del sistema di elettroni e nuclei.

Se una radiazione elettromagnetica disturba lo stato di quiete della molecola, questa assumerà una nuova configurazione della densità elettronica. La risposta della molecola può essere descritta con la sua polarizzabilità elettrica (α), che è una proprietà tensoriale. Questa proprietà della molecola ne determina perciò la risposta ad una perturbazione elettromagnetica. Poiché la polarizzabilità dipende dalla posizione di elettroni e nuclei, le posizioni di questi ultimi influenzano la polarizzabilità e perciò essa risulta essere funzione delle vibrazioni molecolari che spostano i nuclei dalle loro posizioni di equilibrio.

Il campo elettromagnetico genera quindi un dipolo indotto che inizia ad oscillare ad una frequenza prossima a quella della radiazione incidente.

Si esprime la dipendenza nel dominio delle frequenze del campo E come:

$$\mathbf{E} = \mathbf{E}_0 \cdot \cos(\omega_1 t) \quad \dots\dots\dots(\text{Equazione 3.2.1})$$

La dipendenza di α dai moti vibrazionali, tenendo conto della sua natura tensoriale, viene sviluppata in serie di Taylor per ogni componente del tensore ($\alpha_{\rho\sigma}$) e per tutte le coordinate normali di vibrazione (k)⁽⁷⁾. Troncando la serie al primo termine si può allora esprimere un tensore polarizzabilità per ogni coordinata normale di vibrazione:

$$\alpha_k = \alpha_0 + \alpha'_k \cdot Q_k \quad \dots\dots\dots(\text{Equazione 3.2.2})$$

con

$$Q_k = Q_{k0} \cdot \cos(\omega_k t + \delta_k) \quad \dots\dots\dots(\text{Equazione 3.2.3})$$

La dipendenza dal tempo delle coordinate normali di vibrazione genera, quindi, una interazione tra la frequenza del campo incidente (ω_1) e quella dei vari modi normali (ω_k), per la quale si genera un dipolo di polarizzazione, per la molecola (1), pari a:

$$\mathbf{p}^{(1)} = \alpha \cdot \mathbf{E} \quad \dots\dots\dots(\text{Equazione 3.2.4})$$

Sviluppando il vettore polarizzazione con le dipendenze dal tempo del campo e delle vibrazioni, troviamo un risultato scomposto in tre contributi:

$$\mathbf{p}^{(1)} = \mathbf{p}^{(1)}(\omega_1) + \mathbf{p}^{(1)}(\omega_1 - \omega_k) + \mathbf{p}^{(1)}(\omega_1 + \omega_k) \quad \dots\dots\dots(\text{Equazione 3.2.5})$$

con:

$$\mathbf{p}^{(1)}(\omega_1) = \mathbf{p}_0^{Ray} \cos(\omega_1 t) = \alpha^{Ray} \cdot \mathbf{E}_0 \cdot \cos(\omega_1 t) \quad \dots\dots\dots(\text{Equazione 3.2.6})$$

e

$$\mathbf{p}^{(1)}(\omega_1 \pm \omega_k) = \mathbf{p}_{k0}^{Ray} \cos[(\omega_1 \pm \omega_k \pm \delta_k)t] = \alpha_{k0}^{Ram} \cdot \mathbf{E}_0 \cdot \cos[(\omega_1 \pm \omega_k \pm \delta_k)t] \quad \dots\dots\dots(\text{Equazione 3.2.7})$$

dove

$$\alpha_{k0}^{Ram} = \frac{1}{2} \alpha'_k \cdot Q_k \quad \dots\dots\dots(\text{Equazione 3.2.8})$$

Da queste relazioni possiamo dedurre che una radiazione incidente verrà scatterata a tre differenti frequenze:

- ω_1 : il dipolo indotto oscilla alla stessa frequenza della radiazione incidente, è l'evento più intenso e viene detto "Rayleigh scattering", definito dal tensore polarizzabilità α^{Ray}
- $\omega_1 - \omega_k$: il dipolo indotto oscilla ad una frequenza minore rispetto a quella della radiazione incidente, la quale è stata modulata dal modo normale di vibrazione oscillante a frequenza ω_k ; è un evento che viene chiamato "Stokes Raman scattering" ed è definito dal tensore polarizzabilità $\alpha_{k_0}^{Ram}$
- $\omega_1 + \omega_k$: contrariamente al caso precedente, il dipolo indotto oscilla ad una frequenza maggiore rispetto a quella della radiazione incidente; è un evento di bassa intensità che viene chiamato "anti-Stokes Raman scattering"

Come detto in precedenza, qualsiasi sistema molecolare possiede una propria polarizzabilità e quindi tutte le molecole mostreranno uno scattering di Rayleigh.

Al contrario, lo scattering di Raman è soggetto alla regola di selezione di possedere una derivata prima del tensore polarizzabilità sulla coordinata normale di vibrazione diverso da zero. Perciò, si osserva scattering Raman solo quando il tensore polarizzabilità varia con una vibrazione. I modi normali di vibrazione possono essere tanti e di conseguenza si riscontrano alcuni modi Raman-attivi e altri Raman-non attivi, analogamente a come si osserva per la spettroscopia infrarossa.

Accoppiando la spettroscopia Raman ai vantaggi di "amplificazione" dei plasmoni di superficie localizzati (LSP) sulle nanoparticelle, nasce una tecnica chiamata *Surface Enhanced Raman Spectroscopy* (SERS).

Il passaggio dal Raman al SERS sta tutto nella comparsa del LSP che permette la presenza di campi locali enormemente più intensi di come non potrebbe fare la sola radiazione elettromagnetica, sebbene indotta da sorgente laser.

Una molecola che si trovi a contatto con una particella mostra un notevole incremento del rapporto segnale/rumore rispetto al fondo o alle altre specie non a contatto con la superficie⁽⁴⁾. Si possono raggiungere enhanced factor (EF) ancora maggiori se la specie molecolare ha un assorbimento nella stessa zona in cui cade l'assorbimento del LSP, in tal caso i tre sistemi (molecola, plasmone e radiazione) entrano in risonanza tra loro e la tecnica viene chiamata SERRS (*Surface Enhanced Resonant Raman Spectroscopy*).

Risultati ancora maggiori si hanno utilizzando aggregati di particelle a causa della presenza degli Hot Spot^(24,54), che aumentano enormemente il campo elettrico locale, come già ricordato in precedenza.

3.3. Sintesi di AuNPs, metodi di *Bottom Up*

Le nanoparticelle si trovano, dimensionalmente, tra il materiale massivo e il mondo molecolare. Con il termine *Bottom Up* si intendono quelle metodologie di preparazione di sistemi nanostrutturati che vengono costruiti partendo dal mondo delle molecole e dei complessi e inducendo assemblaggio fino alle dimensioni desiderate. I metodi *Bottom Up* sfruttano, tipicamente, delle reazioni chimiche.

La riduzione di complessi di Au per la formazione di nanoparticelle è sempre accompagnata dalla presenza di specie stabilizzanti che inibiscono una crescita eccessiva delle nucleazioni e, al contempo, garantiscano una distribuzione di dimensioni abbastanza stretta.

3. Nanosistemi di Oro, i nostri *carrier*

Questi agenti stabilizzanti possono essere introdotti ad *hoc* oppure essere loro stessi agenti riducenti, come nel caso della reazione di Bottom Up più utilizzata in assoluto per la sintesi di particelle di Oro delle dimensioni di circa 20nm: la riduzione con citrato del HAuCl_4 in H_2O ⁽⁴⁹⁾.

Una variante di questa preparazione consiste nell'introduzione di un agente stabilizzante assieme al citrato, come per esempio il mercaptopropionato sodico ⁽⁴⁹⁾, che si lega più fortemente con la superficie della particella e mostra verso l'esterno delle particelle delle cariche negative che inibiscano la loro ulteriore aggregazione per semplice repulsione elettrostatica.

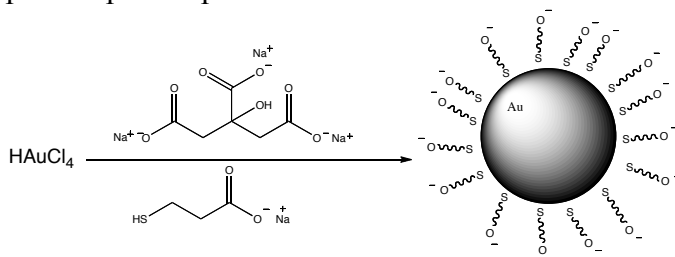


Figura 3.3.1, schema di reazione della sintesi di nanoparticelle con citrato e stabilizzante anionico.

Un altro metodo interessante è quello di Brust-Schiffrin ⁽⁴⁹⁾. La miscela di reazione presenta una fase acquosa, nella quale viene inizialmente dissolto il AuCl_4^- e una fase organica di toluene. Per trasferire il complesso di Oro nella fase organica viene usato uno ione ammonio quaternario idrofobo e la reazione di riduzione è a carico del NaBH_4 . L'agente stabilizzante è presente nella fase organica ed è un tioalcol a lunga catena e le dimensioni delle particelle prodotte si aggirano normalmente tra 1 e 3nm ^(25,49). Il vantaggio di questa preparazione è la possibilità di ottenere AuNPs in soluzione organica e la stabilizzazione è tale da permettere la manipolazione e l'isolamento delle particelle senza ulteriori aggregazioni o decomposizioni.

Utilizzare agenti stabilizzanti più ingombrati, un rapporto maggiore di surfattante/Oro o quencher la reazione appena avvenuta la riduzione (ad esempio abbattendo la temperatura) sono tutti metodi adottati per cercare di modulare la distribuzione di dimensioni delle particelle ⁽⁴⁹⁾.

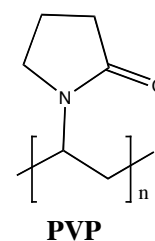
Utilizzare agenti stabilizzanti più ingombrati, un rapporto maggiore di stabilizzanti/cloroaurico o smorzare la reazione appena avvenuta (ad esempio abbattendo la temperatura) sono tutti metodi adottati cercare che consentono di modulare la distribuzione di dimensioni delle particelle ⁽⁴⁹⁾.

Una classe di agenti stabilizzanti molto utilizzata è quella dei polimeri. Benché sia sempre preferito il legame tiolico, l'utilizzo di polimeri con altri gruppi funzionali coordinanti è utilizzato per avvantaggiare una successiva sostituzione, o per promuovere un migliore controllo delle dimensioni.

Si pensa che il ruolo del polimero possa influenzare le dimensioni agendo come agente chelante sull'atomo di metallo prima della riduzione. In questo modo si limita drasticamente la nucleazione e si permette la sintesi di particelle dell'ordine di pochi nanometri di diametro ⁽⁴⁹⁾.

Un esempio è la sintesi di AuNPs con PVP (polivinilpirrolidone).

Il HAuCl_4 viene incorporato nel polimero e successivamente viene aggiunta idrazina. Il colore della soluzione passa da giallo a viola, per la formazione di AuNPs (ricorda l'assorbimento del plasmon a circa 520nm), e poi a blu per l'aggiunta di un eccesso di idrazina anidra. Il secondo viraggio è dovuto alla formazione di aggregati di dimensioni maggiori e la reazione può essere fermata con l'aggiunta di HCl che protona l'idrazina e blocca la coagulazione.



Una tecnica per produrre particelle di forme differenti è invece la *Nanosphere Lithography* (NSL) ⁽⁵⁴⁾, che consiste in una prima deposizione di nanosfere che fungono da maschera e che sono utilizzate nel secondo step come stampo per uno strato di particelle. Infine lo stato inferiore viene rimosso con semplice sonicazione in soluzione e resta solamente un *array* di particelle. Questa tecnica è riportata per Au, Ag, Cu e A e permette di ottenere sfere, prismi triangolari, particelle allungate e altri ancora ⁽⁵⁴⁾ su supporti di diversa natura che vanno dal vetro all'ossido di indio e stagno.

Metodi fisici come ad esempio l'utilizzo di ultrasuoni, irraggiamento laser nell'IR, fotochimica con raggi ultravioletti o trattamenti termici, vengono a volte accoppiati ai metodi di Bottom Up nel tentativo di modulare le dimensioni delle particelle o controllare la velocità delle reazioni di riduzione. ⁽⁴⁹⁾.

Esiste, inoltre, un approccio biologico per ottenere nanostrutture. Quantità microscopiche di microorganismi, come ad esempio i funghi, possono essere utilizzati insieme alle AuNPs per organizzare nanocomponenti, precedentemente sintetizzati, in strutture ordinate. Oppure la reazione degli ioni di AuCl_4^- con un estratto di foglie di Geranio e con un fungo patogeno, *Colletotrichum*, presente anch'esso nelle foglie, conduce alla formazione di AuNPs ⁽⁴⁹⁾.

3.4. Sintesi di AuNPs, metodi di *Top Down*

I metodi *Top Down*, al contrario di quelli Bottom-Up, sono tipicamente considerati metodi fisici e sintetizzano nanostrutture partendo dal materiale massivo.

Il metodo che si è utilizzato durante questo progetto rientra in questa categoria e prende il nome di *Laser Ablation Synthesis in Solution* (LASiS) ^(25,26,27,49).

La tecnica si basa sull'irraggiamento di un target di Au ad alta purezza (99,99%), con impulsi di un laser Nd:YAG (1064nm) a nanosecondi, con frequenza di 10Hz e potenza di circa 0,6W (vedi paragrafo 6.1).

La strumentazione consiste in una sorgente laser e un sistema di ottica che possa focalizzare il fascio su di un target di Oro (o altro materiale) immerso nel solvente.

Il set-up dell'esperimento è quindi molto semplice e viene schematizzato in *Figura 3.4.1*.

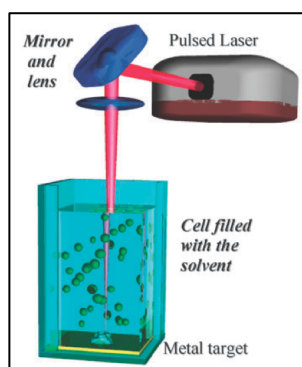


Figura 3.4.1, illustrazione schematica dell'apparato minimo per condurre una LASiS: una sorgente laser, un sistema di ottiche che permetta di indirizzare e focalizzare il raggio e un alloggiamento per il solvente e il target. Tratto da Ref.25

I processi che avvengono al momento dell'ablazione non sono ancora del tutto chiari. Quel che si pensa è che l'ablazione inizi con l'assorbimento dei fotoni incidenti, a cui consegue un grande riscaldamento localizzato e la fotoionizzazione della superficie irradiata ⁽²⁵⁾.

Questi processi, nel tempo di poche decine di picosecondi, portano all'espulsione di materiale come vapore, gocce di metallo fuso, frammenti solidi e la formazione di una nube di plasma, ossia materiale ionizzato ad alta energia ⁽²⁵⁾.

3. Nanosistemi di Oro, i nostri *carrier*

Il fenomeno più importante è proprio l'instaurarsi di questa nube di plasma che viene contenuta in un'area relativamente piccola dal solvente circostante. In questo ambiente il materiale appena separato dal *bulk* viene mantenuto ad energie elevate per alcune decine di nanosecondi⁽²⁵⁾. In funzione della durata dell'impulso si generano, quindi, predominanze di differenti meccanismi di ablazione: con impulsi ai nanosecondi il materiale viene espulso mentre è ancora presente l'impulso, al contrario, nel caso di impulsi ai pico- o femtosecondi, il materiale viene estratto quando l'impulso si è già esaurito. Nel primo caso si assiste a una più ampia espansione della nuvola di plasma composta da atomi ionizzati e clusters.

In queste condizioni il plasma può assorbire parte della radiazione incidente, generando un ulteriore riscaldamento della nube e una omogeneizzazione del materiale ablato in termini di dimensioni e forma⁽²⁵⁾. Per ottenere questi risultati, un laser nel vicino-IR è il più adatto perché previene l'assorbimento della radiazione da parte del materiale ablato, sconveniente poiché porterebbe a una minor potenza sul target e a fenomeni di frammentazione fotoindotta. In letteratura si trovano, comunque, esempi in cui un successivo trattamento con laser risonante con la banda plasmonica del metallo (ad esempio la seconda armonica della 1064nm, che genera un fascio a 532nm in risonanza con il picco plasmonico dell'AuNP a 520nm) ha portato ad una riduzione delle dimensioni particellari con buon controllo della distribuzione media^(25,28,46).

Se invece si conduce l'ablazione con impulsi di durata più breve, ci si può aspettare che il meccanismo predominante sia il cosiddetto "*boiling explosion*", consistente nella separazione di materiale più grosso, come pezzetti solidi o gocce di metallo fuso, e che conduca a particelle di dimensioni medie maggiori.

Passato l'istante della separazione dal materiale massivo, gli atomi ionizzati e i piccoli frammenti e gocce di Au si trovano concentrati nelle strette vicinanze dello *spot* del laser e formano la già citata nube plasmatica. Si instaurano ora dei veloci processi di nucleazione dovuti all'alta energia e la alta concentrazione delle specie all'interno della nube.

Mentre la nucleazione è veloce, la crescita sarà un fenomeno legato al limite diffusionale. La nube tenderà a disperdersi cedendo energia e materiale ablato al sistema composto dal solvente e i suoi soluti. Quest'ultimo, il solvente, sarà anch'esso influenzato dall'intensità della radiazione e da meccanismi di trasferimento energetico o trasferimento elettronico con la nube di plasma e si instaurerà, quindi, uno strato di materiale metallico e solvente entrambi in stato eccitato. Questa concomitanza porta ad una alta reattività tra metallo e solvente e che è spesso seguita dall'instaurarsi di reazioni chimiche direttamente coinvolte nel processo di crescita delle nanoparticelle^(25,26,27,29).

La sintesi di AuNPs, via LASiS, in solvente organico può ad esempio portare a pirolisi del solvente e conseguente deposizione di uno strato carbonioso sulla superficie metallica. Questo è il caso della sintesi in toluene, nel quale si riscontra la formazione di uno strato di grafite superficiale che inibisce la crescita delle particelle e le mantiene ad un diametro di circa 2nm^(25,26). Lo strato di grafite è inoltre anche causa dell'abbattimento della banda plasmonica del metallo, la quale viene ristabilita rimuovendo lo strato carbonioso con H₂SO₄ e H₂O₂ a 70°C per una notte⁽²⁶⁾. Al contrario, il tetraidrofurano si è mostrato non soggetto al problema della pirolisi e si presenta come solvente organico di elezione per il LASiS dell'Au^(25,27,29).

L'ablazione in solvente organico porta a particelle con un diametro, tipicamente, di 5÷15nm, mentre se condotta in solvente acquoso si raggiungono dimensioni di 10÷40nm^(25,26,27,28,30,31,46).

3. Nanosistemi di Oro, i nostri *carrier*

Nella sintesi in solvente acquoso, gli effetti della presenza del solvente sono stati attribuiti alla formazione di ponti di ossigeno superficiali causati, principalmente, dall'altissimo potenziale raggiunto dalle particelle appena ablate e dall'ossidazione ad opera dell' O_2 disciolto.

I soluti presenti nel mezzo, che mostrino capacità coordinanti sul metallo, potranno allora aprire questi ponti ossigeno sostituendosi a un'estremità. In questo modo si liberano dei gruppi Au-OH superficiali che, se deprotonati, contribuiscono a generare delle cariche superficiali discrete negative⁽²⁵⁾.

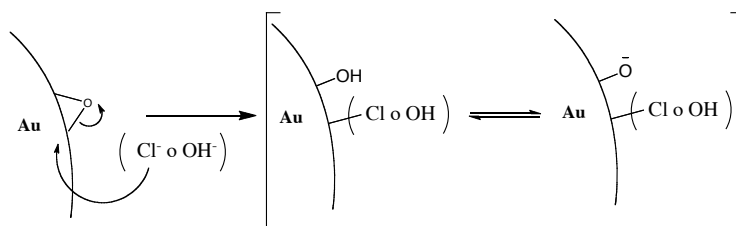


Figura 3.4.2, illustrazione schematica della reazione di formazione delle cariche superficiali sulle AuNPs ad opera di cloruri o ioni ossidrilici.

L'esistenza delle cariche superficiali viene dedotta da esperimenti di Z-spectroscopy ed elettroforetici. L'attribuzione di dette cariche a degli ossigeni coordinati in superficie viene data dalla convergenza di più risultati sperimentali:

- esperimenti di spettroscopia fotoelettronica ai raggi-X mostrano una frazione di atomi di Au con stato di ossidazione +1 e +3⁽²⁵⁾
- esperimenti di spettroscopia FTIR e spettrometria di massa mostrano la presenza di legami superficiali Au-O⁻⁽²⁵⁾
- i risultati di Z-potential vengono influenzati da variazioni di pH⁽²⁵⁾

Tutte queste evidenze hanno portato al calcolo di una percentuale del 3÷7% di atomi di Au superficiali ospitanti una carica negativa⁽²⁵⁾.

Le nanoparticelle divengono allora stabili per repulsione coulombiana e diventa possibile lo stoccaggio di soluzioni di particelle, non ricoperte con agenti surfattanti, per periodi anche superiori ad un anno.

In effetti, si riporta che le particelle preparate in solventi organici mostrano, in media, una maggiore tendenza all'aggregazione di quelle preparate in solvente acquoso⁽²⁵⁾.

Questa tecnica si inserisce come concorrente delle sintesi chimiche per la preparazione di nanoparticelle, non solo AuNPs, con alcuni evidenti vantaggi che ha rispetto a queste ultime:

- semplicità del metodo, ridottissime procedure di preparativa o purificazione;
- formazione di particelle stabili senza l'utilizzo di agenti coordinanti (particelle nude) e quindi molto più reattive;
- possibilità indiscriminata di sintetizzare particelle in solventi organici o inorganici;
- bassi costi di start-up e di smaltimento rifiuti, la strumentazione non si "consuma" come invece i reagenti chimici e non ci sono rifiuti;
- ecologicamente compatibile e ad altissima atom-economy, le materie prime sono un target di Oro e il solvente nel quale si vuole preparare la soluzione, il target residuo si recupera ed è immediatamente riutilizzabile.

Nonostante gli evidenti vantaggi, la tecnica presenta dei punti deboli per quanto riguarda la completa comprensione dei meccanismi alla base dell'ablazione laser e della chimica superficiale che si viene a creare. Un ulteriore punto a sfavore rispetto

ai metodi di Bottom Up risiede nel minor controllo delle dimensioni particellari, che presentano spesso una larga distribuzione.

3.5. Caratterizzazione di AuNPs con spettroscopia di assorbimento UV-vis

La caratterizzazione delle proprietà delle AuNPs come le loro dimensioni, forma e coefficiente di estinzione, è importante per poterle poi usare in applicazioni che sfruttino per esempio l'effetto SERS, dato che molte volte queste proprietà dipendono dal metodo di sintesi adottato.

Nel paragrafo 3.1. è già stato introdotto il modello di Mie che pone in relazione il coefficiente di estinzione con le dimensioni di particelle di un definito metallo, nel limite di particelle sferiche. Questa relazione deriva dal legame tra la costante dielettrica (ϵ) e i processi di scattering e di assorbimento. Infatti, la parte reale della costante dielettrica determina l'indice di rifrazione del materiale mentre quella immaginaria determina l'assorbimento. Infine, la dipendenza di ϵ da R deriva dalla dipendenza della costante di rilassamento che può essere espressa nel seguente modo⁽²⁷⁾:

$$\Gamma(R) = \Gamma_{\infty} + A \frac{v_F}{R} \dots\dots\dots(\text{Equazione 3.5.1})$$

Dove: Γ_{∞} è valore relativo al materiale massivo, v_F è la velocità di Fermi degli elettroni del metallo e A è un parametro che nel nostro caso assume valore usualmente unitario.

Il modello di Mie consente perciò di ottenere le proprietà delle particelle e può, in teoria, risolvere il problema della loro caratterizzazione⁽⁴⁶⁾.

La realtà è che il modello non va bene per fittare spettri si assorbimento di AuNPs, soprattutto nella zona oltre i 550-600nm, nella quale la traccia calcolata tramite il modello presenta sistematicamente una assorbanza inferiore al dato sperimentale^(27,46,47).

Il motivo di questa incongruenza appare evidente osservando immagini TEM di campioni di AuNPs. La questione risiede nella forma delle particelle e nella loro aggregazione.

Il modello di Mie è stato elaborato per particelle sferiche, ma le immagini mostrano una presenza non trascurabile di particelle di forma allungata, di forma sferoidale.

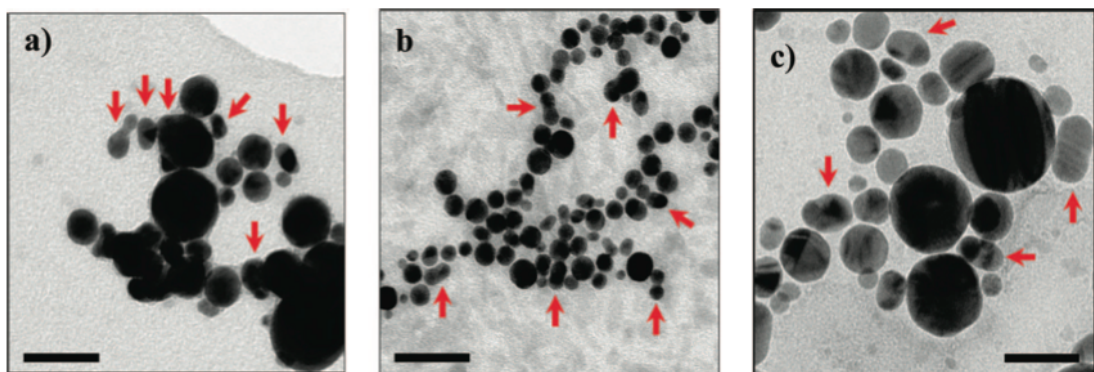


Figura 3.5.1, immagini al TEM di AuNPs con indicati in rosso alcuni esempi di particelle sferoidali, unità di scala 40nm, tratto dal Rif.46

3. Nanosistemi di Oro, i nostri *carrier*

Si introduce allora, con la correzione di Gans al modello di Mie, la dipendenza dalla forma nell'approssimazione che siano presenti solamente particelle sferiche e sferoidali ⁽⁴⁶⁾:

$$\sigma_{ext} = \frac{2\pi V \epsilon_m^{3/2}}{3\lambda} \cdot \sum_j \frac{\frac{1}{P_j^2} \epsilon_2(\omega, R)}{\left(\epsilon_2(\omega, R) + \frac{1-P_j}{P_j} \epsilon_m \right)^2 + \epsilon_2(\omega, R)^2} \dots\dots\dots (Equazione 3.5.2)$$

Dove: σ_{ext} è la sezione d'urto di estinzione mediata su tutte le possibili orientazioni, λ è la lunghezza d'onda della radiazione, V è il volume di una particella sferica di raggio R e di costante dielettrica $\epsilon(\omega, R) = \epsilon_1(\omega, R) + i \epsilon_2(\omega, R)$, ϵ_m è la costante dielettrica del mezzo circostante e P_j è il parametro geometrico che tiene conto della eccentricità dello sferoide.

Il motivo dell'assorbimento nella zona a lunghezze d'onda maggiore di 550-600nm, risiede nell'eccitazione del plasmon relativo all'asse maggiore dello sferoide, mentre il segnale a circa 520nm è analogo a quello mostrato da particelle sferiche e si riferisce al plasmon dell'asse minore ⁽⁴⁶⁾.

In definitiva si può suddividere un generico spettro di assorbimento di AuNPs in 3 zone: una zona a lunghezze d'onda inferiori di 500nm, corrispondente alle transizioni interbanda (vedi il paragrafo 3.1 per una descrizione delle bande elettroniche di una AuNP), il picco plasmonico intorno ai 520nm e tutta la zona verso l'infrarosso che è caratteristica di aggregati e/o particelle di forma differente e/o di dimensioni maggiori ^(25,27,28,30,31,32,46,54).

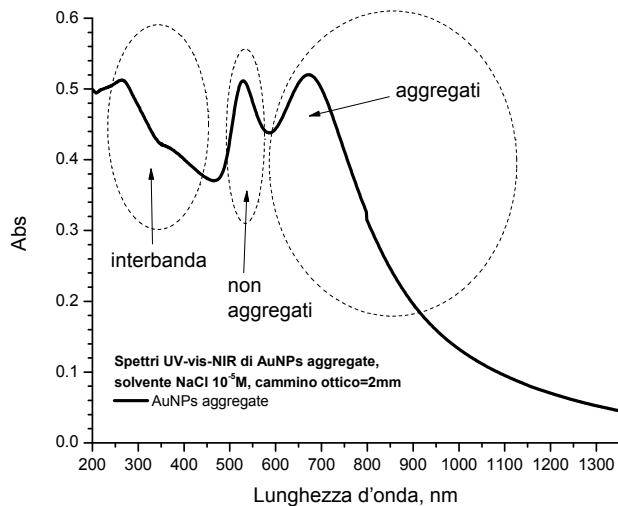


Figura 3.5.2, spettro UV-vis-NIR di AuNPs sintetizzate per LASiS e aggregate per centrifugazione. Sono evidenziate le parti dello spettro caratteristiche delle transizioni inter-banda, delle particelle non aggregate e delle particelle aggregate.

Queste considerazioni hanno portato allo sviluppo di un'applicazione (SPRfit), basata sul modello di Mie e di Gans, che permette il fitting di spettri di assorbimento UV-vis di AuNPs sintetizzate via LASiS con un'accuratezza del 6% circa ⁽⁴⁶⁾.

L'applicazione permette analisi di routine di campioni di AuNPs in diversi solventi e fornisce, tra gli altri dati, informazioni circa il raggio medio delle particelle, la sezione d'urto media di estinzione e la percentuale di particelle sferiche contro le particelle sferoidali ⁽⁴⁶⁾.

Per ottenere queste tre informazioni sarebbe necessario servirsi di più tecniche differenti e spesso il risultato sarebbe frutto di una media calcolata da una piccola popolazione. L'esempio più evidente riguarda l'analisi TEM nella quale la

dimensione e la forma delle particelle è fornita con maggior accuratezza, ma la popolazione osservata è usualmente molto piccola rispetto all'interesse del campione. La tecnica del light scattering è un'altra tecnica in grado di fornire la dimensione media del campione, ma il volume che valuta comprende anche la sfera d'idratazione del solvente e pertanto non è direttamente utile al dato che si sta cercando.

Le assunzioni su cui si basa il programma per il fitting, SPRFit riguardano:

- un'attenta calibrazione della costante dielettrica dell'Au;
- una distribuzione gaussiana del rapporto tra la lunghezza dell'asse maggiore e di quello minore degli sferoidi, in seno ad una natura stocastica dell'aggregazione, centrata sull'unità;
- l'assunzione che il volume di ogni particella sia una costante, ovvero una particella sferica avrà il raggio uguale alla media geometrica dei semiassi di una sferoide.

Nota la sezione d'urto di una singola nanoparticella (σ_{ext}) si può facilmente calcolare il coefficiente di estinzione molare ($\bar{\epsilon}$) come ⁽⁶⁾:

$$\bar{\epsilon} = \frac{N_A \cdot \sigma_{ext}}{\ln 10} \dots\dots\dots(\text{Equazione 3.5.3})$$

$$\bar{\epsilon} [cm^{-1} \cdot M^{-1}] = \frac{\sigma_{ext} [cm^2]}{3.82 \cdot 10^{-21}} \dots\dots\dots(\text{Equazione 3.5.4})$$

3.6. Aggregare e Funzionalizzare le AuNPs

Il motivo che sta alla base dell'aggiunta di surfattanti, nei metodi di sintesi di AuNPs per Bottom Up, è la necessità di prevenire fenomeni di aggregazione, che sono spontanei per sistemi metastabili come le nanoparticelle in soluzione.

La tecnica LASiS permette la produzione di nanoparticelle di Au stabili in soluzione acquosa anche senza l'utilizzo di stabilizzanti. La necessità di indurre l'aggregazione delle nanoparticelle risiede dunque nell'utilizzo che se ne vuole fare.

Nel paragrafo 3.1. si è trattato di come il plasmone superficiale localizzato nelle AuNPs sia fonte di enormi Enhancement Factor quando queste si aggregano. Nel paragrafo 3.2. si è visto come il segnale di Raman scattering sia in grado di fornire una *finger print* della specie analizzata. Questi due effetti, se uniti, hanno evidenti potenzialità nella tecnologia del *sensing* e, in particolare, durante questo progetto sono stati sfruttati per una futura ingegnerizzazione di sistemi di *imaging* su cellule tumorali.

Le condizioni necessarie per permettere la preparazione di composti atti allo scopo dell'imaging sono che le molecole di *SERS probe* leghino fortemente con la superficie delle particelle di Oro e che le stesse alloggino negli Hot Spot degli aggregati. A questo si unisce la necessità di disporre di aggregati che possano sempre mantenersi manipolabili e disperdibili in soluzione, auspicabilmente acquosa giacché ci si va ad interfacciare con il mondo biologico.

Conciliare tutte queste proprietà risulta essere alquanto complicato.

Benché il meccanismo e le variabili che portano alla formazione di aggregati non siano del tutto chiari, è possibile elaborare delle ragionevoli considerazioni incrociando vari risultati sperimentali.

Si presume che le cariche superficiali, presenti come gruppi Au-O⁻, mostrino una forte dipendenza dalla presenza di elettroliti, specialmente se sono in grado di

3. Nanosistemi di Oro, i nostri *carrier*

schermare o annullare la carica negativa. È stata già riportata l'influenza che il pH mostra sui risultati di Z-potential (vedi paragrafo 3.4.) e in letteratura si trovano esempi di laser ablation, in soluzione acquosa, condotta in presenza di elettroliti forti e deboli, cationici e anionici ⁽²⁵⁾. In particolare sono state eseguite ablazioni in soluzione di NaCl a concentrazione inferiore a 10^{-2} M che hanno portato a buoni risultati in termini di stabilità del colloide, probabilmente dovuti ad un incremento nel numero di ponti di ossigeno aperti e quindi allo sviluppo di cariche superficiali.

Sintesi in soluzioni di NaCl a concentrazione di circa 10^{-1} M portano invece a colloidi altamente instabili, che aggregano spontaneamente a pochi minuti dal termine del processo di ablazione, o addirittura con la sintesi ancora in corso.

Questo effetto a massimo che riguarda la concentrazione di sale può essere attribuito a due effetti simultanei, nei quali si trova predominanza di uno o dell'altro aumentando la concentrazione salina. Da una parte, il Cl^- è influente nella formazione di nuove cariche superficiali Au-O^- ed è quindi adiuvante di una maggior stabilità; dall'altra, il controione Na^+ agirà certamente come schermante verso cariche negative e funge quindi da destabilizzante. In effetti, gli esperimenti condotti con surfattanti anionici e cationici hanno evidenziato quanto sia sconveniente l'aggiunta di cariche positive: si ipotizza che i surfattanti anionici si pongano sulla superficie metallica tramite interazioni elettrostatiche mediate dal controione, ad esempio dal Na^+ , mentre quelli cationici fungano da schermanti sulle cariche superficiali e neutralizzino il loro effetto stabilizzante ⁽²⁵⁾.

Le cariche superficiali che si formano normalmente sono state stimate al 3-7% ⁽²⁵⁾ degli atomi di Au presenti sulla superficie di ogni particella, e derivano da ponti Au-O-Au che si aprono e, ragionevolmente, in assenza di aggiunta di sale solo una certa quantità verranno sostituiti.

In seguito si riportano una serie di calcoli approssimati per avere un ordine di grandezza delle cariche superficiali presenti sulle particelle. Le approssimazioni del calcolo sono che le particelle siano perfettamente sferiche e gli atomi che la compongano siano considerate sfere rigide di raggio 1,44Å.

raggio atomico Au, nm 0,144 ⁽⁵⁶⁾	volume atomo di Au, nm ³ 0,0125	
diametro AuNP, nm 20	volume AuNP, nm ³ 4187	
numero atomi per particella 334898		
numero atomi superficiali/atomi interni 1/3 ⁽²⁵⁾		
numero atomi superficiali 110516		
percentuale di cariche per ogni atomo superficiale 7% ⁽²⁵⁾		
numero totale di cariche superficiali 7736		
concentrazione AuNPs, nM 2	numero di AuNP/1mL 1,20E+12	numero di cariche superficiali totali/1mL 9,31E+15

Benché il numero di cariche superficiali totali sia dell'ordine di 10^{16} , se si considera una concentrazione di NaCl dell'ordine di 150mM (corrispondente alla

3. Nanosistemi di Oro, i nostri *carrier*

concentrazione salina nel tampone fisiologico PBS, *phosphate buffer saline*, si trova che per neutralizzare tutte le cariche superficiali presenti in un millilitro di AuNPs, ne devono essere aggiunti meno di 1 μ L.

Si può allora supporre che una bassa concentrazione salina permetta lo “sblocco” di tutte le possibili cariche superficiali fino al limite in cui saranno state aperte tutte, dopodiché la crescente concentrazione di Na⁺ giocherà il ruolo dominante nello schermaggio delle cariche negative. In aggiunta all’effetto schermante degli ioni Na⁺, anche l’effetto di scambio di legante Au-OH \rightarrow Au-Cl potrebbe verificarsi in caso di grande eccesso di cloruri, i quali sono anioni più *soft* dell’ossidrilico (vedi oltre).

Ad alta concentrazione di elettrolita si avrà una nettissima predominanza di cariche positive contro le cariche negative superficiali delle particelle e l’effetto di schermaggio sarà massimo, verrà meno la repulsione coulombiana che manteneva la stabilità e inizierà la formazione di aggregati.

Questo stesso effetto si nota aggiungendo una soluzione abbastanza concentrata di sale (PBS) ad una, già preparata, di AuNPs. Il viraggio cromatico verso il viola-blu è immediato e nell’arco di pochi secondi si assiste ad una completa aggregazione e sedimentazione di materiale scuro e grossolano.

L’aggregazione può venire indotta anche con meccanismi fisici, come la centrifugazione (vedi paragrafo 6.1.).

Quest’ultimo approccio ha dato risultati migliori in termini di riproducibilità dell’aggregazione.

La qualità dell’aggregazione viene valutata positivamente se:

- lo spettro UV-vis delle particelle aggregate ha un alto segnale di picco attorno ai 600nm e un basso segnale intorno ai 1000nm (si valuta il rapporto tra le assorbanze, un buon valore deve essere maggiore di $Abs_{600}/Abs_{1000} = 6$);
- gli aggregati debbono poter essere depositati per centrifugazione e agevolmente dispersi per sonicazione, lo spettro UV-vis dopo tale procedura non deve subire variazioni consistenti;
- funzionalizzando la soluzione di aggregati con opportuni SERRS probe, l’analisi SERS deve mostrare alti segnali di picco, tipicamente maggiori dei $5 \cdot 10^4$ cps

Naturalmente i tre requisiti riportati sono in stretta simbiosi tra di loro. Un campione di particelle che si attaccano sulle pareti del contenitore, o che non si disperdono, o che perdono completamente le loro caratteristiche ottiche, non sono utili a nessuno scopo.

Contrariamente a quanto accade per le soluzioni di particelle isolate, non esiste tutt’ora un buon metodo per caratterizzare gli aggregati. Le analisi TEM possono fornire un’idea del campione facendo statistica su qualche elemento, ma questa è una tecnica non sempre disponibile e non si presta ad analisi di routine.

Analisi TEM di alcune preparazioni di aggregati hanno mostrato una loro dimensione media di circa 100nm di diametro (*Figura 3.6.2*). Per le preparazioni successive si presume che le dimensioni medie si mantengano in sistemi che mostrino una traccia simile UV-vis-NIR.

3. Nanosistemi di Oro, i nostri *carrier*

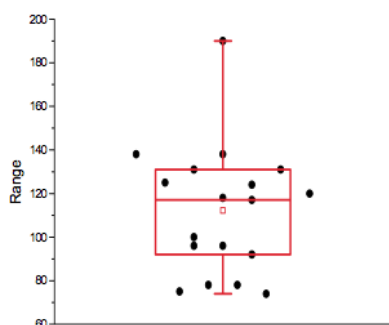
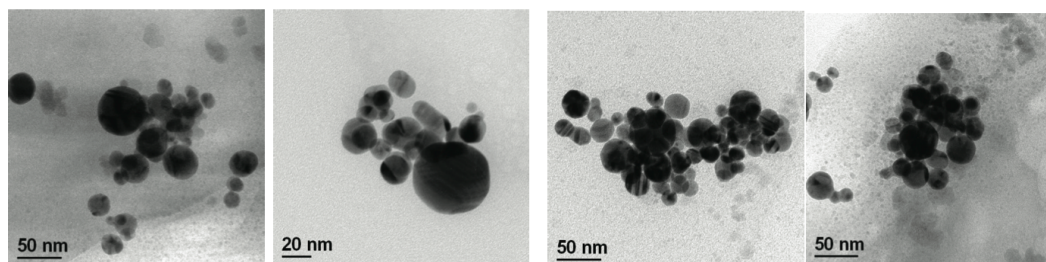


Figura 3.6.2, immagini al TEM di aggregati di AuNPs ottenuti per aggiunta di soluzione salina (PBS), in alto; dispersione delle dimensioni degli aggregati rilevati da analisi TEM, a sinistra. Tratto da: tesi di laurea magistrale in scienze dei materiali per la facoltà di Scienze MM.FF.NN. dell'Università di Padova, laureando Lorenzo Amadio, A.A. 2009/2010, dal titolo "Ingegnerizzazione di nanocompositi con particelle d'oro e anticorpi per imaging e targeting di cellule tumorali"

La funzionalizzazione della superficie delle AuNPs è un altro argomento cruciale. La quasi totalità dei lavori riportati in letteratura predilige l'utilizzo di legami S-Au per coordinazioni forti, mentre ammine, carbossilati e alcoli sono invece i più utilizzati per legami di minore intensità. L'utilizzo di polimeri o grosse biomolecole multichelanti è un ulteriore rimedio all'utilizzo di gruppi poco coordinanti al metallo^(4,13,24,25,28,30,31,32,48,49,55,56).

Vale la pena di soffermarsi sulla natura del legame S-Au, tanto utilizzato sia in letteratura quanto nel presente lavoro.

In generale, si usa riferirsi con il termine di "reazioni di complessamento" quando si indicano i legami che si formano o si rompono tra un metallo, specialmente se un metallo della serie di transizione, e un'altra specie che prende il nome di "legante". Questa distinzione è puramente formale poiché i meccanismi alla base dell'instaurarsi di legami chimici in complessi o in "molecole comuni", sono i medesimi. La *driving force* per la riuscita della reazione è sempre legata al tipo di orbitali che si mescolano, il numero di specie coinvolte e tutte le proprietà annesse e connesse, come il numero di elettroni in gioco, il carattere donatore o accettore, la geometria delle interazioni, l'effetto solvente.

Uno schema qualitativo molto utile per razionalizzare la stabilità di un'interazione metallo-legante è fornito dalla teoria HSAB (*Hard and Soft Acids and Bases*)⁽⁵⁶⁾.

Riferendosi al centro metallico come a un acido di Lewis (elettron-deficiente), il termine acido hard e soft nasce alle caratteristiche di polarizzabilità dello ione metallico. Un acido hard è tipicamente un piccolo catione, con alta densità di carica relativa, ovvero di piccole dimensioni e monocarica o di grandi dimensioni, ma multicarica. Questi atomi non sono molto polarizzabili e mostrano preferenza per atomi donatori con le loro stesse caratteristiche di polarizzabilità, ossia anioni hard.

Gli acidi soft tendono a essere di grandi dimensioni e con bassa carica. La loro lieve densità di carica relativa rende la nuvola elettronica facilmente polarizzabile e vengono chiamati acidi soft.

È stato mostrato che interazioni hard-hard o soft-soft contribuiscono positivamente alla stabilità⁽⁵⁶⁾.

Il caso dell'Au con lo zolfo rientra in questa categoria. L'Au è un metallo pesante, ha tanti elettroni e, specialmente in sistemi nanoparticellari, essi sono molto ben polarizzabili (si ricordi il meccanismo alla base del plasmone di superficie, paragrafo

3. Nanosistemi di Oro, i nostri *carrier*

3.1.). Lo Zolfo è un non-metallo del 3° periodo, rispetto all'Ossigeno possiede il doppio degli elettroni, in un livello dove compaiono per la prima volta gli orbitali d. L'attrazione nucleare verso gli elettroni di valenza è decisamente più blanda e permette una migliore polarizzabilità⁽⁵⁶⁾. La tendenza del gruppo 16 è, infatti, quella del viraggio verso le caratteristiche metalliche: l'Ossigeno elementare è presente solo in forma gassosa, lo Zolfo ha molte forme allotropiche e tende alla concantenazione, il Selenio e il Tellurio sono semiconduttori e il Polonio è un conduttore metallico. Questo trend è sintomo di una diminuita attrazione degli elettroni sul nucleo e un'aumentata polarizzabilità⁽⁵⁶⁾.

Il legame che intercorre in Au-S è quindi di tipo soft-soft e non meraviglia che sia favorito rispetto a Au-O. Numerose evidenze consolidano il carattere stabile e forte della coordinazione delle AuNPs con lo Zolfo, specialmente con la specie tiolica o solfurica, nei quali gli elettroni si rendono più disponibili alla coordinazione^(13,25,48,49,55). Durante il progetto si è mostrato come le specie disolfuriche richiedano un maggior tempo di reazione sulle particelle.

Il colorante che si usa come SERRS probe è il *Texas Red* (TR, vedi figura 5.1.3). Esso presenta una banda di assorbimento parzialmente sovrapposta con il plasmone dei sistemi aggregati di AuNPs e per questa caratteristica, possono entrare in risonanza con il campo della radiazione laser incidente.

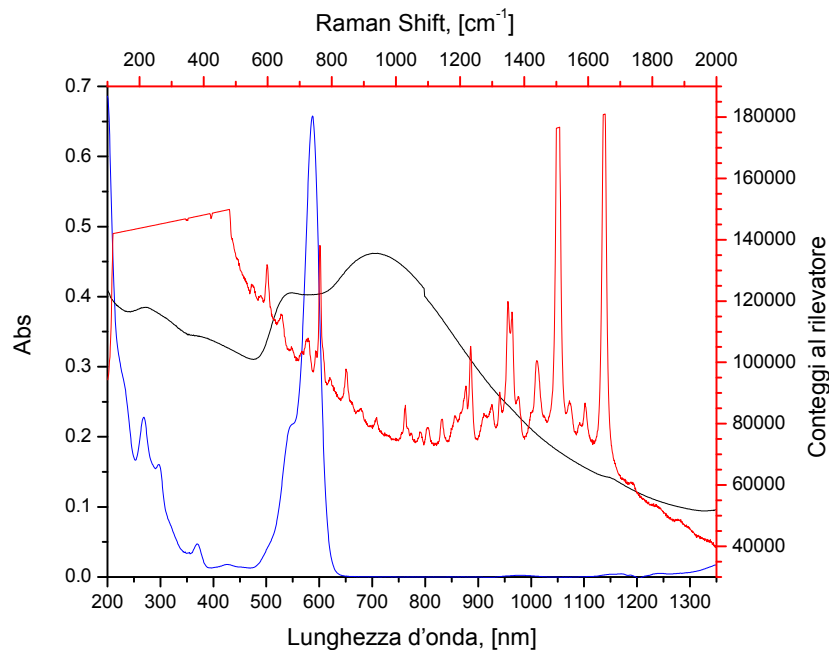


Figura 3.6.3,

in **NERO**: spettro assorbimento UV-vis-NIR di AuNPs sintetizzate per LASiS aggregate per centrifugazione
in **BLU**: spettro assorbimento UV-vis-NIR del TexasRed modificato per la coordinazione sulle particelle (vedi paragrafo 5.1)

in **ROSSO**: spettro SERS del sistema AuNPs-TexasRed, eccitazione 633nm, potenza laser 100%, zoom 5x, una accumulazione da 30s

Nel capitolo 5 si illustreranno tutte le caratteristiche di nostro interesse riguardanti le molecole che si è scelto di utilizzare e come queste sono state modificate per venire incontro alle esigenze sperimentali.

3.7. AuNPs in medicina, biocompatibilità e tossicità

Oltre all'uso medievale delle soluzioni colloidali per scopi terapeutici, come già riportato nel primo paragrafo di questo capitolo, le nanoparticelle di Oro riscontrano un grande interesse nella ricerca medica attuale per applicazioni di drug delivery e sensing.

Sebbene composte di un materiale inerte, è bene considerare il modo nel quale questi sistemi vengono a contatto con le cellule e gli effetti che ne provocano.

Cellule poste a contatto con le nanoparticelle, tendono naturalmente ad incorporarle e si vede che il maggior sito di accumulo intracellulare è il compartimento perinucleare, ovvero una struttura molto vicina al nucleo⁽⁴⁸⁾.

È soprattutto importante separare gli effetti che possono essere dovuti al tipo di materiale, piuttosto di quelli conseguenti al fatto di essere delle nanoparticelle.

Sono stati dimostrati effetti infiammatori causati da nanoparticelle di vario materiale inerte, ma su culture cellulari trattate con AuNPs era assente qualsiasi effetto di citotossicità acuta⁽⁴⁸⁾. In particolare non è stato mostrato alcun rilascio di specie tossiche ioniche, come ad esempio avviene per le nanoparticelle di Cadmio⁽⁴⁸⁾.

Gli effetti di tossicità delle AuNPs sembrano piuttosto dovute al tipo di linea cellulare trattata e, soprattutto, appare evidente come il loro grado di biocompatibilità sia legato prevalentemente al tipo di funzionalizzazione che portano sulla loro superficie e alle loro dimensioni⁽⁴⁸⁾.

L'uso di AuNPs per il targeting, importante per un efficace drug delivery, si basa sostanzialmente sulla coordinazione di anticorpi sulla superficie particellare. Questi hanno un alto grado di selettività per il loro antigene e se ne può verificare un buon accumulo sulle cellule bersaglio^(1,13,48,49).

Le applicazioni di sensing possono invece riguardare le AuNPs con un ruolo attivo, se esse stesse sono l'oggetto che viene visualizzato, ad esempio con il TEM o con metodi colorimetrici^(24,48,49), o con un ruolo passivo se servono solamente come supporti per il trasporto del probe. In quest'ultimo caso le particelle possono essere usate come dei *quencher* di fluorescenza, la quale si ristabilisce sulla cellula bersaglio una volta che la molecola contenente il fluoroforo si sia distaccata dalla superficie^(48,49,55), oppure può agire come supporto per il SERS (come noi realizzato in questo lavoro) sfruttando l'enhancement dovuto al plasmon superficiale localizzato.

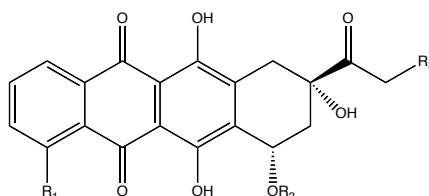
Ad ogni modo la tecnologia è arrivata a permettere di visualizzare e, alcune volte seguirne i movimenti, di una unica particella o aggregato di particelle^(48,54), la sensibilità ottenuta con questi sistemi è ottima e gli sviluppi sono perciò interessanti.

4.La Doxorubicina, il farmaco

La Doxorubicina e la Daunorubicina sono stati isolati negli anni 60' e sono stati approvati dalla *US Food and Drug Administration* (FDA) nel 1974.

In special modo la Doxorubicina emerse come uno dei più efficaci agenti antitumorali per il trattamento della leucemia e di un'ampia gamma di tumori solidi^(1,9).

Questi due composti fanno parte della famiglia delle antracicline, tra le quali figurano altre due molecole già in fase clinica per i loro effetti antitumorali: la Epirubicina e la Idarubicina. Tutte hanno in comune il policiclo a 4 anelli 7,8,9,10-tetraidrotetracene-5,12-chinone, ma differiscono per i residui R₁, R₂ e R₃⁽⁹⁾, come mostrato il figura 4.0.1.



	R ₁	R ₂	R ₃
Doxorubicina	OCH ₃		OH
Daunorubicina	OCH ₃		H
Epirubicina	OCH ₃		OH
Idarubicina	H		H

Figura 4.0.1, tabella delle strutture delle Antracicline attualmente in uso clinico, adattata da Rif.9

Negli ultimi 20 anni sono stati sviluppati una grande varietà di profarmaci, ad alto e basso peso molecolare, che portano una antraciclina come molecola attiva. Molti sono entrati nelle fasi pre-cliniche e i più promettenti stanno entrando ora in commercio. In questo capitolo vengono presentate l'origine naturale delle antracicline e il meccanismo alla base dell'effetto citotossico che le contraddistingue, con particolare attenzione per la Doxorubicina.

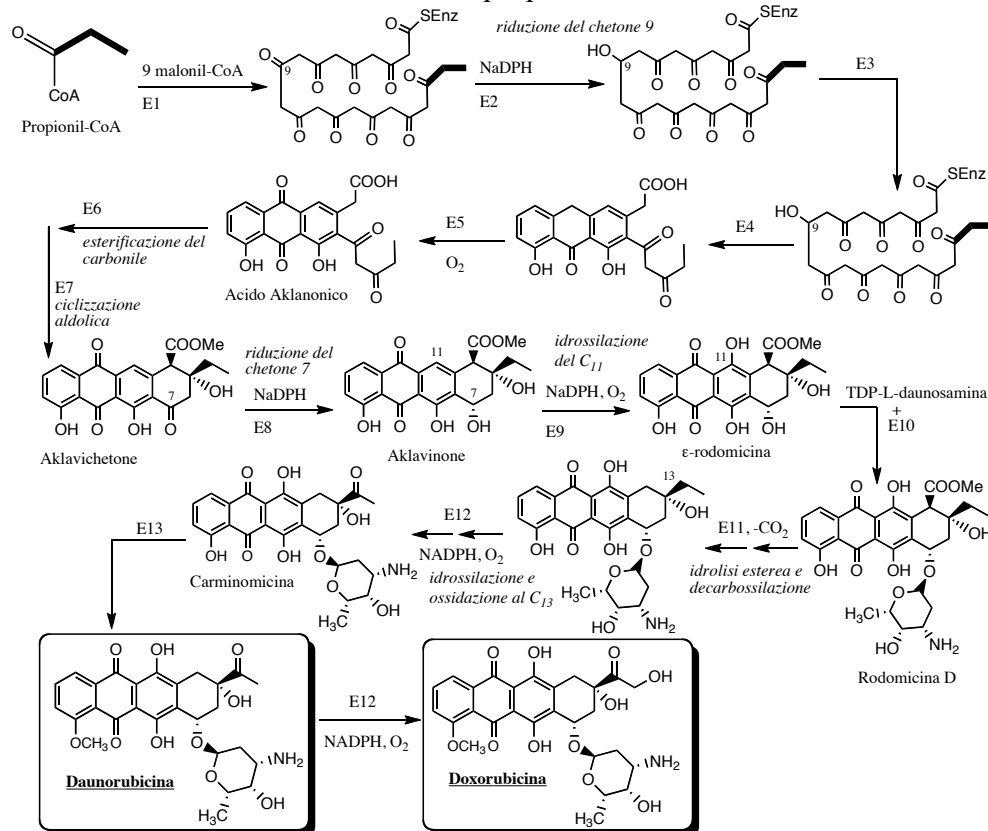
4.1. Biosintesi delle Antracicline

La biosintesi delle due principali molecole di questa famiglia avviene ad opera dei funghi *Streptomyces*. La Daunorubicina è prodotta principalmente dalle *S. coeruleorubicus* e dalle *S. peuceticus*, queste ultime sono state oggetto di modificazione genetica che ha permesso l'espressione di un enzima idrossilasi latente. La specie modificata permette di ottenere Doxorubicina⁽¹⁹⁾.

La Doxorubicina fu per la prima volta isolata nel 1967 dalla Farmitalia di Milano e introdotta negli Stati Uniti nel 1974 sotto il nome di Adriamicina. La sua scoperta fu preceduta da quella dell'analogo deossigenato Daunorubicina (Cerubidina, Daunomicina) nel 1964⁽¹⁸⁾.

La biosintesi, schematizzata in figura 4.1.1, parte dal propionil coenzima A (propionil-CoA) che funge da primo substrato per una serie di 9 condensazioni del malonil-CoA. A questo punto una 9-chetoriduttasi innesca la chiusura dei successivi cicli fino all'antrachinone acido alkanonico. L'acido carbossilico viene esterificato e i quattro anelli vengono processati da una semplice reazione aldolica.

L'ammino-zucchero L-daunosaimina viene dal TDPglucosio (timidina difosfoglucosio) e viene introdotto alla fine della sintesi. L'idrossilazione per passare dalla Daunorubicina alla Doxorubicina è proprio l'ultimo stadio⁽¹⁹⁾.



E1:	DpsA, DpsB, DpsC, DpsD, DpsG	E5:	DnrG (ossigenasi)	E8:	DnrH (riduttasi)	E11:	DnrP (metilesterasi)
E2:	DpsE (9-chetoriduttasi)	E6:	DnrC (O-metiltransferasi)	E9:	DnrF (idrossilasi)	E12:	DoxA (ossigenasi)
E3:	DpsF (ciclasti/aromatasi)	E7:	DnrD (ciclasti)	E10:	DnrS (glicosiltransferasi)	E13:	DnrK (O-metiltrasferasi)
E4:	DpsY (ciclasti)						

Figura 4.1.1, schematizzazione della biosintesi della Doxorubicina e della Daunorubicina nei funghi *Streptomyces*, adattata da Rif 19

4.2. Le Antracicline nella cura del Cancro

Come si legge in tabella 4.2.2, la classe delle Antracicline riscuote un notevole successo nel trattamento di tessuti tumorali, specialmente la Doxorubicina è largamente utilizzata grazie al suo ampio spettro d'azione ^(1,9,18,19).

	<u>dosaggio</u> (espresso in mg per superficie tumorale)	<u>metodo di</u> <u>somministrazione</u>	<u>frequenza</u>
Doxorubicina	50÷75mg/m ²	endovena	ogni tre settimane
Daunorubicina	30÷60mg/m ²	endovena	tre giorni consecutivi
Epirubicina	60÷120mg/m ²	endovena	ogni tre settimane
Idarubicina	60÷120mg/m ²	endovena	tre giorni consecutivi

Tabella 4.2.1, modalità di somministrazione delle antracicline maggiormente uso clinico come antitumorali, adattato da Rif 9

	Doxorubicina	Daunorubicina	Epirubicina	Idarubicina
Approvato per la cura di:	<ul style="list-style-type: none"> • breast cancer • ovarian cancer • transitional cell bladder cancer • bronchogenic lung cancer • thyroid cancer • gastric cancer • soft tissue sarcoma • osteogenic sarcomas • neuroblastoma • Wilms' tumor • Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma • acute myeloblastic leukemia • acute lymphoblastic leukemia • Kaposi's sarcoma 	<ul style="list-style-type: none"> • acute myeloid leukemia • lymphatic leukemias 	<ul style="list-style-type: none"> • breast cancer • small cell lung cancer • ovarian cancer • gastric cancer • rectal cancer • pancreatic cancer • non Hodgkin lymphoma • soft tissue sarcoma. 	<ul style="list-style-type: none"> • acute myeloid leukemia

Tabella 4.2.2, categorie di tumori per le quali è riconosciuta l'efficacia delle antracicline, adattato da Rif 9

La natura dell'ampia differenza di attività tra queste molecole così simili tra loro (vedi figura 4.0.1), si pensa possa risiedere nelle affinità verso differenti sequenze del DNA, nel momento dell'intercalazione nella doppia elica ^(19,68,69) (vedi paragrafo 4.3 per una discussione sulle relazioni di struttura & attività).

Le applicazioni cliniche delle antracicline sono però limitate dai loro effetti collaterali dose-dipendenti. Questi includono tossicità al midollo osseo, disordini gastro-intestinali, nausea, vomito, perdita dei capelli, necrosi locali, ma l'effetto più prorompente è senz'altro quello di cardiotoxicità ^(1,9,18,19).

Mentre la maggior parte dei disordini sono dose-dipendenti, con un picco di tossicità dopo i 7 o 10 giorni e conseguente rapido recupero alla normalità, la cardiotoxicità

4. La Doxorubicina, il farmaco

(cardiomiopatia e arresto cardiaco) è cumulativa ed irreversibile con un rapido accrescimento quando le dosi di Doxorubicina od Epirubicina superano i 500÷900 mg/m² rispettivamente ⁽⁹⁾.

La natura di questo effetto collaterale risiede nella capacità chelante delle Antracicline che reagiscono con il Ferro, promuovendo la formazione di radicali all'Ossigeno o al Carbonio, o con metalli alcalini, inibendo le pompe Na⁺/K⁺-ATPasi cardiache ^(18,19).

Come trattato nel capitolo 1, il trattamento chemioterapico per il cancro può avvenire con l'assimilazione di più principi attivi simultaneamente, secondo un regime programmato. La Doxorubicina è somministrabile sia incapsulata in un lisosoma (sotto il nome commerciale di *Doxil*), sia come componente dei regimi ABVD (Adriamicina, Bleomicina, Vinblastina, Dacarbazina), CHOP (Ciclofosfamide, Adriamicina, Vincristina, Prednisone) e FAC (5-fluoruracile, Adriamicina, Ciclofosfamide) ⁽¹⁸⁾.

Il trattamento con Antracicline può portare anche alla cosiddetta MDR (*MultiDrug Resistance*), ovvero una sviluppata resistenza del tessuto bersaglio verso il trattamento. La crescita di questa resistenza può pesantemente pregiudicare il successo del trattamento chemioterapico.

La MDR deriva prevalentemente dalla accresciuta espressione di proteine ATP-dipendenti espressamente adibite all'efflusso di sostanze nocive al di fuori della cellula ^(1,8,18,55).

Un agente terapeutico può manifestare il suo effetto farmacologico o tossicologico esclusivamente se raggiunge una sufficiente concentrazione nel sito bersaglio. In questo senso, soprattutto per farmaci come le antracicline che devono raggiungere il DNA, il passaggio attraverso le membrane biologiche rappresenta un fattore critico.

Per molte molecole, la capacità di passare queste barriere non è esclusivamente legata ai loro parametri fisico-chimici, ma può essere governata anche da meccanismi di trasporto, sia nel verso in entrata che in quello in uscita.

Tra questi trasportatori, un gruppo di proteine chiamate appunto "proteine di trasporto", meritano una particolare attenzione poiché possono prevenire l'accumulo intracellulare di agenti citotossici, come la Doxorubicina, e vanificare la loro efficienza. Tra queste proteine si evidenziano le P-glicoproteine, le Multidrug

Resistance-Associated Proteins (MRPs) e la Breast Cancer-Resistant Protein (BCRP) ⁽⁸⁾, schematizzate in figura 4.2.3.

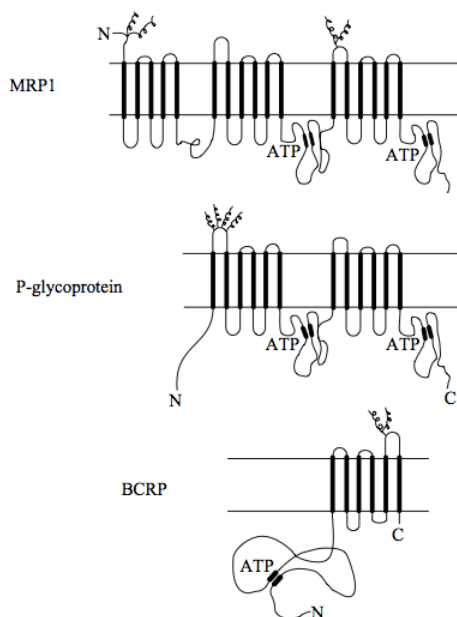


Figura 4.2.3, schema delle tre classi di proteine di trasporto trattate nel testo.

Il nucleotide è legato nell'ambiente intracellulare ed esibisce attività verso ATPasi, l'idrolisi dell'ATP fornisce l'energia necessaria per l'azione di pompaggio attraverso i domini trans-membrana della proteina di trasporto.

Tratto da Rif 8.

4.3. Doxorubicina, relazioni di struttura & attività

La struttura a doppia elica del DNA è un bersaglio molto efficace per indurre apoptosi cellulare. Molti farmaci che agiscono sul DNA hanno l'effetto ultimo di bloccare la sua trascrizione o replicazione, o entrambe. I metodi con cui si raggiunge questo scopo vanno dall'alchilazione della catena di nucleotidi, all'inibizione di enzimi atti al suo processamento, all'intercalazione^(1,17).

Tutti questi effetti giocano sul riconoscimento del DNA con gli enzimi che devono elaborarlo, come le topoisomerasi, che servono a svolgere l'intreccio della doppia elica e separare i filamenti⁽¹⁷⁾.

L'intercalazione consiste nell'intrusione del farmaco nella doppia elica attraverso il passo maggiore o il passo minore. Esso si stabilizza attraverso interazioni di π con le basi azotate oppure attraverso la formazione di legami ad idrogeno con i nucleotidi o con molecole di solvente che si dispongono a ponte tra il farmaco e la catena di DNA⁽¹⁷⁾.

I substrati che mostrano proprietà intercalanti hanno tipicamente delle porzioni lineari, che si inseriscono agevolmente tra le basi azotate, e dei gruppi che possono garantire la stabilità della coordinazione⁽¹⁷⁾.

La Doxorubicina, così come le altre Antracicline, devono la loro attività antitumorale al meccanismo di intercalazione^(1,8,9,17,18,19,55,67,68,69,70,71,72).

Un interessante studio di Frederick et al. del 1990 aiuta in modo molto chiaro a percepire il meccanismo con cui la Doxorubicina (DOXO) e la Daunorubicina (DAU) si inseriscono tra le basi di un frammento di DNA modello, di sequenza d(CGATCG)⁽⁶⁹⁾.

Lo studio parte da un lavoro precedente dello stesso gruppo che ha esaminato il complesso della DAU con la sequenza d(CGTACG). I due DNA modello differiscono unicamente dalla disposizione di due basi azotate, un adenina e una timidina. Nel precedente lavoro si è scoperto che la DAU si inserisce nel passo CpG in entrambi gli estremi della catena e che si instaurano delle interazioni tra l'ammino-zucchero e le molecole di solvente messe a ponte nel passo minore dell'elica.

Si pensò quindi che le basi adiacenti al sito di intercalazione potessero influire la coordinazione dello zucchero e che un nuovo gruppo funzionale nella porzione policiclica (l'ossidrile al C₁₄ della DOXO), potesse instaurare qualche specificità o selettività di interazione.

In effetti, il confronto tra la DOXO e la DAU, legate alla stessa sequenza di nucleotidi, evidenzia l'impiego dell'ossidrile al C₁₄ della DOXO per interazioni mediate dal solvente.

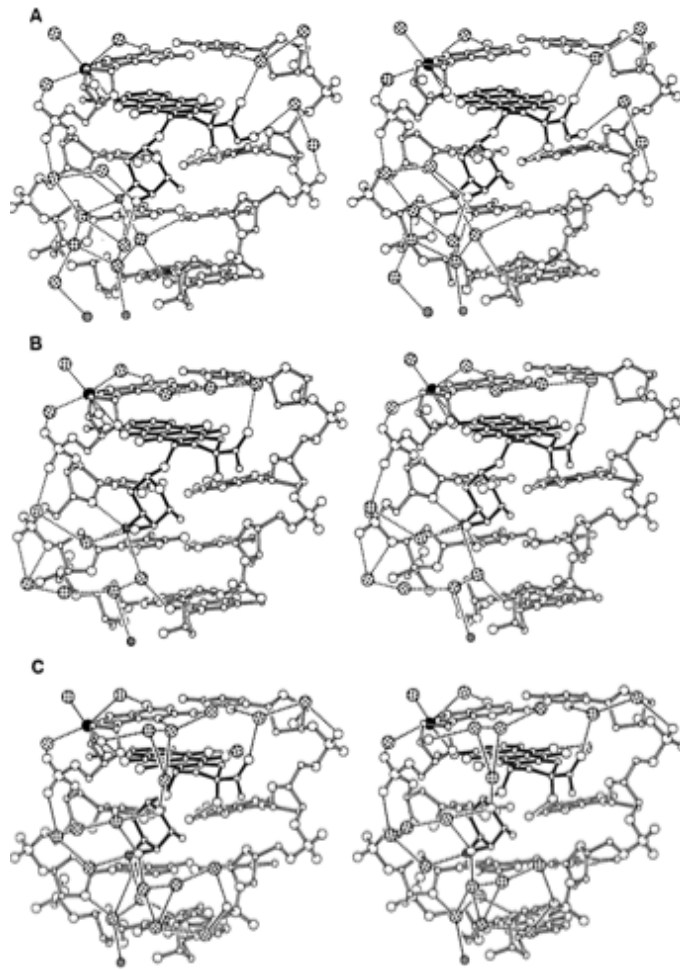
La porzione policiclica dei farmaci conferma la preferenza di coordinazione nel passo tra le basi

In tutti e tre i complessi (vedi figura 4.3.1), un estremo del sistema policiclico è ancorato, con due legami ad idrogeno, direttamente al DNA, mentre l'altro estremo è stabilizzato tramite coordinazione con una specie del solvente, che sembra essere uno ione Na⁺.

La posizione di questa specie è fissata da due ulteriori leganti: molecole di acqua a ponte con le basi azotate e i fosfati.

4. La Doxorubicina, il farmaco

*Figura 4.3.1,
complesso A: intercalazione della
DOXO in d(CGATCG)
complesso B: intercalazione della
DAU in d(CGATCG)
complesso C: intercalazione della
DAU in d(CGTACG)
Nelle figure si esprimono i legami
delle Antracicline con linee piene e
quelli della sequenza di nucleotidi
con linee vuote; le molecole di
solvente sono simboleggiate da
palline riempite a puntini; l'atomo
di Na⁺ che aiuta a stabilizzare
l'interazione DNA-farmaco è una
sfera piena; i legami ad idrogeno
sono rappresentati da linee
tratteggiate.
Tratto da Rif 69.*



Questo sistema di complessazione è un ottimo esempio di come il solvente possa venire fortemente coinvolto nell'interazione farmaco-DNA.

L'ammino-zucchero, contrariamente alla parte policiclica, mostra una differente conformazione passando attraverso la serie dei tre complessi. Sebbene risieda in tutti i casi nel passo minore dell'elica, emergono delle differenze legate al cambio della sequenza.

Nei complessi A e B (dove la sequenza è d(CGATCG)), lo zucchero sfrutta diverse interazioni di tipo van der Waals con il lato delle basi azotate esposto nel passo minore, il che li rende più solidi rispetto al complesso C.

In conclusione, lo studio di Frederick et al. sostiene che le conformazioni delle due sequenze di DNA molello, compresi gli angoli torsionali dello scheletro di fosfati e deossiribosii, sono molto simili, tanto da essere quasi sovrapponibili.

Analogamente, le posizioni di intercalazione dei nuclei policiclici delle Antracicline si conservano per tutti i complessi. Esse vengono stabilizzate, ad un estremo, tramite legami idrogeno col solvente nel passo maggiore dell'elica, mentre all'altro estremo da legami ad idrogeno con il DNA nel passo minore.

Le differenze sostanziali si evidenziano nelle interazioni dell' ammino-zucchero nel passo minore, dove la sequenza di nucleotidi determina un maggiore o minore numero di interazioni stabilizzanti.

4.4. Doxorubicina per *Imaging*, pregi e difetti

Un lavoro di Karukstis et al. del 1990 ⁽¹⁵⁾ si prefigge di studiare la modulazione del segnale di fluorescenza della Doxorubicina (DOXO) e della Daunorubicina (DAU) dovuta alle interazioni con l'intorno. In particolare si studia l'effetto di solvatocromia inversa che viene mostrato negli spettri di fluorescenza di queste due Antracicline in funzione della costante dielettrica del solvente e, in linea più generale, dell'intorno in cui si vengono a trovare.

La DOXO e la DAU sono molecole anfifiliche per il loro gruppo idrofobico policiclico, dove troviamo il cromoforo antrachinone, e per quello idrofilo amminoglicosilico (vedi figura 4.0.1).

Il segnale di fluorescenza è spesso utilizzato per monitorare l'Antraciclina nella membrana cellulare, nel citoplasma, o intercalata nel DNA, in quanto è stato mostrato come la coordinazione con peptidi, o altri sistemi, possa generarne delle variazioni sensibili.

Lo studio esamina quindi la fluorescenza della DOXO e della DAU quando queste si trovano in solventi diversi, in diverse concentrazioni, in diverse condizioni di pH e in presenza di sistemi micellari.

Sono stati utilizzati quindici solventi, in un intervallo di costante dielettrica che va da 78,38 (per l'acqua) a 1,924 (per l'eptano).

L'andamento che si evidenzia (vedi figura 4.4.1) segue la diminuzione della costante dielettrica con:

- un generale spostamento verso il blu del picco a circa 590nm;
- un regolare incremento dell'area relativa del picco a 630-635nm;
- un andamento a minimo dell'area relativa del picco a 550-555nm con il minimo in corrispondenza della costante dielettrica 14,7 (isopentanol);
- un andamento a massimo per l'area relativa del picco a circa 590nm, con il massimo in corrispondenza della costante dielettrica 20-24

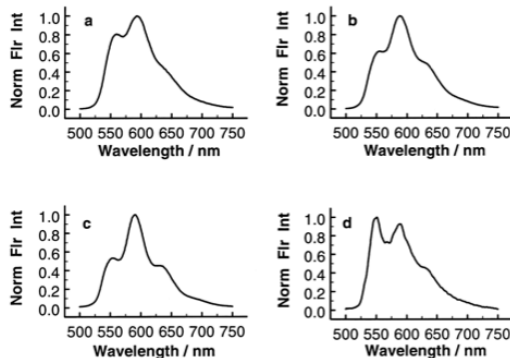
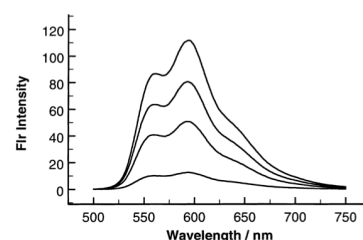


Figura 4.4.1, spettri di fluorescenza della Doxorubicina ($\lambda_{eccitazione}=479nm$) in (a) acqua, (b) metanolo, (c) 1-pentanol, (d) eptano
Tratto da Rif 15.

Il lavoro mostra altresì come l'intensità relativa dei picchi a 560nm e 590nm della DOXO sia lievemente attenuata per *quenching* dell'emissione qualora la concentrazione di Antraciclina superi il valore di 10 μ M, figura 4.4.2.

Figura 4.4.2, spettri di fluorescenza della Doxorubicina ($\lambda_{eccitazione}=479nm$) in soluzione acquosa. Mentre l'intensità degli spettri aumenta passando da 1 a 5, 10, 20 μ M, l'intensità relativa dei picchi a 560-590nm diminuisce da 0,804 per 1 μ M a 0,775 per 20 μ M.
Tratto da Rif 15.



4. La Doxorubicina, il farmaco

Il pH dell'intorno si rivela un ulteriore elemento di modulazione della fluorescenza: uno *screening* tra i valori di pH da 5,5 a maggiore di 10, hanno mostrato una diminuzione dell'intensità concomitante ad un diverso rapporto delle intensità relative dei picchi a circa 560 e 590nm, figura 4.4.3.

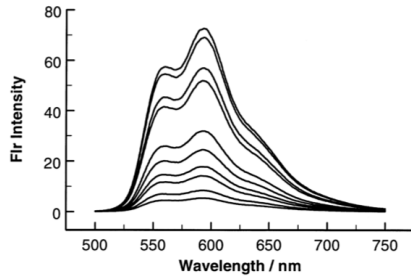


Figura 4.4.3, spettri di fluorescenza della Doxorubicina ($\lambda_{eccitazione}=479nm$) in soluzione acquosa. L'intensità degli spettri diminuisce all'aumento del pH.
Tratto da Rif 15.

In un sistema micellare inverso (composto da esano, acqua e un tensioattivo), le Antracicline si ripartiscono in funzione della concentrazione.

Nel processo di ripartizione, il fluoroforo tende ad ottimizzare la solvatazione e i legami ad idrogeno della frazione idrofila dell'ammino-zucchero, cercando allo stesso tempo di massimizzare le interazioni idrofobiche del sistema antrachinonico con la superficie surfattante ⁽¹⁵⁾.

A basse concentrazioni di farmaco, il cromoforo della Doxorubicina sembra risiedere nell'ambiente idrofobico, presumibilmente la superficie surfattante. Ad alte concentrazioni la DOXO si ripartisce in un ambiente più idrofilico, come la porzione di acqua libera o lo strato del tensioattivo legato sulla superficie dell'acqua.

Questo lavoro illustra come la coordinazione delle Antracicline possa venire monitorata attraverso il loro segnale di fluorescenza. Uno strumento come questo sarebbe molto utile per capire la distribuzione intra-cellulare di questa classe di farmaci, ma soffre di alcune importanti lacune legate all'interpretazione univoca degli effetti sul segnale di fluorescenza dovuti da una modulazione concomitante ad opera di molte variabili.

Di certo si capisce che uno studio quantitativo basato sulla fluorescenza di questi composti non può aver luogo se non si prendono in considerazione tutti i parametri che ne modulano le caratteristiche.

In questo progetto di tesi si è scelto di utilizzare l'assorbimento, e non la fluorescenza, per le determinazioni quantitative della Doxorubicina.

4.5. Letteratura recente sulla Doxorubicina

In questo paragrafo vengono presentati alcuni brevi esempi di come la comunità scientifica si interessi alla Doxorubicina. Sono stati selezionati alcuni lavori dal 2004 al 2011 che studiano la DOXO coniugata o prossima ad altri sistemi che vanno dai fullereni, ai polimeri, ai peptidi, ai nanotubi, alle nanoparticelle.

Nel 2004 il gruppo di ricerca di Bogdanovic et al. pubblica un lavoro su come i derivati dei fullereni, quali il $C_{60}(OH)_{22}$, che mostrano essi stessi attività antitumorale, possano inibire gli effetti citotossici propri della DOXO ⁽²²⁾. Viene dimostrato che in particolare il $C_{60}(OH)_{22}$ è in grado di ridurre gli effetti provocati dalla DOXO fino al 50% anche in concentrazioni nanomolare, sia se somministrati prima, durante, o fino ad un'ora successiva al trattamento di cellule con la DOXO.

Nel 2006 Wang et al. pubblicano uno studio dove coniugano la DOXO con un acido grasso ω -3, il DHA, naturalmente presente nelle membrane cellulari e nel latte materno umano ⁽²⁰⁾. Il loro intento sta nel promuovere il drug delivery della DOXO attraverso l'acido grasso, considerando che le cellule tumorali usufruiscono in larga parte di certi tipi di lipidi naturali come precursori biochimici o riserve di energia. Il link tra la DOXO e il DHA avviene tramite idrazone al carbonile del C_{13} della DOXO e viene dimostrato un lieve incremento di attività antitumorale rispetto al farmaco non modificato.

Nel 2007 Ali-Boucetta et al. studiano la formazione di un complesso non covalente tra la Doxorubicina e Nanotubi MWNT (*MultiWalled NanoTube*) a fini di drug delivery per tessuti neoplastici ⁽²³⁾. Il complesso si pensa formato da interazioni π - π tra la porzione antrachinonica della DOXO e le pareti del nanotubo. La sua realizzazione avviene con un rapporto dell'ordine di 10^{18} molecole di DOXO per mg di MWNT e viene seguita tramite studi di fluorescenza della DOXO. La sua attività citotossica sembra maggiore rispetto al farmaco non coordinato, anche in virtù della concomitante tossicità del MWNT.

Nel 2008 Jia et al. sfruttano una matrice polimerica formata da idrossipropilmetilacrilamide (HPMA) e piridildisolfuretilmetacrilato (PDSM) per sintetizzare un sistema di drug delivery della Doxorubicina legata tramite un legame acido sensibile ⁽²¹⁾. Il polimero si trova in forma micellare per la formazione di ponti disolfuro, e può disgregare per riduzione degli stessi ponti. La DOXO viene legata al polimero tramite un linker consistente in un legame idrazone al C_{13} della DOXO, da una parte, e una maleimmide dall'altra, che reagisce velocemente con un solfuro libero. Il composto dimostra un efficace rilascio del farmaco in ambiente a pH 5.

Nel 2011 Wang et al. sintetizzano un sistema composto da nanoparticelle di Au, del diametro di circa 30nm, alle quali viene coordinato del PEG che porta legata la Doxorubicina attraverso un legame idrazone al carbonile del C_{13} ⁽⁵⁵⁾. I risultati dimostrano un incremento nell'accumulo di farmaco nell'ambiente intracellulare e conseguente aumento di effetto citotossico del trattamento.

Nello stesso anno Ai et al. pubblicano una sintesi che riguarda la Doxorubicina, funzionalizzata all'ossidrile del C_{14} tramite legame estereo, con un peptide che mostra riconoscimento per un recettore di un EGF (*Epidermal Grow Factor*) di cellule tumorali ⁽⁶⁷⁾. Gli studi di citotossicità dimostrano un calo di attività rispetto alla Doxorubicina non modificata.

Nel capitolo seguente viene esposto il contributo che pone questo lavoro di tesi allo studio di nuovi meccanismi di drug delivery per la Doxorubicina.

4.La Doxorubicina, il farmaco

5.L'obiettivo del progetto e le strategie per raggiungerlo

Nei capitoli precedenti sono stati trattati i temi più pertinenti al progetto di tesi: quali sono le peculiarità di una cellula tumorale, come si cerca di rimediare alla poca selettività o all'aggressività di alcuni farmaci, quali caratteristiche identificano le AuNPs e le distinguono dagli altri sistemi di trasporto, con quali criteri la Doxorubicina è stata scelta come farmaco antitumorale per questo lavoro.

Nei paragrafi successivi si espongono i dettagli su come tutte queste conoscenze si siano integrate per raggiungere lo scopo del progetto.

Lo scopo della tesi è di comporre una formulazione con attività citotossiche antitumorali, che sia in grado di discernere le cellule bersaglio da quelle sane e che permetta una tracciabilità del preparato con alta sensibilità.

Di seguito si riportano i diversi momenti della preparazione.

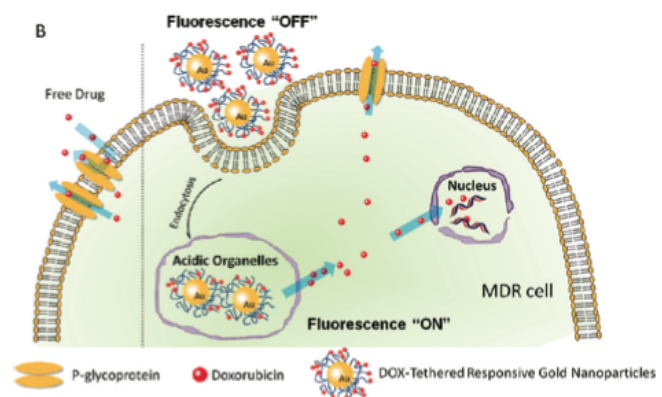
5.1. Il *targeting* e l'*imaging* uniti al *drug delivery*

Il problema del *drug delivery* doveva essere considerato parallelamente a quello del *targeting* e dell'*imaging*, in cui era impegnata un'altra parte del laboratorio ospitante. Prioritario era quindi occuparsi di come trasportare il farmaco, e come aspettava questo veniva rilasciato nella cellula.

Per avere un effetto, una molecola citotossica, come la Doxorubicina, deve essere trasportata all'interno della cellula.

Si trova che sistemi di dimensioni di circa 100 nm, che vengono a trovarsi sulla superficie cellulare, vengono internalizzati per endocitosi. Essi hanno buona probabilità di venire quindi inglobati in vescicole che li trasportano all'interno della cellula, da cui vengono poi rilasciati.

Figura 5.1.1, illustrazione schematica del processo di internalizzazione di sistemi di AuNPs. Tratto da Ref.55



Il meccanismo scelto prevede di fare *targeting*, con un anticorpo monoclonale, di aggregati di particelle sui recettori di membrana. Successivamente la cellula avvierà un processo di endocitosi mediata da recettori ⁽⁴²⁾. Il sistema che faremo aderire alla membrana è quindi composto dall'aggregato di AuNPs funzionalizzato.

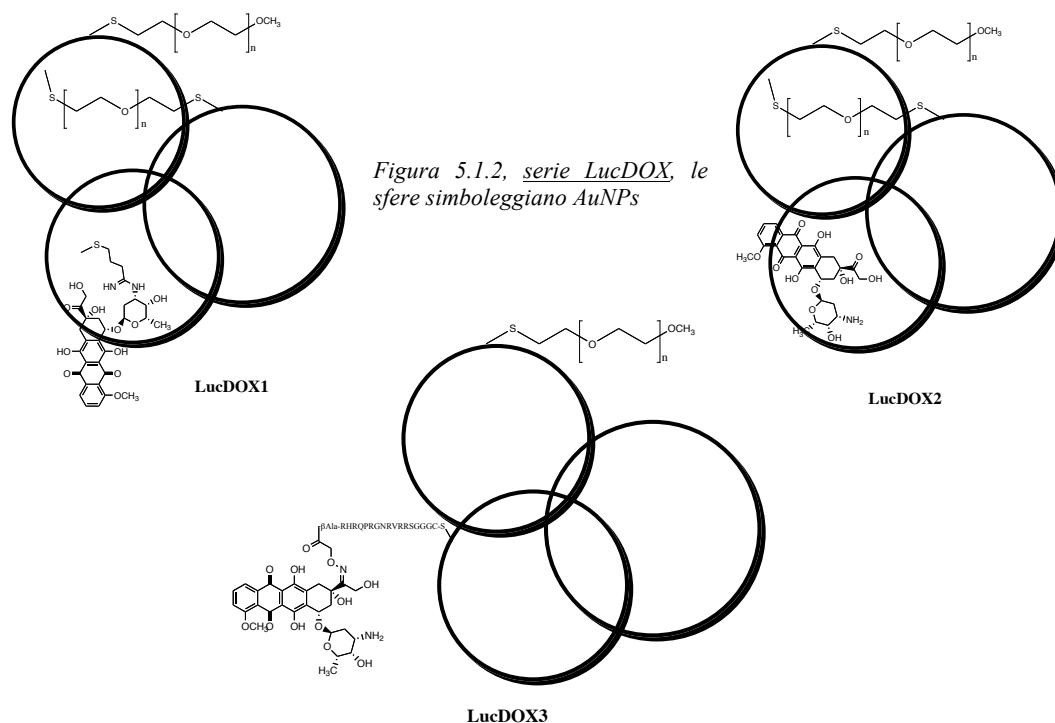
5.L'obiettivo del progetto e le strategie per raggiungerlo

Sebbene carente della stessa selettività, anche sistemi privi di anticorpo possono venire inglobati dalla cellula con gli stessi processi.

Sono state preparate due serie di campioni, la *serie LucDOX* e la *serie AbDOX*.

Per studiare il *drug delivery* della Doxorubicina (DOXO) mediante i sistemi di AuNPs, si è scelto di trascurare l'effetto di targeting nella serie LucDOX.

La serie *LucDOX* viene schematizzata qui di seguito. La Figura 5.1.1 mostra i tre tipi di preparazioni di questo tipo, che hanno tutti una base di aggregati di AuNPs.



Le preparazioni “*LucDOX*” si concentrano esclusivamente sul drug delivery e sono state nominate secondo l'ordine cronologico della loro sintesi.

Nelle *LucDOX1* il farmaco è stato legato covalentemente alle particelle mediante un *linker* tiolico, aggiunto al gruppo amminico del carboidrato.

Nelle *LucDOX2* la doxorubicina è stata fatta aderire alle AuNPs semplicemente tramite l'interazione π del sistema aromatico e i gruppi ossidrilici e amminico.

Nelle *LucDOX3* un peptide di 18 residui, idrolizzabile da enzimi intracellulari, si lega a ponte tra la superficie delle particelle e la Doxorubicina.

Tutte le preparazioni sono state trattate con del polietilenglicole (PEG) modificato con un tiolo terminale al fine di migliorare la sua adesione alla superficie di Au.

Sono stati utilizzati due differenti tipi di PEG: uno con il tiolo ad entrambe le estremità e peso molecolare medio di 2000Da (HS-PEG₂₀₀₀-SH), per indurre *cross-link* e stabilizzare l'aggregazione; l'altro con il tiolo ad una sola estremità e con peso molecolare medio di 5000Da (M-PEG₅₀₀₀-SH), per completare il ricoprimento della superficie delle AuNPs e avvantaggiare la biocompatibilità.

Nella preparazione *LucDOX3* si è visto che l'aggiunta di HS-PEG₂₀₀₀-SH non portava grandi benefici nella stabilizzazione degli aggregati, per cui è stato deciso di non utilizzarlo.

5.L'obiettivo del progetto e le strategie per raggiungerlo

In fase di pianificazione si prevedeva che il legame dell'antraciclina con le particelle fosse più labile secondo la scala:



In effetti, ci si aspettava che LucDOX1 non liberasse il farmaco, e quindi non mostrasse un effetto citotossico.

LucDOX2, al contrario, presenta un legame di coordinazione della Doxorubicina con le particelle piuttosto debole e doveva, quindi, rilasciarla in modo non selettivo, con un effetto simile a quello della Doxorubicina tal quale, senza AuNPs.

LucDOX3 è infine, la molecola che consente un rilascio mirato del farmaco. In questo caso, infatti, il peptide scelto per l'ancoraggio all'AuNP della Doxorubicina, è stato riportato essere selettivamente tagliato da enzimi quali le furine⁽¹²⁾.

L'obiettivo della sintesi è perciò quello di legare il farmaco al peptide, che sarà tagliato una volta che il sistema viene internalizzato nella cellula per endocitosi⁽⁵⁵⁾.

Nelle preparazioni AbDOX si unisce il drug delivery di LucDOX2 con le potenzialità di targeting di un anticorpo monoclonale, fornito dal gruppo di ricerca del Prof. Marco Colombatti del Dipartimento di Patologia, sezione di Immunologia, dell'Ospedale Policlinico "G.B. Rossi" di Verona.

L'anticorpo, coperto da brevetto e indicato con la sigla D2/B, non ha una struttura nota, per la sua parte variabile, ma si è mostrato selettivo per l'antigene PSMA (*Prostate Specific Membrane Antigen*), una glicoproteina di membrana espressa nelle cellule tumorali della prostata.

La serie di campioni AbDOX1-6 (vedi Tabella 5.1.3), è stata sintetizzata per esaminare gli effetti sulle cellule delle diverse componenti del materiale nanostrutturato. È auspicabile che, escludendo effetti nocivi dell'anticorpo, del PEG e delle stesse particelle, e considerando che il colorante TexasRed sembra essere saldamente legato alle AuNPs, solamente la Doxorubicina, e perciò solo i campioni AbDOX1 e AbDOX2 dovrebbero mostrare tossicità.

	AuNPs	DOXO	TexasRed	Anticorpo D2B	M-PEG-SH	BSA
AbDOX1	✓	✓	✓	✓	✓	✓
AbDOX2	✓	✓		✓	✓	✓
AbDOX3	✓		✓	✓	✓	✓
AbDOX4	✓		✓		✓	✓
AbDOX5	✓				✓	✓
AbDOX6	✓			✓	✓	✓

Tabella 5.1.3, serie AbDOX,
in corrispondenza di ogni campione è indicata la sua composizione con una ✓.

Analisi di citofluorimetria indicheranno se l'anticorpo, funzionalizzato per essere coordinato sulle particelle, rimane attivo verso il suo antigene.

Il colorante utilizzato come *SERRS probe* è il TexasRed, riportato in figura 5.1.4.

5.L'obiettivo del progetto e le strategie per raggiungerlo

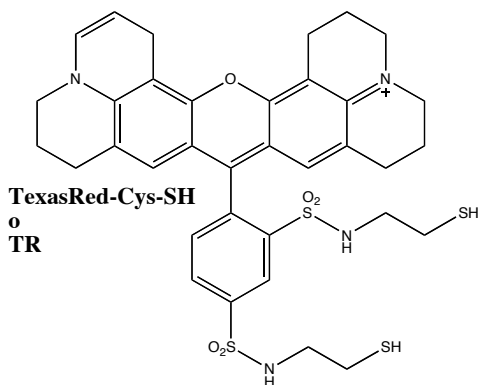


Figura 5.1.4, il colorante TexasRed modificato per una solida adesione sulle AuNPs.

L'ottimizzazione delle procedure di sintesi di questo composto e la sua coniugazione con le AuNPs sono state oggetto di un progetto di tesi precedente, svolto sempre nel laboratorio ospitante (vedi: tesi di laurea magistrale in Scienza dei Materiali dell'Università di Padova, laureando Lorenzo Amadio, A.A. 2009/2010, dal titolo *Ingegnerizzazione di nanocompositi con particelle d'oro e anticorpi per imaging e targeting di cellule tumorali*).

5.2. Il reattivo di Traut

Nel 1978 Traut et al. pubblicano un articolo in cui propongono il 2-imminotetraidrotiofene (2IT) come reattivo per formare ponti disolfuro nelle proteine ribosomiali di *Escherichia coli* ⁽⁵⁷⁾. Nel loro lavoro spiegano come la struttura di questo composto fosse stata male interpretata e, attraverso studi incrociati di massa e spettroscopie sia ottiche che magnetiche, ne svelano la giusta struttura. Si è scoperto che il 2IT reagisce preferenzialmente con amminoacidi lisina esposti e che è stabile in soluzioni acide o neutre.

I risultati più importanti che mostra lo studio del gruppo di Traut riguardano la cinetica di reazione del 2IT. Si riporta che in assenza di ammine primarie, lo sviluppo di gruppi tiolici è molto lento: alla temperatura di 25°C in presenza di trietilammina (TEA) a pH 8, lo sviluppo di gruppi tiolici è appena lo 0,9% al minuto, mentre all'aggiunta di glicilglicina si porta subito la reazione a completezza. Tramite analisi di assorbimento UV-vis, si evidenzia come il 2IT sia stabile sia in condizioni acide, sia in presenza di TEA pH 8 (perdita di assorbanza minore del 3%), ma all'aggiunta di una base (pH 10) l'assorbimento decade completamente, indice di idrolisi base-catalizzata ⁽⁵⁷⁾.

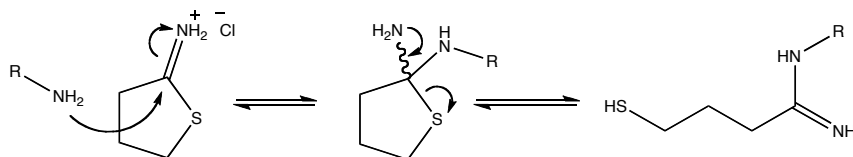


Figura 5.2.1, schema del meccanismo di reazione del 2-iminotiolano con una generica ammina primaria.

Il tiolo formato da una ammina che reagisce con il 2IT non è però stabile. Tralasciando la tendenza al ponte disolfuro caratteristico dei tioli, è stata dimostrata anche una rilevante possibilità di ciclizzazione ⁽⁵⁸⁾. Uno studio pubblicato nel 2001 da Mokotoff et al. dimostra che l'intermedio tiolico è stabile in ambiente acido, ma

5.L'obiettivo del progetto e le strategie per raggiungerlo

ha la tendenza a ciclizzare, espellendo ammoniacca, se si trova in ambiente basico già da pH 7,8⁽⁵⁸⁾. Nelle conclusioni del lavoro, spiegano come si è dimostrato più labile il tiolo derivato dall'attacco di un'ammina con $pK_a \approx 8$ piuttosto che una a basicità maggiore. L'ammina della catena laterale di una lisina ha $pK_a \approx 9,5$ e forma, in effetti, un tiolo più stabile. La ragione di questa evidenza può facilmente essere ipotizzata come derivante da un accresciuto effetto elettron-donatore sul centro carbonioso elettrofilo, che sfavorisce l'attacco alla stregua di quanto avviene tra estere e ammidi.

In sostanza, il reattivo di Traut è un ottimo substrato, ma deve essere utilizzato con cautela ed è bene porre una particolare attenzione al pH, infatti con valori uguali o superiori a 10 diventa reattivo anche verso ossidrili alifatici e aromatici, sebbene la costante di velocità resti dell'ordine dell'1% contro un'ammina primaria⁽²⁾.

Nella progettazione dei nostri campioni abbiamo scelto di utilizzare il reattivo di Traut per funzionalizzare le molecole che sarebbero andate direttamente ad aderire sulle AuNPs, grazie all'ottima affinità di queste ultime per i gruppi SH.

I substrati modificati con 2IT sono stati la Doxorubicina per LucDOX1 (vedi paragrafo 6.2.) e l'anticorpo D2B per la serie AbDOX (vedi paragrafo 6.7.). In entrambi sono state sfruttate le loro ammine primarie, come mostrato in *Figura 5.2.2*.

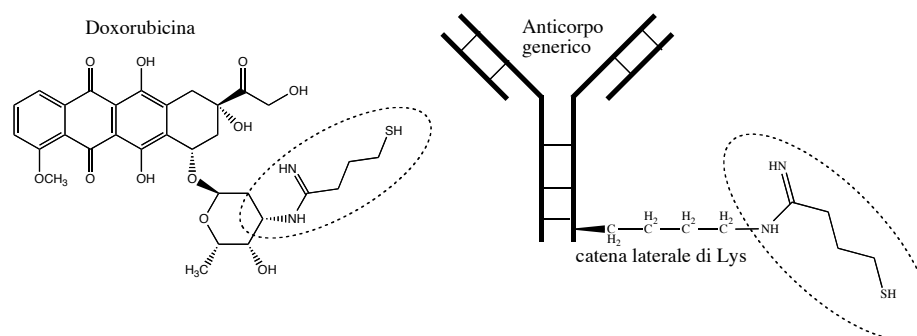


Figura 5.2.1, siti di legame del 2-iminotiolano nella Doxorubicina, a sinistra, e nell'ammina della catena laterale di una lisina, a destra.

5.3. Preparazione del peptide, sintesi in fase solida

L'utilizzo di peptidi per il drug delivery è stato discusso nel capitolo 2.

La sintesi dei peptidi è un argomento presente nei laboratori di sintesi da ormai più di un secolo.

Nel 1901 Emil Fischer sintetizzò il primo dipeptide ed è considerato il fondatore della chimica dei peptidi, nonché autore del termine "peptide"⁽¹⁶⁾.

Nel 1932, Bergmann e Zervas inventano il primo gruppo protettore, il benzilossicarbonile. Da questa data si può dire che iniziò la sintesi peptidica moderna. Infatti il problema principale nelle prime sintesi di Fischer risiedeva nella grandissima difficoltà di preparare delle catene che non fossero omopeptidi, ossia formate dalla polimerizzazione di un unico amminoacido. L'introduzione e lo sviluppo dei gruppi protettori permise di selezionare il *coupling* di un amminoacido alla volta e permettere la preparazione di sequenze peptidiche varie.

5.L'obiettivo del progetto e le strategie per raggiungerlo

Un'altra complicazione che non fu possibile risolvere era invece l'inevitabile serie di passaggi di purificazione del prodotto, conseguenti ad ogni nuovo amminoacido aggiunto alla catena. Per lunghi peptidi, questo significava una inevitabile perdita di resa e limitava l'utilizzo di queste reazioni per la sintesi di proteine ed enzimi.

Nel 1963 Merrifield pubblicò il primo protocollo per la sintesi di peptidi su fase solida ⁽¹⁶⁾.

Questa nuova tecnica si inseriva laddove la sintesi in soluzione era più carente, eliminando le perdite per i passaggi di purificazione. Il concetto alla base consiste infatti nell'ancorare il primo amminoacido a una resina polimerica insolubile, il secondo residuo viene attaccato con le usuali reazioni in soluzione (vedi figura 5.3.1) e l'eccesso di reagente con i sottoprodotti vengono filtrati via. In questo modo il peptide cresce ancorato alla resina e le perdite, sia in resa che in tempo, sono inferiori.

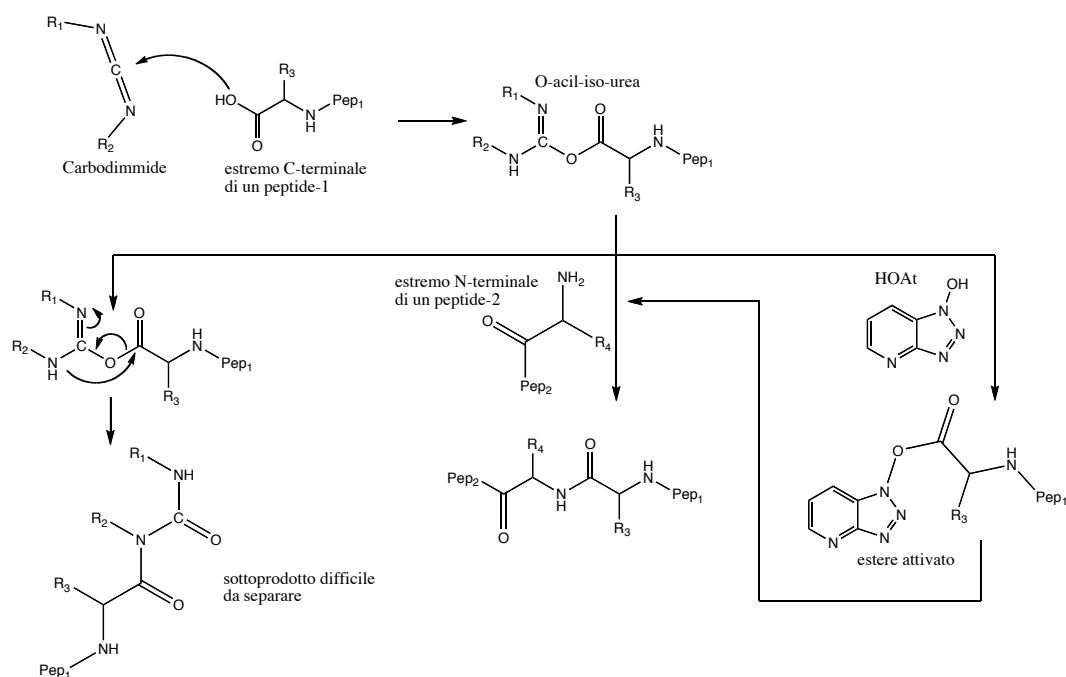


Figura 5.3.1, schema della reazione di formazione di un legame peptidico catalizzata da carbodimide e/o dalla formazione di un estere attivo.

Gli svantaggi rispetto alla sintesi in soluzione stanno nell'impossibilità di seguire con precisione la crescita della catena, infatti sarà possibile caratterizzare il prodotto solamente distaccandolo dal supporto. Usando un eccesso di reagente si possono spingere tutti gli step ad alte rese, ma la formazione di catene peptidiche tronche o carenti di qualche residuo è una eventualità ricorrente e, spesso, inevitabile.

Il peptide utilizzato in questo progetto di tesi è stato realizzato collaboratori nel Laboratorio della Prof.ssa Marina Gobbo del Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università degli Studi di Padova.

La scelta della sequenza di amminoacidi è stata effettuata prendendo spunto dal lavoro pubblicato da Heisler et al. nel 2003 ⁽¹²⁾. Nell'articolo si descrive la sintesi di immunotossine legando una tossina (Saporina) ad una sequenza di nucleotidi che esprime un fattore di crescita molto codificato nelle cellule tumorali. Il link tra le due frazioni avviene tramite un peptide che mostra affinità per gli enzimi Catepsina e Furina. Si mostra come la sequenza riconosciuta dalle Furine venga tagliata negli endosomi e, dato che i nostri sistemi sembrano destinati ad essere internalizzati dalla

5.L'obiettivo del progetto e le strategie per raggiungerlo

cellula per questa via, si è scelto di preparare un peptide che contenga questa sequenza di 13 amminoacidi (vedi figura 5.3.2).

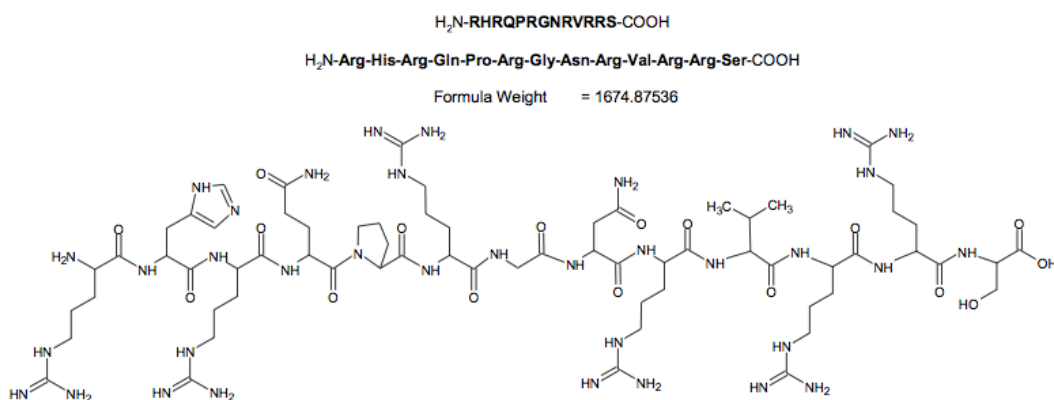


Figura 5.3.2, struttura della sequenza peptidica che mostra affinità per l'enzima Furina

I siti di attacco dell'enzima sono in corrispondenza delle arginine basiche. Quindi, è stato considerato opportuno inserire nella sequenza, degli amminoacidi terminali che fungessero come distanziatori tra le particelle, da un lato, e la Doxorubicina, dall'altro. Sono state aggiunte tre glicine nel lato C-terminale e una β -alanina in quello N-terminale.

Inoltre è stata inserita una cisteina nel lato C-terminale per favorire l'ancoraggio del peptide sugli aggregati di AuNPs. Per la sequenza finale, vedi il paragrafo 6.4.

L'attacco del peptide alle AuNP segue quindi la nota affinità dello zolfo per le particelle di Oro.

5.4. Ancorare la Doxorubicina al peptide

Nel paragrafo precedente si è "scelto" il giusto peptide e lo si è sintetizzato con la tecnica della fase solida. Di seguito si descrive il modo usato per legare il farmaco Doxorubicina al peptide.

Riferendoci al campione LucDOX3, si è cercato un tipo di ancoraggio tra la Doxorubicina e il peptide conciliante le caratteristiche di struttura&attività dell'antraciclina, da un lato, e della stabilità del legame, dall'altro.

Nel capitolo 4 è stata presentata la DOXO in quello che riguarda la sua potenzialità come agente antitumorale, mentre la parte più propriamente "chimica" della sua manipolazione è stata introdotta nel capitolo 2.

Come mostrato in figura 5.4.1, la molecola di DOXO è caratterizzata da una discreta quantità di gruppi funzionali, ma solamente alcuni sono quelli appetibili per una funzionalizzazione atta al drug delivery ^(9,10,11,14,33,42,43,44), in ragione della semplicità della reazione, delle rese e delle relazioni di struttura&attività.

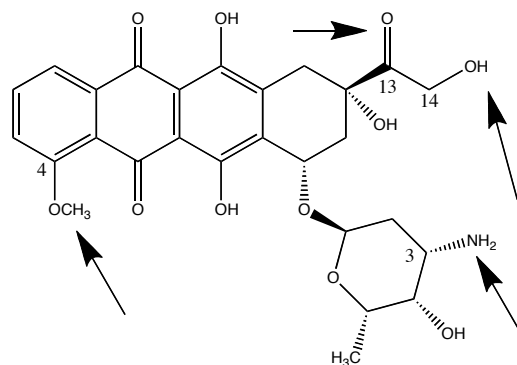


Figura 5.4.1, schema dei siti di funzionalizzazione e modificazione della DOXO più sfruttati per il drug delivery, numerazione dei carboni tratta da Rif.33

5.L'obiettivo del progetto e le strategie per raggiungerlo

L'azoto del carbonio 3 del carboidrato è una delle soluzioni più utilizzate per via della semplicità della reazione che porta, ad esempio, a legami peptidici, lasciando inalterata la zona policiclica. Come già trattato (capitolo 4), lo zucchero ha una sua importanza nello stabilizzare l'interazione con le basi azotate del DNA e si trova che una modifica permanente in quel punto potrebbe inficiarne l'attività.

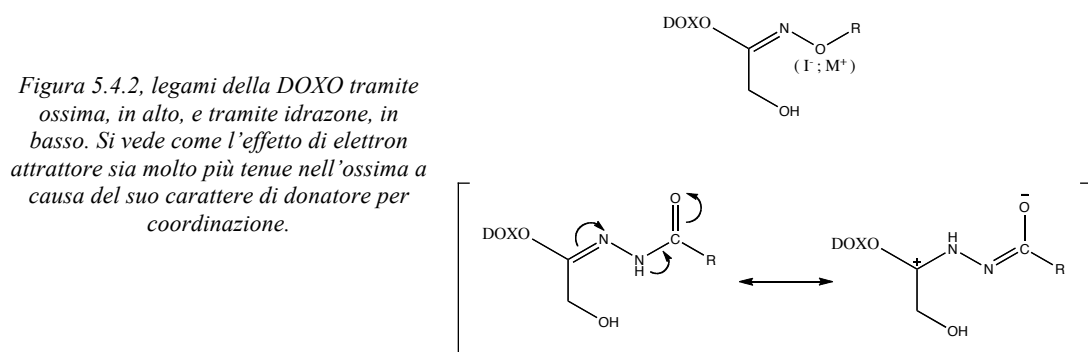
Sarebbe quindi auspicabile che il farmaco, modificato all'azoto, si liberasse tal quale⁽³³⁾, ma questa richiesta è difficile da soddisfare soprattutto se si è scelto di utilizzare l'azoto per un legame ammidico, notoriamente resistente in ambienti biologici se non sotto azione di enzimi.

Il carbonio 4 dell'antraciclina può essere sfruttato per sostituire il gruppo metil-etero⁽³³⁾, ma è una zona ancora più critica perché direttamente coinvolta nel meccanismo di intercalazione e, in effetti, non si trovano molti esempi a riguardo.

Il carbonio 14 e l'alcol adiacente possono essere buoni substrati per esteri o tioesteri^(9,14,33), ma il sito che abbiamo deciso di sfruttare è il gruppo carbonilico del carbonio 13.

L'utilizzo, riferito a questo sito di legame, che si riscontra più frequentemente è quello della reazione con idrossilammine o idrazine, per formare ossime o idrazoni. A seconda della loro natura questi gruppi funzionali hanno una differente labilità, in un articolo di Kaneko et al. si legge di uno studio volto precisamente ad analizzare la differenza tra la DOXO legata ad un anticorpo monoclonale tramite ossima piuttosto che tramite idrazone⁽⁴²⁾.

Questi due gruppi hanno evidenti differenze di stabilizzazione del legame imminico, come mostrato anche in figura 5.4.2. Utilizzando la rappresentazione delle strutture limite di risonanza, si può schematizzare come la distribuzione elettronica sull'immina dell'ossima sia più concentrata che su quella dell'idrazone, il quale rende il carbonio 13 maggiormente elettrofilo e predisposto all'idrolisi.



In termini di meccanismo di drug delivery, si trova che la coordinazione via idrazone rilascia quantitativamente il farmaco in ambiente debolmente acido (nella vescica lisosomiale il pH arriva anche fino a 4-5^(9,33,42,55)), mentre per l'ossima sono richieste condizioni decisamente più forti^(50,51,52,53,59,60,61,62,63).

Nel già citato studio di Kaneko si testano i rilasci di DOXO con la tecnica HPLC dopo incubazione in soluzioni tamponate a pH variabili. Il risultato è che l'idrazone appare stabile in condizioni di pH da 7,4 a 6,5, mentre s'idrolizza completamente dopo 4ore di incubazione a 37°C a pH 5, con un tempo di dimezzamento del rilascio della DOXO di 2,5ore. Al contrario, nel trattamento del substrato preparato tramite ossima non si rilevano tracce di DOXO neppure dopo 24 ore di trattamento.

In un altro lavoro, di Miklan et al.⁽³³⁾, sono presentati tre differenti tipi di legame tra la Daunomicina (DAU) e un oligopeptide da 6 e 8 residui di arginina (anche il

5.L'obiettivo del progetto e le strategie per raggiungerlo

peptide scelto per il nostro progetto è ricco di arginine). Le coordinazioni analizzate sono riportate in figura 5.4.3 e consistono in un'ossima, un'idrazone e un'amide⁽³³⁾.

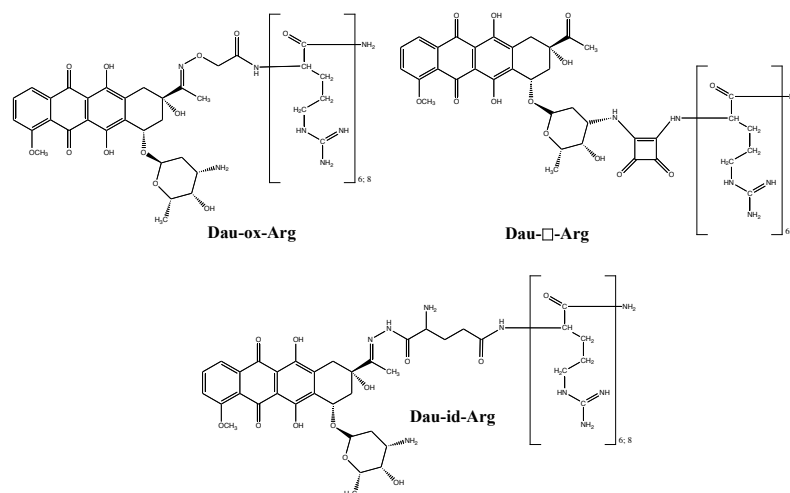


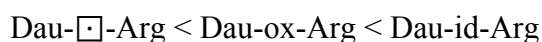
Figura 5.4.3, campioni sintetizzati nello studio di Miklan, riadattata da Rif.33

Lo studio riporta interessanti risultati di stabilità e citotossicità.

I tre preparati sono stati testati in tampone di acido citrico a pH 5 e a pH 2. Il campione Dau-□-Arg e Dau-ox-Arg rimangono inalterati per tempi di almeno due settimane, mentre Dau-id-Arg mostra un rilascio continuo di antraciclina con tempi di dimezzamento di $t_{1/2_{acqua\ distillata}} = 48h$; $t_{1/2_{pH5}} = 70min$; $t_{1/2_{pH2}} = 25min$.

Un'ulteriore evidenza importante è che la coordinazione con il peptide, in tutte e tre le forme, non modifica lo spettro di assorbimento, ma può avere degli influssi in quello di fluorescenza.

La citotossicità mostrata dai preparati segue, come atteso, lo stesso andamento della loro sensibilità all'idrolisi:



Al fine di voler studiare il rilascio della DOXO unicamente dovuto al taglio del peptide da parte di enzimi intracellulari, la scelta è caduta su una funzionalizzazione tramite ossima.

Adattando alcuni protocolli di letteratura^(14,33,35,36,37,38,39,40,41), abbiamo legato l'acido aminossiacetico (AoA), protetto all'ammina con il gruppo *tert*-butilossicarbonile (Boc o B), all'estremità amminica del peptide, ancora ancorato al supporto solido, sfruttando lo stesso tipo di reazioni di formazione del legame peptidico trattate nel paragrafo 5.3 (vedi anche i dettagli sperimentali al paragrafo 6.4).

Il nuovo peptide "BAoA-Pep" viene distaccato dalla resina clorotritilica con trattamento con acido forte. Questo libera anche tutte le catene laterali e la protezione dell'amminossiacetile. Il composto è pronto per essere legato alla DOXO.

In letteratura si trovano esempi di questa reazione sia acido^(14,33,34,44) che base⁽⁴⁵⁾ catalizzata, il meccanismo che segue è il classico per la formazione di basi di Schiff, schematizzato in figura 5.4.4.

5.L'obiettivo del progetto e le strategie per raggiungerlo

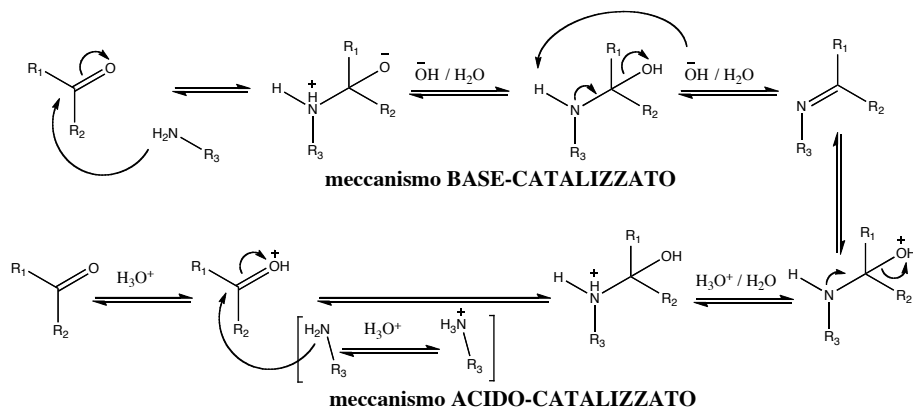


Figura 5.4.4, schema dei meccanismi acido e base catalizzati per la formazione di una generica base di Schiff, adattato da Rif.64

La scelta è andata su un meccanismo acido catalizzato in tampone di acido acetico e acetato di sodio a pH circa 5. La già citata stabilità dell'ossima all'idrolisi si presume che sposti gli equilibri verso i prodotti e, quindi, risulta più importante avvantaggiare l'elettrofilicità del substrato carbonile. Il difetto della catalisi basica è quello di un gruppo uscente peggiore rispetto a quello che si forma in ambiente acido (OH⁻ invece di H₂O), un pH troppo basso può, d'altronde, disattivare il reagente amminico poiché solamente la sua forma deprotonata è nucleofila ⁽⁶⁴⁾.

5.5. Strumenti e tecniche di caratterizzazione

5.5.1. Spettroscopia UV-vis-NIR

La caratterizzazione per spettroscopia ottica nel visibile, vicino UV e vicino IR è utilizzata, largamente in questo lavoro, soprattutto per la caratterizzazione delle soluzioni di nanoparticelle di Au.

Nel capitolo 3 è stato dato ampio risalto alle caratteristiche ottiche delle nanoparticelle di Au.

Lo spettrometro utilizzato per raccogliere lo spettro UV-visibile è un *Varian Cary 5*, e gli spettri sono stati registrati in cuvette in quarzo da 2mm nel range 200-1350 nm.

La pulizia della vetreria per le analisi viene garantita con lavaggi in acqua regia (HNO₃ : HCl, 1:3).

Un problema riscontrato spesso è infatti quello dei falsi positive dovuti alle particelle che si depositano sulle pareti delle cuvette. Queste contaminano il contenitore e possono trasferirsi ad altre soluzioni, contaminandole.

L'Oro non è attaccato dai componenti dell'acqua regia presi singolarmente, ma l'effetto combinato dell'acido nitrico come ossidante e dei cloruri come leganti permette l'ossidazione da Au ad HAuCl₄.

5.5.2. Spettroscopia Raman

Lo strumento utilizzato è un modello *InVia della Renishaw*[®], dotato di due sorgenti laser (Argon ed He-Ne) ed interfacciato direttamente ad un microscopio confocale *Leika DM-LM*. Il sistema è dotato di elevata stabilità ed efficienza ottica, possibilità di scansione continua per finestre spettrali estese ed elevate risoluzioni spaziali.

La radiazione a 632.8nm del laser He-Ne ha una intensità massima in uscita di 17mW, mentre quella a 488nm del laser ad Argon ha una intensità massima di 48mW. Come si può vedere nella figura 5.5.2.1, nella parte iniziale del suo percorso il fascio laser viene attenuato attraverso una serie di filtri con diversa densità ottica, intercambiabili via software. Dopo gli specchi di ingresso, è montato un sistema di lenti che funge da *beam expander*, trasformando la radiazione, quasi puntiforme in ingresso, in un fascio a raggi paralleli di 6mm di diametro, in uscita; in questo modo l'apertura posteriore del microscopio viene illuminata uniformemente.

Tra i due blocchi del *beam expander* si trova un *pinhole*, usato come diaframma per microscopia confocale quando è richiesta una maggiore risoluzione spaziale in profondità. Il raggio passa quindi per un *beam splitter* che lo dirige sul campione, e dal campione alla telecamera oppure alla CCD (*Charge-Coupled Device*). L'illuminazione del campione con luce visibile è ottenuta con una sorgente interna al *podule*, che contiene anche un riferimento interno in silicio monocristallino, necessario per la calibrazione rapida dello strumento. Il microscopio ottico è dotato di obiettivi da 5×, 20×, 50× (della *Olympus*) e un 20× a lunga focale della *Leika*. Lo *spot laser* sul campione è di 1µm usando l'obiettivo 50×, 3.5 µm per 20× e 18 µm per 5× in modalità Standard.

La luce raccolta in *backscattering* dallo stesso obiettivo viene filtrata mediante il *notch-filter*, che taglia la quasi totalità della luce diffusa elasticamente, con una capacità di *cut-off* di circa 80cm⁻¹.

La radiazione scatterata raggiunge poi il reticolo di diffrazione con 1800 linee/mm, e successivamente attraversa una lente e una fenditura (con apertura modulabile sia in ampiezza che in altezza, ed impostata su 65µm in modalità standard).

Infine arriva al rivelatore, costituito da un CCD di 400 *pixel*, ognuno dei quali di dimensione 22µm×22µm, montato su uno spettrografo con focalizzazione planare. Ogni *pixel* è costituito da un diodo di silicio in grado di generare una corrente quando colpito da radiazioni elettromagnetiche. Colonne di pixel costituiscono i canali all'interno dei quali vengono raccolti elettroni di un dato *range* energetico. Il sensore può analizzare un intervallo di lunghezze d'onda o alternativamente centrarsi attorno ad un dato valore di Raman Shift.

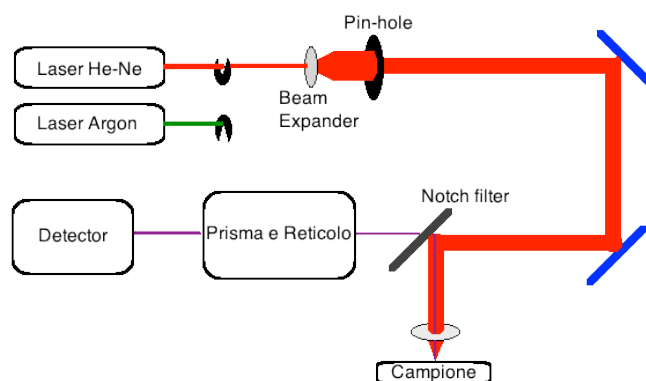


Figura 5.5.2.1, schema a blocchi della strumentazione per spettroscopia Raman

5.5.3. *High Performance Liquid Chromatography*

La cromatografia viene tipicamente utilizzata per separare le componenti di una matrice, solitamente di matrice organica.

Operativamente si sfrutta la migrazione di una miscela di composti trascinata da un flusso di solvente. La miscela compie un cammino su di un supporto che rende possibile la separazione delle varie componenti.

Le fondamenta su cui si basa la tecnica risiedono negli equilibri di ripartizione di una specie posta a contatto tra due fasi: una è in stato di moto e tende, quindi, a trascinare via l'analita, l'altra è invece stazionaria su di un supporto e tende a trattenerlo. La tecnica è in grado di separare gli elementi di una matrice a seconda della loro differente affinità verso la fase mobile o verso quella stazionaria: una specie che instaura delle interazioni più forti con la fase mobile tende a non essere rallentata dalla fase stazionaria, viceversa si ha il caso di un componente che resta stabilmente depositato.

La fase mobile può essere un gas oppure un liquido e quella stazionaria un solido oppure un liquido non volatile adsorbito su una superficie.

La più netta distinzione tra le tecniche cromatografiche si ha per la scelta della fase mobile. Nella cromatografia liquida su colonna, la matrice da separare viene posta in testa alla colonna impaccata e gli eluenti vengono spinti per trascinare gli analiti lungo tutta la sua lunghezza. In coda alla colonna si trova, quindi, un sistema di rilevazione sensibile alla classe di analiti presenti nella miscela, uno dei più comuni è senz'altro uno spettrofotometro UV-vis.

L'ottimizzazione della separazione prevede un'efficace interazione con la fase stazionaria e un'accorta scelta degli eluenti della fase mobile. Dato che le interazioni con l'analita riguardano solamente uno strato superficiale delle particelle della fase stazionaria, diminuire le dimensioni del materiale impaccato porta ad un aumento della superficie esposta e, conseguentemente, ad un incremento di efficienza. Per permettere l'eluizione in tempi ragionevoli si fluisce allora l'eluente sotto alte pressioni, questo permette tempi di analisi brevi mantenendo profili di eluato risolti e stretti.

L'utilizzo di colonne impaccate finemente ed eluenti spinti mediante pompe costituiscono gli elementi base della *High Performance*, o *High Pressure*, o *High Speed Liquid Chromatography*⁽⁶⁶⁾.

Durante questo progetto ci siamo serviti della tecnica HPLC sia per fini analitici che per fini preparativi. In entrambi i casi, le colonne erano impaccate dello stesso materiale (vedi paragrafi 6.4 e 6.5), ovvero microsfele di silice funzionalizzate con idrocarburi a lunga catena. Gli eluenti utilizzati sono stati acqua e acetonitrile, con aggiunta di una bassa percentuale di acido trifluoroacetico, per un pH di circa 2. Data la polarità degli eluenti maggiore di quella della fase stazionaria, il metodo da noi utilizzato cade sotto la classe delle analisi HPLC in fase inversa.

Il profilo di eluizione viene sottoposto a gradiente per ottimizzare la separazione di componenti peptidici caratterizzati da differente idrofobicità. Passando da un eluente maggiormente acquoso ad uno maggiormente apolare si vuole favorire un tempo di ritenzione maggiore per gli analiti più idrofobi.

Le analisi e le procedure di preparativa vengono effettuate presso i laboratori della Prof.ssa Marina Gobbo del Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università degli Studi di Padova.

5.5.4. Spettrometri di massa ESI-TOF

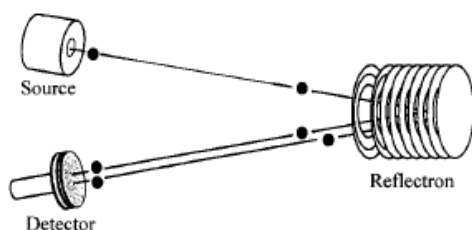
ESI è l'acronimo di *electron spray ionization* ed è ottenuto mediante iniezione, attraverso una linea capillare di metallo, della soluzione di analita in presenza di un forte campo elettrico ⁽⁶⁵⁾. La produzione di ioni tramite ESI può essere considerata derivante da tre fasi principali:

- produzione di gocce cariche, formate nella regione direttamente vicina all'uscita dal capillare;
- veloce diminuzione delle dimensioni della goccia carica a causa di evaporazione del solvente e, attraverso fenomeni di repulsione coulombiana, formazione di gocce cariche di dimensioni molto ridotte,
- produzione di ioni in fase gassosa come ultima divisione di piccole goccioline cariche.

Il *Time-Of-Flight* è, dal punto di vista teorico, il più semplice analizzatore di massa. In linea generale consiste in una sorgente *soft* (come appunto l'ESI) di ioni positivi o negativi e in un *detector* con interposto tra i due un canale sotto vuoto e in assenza di campo ⁽⁶⁵⁾.

Una sorgente *soft* è definita come una ionizzazione che non provochi frammentazione della molecola campione, spesso attraverso la preliminare ionizzazione di un gas di supporto che trasferisce poi la carica all'analita. Gli ioni appena formati sono poi spinti nel canale sottovuoto tramite applicazione di una differenza di potenziale. L'energia che acquisiscono le particelle è pura energia cinetica e tramite questa avviene la selezione dei rapporti m/z ; intuitivamente è chiaro che, a parità di campo applicato, le molecole con una massa maggiore saranno accelerate meno di quelle più leggere e il "*time of flight*" sarà più lungo ⁽⁶⁵⁾.

Ad ogni modo, una distribuzione non omogenea dell'energia cinetica dalla sorgente si rifletterà certamente in una scarsa risoluzione dello strumento; per ovviare a questo inconveniente si usa applicare un *Reflectron* tra la sorgente e il "canale di volo" dove



Scheme of reflectron TOF

gli ioni passano per anelli a voltaggio crescente fino a un paio di centinaia di Volt maggiore di quello di accelerazione alla sorgente. In questo modo si ha un flusso di ioni in uscita con una più omogenea energia cinetica: gli ioni (della stessa molecola, naturalmente) che arrivano più accelerati penetreranno maggiormente nel *Reflectron*, mentre

quelli più "lenti" saranno subito respinti e entreranno nel "canale di volo" insieme ⁽⁶⁵⁾. Le analisi sono state effettuate con uno strumento *Applied Biosystem 5220* presso i laboratori del Prof. Daniele Dal Zoppo del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università degli studi di Padova.

5.5.5. Citofluorimetria

Nei citofluorimetri, una sospensione cellulare viene iniettata in un sistema fluidico, il quale tende, in opportune condizioni idrodinamiche, a trasportare le cellule in maniera separata e ordinata fino al punto di misura, dove incontra il fascio di luce focalizzata proveniente dal laser.

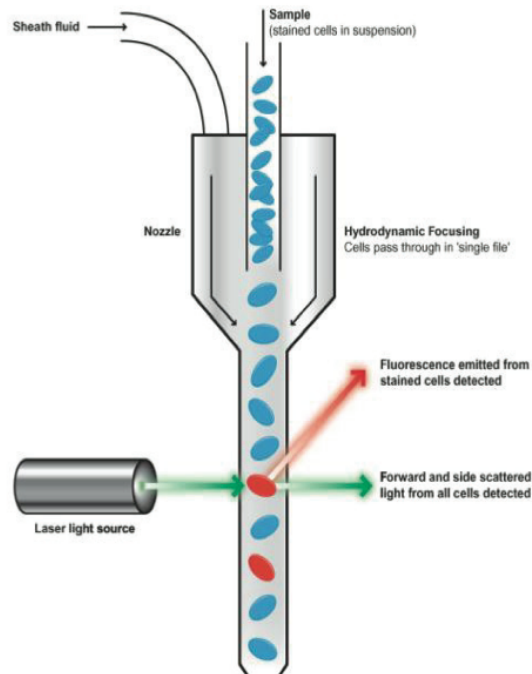
I segnali di scattering e fluorescenza che si generano in seguito all'interazione radiazione-cellula sono raccolti da un sistema di lenti, specchi e filtri ottici, e inviati ai rispettivi sensori (fotodiodi e fotomoltiplicatori) che ne misurano l'intensità. La pressione di spinta e la diluizione del campione consentono di contare fino a qualche migliaia di cellule al secondo.

Si possono utilizzare anticorpi monoclonali, marcati con fluorofori, specifici per antigeni presenti sulla membrana cellulare; dal segnale di fluorescenza si ricava una stima della quantità di antigene presente nel campione. Ciò è stato sfruttato durante questo lavoro di tesi per verificare,

grazie ad un anticorpo marcato con fluoresceina (*anti-mouse FITC*) che si lega agli altri Ab, l'avvenuta coniugazione del D2B con le AuNP e successivamente il loro legame con le cellule.

Le analisi sono state svolte nei laboratori del Dipartimento di Patologia, Sezione di Immunologia del Policlinico "GB. Rossi" di Verona, dal gruppo di ricerca del Prof. Marco Colombatti.

Il protocollo utilizzato consiste nell'incubazione di $2 \cdot 10^5$ cellule per campione per 90 minuti a 4°C in presenza di AuNPs (funzionalizzate come nella serie AbDOX) e diluite con BSA in PBS all'1%. Il campione viene poi lavato con PBS a freddo e nuovamente incubato a 4° per 40 minuti in presenza dell'anti-mouse FITC diluito 1:200 con BSA in PBS al 0,2%. Un controllo negativo viene preparato senza particelle e uno positivo viene preparato con anticorpo puro, quindi non attaccato sulle AuNPs.



5.5.6. Analisi di citotossicità

Per analizzare la vitalità cellulare in seguito al trattamento con i nostri substrati si usano test di marcatura con timidina triziata, ovvero arricchita dell'isotopo ^3H .

Per analizzare la vitalità cellulare in seguito al trattamento con i nostri substrati si usano test di marcatura con timidina triziata, ovvero arricchita dell'isotopo ^3H .

Le analisi sono state svolte nei laboratori del Dipartimento di Patologia, Sezione di Immunologia del Policlinico "GB. Rossi" di Verona, dal gruppo di ricerca del Prof. Marco Colombatti.

Dai saggi di incorporazione della timidina triziata si allestiscono delle curve di crescita di una coltura cellulare. Più le cellule crescono e si riproducono, più replicano il DNA e più timidina triziata incorporano per sintetizzarlo.

Si usa la timidina perchè è una base presente solo nel DNA e non nel RNA (che notoriamente contiene uracile al posto della timidina). Si usa poi il trizio perchè è possibile misurarne la radioattività. Quindi si possono valutare diverse condizioni di crescita andando a guardare l'incorporazione della timidina triziata rispetto ad una coltura standard.

Le cellule vengono raccolte e lisate, rotte meccanicamente facendole passare attraverso un filtro e facendo poi una serie di lavaggi al filtro per ottenere quello che sarà DNA marcato.

Il filtro viene quindi messo in un liquido di scintillazione e le radiazioni beta emesse dal filtro, contenente DNA marcato, collidono con le molecole del liquido di scintillazione, che loro volta rilasceranno dei fotoni di luce rilevati e misurati (in colpi per minuto CPM) da uno strumento apposito, il *beta counter*.

5.L'obiettivo del progetto e le strategie per raggiungerlo

6. Protocolli sperimentali

In questo capitolo sono descritte le operazioni che sono state svolte materialmente per la realizzazione pratica dei propositi espressi nel capitolo 5.

La scelta dei protocolli sperimentali da seguire avviene per esperienza personale del gruppo di ricerca e per adattamento di procedure riportate in letteratura (vedi capitolo 9).

Per la realizzazione di questo progetto di tesi si è usufruito dell'ospitalità presso i laboratori del prof. Moreno Meneghetti e i laboratori della prof.ssa Marina Gobbo presso il Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università degli Studi di Padova.

6.1. LASiS e formazione di aggregati di AuNPs

Per quanto concerne le dinamiche di ablazione, si rimanda al paragrafo 3.4.

Per ottenere le soluzioni colloidali di nanoparticelle di Oro, lo strumento utilizzato in questo lavoro di tesi è un laser a Nd:YAG, (modello YG-981E-10[®] della Quantel) in cui il mezzo attivo è un cristallo di granato di ittrio e alluminio (*yttrium aluminium garnet*, Y₂Al₅O₁₂) drogato con ioni Nd³⁺.

Si utilizza la riga fondamentale ($\lambda=1064$ nm), con impulsi della durata di 9ns e una frequenza di ripetizione di 10Hz; la potenza utilizzata è di circa 600 mW, che si traduce in una fluenza di circa 10 J/cm² sul campione.

Il target consiste in un disco di Au 99,9% dello spessore di circa 1±0,5 mm, posto circa 0,6cm prima del fuoco della lente (focale 100 mm) che focalizza il fascio. Questo consente di evitare in particolar modo l'ebollizione locale dell'acqua, con conseguente spargimento di spruzzi di solvente nei supporti ottici.

La provetta di polietilene, sul fondo della quale è posizionato il dischetto d'oro, è riempita con circa 15 mL di una soluzione 10⁻⁵M di NaCl in H₂O bidistillata.

L'ablazione è mantenuta per circa un'ora, il termine è dettato da periodiche misure di assorbanza della soluzione di AuNPs.

Si decide di considerare terminato il processo di sintesi quando il picco di assorbimento del plasmone superficiale delle AuNPs raggiunge un valore di assorbanza $Abs_{520nm} \geq 0,2$ registrata in cuvetta di quarzo con cammino ottico di 2mm.

L'analisi dello spettro di assorbimento, grazie al software SPRFit (vedi paragrafo 3.5), per questo intervallo di assorbimento riporta una concentrazione di AuNPs dell'ordine di qualche unità nanomolare.

Nei protocolli successivi si riportano gli spettri di assorbimento delle particelle utilizzate, con annesso il report dei risultati del fitting calcolato da SPRFit.

6.2. LucDOX1, legame covalente DOXO-AuNPs

Materiali:

- AuNP (del 30/11/2010), invecchiate 5min a 60°C
- Doxorubicina·HCl soluzione in H₂O bidistillata a 10⁻³M
- Phosphate Buffer (PB) (50mM PO₄³⁻, pH≈8)
- Phosphate Buffer Saline (PBS) (0.15M NaCl + 10mM PO₄³⁻, pH 7.4)
- 2-Iminotiolano (2-IT) (0,5mg/mL) soluzione fresca
- HS-PEG-SH 2000D (0.5mg/mL)
- HS-PEG-OCH₃ 5000D (0.5mg/mL)
- Albumina Bovina (BSA)

<i>DOXO</i> [10 ⁻³ M]	<i>2-IT</i> [0,5g/L]	<i>PB</i>	<i>AuNPs</i>	<i>HS-PEG-SH</i>	<i>M-PEG-SH</i>	<i>BSA</i>
50μL	140μL	500μL	2mL	72μL	150 μL	10mg

Procedimento:

In una fialetta Eppendorf vengono aggregati per centrifugazione 2mL di soluzione di AuNP. Il surnatante viene rimosso e si ridisperdono le particelle aggregate con 1mL di H₂O bidistillata.

La fiala di particelle aggregate viene separata in due aliquote di ugual volume al fine di permettere la sintesi di due campioni analoghi in parallelo (LucDOX1a-b). I volumi di reagenti indicati in seguito fanno riferimento alla totalità delle due aliquote.

In una ulteriore fialetta Eppendorf vengono posti a reagire la soluzione di DOXO, la soluzione di 2-IT in solvente PB per 10 minuti in agitatore rotativo (miscela *DOXO-IT*).

100μL della miscela di reazione *DOXO-IT* vengono aggiunti alla fiala contenente le particelle aggregate; si lascia reagire per 1h30' in agitatore rotativo.

Al termine vengono aggiunti 72μL di HS-PEG₂₀₀₀-SH e si lascia in agitatore rotativo per 1h30'.

Si centrifuga la miscela, il surnatante viene rimosso, si disperde con 1mL di H₂O bidistillata e si controllano gli spettri UV-vis e Raman (Figura 6.2.2 e 6.2.3, punto analisi 1).

Vengono allora aggiunti 300μL di M-PEG₅₀₀₀-SH e si lascia reagire per tutta la notte in agitatore rotativo.

Si centrifuga la miscela, il surnatante viene rimosso, si disperde con 1mL di PBS e si controllano gli spettri UV-vis e Raman (Figura 6.2.2 e 6.2.3, punto analisi 2).

Alla fiala di LucDOX1 vengono infine aggiunti 10mg di BSA.

6. Protocolli sperimentali

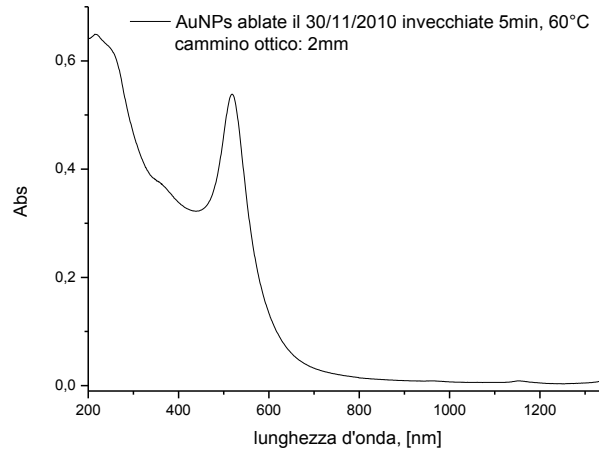


Figura 6.2.1, spettro di assorbimento UV-vis-NIR della soluzione colloidale di AuNPs preparate con LASiS e utilizzate per LucDOX1; sotto è riportata la tabella con i parametri calcolati da SPRFit (vedi paragrafo 3.5.)

	R (nm)	Spheres %	1-RSS	MaxSPA (m ²)	ϵ (cm ⁻¹ M ⁻¹)	Abs _{b=2mm} (520nm)	C (mol/L)
AuNPs ablate 30/11/10	7,3	90,5	9,14 · 10 ⁻⁴	1,10 · 10 ⁻¹⁶	2, · 10 ⁸	0,53769	9,31 · 10 ⁻⁹

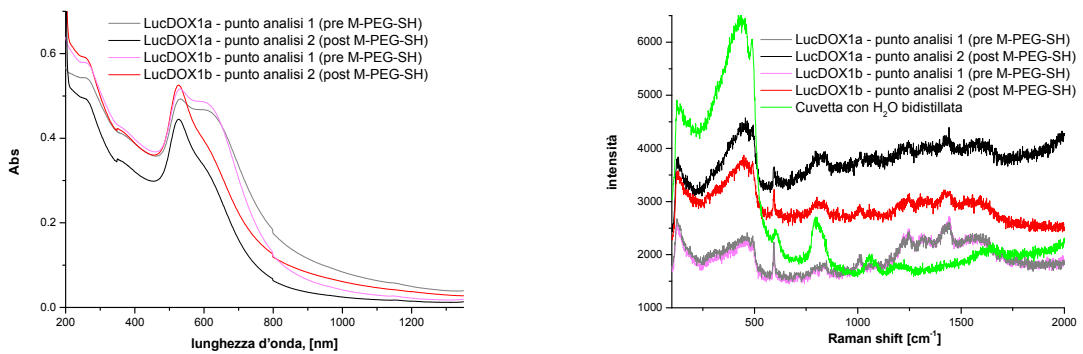


Figura 6.2.2,

a SINISTRA: spettri di assorbimento UV-vis-NIR della preparazione LucDOX1 durante le fasi della sua preparazione;

a DESTRA: spettri SERS della preparazione LucDOX1 durante le fasi della sua preparazione; irraggiamento con raggio laser 633nm, potenza 100%, ingrandimento 5x, una acquisizione di 30s

6.3. LucDOX2, adsorbimento DOXO-AuNPs

Materiali:

- AuNP (del 30/11/2010), invecchiate 5min a 60°C
- Doxorubicina·HCl soluzione in H₂O bidistillata a 10⁻³M
- Phosphate Buffer Saline (PBS) (0.15M NaCl + 10mM PO₄³⁻, pH 7.4)
- HS-PEG-SH 2000D (0.5mg/mL)
- HS-PEG-OCH₃ 5000D (0.5mg/mL)
- Albumina Bovina (BSA)

<i>DOXO [10⁻³M]</i>	<i>PBS</i>	<i>AuNPs</i>	<i>HS-PEG₂₀₀₀-SH</i>	<i>M-PEG₅₀₀₀-SH</i>	<i>BSA</i>
400μL	500μL	2mL	72μL	300 μL	10mg

Procedimento:

In una fialetta Eppendorf vengono aggregati per centrifugazione 2mL di soluzione di AuNP. Il surnatante viene rimosso.

La fiala di particelle aggregate viene separata in due aliquote di ugual volume al fine di permettere la sintesi di due campioni analoghi in parallelo (LucDOX2a-b). I volumi di reagenti indicati in seguito fanno riferimento alla totalità delle due aliquote.

Alle particelle aggregate vengono aggiunti 400μL di soluzione DOXO 10⁻³M, la miscela viene quindi sonicata per disperdere le particelle e posta in agitatore rotativo per 3 ore.

Al termine vengono aggiunti 72μL di HS-PEG₂₀₀₀-SH e si lascia in agitatore rotativo per 1h30'.

Si centrifuga la miscela, il surnatante viene rimosso, si disperde con 1mL di H₂O bidistillata e si controllano gli spettri UV-vis e Raman (Figura 6.3.2 e 6.3.3, punto analisi 1).

Vengono allora aggiunti 300μL mL di M-PEG₅₀₀₀-SH e si lascia reagire per tutta la notte in agitatore rotativo.

Si centrifuga la miscela, il surnatante viene rimosso, si disperde con 1mL di PBS e si controllano gli spettri UV-vis e Raman (Figura 6.3.2 e 6.3.3, punto analisi 2).

Alla fiala di LucDOX2 vengono infine aggiunti 10mg di BSA.

6. Protocolli sperimentali

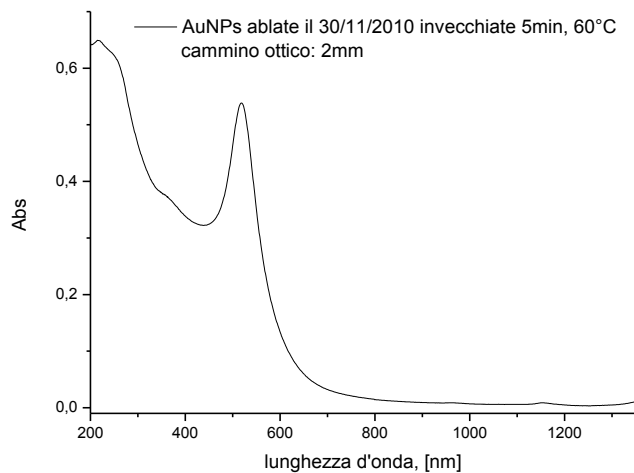


Figura 6.3.1, spettro di assorbimento UV-vis-NIR della soluzione colloidale di AuNPs preparate con LASiS e utilizzate per LucDOX2; sotto è riportata la tabella con i parametri calcolati da SPRFit (vedi paragrafo 3.5.)

	R (nm)	Spheres %	1-RSS	MaxSPA (m ²)	ϵ (cm ⁻¹ M ⁻¹)	Ab _{Sb=2mm} (520nm)	C (mol/L)
AuNPs ablate 30/11/10	7,3	90,5	$9,14 \cdot 10^{-4}$	$1,10 \cdot 10^{-16}$	$2, \cdot 10^8$	0,53769	$9,31 \cdot 10^{-9}$

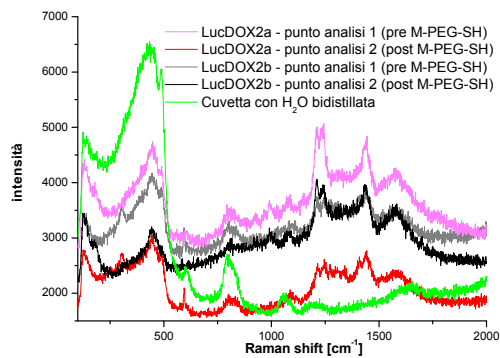
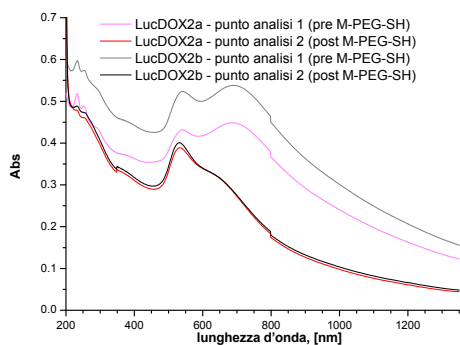


Figura 6.3.2,
a SINISTRA: spettri di assorbimento UV-vis-NIR della preparazione LucDOX2 durante le fasi della sua preparazione;
a DESTRA: spettri SERS della preparazione LucDOX2 durante le fasi della sua preparazione; irraggiamento con raggio laser 633nm, potenza 100%, ingrandimento 5x, una acquisizione di 30s

6.4. AoA-Pep, preparazione del *clivable peptide*

Materiali:

- Substrato peptide su resina 2-clorotritilica ("Pep-R"), fornito dai laboratori della prof. Marina Gobbo; Peptide:

H-βAla-Arg-His-Arg-Gln-Pro-Arg-Gly-Asn-Arg-Val-Arg-Arg-Ser-Gly-Gly-Gly-Cys-OH

H-βAla-RHRQPRGNRVRSSGGGC

- Acido Boc-amminossiacetico ("BAoA"), solido bianco, Sigma Aldrich
- 1-idrossi-7-aza-benzotriazolo ("HOAt"), 1M in N-metilpirrolidone ("NMP"), fornito dai laboratori della prof. Marina Gobbo
- Diisopropilcarbodimmide ("DIC"), liquido incolore
- Dimetilformammide ("DMF"), anidro
- Dimetilformammide ("DMF")
- Diclorometano ("DCM"), anidro
- Diclorometano ("DCM")
- Etere etilico ("Et₂O")
- Acido Trifluoroacetico ("TFA"), concentrato
- Tri-isopropilsilano ("TIS")
- Etanditiolo ("EDT")

	MM, [g/mol]	massa, [mg]	densità, [g/mL]	volume, [mL]	moli, [mmol]	eq
peptide-Resina clorotritilica	5480	210.10	-	-	0.038	1
DIC	126.2	20.32	0.806	"0.025"	0.161	4.2
BAoA	191.18	29.90	-	-	0.156	4.1
HOAt, 1M in NMP	135.12	21.62	-	0.160	0.160	4.2

soluzione madre di DIC in DCM anidro	prelievo dal puro, [mL]	V _{finale} , [mL]	C, [M]	V _{prelievo} , [mL]
	0.250	1.000	1.597	0.101

solventi:	MM, [g/mol]	densità, [g/mL]	Teb, [°C]	volume, [mL]
DMF anidro	73.10	0.94	153	1.000
DCM anidro	84.93	1.33	40	0.401
NMP (soluzione HOAt)	99.13	1.03	202	0.160

Soluzione Sblocco	rapporti in volume	volume, [mL]
TFA	94.0%	4.700
H ₂ O	2.5%	0.125
TIS	2.5%	0.125
EDT	1.0%	0.050

6. Protocolli sperimentali

Procedimento:

È stata innanzitutto preparata la soluzione di DIC in DCM prelevando 250 μ L di DIC anidro e diluendoli con 750 μ L di DCM anidro.

È stato pesato il BAoA ed è stato disperso in 300 μ L di DCM anidro.

Alla sospensione di BAoA sono stati aggiunti i 160 μ L di soluzione di HOAt. Dopo breve agitazione sono stati aggiunti 101 μ L della soluzione di DIC.

Alla siringa (con setto nella base per trattenere la resina) contenente Pep-R, precedentemente bagnata con DMF anidra, viene aggiunto tutto il volume della miscela di BAoA, DIC e HOAt, si pone in agitazione per 4-5ore.

Si drena quindi completamente il liquido dalla siringa e si eseguono più lavaggi con DMF e DCM.

Il prodotto viene tenuto in essiccatore, a temperatura ambiente e sotto vuoto per una notte.

Lo sblocco del peptide dalla resina avviene mediante trattamento con la Soluzione Sblocco: 3mL vengono aggiunti al composto essiccato, si lascia in agitazione per circa 3ore.

Si osserva che, al momento dell'aggiunta della Soluzione Sblocco, la resina passa a una colorazione rossa, al termine delle 3ore tutta la soluzione appare di color rosso.

Si raccoglie la soluzione in una provetta di plastica (*Falcon*), e si lava la resina con piccole aliquote di Soluzione Sblocco.

Con un leggero flusso di N₂ si porta a secco la soluzione appena raccolta.

Si aggiunge ora abbondante Et₂O per facilitare la precipitazione del peptide e si lascia per qualche minuto a cristallizzare in un bagno di ghiaccio.

Si osservano precipitati di color giallo vivo.

La provetta viene centrifugata e si allontana il surnatante.

La procedura di lavaggio con Et₂O viene ripetuta altre 2 volte.

La provetta viene posta in essiccatore, a temperatura ambiente e sotto vuoto per allontanare tutto il solvente.

Il peptide appare cristallino, color bianco opaco.

Si procede ad analisi mediante HPLC (colonna Vydac C18 – grani 5 μ m, eluenti H₂O+0.1%TFA e H₂O:CH₃CN 90:10+0.1%TFA, rampa 5-100% in 30min, flusso 1,5mL/min, Rt \approx 9min) e Massa (ESI-TOF).

6. Protocolli sperimentali

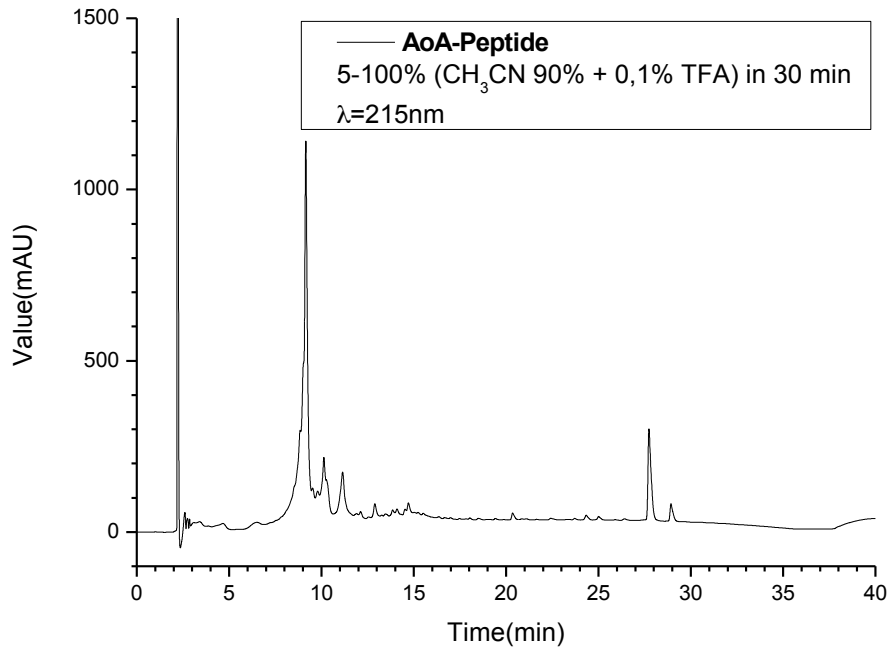


Figura 6.5.1, traccia cromatografica della miscela di reazione; colonna Vydac C18 - grani 5 μ m, eluenti H₂O+0.1%TFA e H₂O:CH₃CN 90:10+0.1%TFA, rampa 5-100% in 30min, flusso 1,5mL/min

Applied Biosystems Mariner System 5220

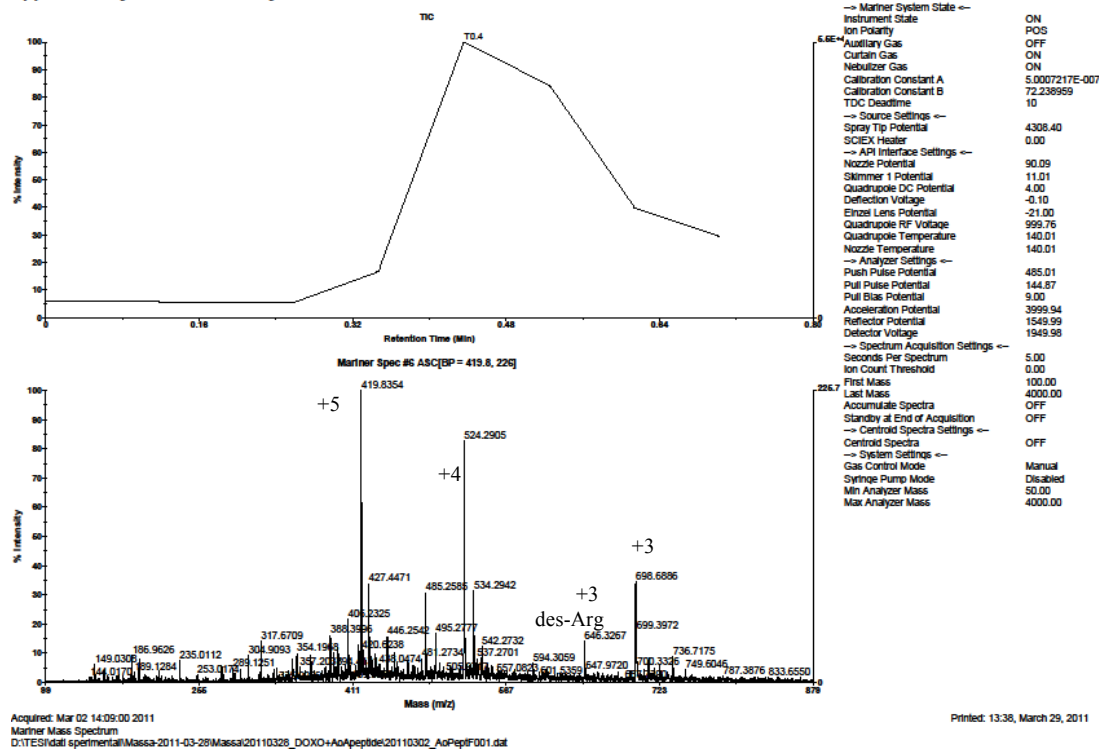


Figura 6.5.5, spettro di massa per ESI-TOF della miscela di reazione.

6.5. DOXO-Pep, DOXO-clivable peptide

Materiali:

- Substrato “Pep-AoA”, solido bianco opaco, vedi paragrafo 6.4:
 $\text{H}_2\text{NOCH}_2\text{CO}-\beta\text{Ala}-\text{Arg}-\text{His}-\text{Arg}-\text{Gln}-\text{Pro}-\text{Arg}-\text{Gly}-\text{Asn}-\text{Arg}-\text{Val}-\text{Arg}-\text{Arg}-\text{Ser}-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Cys}-\text{OH}$
 $\text{H-AoA}-\beta\text{Ala}-\text{RHRQPRGNRVRRSGGGC}$
- Doxorubicina·HCl (“DOXO·HCl”), solido rosso, Sigma Aldrich
- Soluzione tampone AcOH/AcONa pH \approx 5 (0,2M in AcO⁻)

	MW, [g/mol]	massa, [mg]	C, [mM]	massa, [μ mol]	volume, [mL]	eq
DOXO·HCl	543,52	5,0	1,8	9,20	-	1
AoA-Pep	2092	34,7	3,3	16,59	-	1,8
AcOH, pH 5	-	-	200	-	5	-

Procedimento:

La soluzione tampone viene fatta disareare gorgogliando N₂ per circa 30minuti sotto agitazione magnetica e in bagno di ghiaccio.

Si pesa l'aliquota di DOXO·HCl e si scioglie in un palloncino con 1mL di soluzione tampone.

Il pallone di reazione viene allora chiuso con un setto di gomma e all'interno viene fatto fluire N₂.

Si pesa l'aliquota di Pep-AoA e si scioglie, a parte, con 4mL di soluzione tampone.

Si unisce la soluzione di Pap-AoA con quella di DOXO·HCl nel pallone di reazione, si fa fluire N₂ ancora per un paio di minuti e poi si lascia il tutto in agitazione magnetica e coperto dalla luce.

Si effettuano periodicamente dei piccoli prelievi della miscela per seguire lo svolgersi della reazione mediante HPLC (colonna Vydac C18 - grani 5 μ m, eluenti H₂O+0.1%TFA e H₂O:CH₃CN 90:10+0.1%TFA, rampa 5-100% in 30min, flusso 1,5mL/min).

Dopo 22h di reazione, si decide di dividere la miscela in due frazioni, una delle quali verrà liofilizzata e sciolta in un volume inferiore di soluzione tampone: 3mL di miscela di reazione vengono liofilizzati (il sistema criogenico è costituito da acetone e ghiaccio secco) e sciolti nuovamente in 1mL di soluzione tampone. Viene effettuata una prova in bianco per essere sicuri che il trattamento riconduca ad una soluzione a pH \approx 5: 3mL di soluzione tampone vengono liofilizzati e sciolti con acqua MilliQ, con cartina al tornasole appare pH \approx 7; questa miscela viene allora diluita 1:1 con la soluzione tampone e si valuta nuovamente l'acidità che appare a pH \approx 5.

La nuova suddivisione della miscela di reazione è ora:

miscela	volume, [mL]	DOXO·HCl		AoA-Pep	
		massa, [μ mol]	C, [mM]	massa, [μ mol]	C, [mM]
"diluita"	2	3,7	1,8	6,6	3,3
"concentrata"	1	5,52	5,52	9,95	9,95

I tempi di reazione riferiti alla miscela “concentrata” si riferiscono al tempo passato dal momento in cui essa viene preparata per liofilizzazione a partire da una frazione di quella “diluita”.

6. Protocolli sperimentali

Dopo 120h di reazione (riferiti alla miscela “diluita”) si nota una colorazione più scura delle due miscele, specialmente di quella “concentrata”.
Le due miscele sono state lasciate reagire per un totale di 16 giorni (15 per quella “concentrata”).

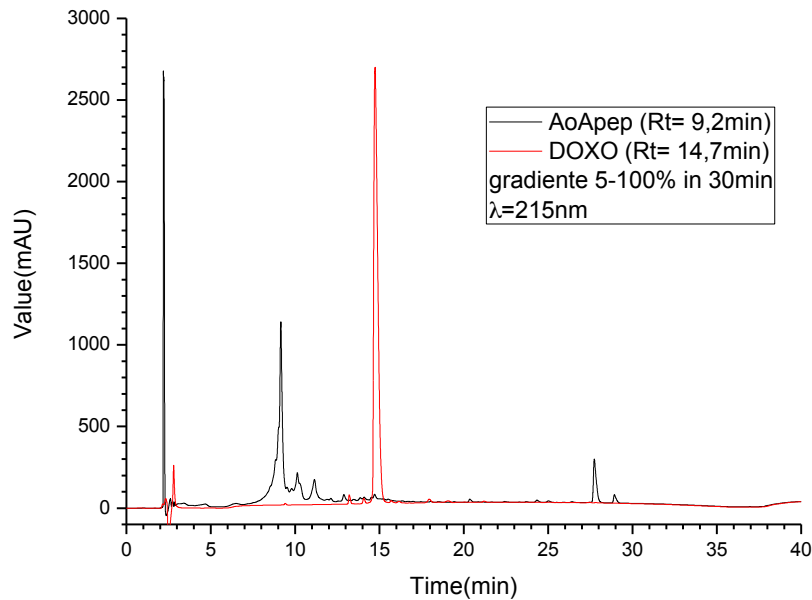


Figura 6.5.1, tracce cromatografiche di una soluzione di Doxorubicina e di una di AoApep; colonna Vydac C18 - grani $5\mu\text{m}$, eluenti $\text{H}_2\text{O}+0.1\%\text{TFA}$ e $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$ 90:10+0.1%TFA, rampa 5-100% in 30min, flusso 1,5mL/min

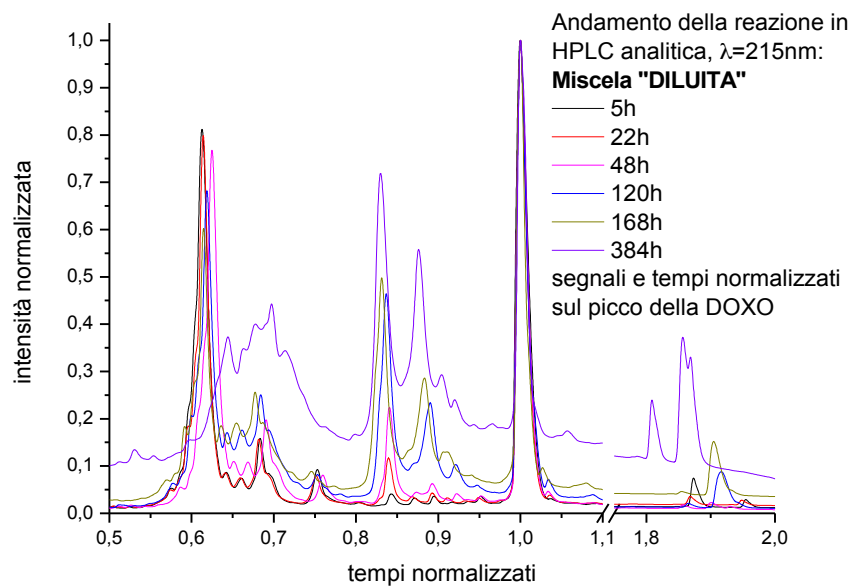


Figura 6.5.2, tracce cromatografiche della miscela di reazione DILUITA di DOXO e AoApep eseguite a tempi successivi per valutare l'andamento della reazione; colonna Vydac C18 - grani $5\mu\text{m}$, eluenti $\text{H}_2\text{O}+0.1\%\text{TFA}$ e $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$ 90:10+0.1%TFA, rampa 5-100% in 30min, flusso 1,5mL/min

6. Protocolli sperimentali

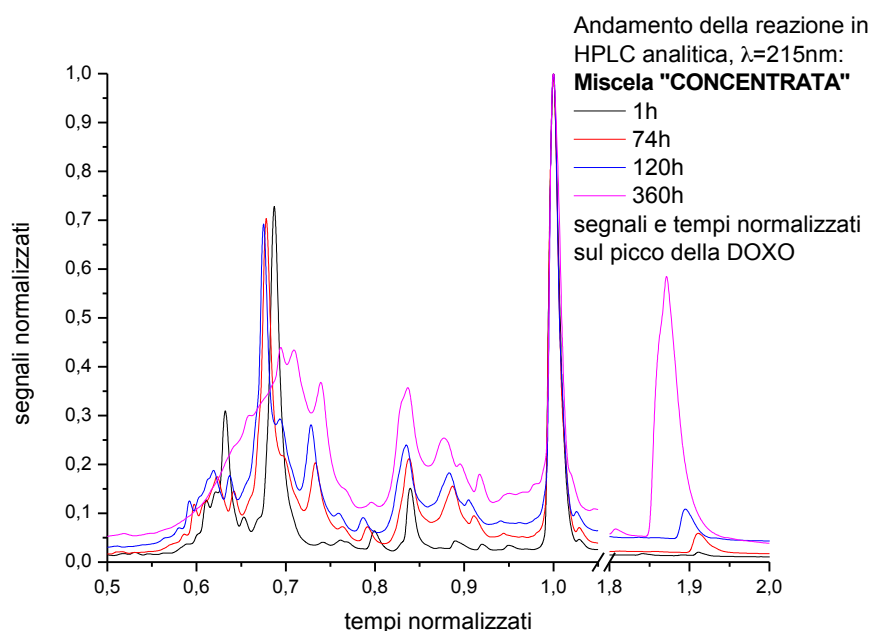


Figura 6.5.3, tracce cromatografiche della miscela di reazione *CONCENTRATA* di DOXO e AoApep eseguite a tempi successivi per valutare l'andamento della reazione; colonna Vydac C18 - grani 5 μ m, eluenti H₂O+0.1%TFA e H₂O:CH₃CN 90:10+0.1%TFA, rampa 5-100% in 30min, flusso 1,5mL/min

Le due miscele vengono quindi purificate in HPLC preparativa (colonna Vydac C18 - grani 10 μ m, eluenti H₂O+0.1%TFA e H₂O:CH₃CN 90:10+0.1%TFA, rampa 15%(5')_15-42%(20')_42-100%(4')_100%(3')_100-15%(8'), flusso 15mL/min).

Sono state raccolte le varie frazioni che vengono poi caratterizzate con spettrometria di massa (ESI-TOF) e confronto con HPLC analitica (colonna Vydac C18 – grani 5 μ m, eluenti H₂O+0.1%TFA e H₂O:CH₃CN 90:10+0.1%TFA, rampa 5-100% in 30min, flusso 1,5mL/min).

Le frazioni vengono numerate in ordine cronologico come in figura (riferita alle tracce cromatografiche della colonna analitica al momento della separazione in colonna preparativa):

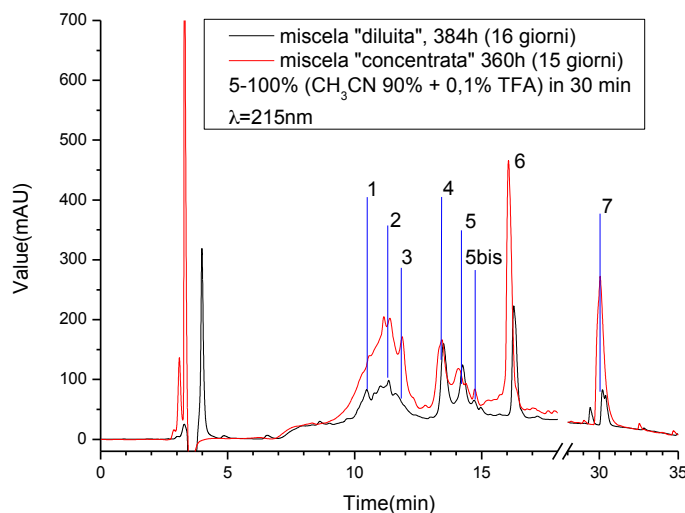


Figura 6.5.4, tracce cromatografiche delle miscele di reazione *DILUITA* e *CONCENTRATA*, con indicata la numerazione dei picchi utilizzata per nominare le frazioni estratte; colonna Vydac C18 - grani 5 μ m, eluenti H₂O+0.1%TFA e H₂O:CH₃CN 90:10+0.1%TFA, rampa 5-100% in 30min, flusso 1,5mL/min

6. Protocolli sperimentali

Applied Biosystems Mariner System 5220

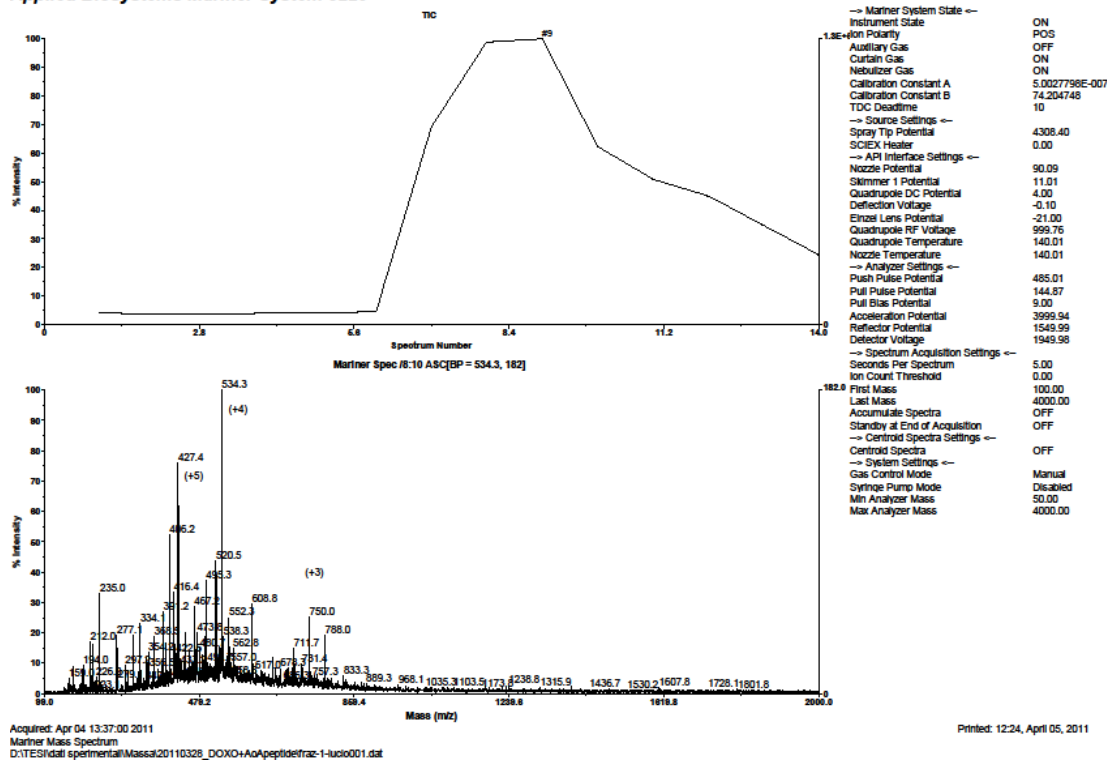


Figura 6.5.5, spettro di massa per ESI-TOF della frazione 1 per la miscela DILUITA

Applied Biosystems Mariner System 5220

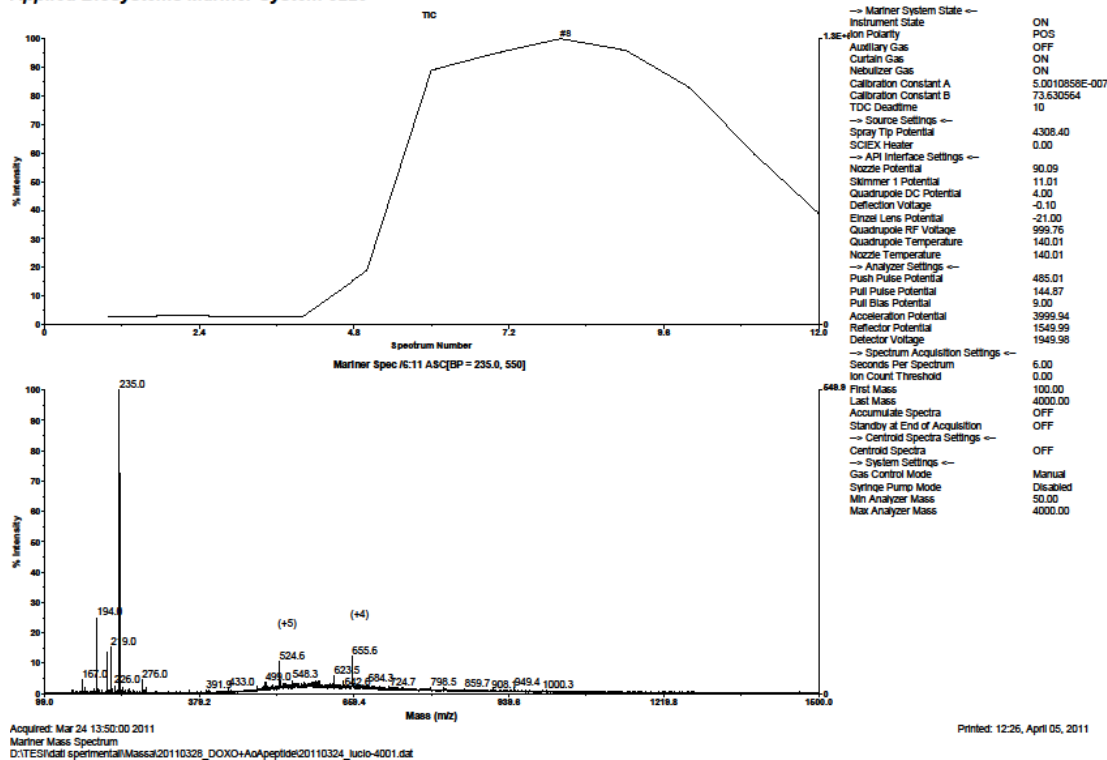


Figura 6.5.6, spettro di massa per ESI-TOF della frazione 4 per la miscela DILUITA

6. Protocolli sperimentali

Applied Biosystems Mariner System 5220

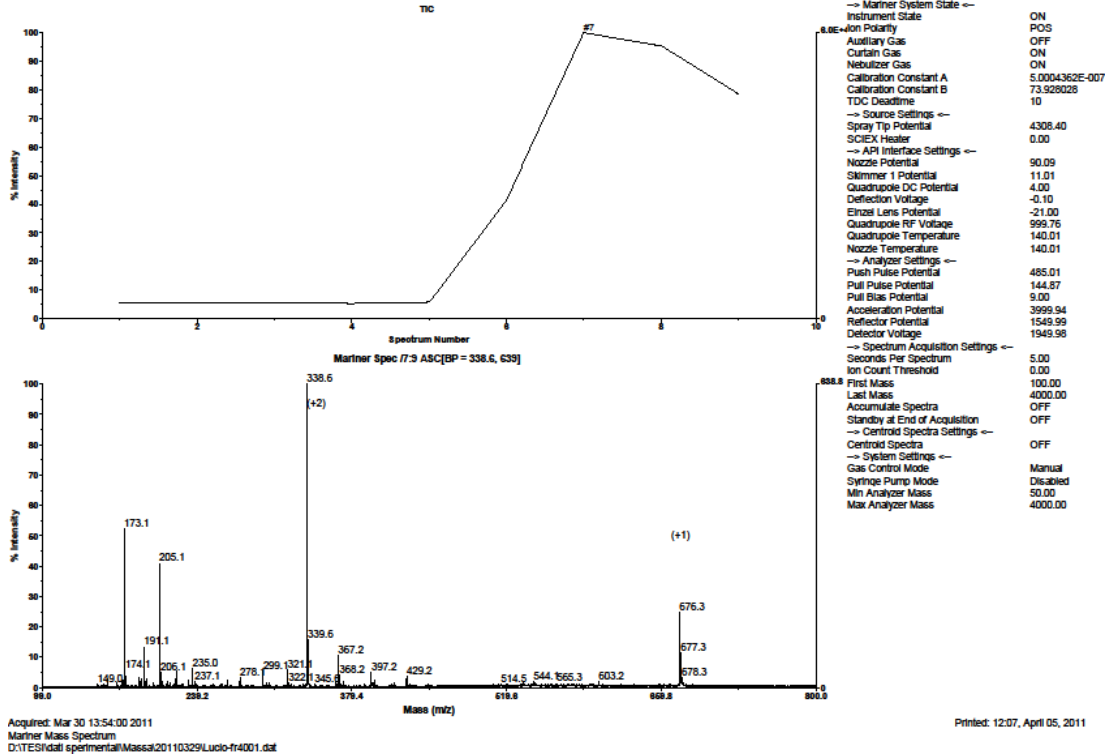


Figura 6.5.7, spettro di massa per ESI-TOF della frazione 4 per la miscela CONCENTRATA

Applied Biosystems Mariner System 5220

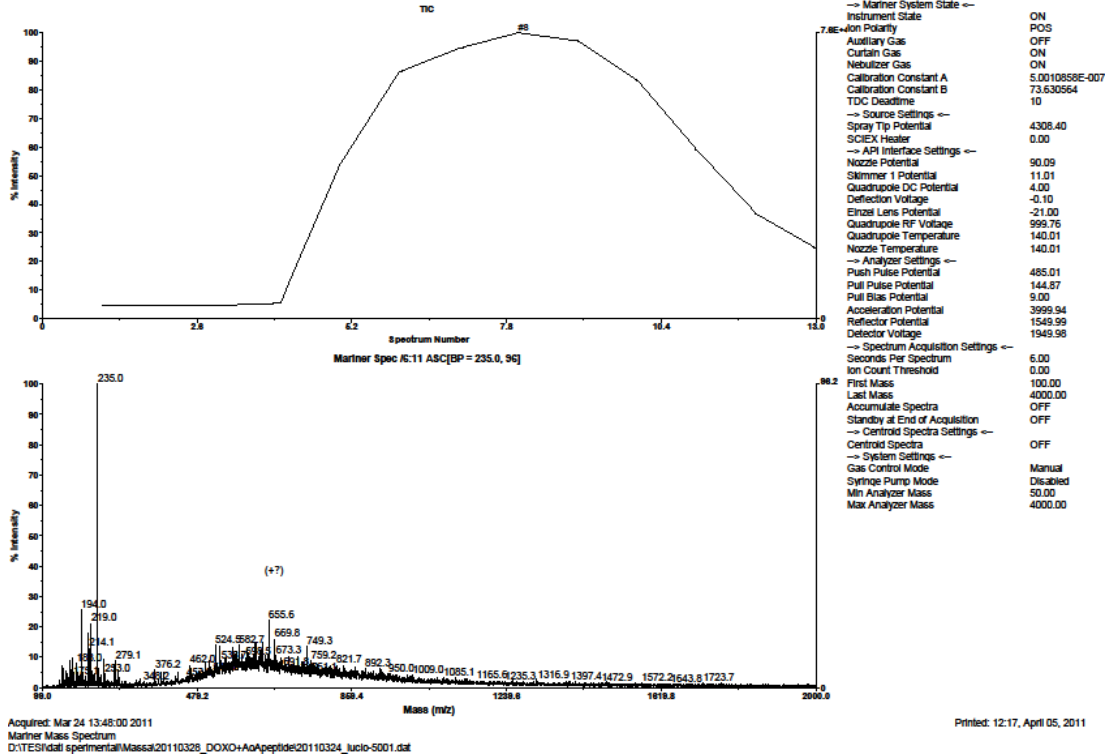


Figura 6.5.8, spettro di massa per ESI-TOF della frazione 5 per la miscela DILUITA

6. Protocolli sperimentali

Applied Biosystems Mariner System 5220

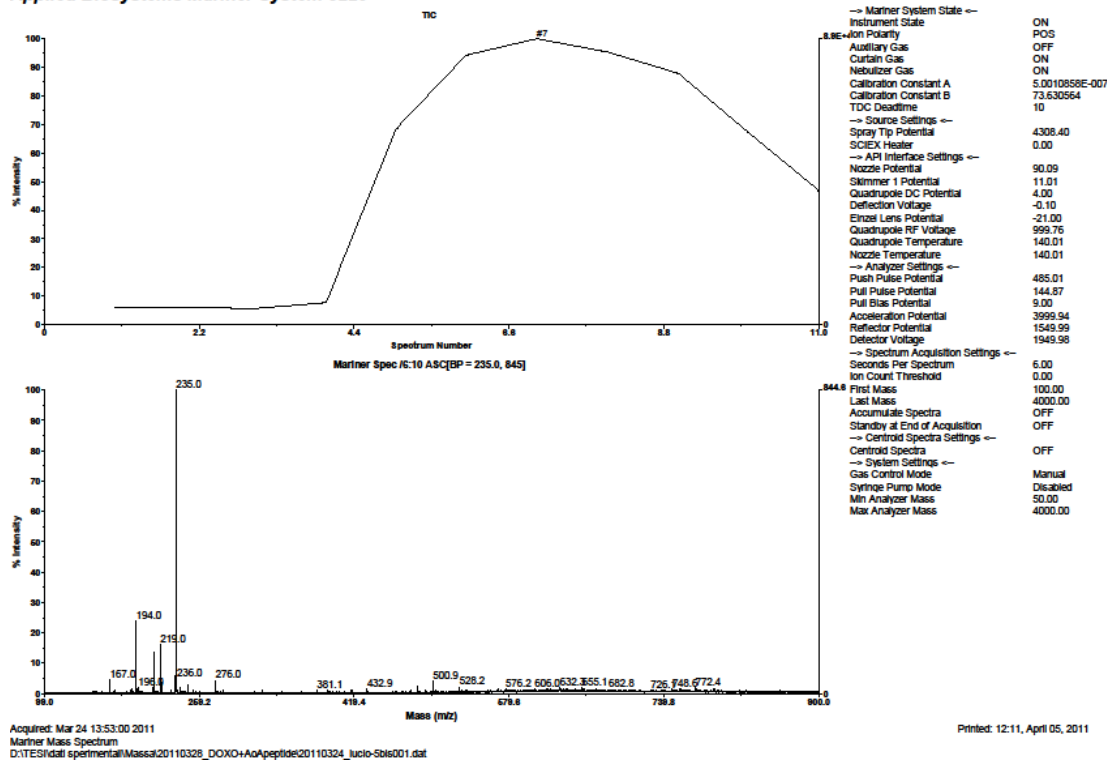


Figura 6.5.9, spettro di massa per ESI-TOF della frazione 5bis per la miscela DILUITA

Applied Biosystems Mariner System 5220

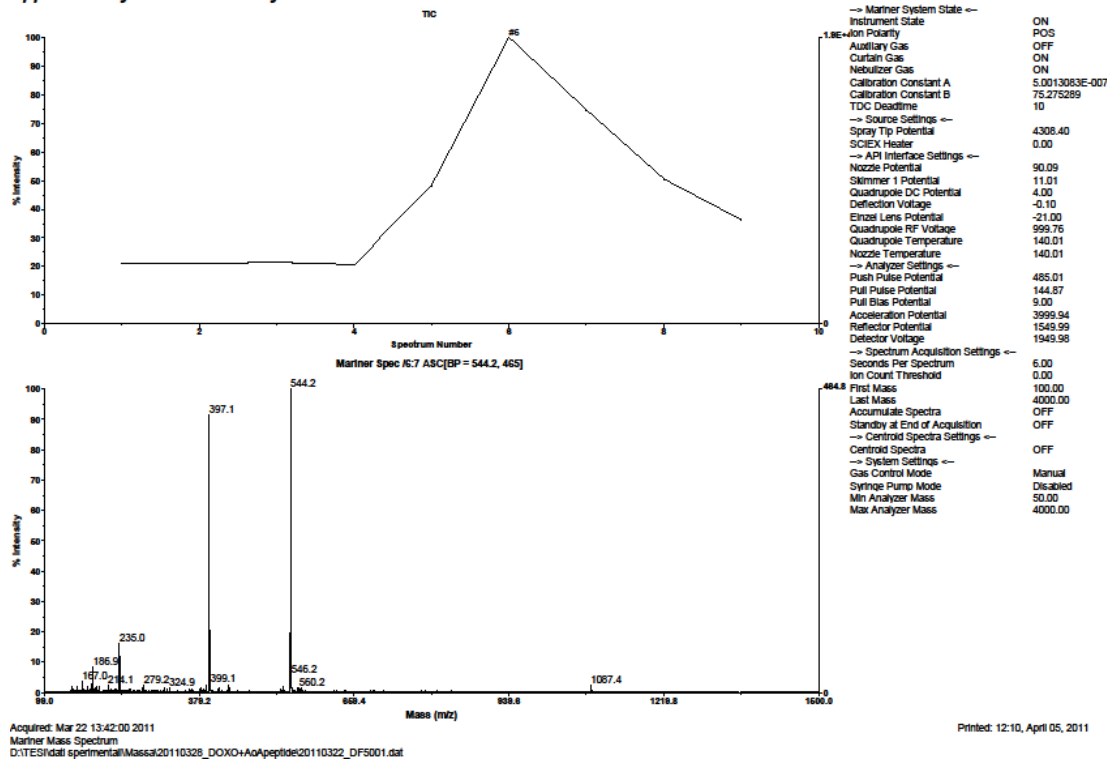


Figura 6.5.10, spettro di massa per ESI-TOF della frazione 6 per la miscela DILUITA

6. Protocolli sperimentali

Applied Biosystems Mariner System 5220

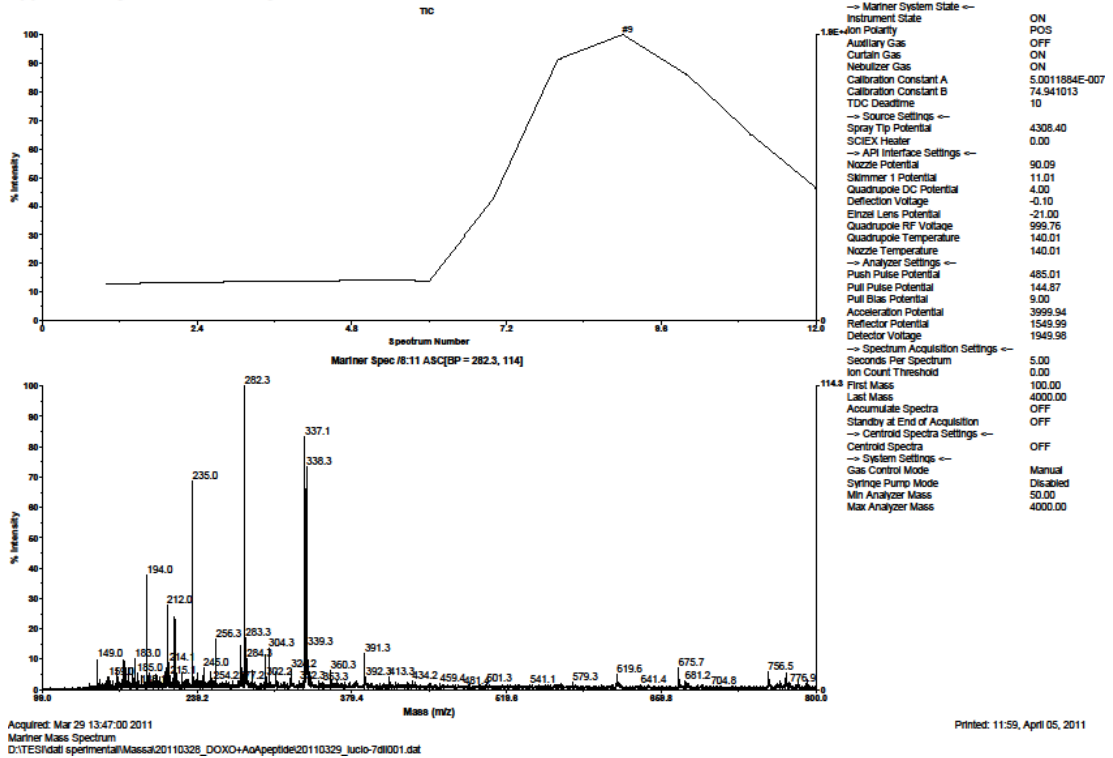


Figura 6.5.11, spettro di massa per ESI-TOF della frazione 7 per la miscela DILUITA

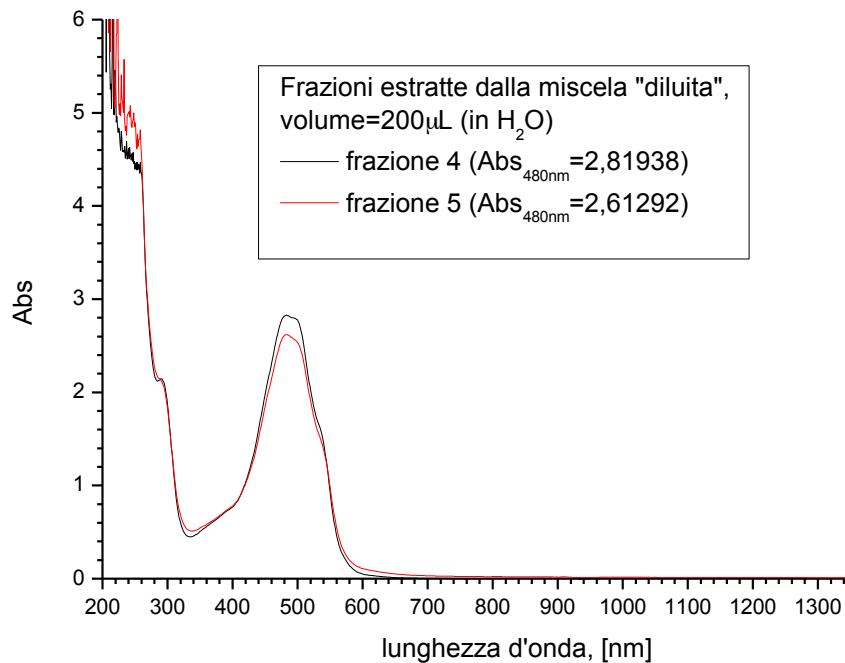


Figura 6.5.12, spettro di assorbimento UV-vis-NIR delle frazioni 4 e 5 della miscela DILUITA, cammino ottico da 2mm

6.6. LucDOX3, *clivable peptide* DOXO-AuNPs

Materiali:

- Substrato “Pep-AoA-DOXO”, soluzione arancione, frazione 4 miscela “diluita”, vedi paragrafo 6.5 ($\approx 80\mu\text{L}$)
- Soluzione colloidale di AuNPs sintetizzate per *laser ablation* il 30/03/2011 in soluzione acquosa di $\text{NaCl} \approx 10^{-5}\text{M}$ ($\approx 8\text{mL}$)

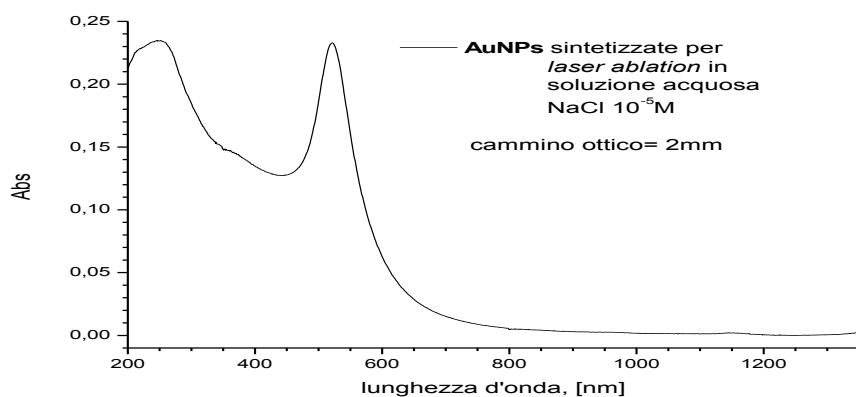


Figura 6.6.1, spettro di assorbimento UV-vis-NIR della soluzione colloidale di AuNPs preparate con LASiS e utilizzate per LucDOX3; sotto è riportata la tabella con i parametri calcolati da SPRFit (vedi paragrafo 3.5)

	R (nm)	Spheres %	1-RSS	MaxSPA (m^2)	ϵ ($\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)	Abs _{b=2mm} (520nm)	C (mol/L)
AuNPs ablate 30marzo	9,6	68,5	$1,30 \cdot 10^{-3}$	$2,87 \cdot 10^{-16}$	$7,51 \cdot 10^8$	0,2461	$1,64 \cdot 10^{-9}$

- Soluzione acquosa di $\text{CH}_3\text{O-PEG}_{5000}\text{-SH}$ 0,5mg/mL, preparata di fresco ($\approx 144\mu\text{L}$)

	concentrazione, M	volume, μL	moli	# particelle	eq
AuNPs	$1,64 \cdot 10^{-9}$	2000	$3,28 \cdot 10^{-12}$	$1,97 \cdot 10^{12}$	1,00
Pep-AoA-DOXO	$1,75 \cdot 10^{-3}$	20	$3,50 \cdot 10^{-8}$	$2,11 \cdot 10^{16}$	$1,07 \cdot 10^4$
M-PEG-SH	$1,00 \cdot 10^{-4}$	36	$3,60 \cdot 10^{-9}$	$2,17 \cdot 10^{15}$	$1,10 \cdot 10^3$

N.B.: la tabella si riferisce alla stechiometria adottata per una unica preparazione di LucDOX3 e non al consumo complessivo di reagenti.

6. Protocolli sperimentali

Procedimento:

Si centrifugano 8mL di AuNPs per indurre aggregazione. Si separa il surnatante e si disperdono le particelle aggiungendo 2mL di H₂O bidistillata e sonicando in bagno ad ultrasuoni.

Si dividono le particelle aggregate in 4 aliquote da 0,5mL: 2 di queste saranno utilizzate per la preparazione LucDOX3 (“LucDOX3_1” e “LucDOX3_2”) e altre due per la preparazione del campione di riferimento B1 (“B1_1” e “B1_2”). D’ora in avanti si farà riferimento ad una sola fialetta per ogni tipo diverso di questi campioni, fermo restando che se ne preparano due identiche in parallelo.

Le due fialette LucDOX3 vengono centrifugate e viene separato il surnatante. Si aggiungono allora 20μL di soluzione di Pep-AoA-DOXO ad ogni fialetta (l’aggiunta è fatta direttamente sulle particelle “secche”), si sonica in bagno ad ultrasuoni per cercare di disperdere il massimo possibile degli aggregati e si lascia reagire in agitatore rotativo per 1ora.

Al termine della reazione si aggiungono 500μL di H₂O bidistillata e si disperdono le particelle con ultrasuoni. Si purifica la miscela per centrifugazione.

Si preparano due campioni di riferimento (REF1 e REF2) per determinare la quantità di substrato coordinato agli aggregati di particelle: per entrambi si diluiscono 20μL di Pep-AoA-DOXO con 500μL di H₂O bidistillata.

Dall’analisi della quantità di Pep-AoA-DOXO coordinata sono preparati i campioni di riferimento B2 e B3:

B2: soluzione di DOXO-AoA-Pep in PBS alla concentrazione, in DOXO, di ≈10μM

B3: soluzione di DOXO in PBS alla concentrazione, in DOXO, di ≈10μM

	Abs _{480nm}	concentrazione, μM
B2	0,01555	9,65
B3	0,01813	11,26

Vengono allora aggiunti 36μL della soluzione di M-PEG₅₀₀₀-SH ad ognuna delle 4 fiale di particelle aggregate (LucDOX3_1e2 e B1_1e2) e si lascia reagire per 3ore.

Si centrifugano tutti i campioni e si separa il surnatante.

Si disperdono, infine, gli aggregati con 500μL di PBS.

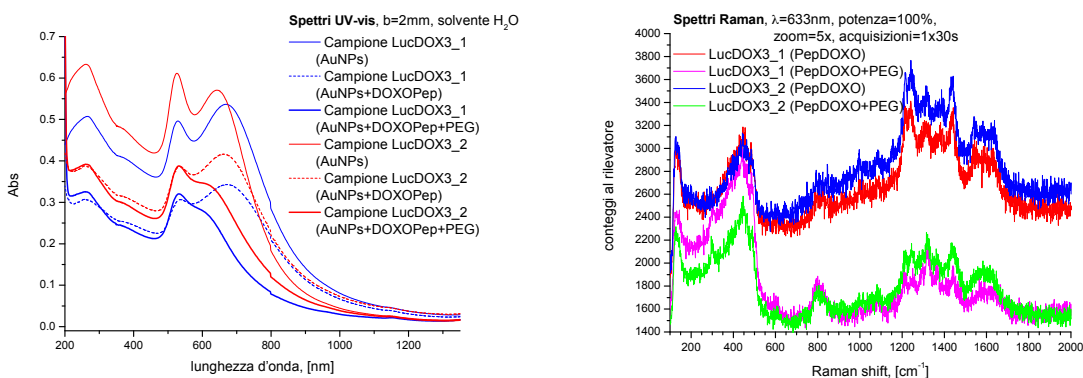


Figura 6.6.2,

a SINISTRA: spettri di assorbimento UV-vis-NIR di LucDOX3 durante le fasi della sua preparazione;
a DESTRA: spettri SERS di LucDOX3 durante le fasi della sua preparazione.

6. Protocolli sperimentali

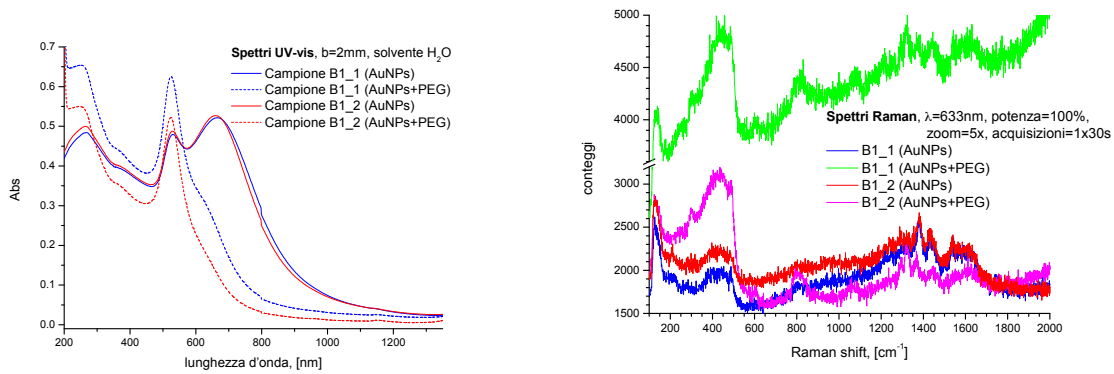


Figura 6.6.3,
a SINISTRA: spettri di assorbimento UV-vis-NIR di B1 durante le fasi della sua preparazione;
a DESTRA: spettri SERS di B1 durante le fasi della sua preparazione.

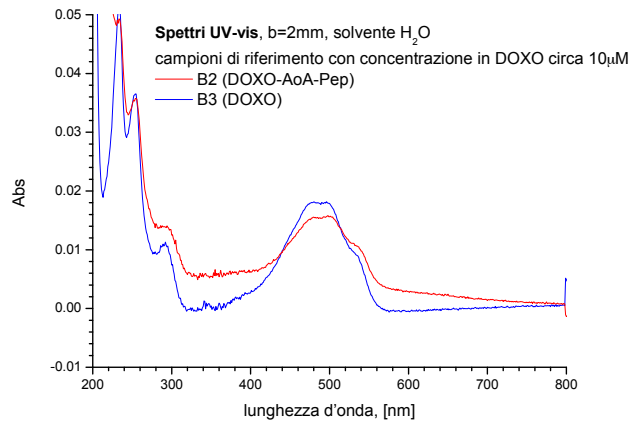


Figura 6.6.4,
spettri di assorbimento UV-vis-NIR delle soluzioni di riferimento B2 e B3

6.7. Serie AbDOX, *delivery* e *targeting*

Materiali:

- soluzione colloidale di AuNPs sintetizzate per laser ablation il 13/07/2010 in soluzione acquosa di NaCl $\approx 10^{-5}$ M

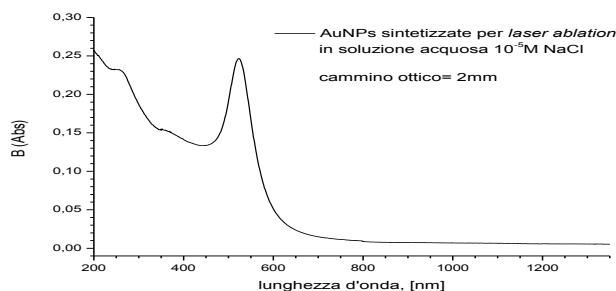


Figura 6.7.1, spettro di assorbimento UV-vis-NIR della soluzione colloidale di AuNPs preparate con LASiS e utilizzate per LucDOX3; sotto è riportata la tabella con i parametri calcolati da SPRFit (vedi paragrafo 3.5)

	R (nm)	Spheres %	1-RSS	MaxSPA (m ²)	ϵ (cm ⁻¹ M ⁻¹)	Ab _{s_b=2mm} (520nm)	C (mol/L)
AuNPs	9,3	91,5	$9,954 \cdot 10^{-4}$	$2,638 \cdot 10^{-16}$	$6,907 \cdot 10^8$	0,24504	$1,77 \cdot 10^{-9}$

- soluzione acquosa di Doxorubicina·HCl 1,21mM (“DOXO”)
- soluzione di TexasRed-Cys-SH $3,3 \cdot 10^{-5}$ M in Metanolo (“TR”)

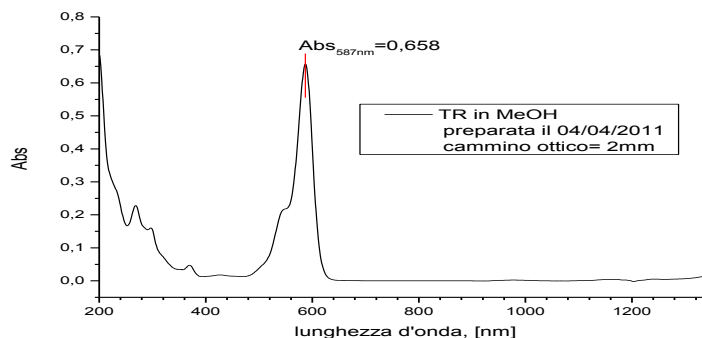


Figura 6.7.2, spettro di assorbimento UV-vis-NIR della soluzione di colorante TR

- Soluzione acquosa di PBS (*Phosphate Buffer Saline*) 0,15M NaCl e 10mM PO₄³⁻, pH 7,4
- soluzione acquosa di anticorpo D2B 1,3g/L in PBS
- soluzione acquosa di 2-Iminotiolano (“2IT”) 0,5mg/mL, preparata di fresco
- soluzione tampone di NaHCO₃ 1M in acqua bidistillata
- soluzione acquosa di CH₃O-PEG₅₀₀₀-SH 0,5mg/mL, preparata di fresco

6. Protocolli sperimentali

Procedimento:

La preparazione di tutti i campioni della serie AbDOX è stata eseguita in parallelo come mostrato in figura 6.7.3.

La preparazione dell'anticorpo D2B funzionalizzato segue la procedura suggerita dai colleghi del gruppo di ricerca del Prof. Marco Colombatti, presso i laboratori del Dipartimento di Patologia, Sezione di Immunologia del Policlinico "GB Rossi" di Verona.

Si mescola 1,3mL di soluzione di D2B con 340 μ L di soluzione di NaHCO₃ e 34 μ L di soluzione di 2IT. La reazione viene mantenuta per 2ore a temperatura ambiente e una notte in frigorifero alla temperatura di 4°C.

Il giorno dopo si registra lo spettro UV-vis della miscela di reazione e si centrifuga la stessa in membrana semipermeabile ad esclusione dimensionale (pori da 10000Da).

L'anticorpo viene ripreso con 4mL di PBS effettuando ripetuti lavaggi della membrana, questa soluzione di anticorpo reagito con il 2IT viene chiamata "Ab-2IT".

Viene registrato lo spettro UV-vis della soluzione di anticorpo recuperato dalla membrana.

Per valutare le rese delle reazioni di coordinazione della DOXO, del TR e dell'anticorpo sulle AuNPs, oltre che alla reazione di funzionalizzazione dell'anticorpo, vengono preparate delle soluzioni di riferimento:

- "RifDOXO": 20 μ L di soluzione di DOXO diluiti con 500 μ L di H₂O bidistillata
- "RifTR": 50 μ L di soluzione di TR diluiti con 500 μ L di H₂O bidistillata
- "Rif2IT": 34 μ L di soluzione di 2IT diluiti con 1640 μ L di H₂O bidistillata

6. Protocolli sperimentali

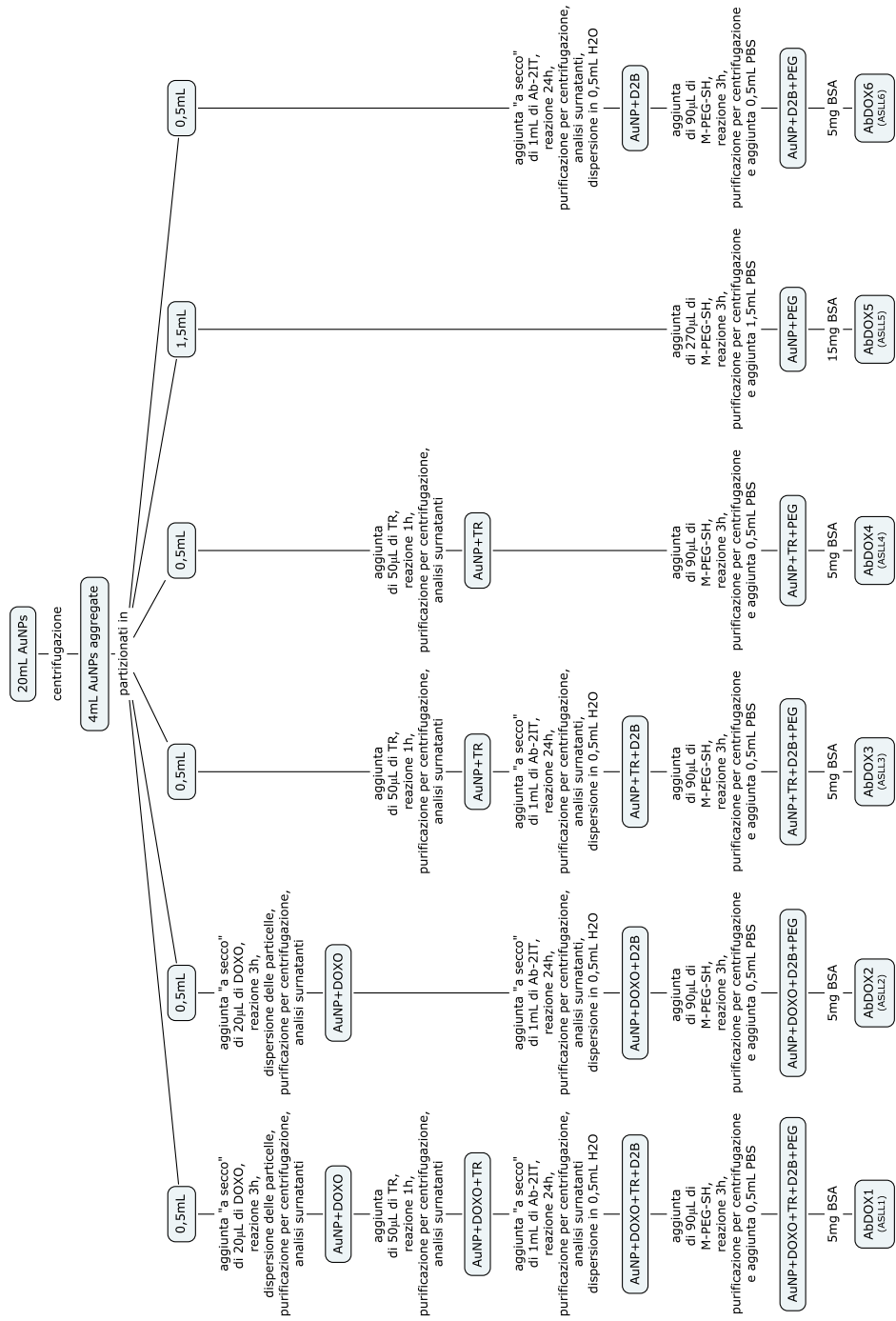


Figura 6.6.3, schema della preparazione parallela di tutti i campioni della serie AbDOX. Dove non specificato altrimenti, le particelle vengono disperse in 0,5mL di H₂O bidistillata.

6. Protocolli sperimentali

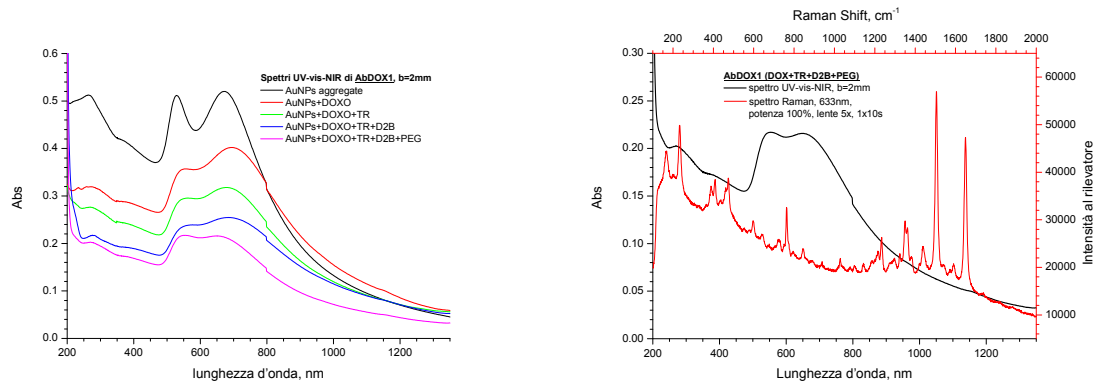


Figura 6.6.4,
 a SINISTRA: spettro di assorbimento UV-vis-NIR della preparazione AbDOX1 durante le fasi della sua preparazione;
 a DESTRA: spettri di assorbimento UV-vis-NIR e SERS del campione AbDOX1.

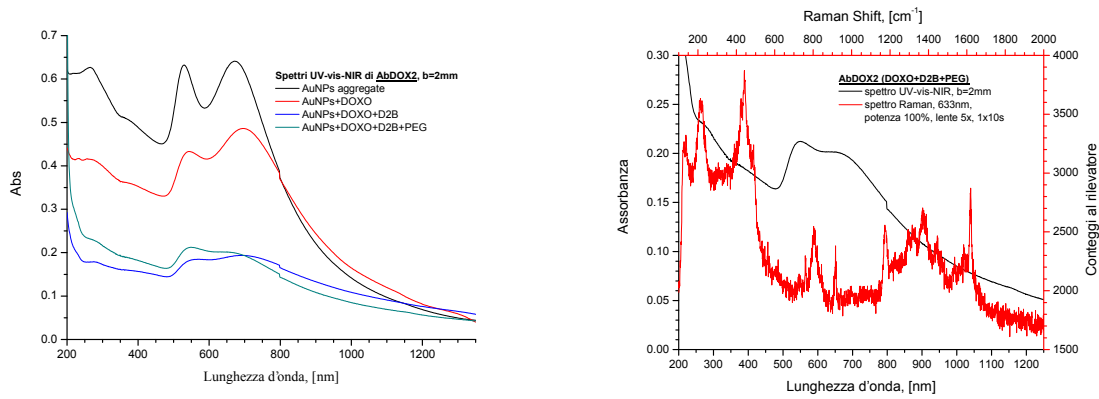


Figura 6.6.5,
 a SINISTRA: spettro di assorbimento UV-vis-NIR della preparazione AbDOX2 durante le fasi della sua preparazione;
 a DESTRA: spettri di assorbimento UV-vis-NIR e SERS del campione AbDOX2.

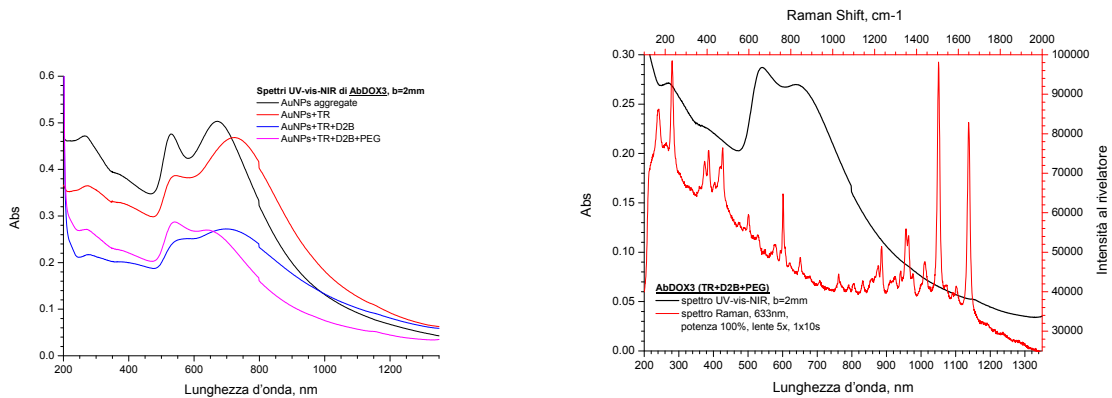


Figura 6.6.6,
 a SINISTRA: spettro di assorbimento UV-vis-NIR della preparazione AbDOX3 durante le fasi della sua preparazione;
 a DESTRA: spettri di assorbimento UV-vis-NIR e SERS del campione AbDOX3.

6. Protocolli sperimentali

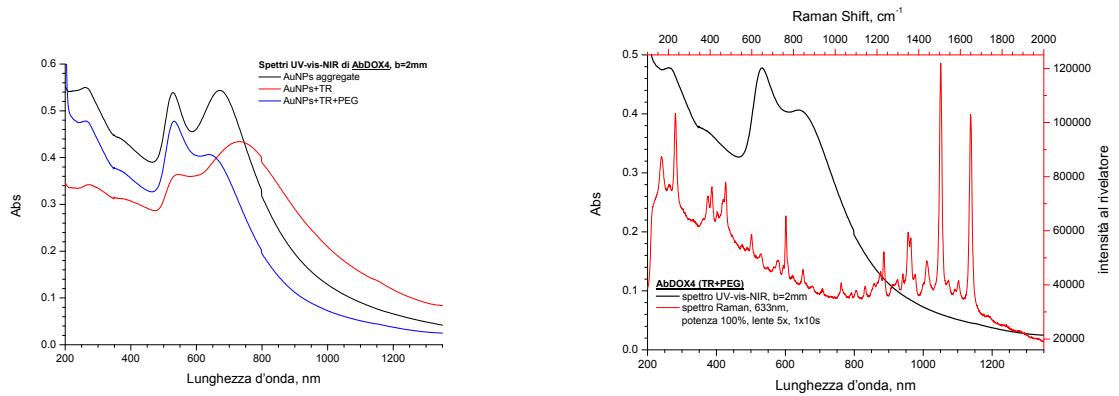


Figura 6.6.7,
 a SINISTRA: spettro di assorbimento UV-vis-NIR della preparazione AbDOX4 durante le fasi della sua preparazione;
 a DESTRA: spettri di assorbimento UV-vis-NIR e SERS del campione AbDOX4.

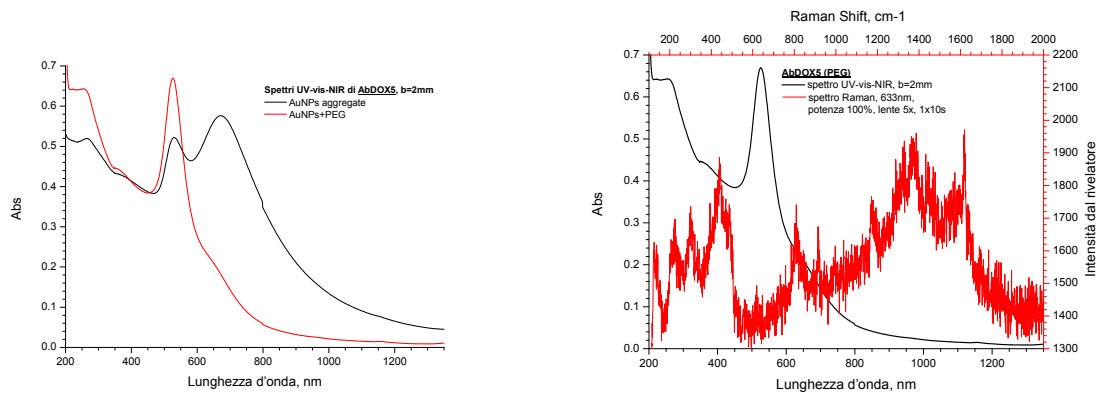


Figura 6.6.8,
 a SINISTRA: spettro di assorbimento UV-vis-NIR della preparazione AbDOX5 durante le fasi della sua preparazione;
 a DESTRA: spettri di assorbimento UV-vis-NIR e SERS del campione AbDOX5.

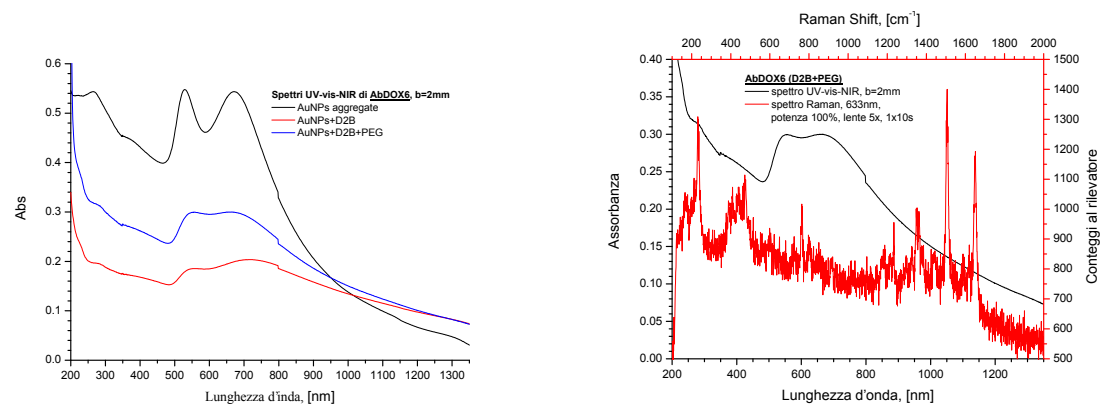


Figura 6.6.9,
 a SINISTRA: spettro di assorbimento UV-vis-NIR della preparazione AbDOX6 durante le fasi della sua preparazione;
 a DESTRA: spettri di assorbimento UV-vis-NIR e SERS del campione AbDOX6.

6. Protocolli sperimentali

7.Risultati e Discussione

La manipolazione delle soluzioni di particelle ottenute per LASiS è veramente semplice, non richiede condizioni di reazione particolari, né attivatori per i reagenti. Come traspare anche dai protocolli riportati nel capitolo 6, è sufficiente mettere a contatto le AuNPs con una soluzione contenente il reattivo che si vuole coordinare e questo, nella maggior parte dei casi, si coordina in quantità proporzionale alla disponibilità di formazione di legami forti con la superficie metallica, tipicamente legami S-Au.

Per valutare la quantità di reattivo che si lega sulla superficie delle particelle, si è scelto di eseguire una valutazione in negativo, in altre parole determinare quanto non ne abbia reagito per poi confrontare il dato con la quantità di substrato di partenza.

Questo metodo è stato particolarmente utile nel determinare le rese di coordinazione per il campione LucDOX3 e per tutta la serie AbDOX.

Il motivo per il quale non si è determinata la resa anche per i restanti campioni LucDOX1 e LucDOX2 risiede in difficoltà pratiche e di qualità del risultato.

In LucDOX1, la Doxorubicina viene funzionalizzata con il 2-iminotiolano. Questa miscela di reazione, in soluzione basica tamponata, viene immediatamente utilizzata per la coordinazione sulle particelle. Sebbene si eviti qualsiasi manipolazione del substrato prima del trattamento sulle AuNPs, la sintesi non porta comunque a un'elevata resa di coordinazione, come mostrato dalle intensità degli spettri SERS in figura 6.6.2.

Il motivo si presume risieda nell'instaurarsi di reazioni collaterali che danneggiano il gruppo tiolico appena formato, come mostrato in figura 7.1.

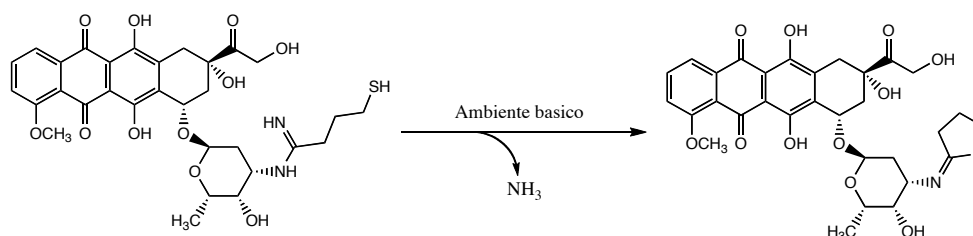


Figura 7.1, reazione di formazione del sottoprodotto di ciclizzazione intramolecolare.

La caratterizzazione di questo sottoprodotto, come pure quella del prodotto desiderato, avviene per spettrometria di massa ESI-TOF. Il dato non risulta però molto significativo a causa delle interferenze dovute alla presenza di molti elettroliti, che abbassano la sensibilità del metodo. Si osservano, infatti, picchi poco intensi con conseguente scarsa importanza diagnostica del dato ottenuto. Successive analisi della reazione sarebbero necessarie per un futuro sviluppo del progetto, ma in questa sede non hanno rappresentato una priorità e si è ritenuto che l'ipotesi della formazione del sottoprodotto potesse essere ragionevole da confronto con studi riportati in letteratura^(2,58).

Nel caso di LucDOX2, invece, la Doxorubicina non modificata viene adsorbita direttamente sulle AuNPs. Per raggiungere questo scopo la Doxo viene utilizzata in largo eccesso e si osserva che una sensibile quantità di Antraciclina viene adsorbita sulle particelle.

7. Risultati e Discussione

	concentrazione, M	volume, μL	numero particelle
DOXO	0,001	400	$2,41 \cdot 10^{17}$
AuNPs	$9,31 \cdot 10^{-9}$	2000	$1,12 \cdot 10^{13}$

Tabella 7.2, reagenti utilizzati nella preparazione di LucDOX2.
Notare un eccesso della quantità di DOXO maggiore di 10^4 .

Il legame che s'instaura sulle particelle, come spiegato nel capitolo 3, è probabilmente di tipo debole, ma la possibilità di formare più legami in un sistema di particelle aggregate, rende la coordinazione stabile a successivi trattamenti.

L'analisi della soluzione contenente la Doxorubicina che non si è coordinata con le AuNPs si è dimostrata poco sensibile a causa del largo eccesso utilizzato per indurre la reazione. La differenza tra lo spettro di assorbimento della soluzione reagente e quello della soluzione del substrato non reagito sono, infatti, troppo simili per trarre un utile risultato dalla differenza dei due.

Ad ogni modo, gli spettri SERS mostrano chiaramente un consistente adsorbimento dell'Antraciclina sulla superficie particellare e questo è sufficiente per attribuire un risultato favorevole alla preparazione (vedi figura 6.3.2). In effetti, per la serie AbDOX, si è scelto di sfruttare questo semplice metodo per fare adsorbire il farmaco sulle AuNPs.

Dalla stessa analisi SERS di LucDOX2, emerge un altro particolare che si rivelerà importante anche nelle successive sintesi: gli effetti dell'aggiunta del M-PEG-SH come ultimo stadio.

Dalla figura 6.3.2 si nota che dopo l'aggiunta della soluzione di M-PEG-SH si sviluppano due importanti effetti. Lo spettro UV-vis-NIR perde globalmente in intensità, ma si nota che la banda a circa 700nm risulta maggiormente interessata di quella a circa 520nm. Nello spettro SERS si ha una decisa diminuzione generale d'intensità del segnale di scattering, particolarmente significativo nella zona tra 1000 e 1500 cm^{-1} .

Come spiegato nel capitolo 3, la zona di assorbimento a circa 700nm è caratteristica degli aggregati di nanoparticelle. Una sua scomparsa, in seguito a trattamento con PEG, può quindi significare che quest'ultimo ha un ruolo nella distruzione degli aggregati di AuNPs. In molti casi si nota, infatti, un concomitante abbassamento del segnale a circa 700nm con un aumento a 520nm (un esempio evidente è in figura 6.6.8). Il fatto che in LucDOX2 non si verifichi anche l'innalzamento del picco delle particelle non aggregate può probabilmente essere dovuto all'insieme di effetti di disaggregazione e di adesione sulle pareti di plastica del contenitore.

Nella zona spettrale a circa 450nm, caratteristica delle transizioni interbanda delle nanoparticelle di Au, si ha una più accurata valutazione degli effetti di diluizione del campione. Nella figura 6.6.8 si vede che gli effetti dovuti alla perdita di struttura aggregata non intaccano quasi per nulla la zona a 450nm, questo è indice che la quantità di particelle, aggregate o meno, presente nel campione è rimasta la stessa. Al contrario, negli spettri di assorbimento della figura 6.3.2, riferiti alla preparazione LucDOX2, si nota anche una diminuzione di assorbimento nella zona a 450nm. Possiamo dire che, considerato l'effetto di diluizione dovuto alla perdita di particelle, è evidente una diminuzione della struttura aggregata e un lieve aumento delle AuNPs libere.

Analizzando lo spettro SERS, si possono supporre due tipologie di effetti dovuti dalla coordinazione del PEG. Un primo è legato al disgregamento degli aggregati, che causa una perdita delle strutture con *Hot Spots*, responsabili del grande aumento di sensibilità del segnale di scattering Raman. Un secondo effetto può essere dovuto

7. Risultati e Discussione

alla sostituzione del legante Doxorubicina a favore di una interazione più robusta con il tiolo del PEG.

Entrambi questi fattori portano ad una diminuzione del segnale Raman caratteristico della Doxorubicina, nella zona tra 1000 e 1500cm^{-1} .

L'attribuzione di questo intervallo di Raman Shift alla DOXO avviene per confronto con gli altri campioni di particelle funzionalizzate. Il picco intorno a 1250cm^{-1} , particolarmente evidente in figura 6.3.2, è ricorrente in tutte le sintesi con Doxorubicina e si pensa sia maggiormente diagnostico rispetto alle bande a 1400 - 1500cm^{-1} .

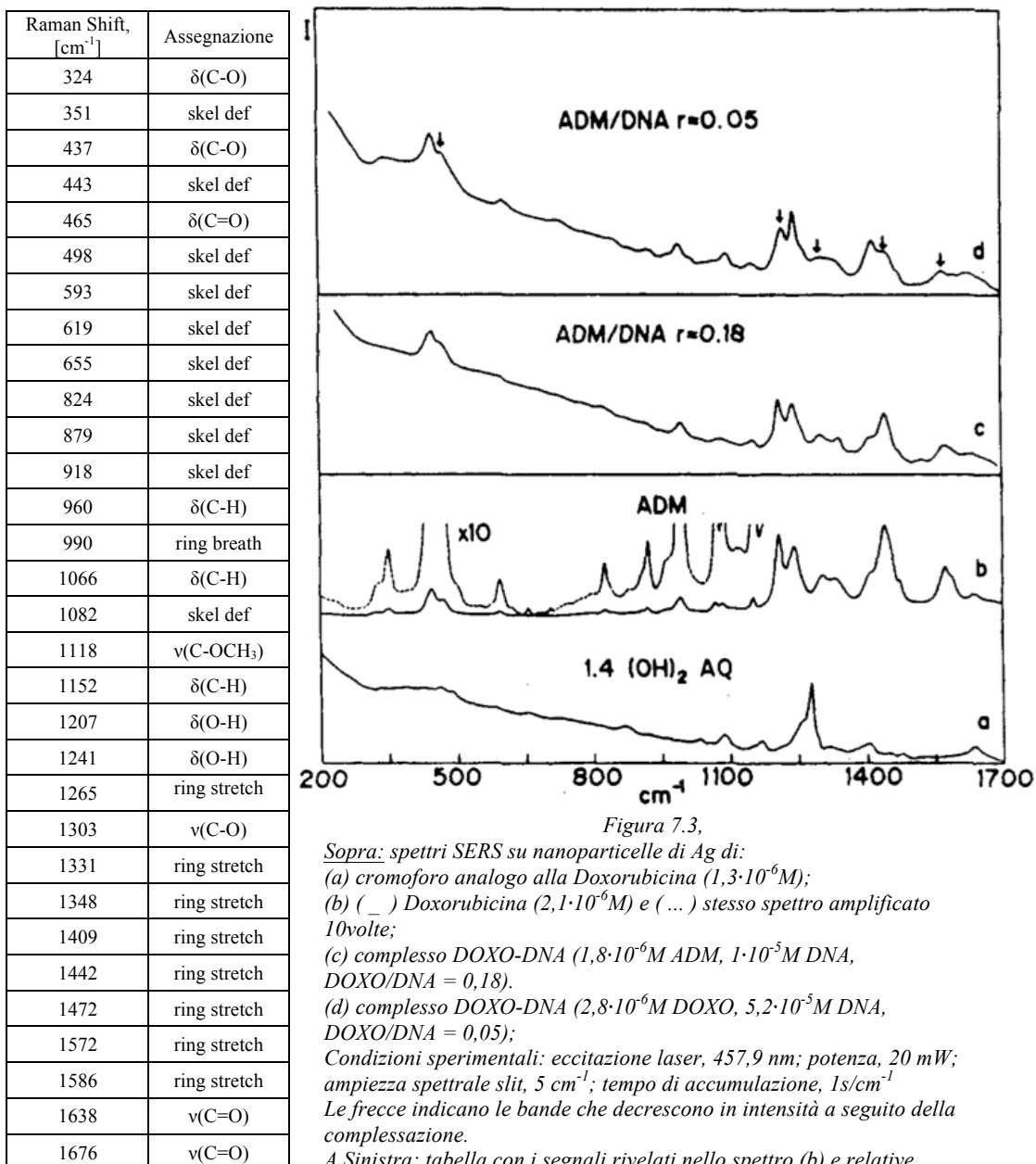


Figura 7.3,

Sopra: spettri SERS su nanoparticelle di Ag di:
 (a) cromoforo analogo alla Doxorubicina ($1,3 \cdot 10^{-6} \text{M}$);
 (b) (—) Doxorubicina ($2,1 \cdot 10^{-6} \text{M}$) e (...) stesso spettro amplificato 10 volte;
 (c) complesso DOXO-DNA ($1,8 \cdot 10^{-6} \text{M}$ ADM, $1 \cdot 10^{-5} \text{M}$ DNA, DOXO/DNA = 0,18).
 (d) complesso DOXO-DNA ($2,8 \cdot 10^{-6} \text{M}$ DOXO, $5,2 \cdot 10^{-5} \text{M}$ DNA, DOXO/DNA = 0,05);
 Condizioni sperimentali: eccitazione laser, 457,9 nm; potenza, 20 mW; ampiezza spettrale slit, 5 cm^{-1} ; tempo di accumulazione, 1 s/cm^{-1}
 Le frecce indicano le bande che decrescono in intensità a seguito della complessazione.
 A Sinistra: tabella con i segnali rivelati nello spettro (b) e relative attribuzioni.
 Adattato da Rif 75.

La sintesi di LucDOX3 comprende molti aspetti legati anche alla preparazione del reattivo DOXO-AoA-Pep.

La reazione di addizione dell'acido amminossiacetico al peptide (paragrafo 6.4) avviene in fase solida. Il reagente è stato acquistato protetto all'ammina da un gruppo

terbutilossicarbonile, questo per prevenire la formazione del legame ammidico tra due molecole di AoA.

La reazione di condensazione di quest'ultimo con il peptide avviene con i meccanismi già spiegati nel paragrafo 5.3: il BAoA viene attivato, tramite formazione di esteri attivi, grazie alla diisopropilcarbodimmide (DIC) e al 1-idrossi-7-azabenzotriazolo (HOAt), la reazione porta alla formazione di un legame ammidico con l'ammina della β -alanina terminale.

Lo sblocco del prodotto dalla resina clorotritilica avviene per trattamento acido. La miscela utilizzata contiene acido trifluoroacetico concentrato e altri composti minoritari che hanno la funzione di *scavenger*.

La resina utilizzata prevede una rimozione della catena peptidica a seguito di trattamento acido. I gruppi protettori alle catene laterali sono anch'essi rimovibili in ambiente acido e lo sblocco avviene simultaneamente all'ultimo stadio. Uno schema semplificato è proposto in figura 7.4.

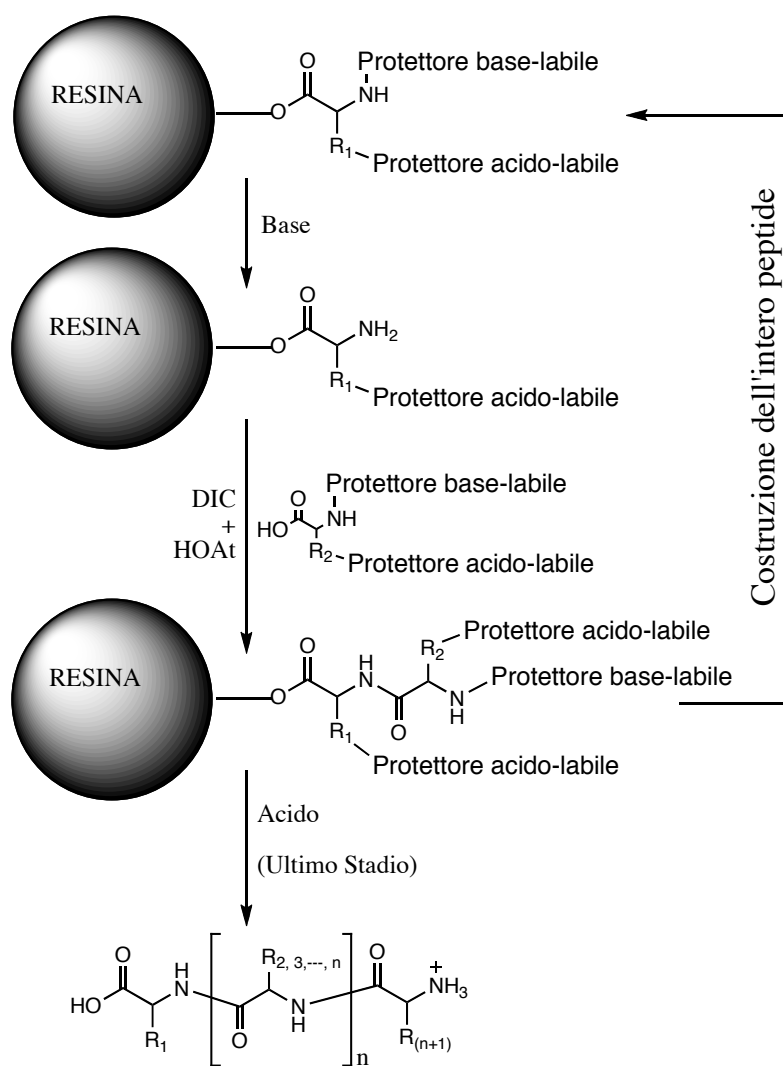


Figura 7.4, schema semplificato di una sintesi in fase solida come quella condotta per ottenere il peptide di cui al paragrafo 6.4. Gli scavenger vengono aggiunti alla miscela acida dell'ultimo stadio per prevenire reazioni collaterali che riguardano in particolar modo i residui dei gruppi protettori alle catene laterali.

7. Risultati e Discussione

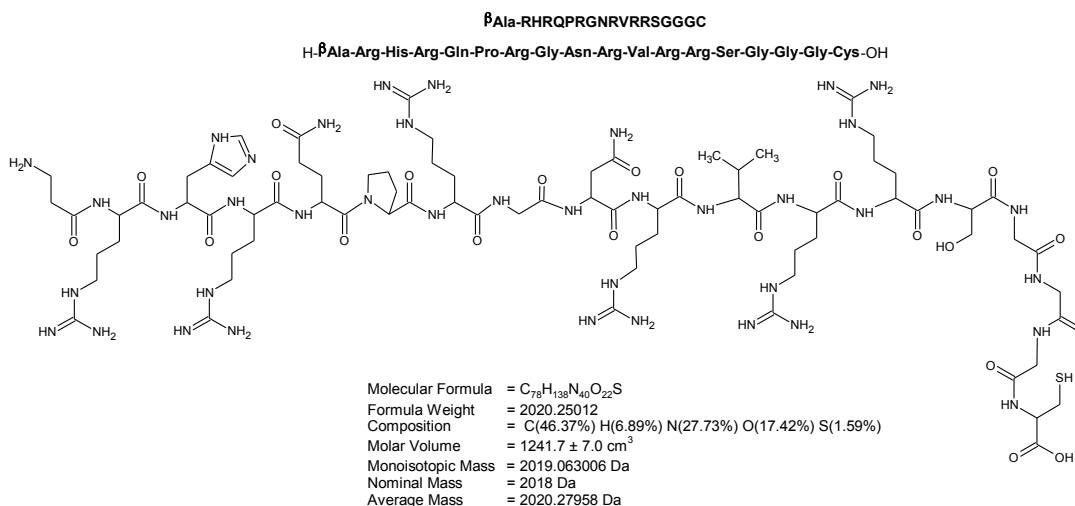


Figura 7.5, struttura molecolare del peptide utilizzato per la reazione con il BAoA, di cui al paragrafo 6.4.

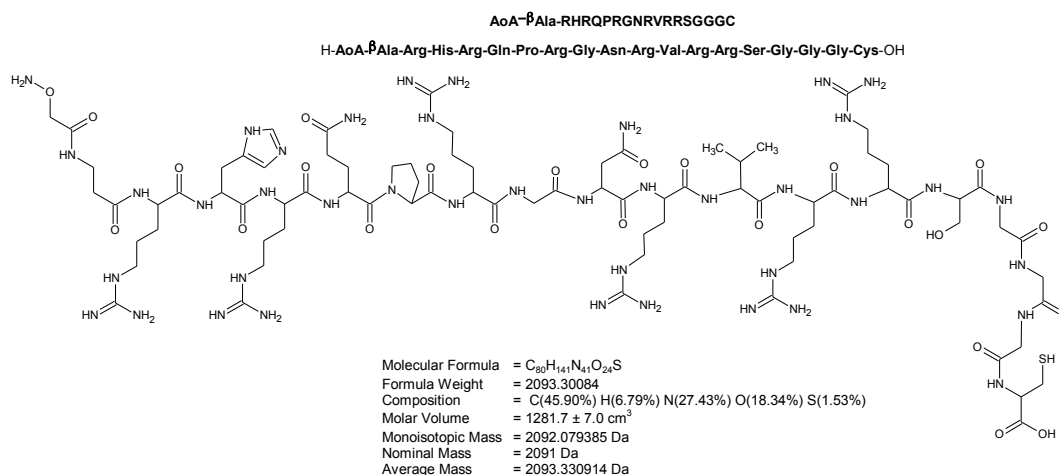


Figura 7.5, struttura molecolare del prodotto atteso "Pep-AoA", di cui al paragrafo 6.4.

La traccia cromatografica, di cui alla figura 6.5.1, mostra la predominanza di un picco con tempo di ritenzione di circa 9 minuti. Ci si aspetta che, per le ridotte dimensioni e la natura particolarmente idrofila del composto, non sia possibile osservare un segnale cromatografico del AoA non reagito, e che il tempo di ritenzione del peptide prima e dopo l'aggiunta di questo ultimo residuo non si modifichi considerevolmente. Alla luce di ciò, l'analisi cromatografica è indice della purezza della miscela, ma per confermare che la reazione sia andata a buon fine ci atteniamo all'analisi della massa isotopica.

Dal grafico riportato in figura 6.5.5 si analizzano i seguenti picchi principali:

	Segnali, (m/z)			Attribuzione
Miscela di reazione	(419,8·5)-5= 2094	(524,3·4)-4= 2093,2	(698,7·3)-3= 2093,1	AoA-Pep
Pep + AoA	(646,3·3)-3= 1935,9			des _{Arg} (AoA-Pep)

Tabella 7.6, analisi dello spettro di massa in figura 6.5.5.

7. Risultati e Discussione

La reazione della Doxorubicina con il peptide AoA-Pep ha presentato, invece, degli inconvenienti. La cinetica di reazione, contrariamente a quanto è possibile leggere in letteratura⁽¹⁴⁾, si è dimostrata molto più lenta.

Per verificare che non fosse un problema di concentrazione, si è provato a separare la miscela di reazione in due aliquote, una delle quali è stata liofilizzata e disciolta nuovamente in un volume minore degli stessi solventi. Come spiegato nel paragrafo 6.5, le miscele sono poi state chiamate “diluita” e “concentrata”. La reazione di entrambe è stata seguita con periodici prelievi e analisi cromatografiche.

In seguito si riportano le percentuali delle aree relative ai picchi delle varie frazioni estratte (vedi figura 6.5.4) rispetto all’area del picco della DOXO (frazione 6) nel medesimo cromatogramma (vedi tutti i cromatogrammi nelle figure 6.5.2 e 6.5.3).

	tempo di reazione	frazione 4	frazione 5	frazione 7
miscela "diluita"	5h	1,63%	-	4,68%
	22h	8,75%	-	1,56%
	48h	16,79%	1,89%	0,64%
	120h	50,08%	30,39%	12,26%
	168h	63,01%	43,11%	18,66%
	384h	90,80%	68,50%	30,90%
miscela "concentrata"	1h	12,00%	-	-
	74h	28,44%	21,25%	7,05%
	120h	29,88%	13,64%	9,96%
	360h	37,70%	10,50%	130,60%

Tabella 7.7,

analisi delle aree cromatografiche per le miscele di reazione nella sintesi del prodotto DOXO-AoA-Pep, percentuali relative al picco del reagente Doxorubicina (numero 6, figura 6.5.4).

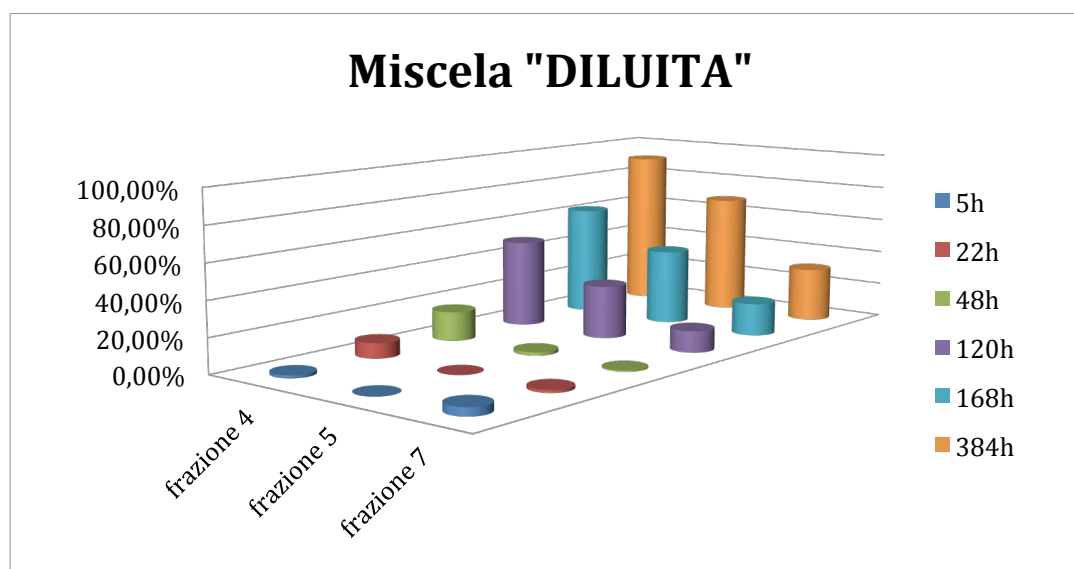


Figura 7.8, istogramma relativo alle percentuali della miscela “diluita” in tabella 7.7

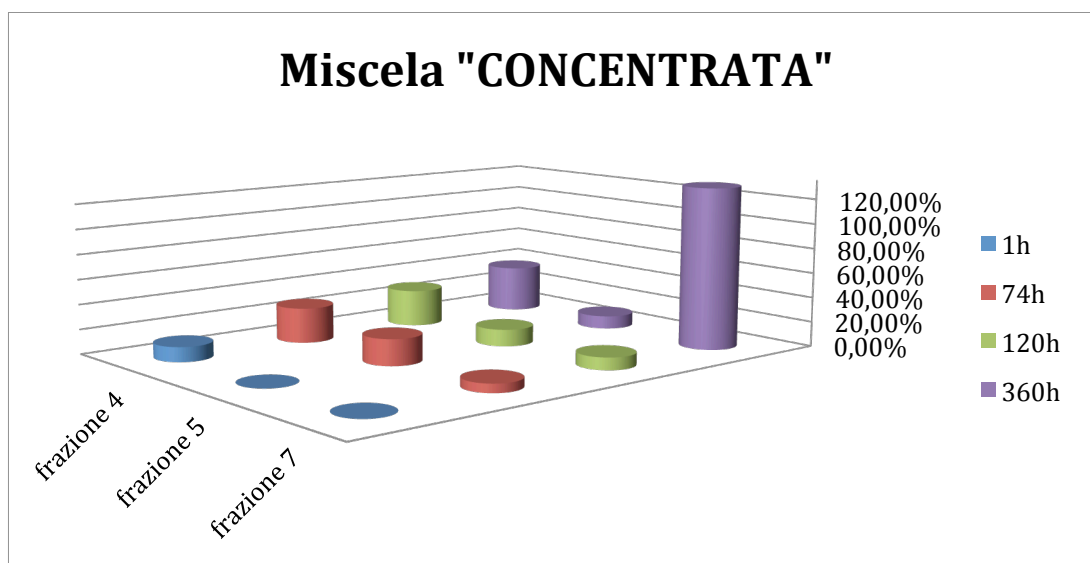


Figura 7.9, istogramma relativo alle percentuali della miscela "concentrata" in tabella 7.7

Questo tipo di valutazione mostra alcuni problemi per poter essere considerata di tipo quantitativo.

Un'analisi come questa, richiederebbe l'utilizzo di un riferimento interno che non venga coinvolto nella reazione, ma questo, per evitare interferenze, non è stato possibile. Non era altresì possibile un'attenta valutazione dei volumi dei prelievi a ogni analisi, in quanto le basse quantità utilizzate per la sintesi e il volume complessivo delle miscele di reazione, obbligavano a prelevare solamente il minimo indispensabile, spesso non facilmente quantificabile. E questo, in particolare, dal momento in cui la miscela è stata separata in due frazioni.

Per una valutazione qualitativa dell'andamento delle reazioni che si riferiscono alle figure 7.8 e 7.9, si è quindi scelto come picco di riferimento il segnale della Doxorubicina, per il motivo che esso cade in una zona relativamente libera da altri segnali e la sua area è, quindi, calcolabile ogni volta con buona precisione.

Dopo oltre due settimane di reazione, si è deciso di proseguire con la purificazione, il riconoscimento e l'isolamento dei prodotti mediante HPLC in colonna preparativa.

I campioni sono stati separati e analizzati e si riporta in seguito l'analisi degli spettri di massa caratteristici di ognuno (figure da 6.5.5 a 6.5.11).

7. Risultati e Discussione

Frazione e miscela	Figura di riferimento	Segnali significativi, (m/z)			Attribuzione
1 "diluita"	6.5.5	(427,4·5) -5= 2132	(534,3·4) -4= 2133,2	(750,0·3) -3= 2247	(AoA-Pep)+40; (AoA-Pep)+155
4 "diluita"	6.5.6	(524,7·5) -5= 2618,5	(655,6·4) -4= 2618,4		DOXO-AoA-Pep
4 "concentrata"	6.5.7	(338,6·2) -2= 675,2	676,3-1= 675,2		
5 "diluita"	6.5.8	(655,6·4) -4= 2618,4			DOXO-AoA-Pep
5bis "diluita"	6.5.9				nessun picco rilevante
6 "diluita"	6.5.10	544,2-1= 543,2	397,1-1= 396,1	399,1-1= 398,1	DOXO; DOXO senza zucchero
7 "diluita"	6.5.11	282,2-1= 281,2	337,1-1= 336,1	391,3-1= 390,3	

Tabella 7.10, analisi degli spettro di massa delle miscele di reazione descritte al paragrafo 6.5.

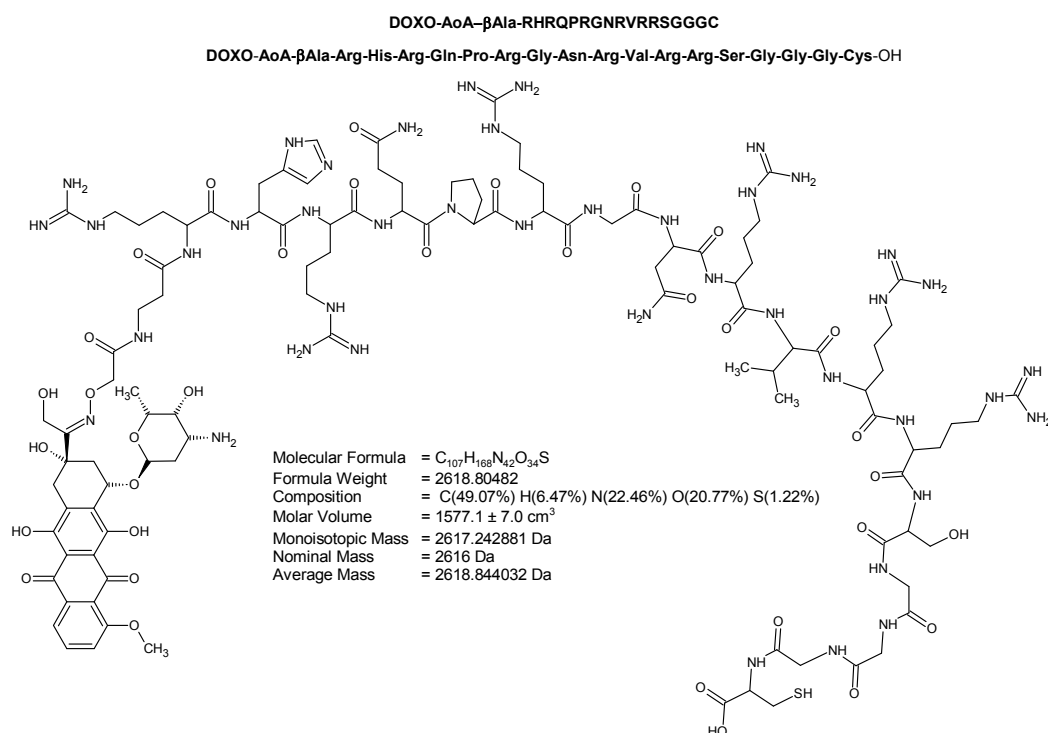


Figura 7.11, struttura molecolare del prodotto atteso "DOXO-AoA-Pep", di cui al paragrafo 6.5.

7. Risultati e Discussione

In tutti gli spettri di massa risulta un picco monocarica a circa $MW=235m/z$, che viene presunto come impurezza della vetreria o della strumentazione.

Non tutti i segnali sono stati identificati, alcune frazioni di estratto restano tuttora incognite.

La “pancia” degli spettri di massa si ritiene dovuta ad aggregazioni che limitano la volatilità degli analiti.

Le frazioni 4 e 5, corrispondenti al prodotto desiderato, sono state ulteriormente analizzate in HPLC per verificarne la purezza (figura 7.12).

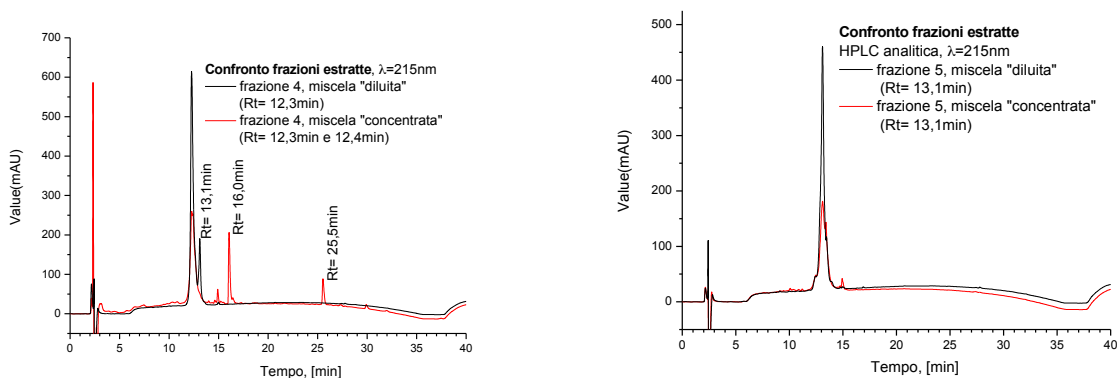


Figura 7.12, confronto delle tracce cromatografiche delle miscele “diluita” e “concentrata” per le frazioni 4 (a sinistra) e 5 (a destra); colonna Vydac C18 - grani 5 μ m, eluenti H₂O+0.1%TFA e H₂O:CH₃CN 90:10+0.1%TFA, rampa 5-100% in 30min, flusso 1,5mL/min

La frazione 4 “concentrata”, della quale non viene riportata l’analisi per spettrometria di massa, mostra una traccia cromatografica anomala: è presente il picco corrispondente al prodotto desiderato (per confronto con il picco della frazione 4 “diluita”), ma sono presenti un ulteriore segnale in corrispondenza del prodotto, un picco in corrispondenza della posizione della DOXO (per confronto con figura 6.5.1) e uno in corrispondenza della frazione 7. Si ritiene improbabile che questa evidenza derivi da un errore di raccolta in colonna preparativa: il tempo a disposizione per separare le frazioni è ampiamente sufficiente per operare con accortezza e, inoltre, manca la traccia della frazione 5, ovvero quella subito successiva.

Si pensa che sia più probabile che il prodotto DOXO-AoA-Pep si sia idrolizzato rilasciando l’Antraciclina (a causa della lunga permanenza in soluzione di eluente acido), ma anche questa ipotesi manca di alcune conferme: la prima è l’assenza del picco della frazione 1, attribuito ad AoA-Pep, la seconda è la presenza della traccia caratteristica della frazione 7, tuttora incognita.

La traccia cromatografica della frazione 4 “diluita” mostra un doppio picco; si ritiene che possa essere dovuto ad una imperfezione nella raccolta delle frazioni, dato che la successiva frazione 5 è a tempi molto prossimi.

Ciò non toglie il sospetto che i picchi delle frazioni 4 e 5 “diluita” possano nascondere i segnali dovuti a più di una specie, ma non è possibile un’adeguata caratterizzazione a causa della “pancia” degli spettri di massa.

Di questi campioni si registra lo spettro di assorbimento UV-vis (figura 6.5.12) e si cerca di calcolare la concentrazione del prodotto per confronto con uno spettro di assorbimento della DOXO·HCl a concentrazione nota di circa 0,5mM (figura 7.13).

7. Risultati e Discussione

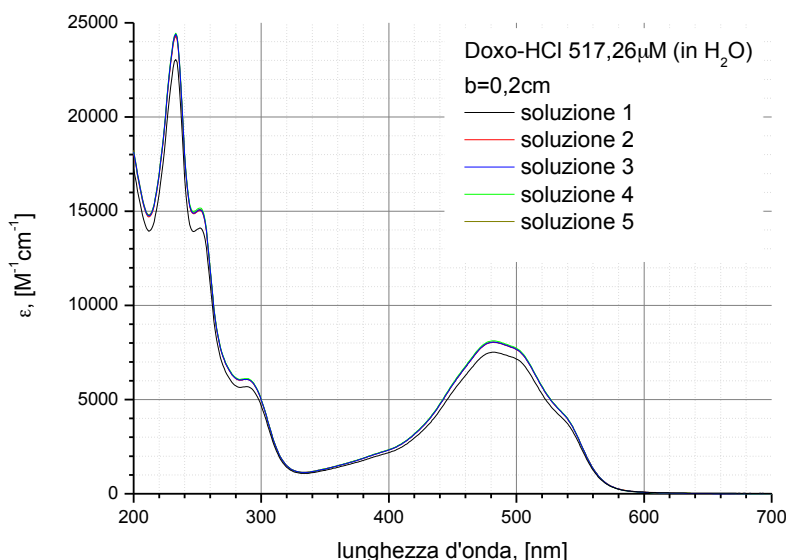


Figura 7.13, spettro di assorbimento di soluzioni Doxorubicina-HCl a titolo noto in solvente acquoso.

Si determina un coefficiente di estinzione molare alla lunghezza d'onda di 480nm, calcolato da 5 campioni di soluzione di DOXO-HCl 517,26 μ M. Si decide di escludere il valore derivante dallo spettro numero 1 perché discosta eccessivamente dalle altre prove.

campione	1	2	3	4	5
ϵ_{480nm} , [M ⁻¹ cm ⁻¹]	7503,161	8026,357	8107,003	8037,668	8045,435
media (escluso campione 1)	8054,116				

Tabella 7.14, determinazione del coefficiente di estinzione molare della Doxorubicina-HCl in solvente acquoso.

La concentrazione dei campioni di DOXO-AoA-Pep viene calcolata sulla frazione dello spettro di assorbimento inerente esclusivamente al contributo della Doxorubicina. Un'eventuale formazione del disolfuro (per i tioli delle cisteine del peptide), con conseguente fusione di due catene peptidiche, non crea problemi nel calcolo poiché si riesce comunque ad indicare la concentrazione di residui peptidici nei quali la reazione di *coupling* via ossima è andata a buon fine.

	assorbanza 480nm	[DOXO], mM
frazione 4 miscela "diluata"	2,819	1,75
frazione 5 miscela "diluata"	2,613	1,62

Tabella 7.15, concentrazione delle soluzioni di DOXO-AoA-Pep ottenute dalla sintesi descritta nel paragrafo 6.5

Alla luce dei dati ottenuti pare che la sintesi di DOXO-AoA-Pep riesca meglio nelle condizioni della miscela "diluata".

Non è chiaro quale sia il motivo per il quale la miscela "concentrata" abbia dato risultati più deludenti, ma la predominanza della frazione 7 fa pensare che, in qualche modo, la Doxorubicina sia andata incontro a processi degradativi che non sono stati altrettanto efficaci nella miscela "diluata".

7. Risultati e Discussione

Il tempo per raggiungere un ottimale accumulo di prodotto appare molto diverso rispetto a quanto riportato in letteratura: da 24 a 48h⁽¹⁴⁾. La ragione potrebbe essere ricercata in un errato controllo del pH nella miscela di reazione. Per i motivi, già citati, di utilizzo di piccoli volumi di reazione e la presenza di soluzioni colorate, si è dovuto fare affidamento unicamente sulla soluzione tampone di acido acetico/acetato di sodio, senza poter verificare ulteriormente il pH nel pallone di reazione.

L'ultimo stadio nella sintesi del campione LucDOX3 è la coordinazione sulle AuNPs.

Il calcolo della quantità di DOXO-AoA-Pep legata alle particelle avviene per analisi della concentrazione del reagente residuo a seguito della purificazione delle AuNPs.

I riferimenti REF1 e REF2 servono per avere un confronto dello spettro che ci aspetteremmo se neppure una molecola di DOXO-AoA-Pep si fosse legata sulle AuNPs.

In seguito vengono presentati gli spettri UV-vis di queste due soluzioni, confrontate con le soluzioni surnatanti ottenute dalla purificazione, tramite centrifugazione, delle particelle a seguito della reazione con il DOXO-AoA-Pep (figura 7.16).

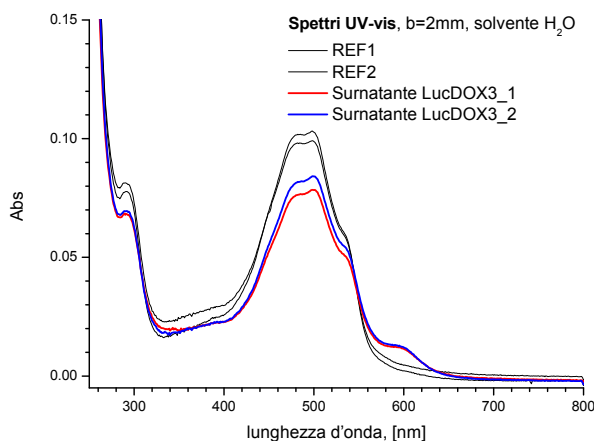


Figura 7.16, spettri di assorbimento dei riferimenti di DOXO-AoA-Pep e delle soluzioni ottenute dalla purificazione delle particelle, come descritto nel paragrafo 6.6.

Dal valore del coefficiente di estinzione molare della Doxorubicina in solvente acquoso, calcolato precedentemente, si valuta la concentrazione di DOXO-AoA-Pep nei riferimenti RIF1 e RIF2. La media è di [DOXO-AoA-Pep]=62 μ M.

In seguito si riportano i risultati della determinazione della concentrazione delle soluzioni surnatanti e della resa di coordinazione sulle AuNPs.

	Abs _{480nm}	concentrazione, μ M	moli in 520 μ L
surnatante LucDOX3_1	0,07615	47,27	2,46 $\cdot 10^{-8}$
surnatante LucDOX3_2	0,08138	50,56	2,63 $\cdot 10^{-8}$

Tabella 7.17, determinazione della concentrazione delle soluzioni surnatanti. Si ricorda che il volume complessivo comprende 20 μ L della soluzione di DOXO-AoA-Pep più una aggiunta in un secondo momento di 500 μ L di H₂O, vedi paragrafo 6.5.

7. Risultati e Discussione

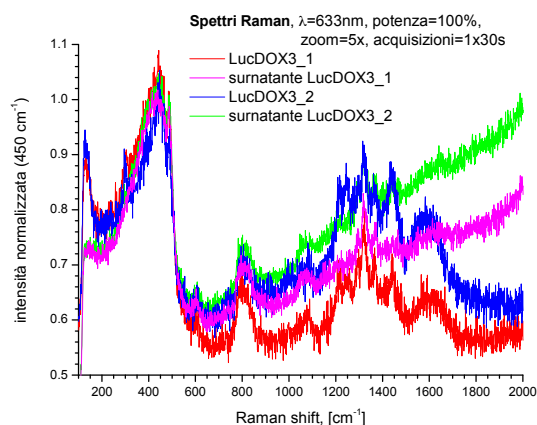
	moli di DOXO-AoA-Pep coordinate alle AuNPs	resa di coordinazione, %	resa di coordinazione media, %
LucDOX3_1	$7,75 \cdot 10^{-9}$	24	21,5
LucDOX3_2	$6,06 \cdot 10^{-9}$	19	

Tabella 7.18, determinazione della resa di coordinazione di DOXO-AoA-Pep sulle particelle. Il dato di moli coordinate alle AuNPs è ottenuto per differenza del numero di moli di reagente nelle soluzioni RIF1 e RIF2 (al volume di 520 μ L) con il numero di moli di composto trovato nelle soluzioni surnatanti.

Negli spettri di assorbimento dei surnatanti, figura 7.16, si nota la presenza di una piccola spalla a circa 600nm, assente nei riferimenti. Si presume che questo segnale sia dovuto a delle particelle residue, coordinate con il substrato e mantenute in soluzione.

Per verificare questa possibilità vengono confrontati gli spettri SERS dei campioni LucDOX3 e delle soluzioni dei surnatanti.

Figura 7.19, spettri di scattering Raman dei campioni LucDOX3 e delle soluzioni di surnatanti.



Osservando i grafici, si nota la caratteristica serie di segnali dell'Antraciclina nei campioni LucDOX3 (zona tra 1200 e 1500 cm^{-1}) e l'assenza di qualsiasi tipo di segnale caratteristico per le soluzioni dei surnatanti.

Le informazioni che si traggono da questa analisi sono principalmente due:

- la presenza della Doxorubicina è visibile solo per campioni LucDOX3, benché contengano solo un quarto circa della quantità presente nelle soluzioni di surnatanti; questo unicamente grazie al potere "amplificante" della tecnica SERS
- l'assenza di enhancement può indicare che le presunte particelle legate al peptide non siano aggregate, in questo caso il sistema è certamente più dissolvibile in soluzione e manca della geometria necessaria alla presenza degli *Hot Spot*, notoriamente importanti per l'effetto SERS.

La presenza della spalla a 600nm è allora da attribuirsi a particelle presenti in tracce. Si ricorda che le AuNPs utilizzate in questa preparazione hanno un coefficiente di estinzione molare dell'ordine di 10^8 (vedi paragrafo 6.6), mentre quello calcolato per la Doxorubicina in acqua è solo di $8 \cdot 10^3$.

LucDOX1, LucDOX2 e LucDOX3 sono stati utilizzati per test di citotossicità (vedi paragrafo 5.5.6) su colture di cellule HELA presso i laboratori del Dipartimento di Patologia, Sezione di Immunologia del Policlinico "GB Rossi" di Verona, dal gruppo di ricerca del Prof. Marco Colombatti.

Di seguito si riportano i risultati ottenuti fino ad ora.

7. Risultati e Discussione

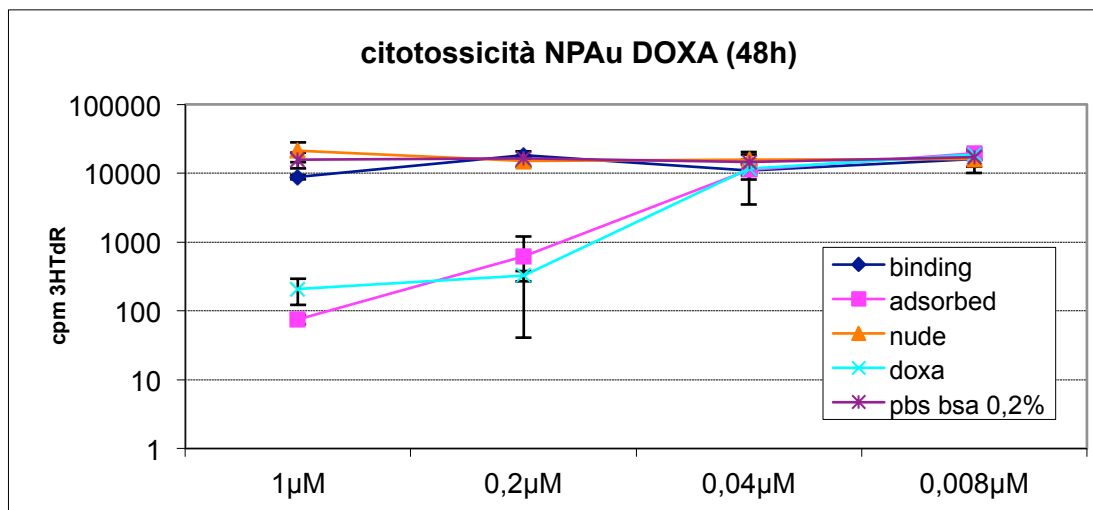


Figura 7.20, analisi di citotossicità per i campioni: LucDOX1 (“binding”), LucDOX2 (“adsorbed”), AuNPs ricoperte con M-PEG-SH e BSA (“nude”), una soluzione di Doxorubicina circa 10 μM (“doxa”) e una soluzione di BSA in PBS allo 0,2% (“pbs bsa 0,2%”). Il protocollo adottato segue quanto descritto nel paragrafo 5.5.6. In ascissa abbiamo le concentrazioni dei campioni, in ordinata la percentuale di vitalità delle cellule post-trattamento.

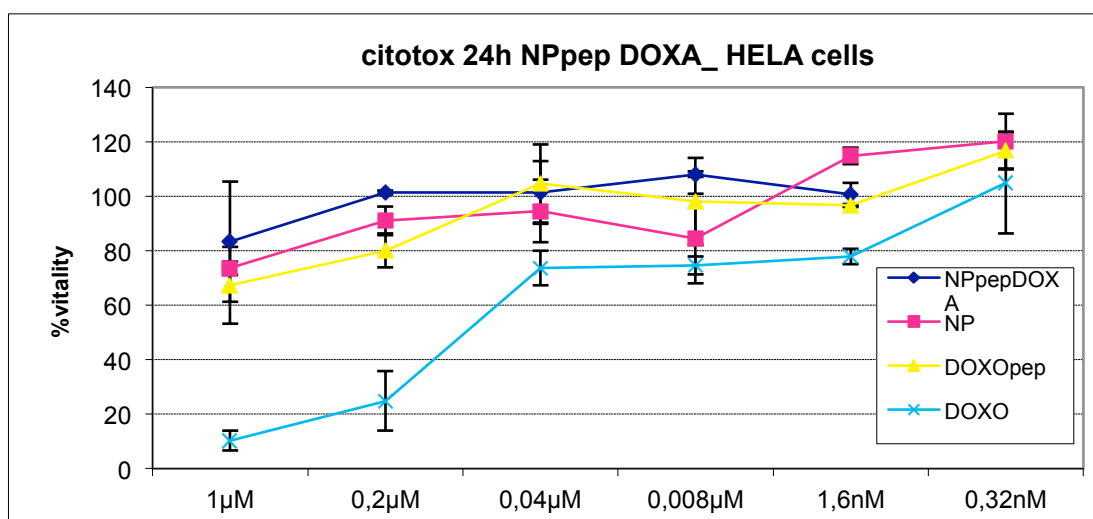


Figura 7.21, analisi di citotossicità per i campioni: LucDOX3 (“NPpepDOXA”), AuNPs ricoperte con M-PEG-SH e BSA (“NP”), una soluzione di DOXO-AoA-Pep 9,6 μM (“DOXOpep”) e una soluzione di Doxorubicina 11,3 μM (“DOXO”). Il protocollo adottato segue quanto descritto nel paragrafo 5.5.6. In ascissa abbiamo le concentrazioni dei campioni, in ordinata la percentuale di vitalità delle cellule post-trattamento.

Quello che emerge da queste prime analisi deve essere interpretato con molta cautela.

Le preparazioni della serie LucDOX vorrebbero coprire tutto l’intervallo di attività citotossica, passando da un potenziale prossimo a quello della Doxorubicina non coordinata (LucDOX2) a uno pressoché inerte tipico delle sole AuNPs (LucDOX1). Una via intermedia dovrebbe essere rappresentata dalla preparazione LucDOX3.

In effetti, il grafico ripotato in figura 7.20 pare confermare le previsioni per LucDOX1 e LucDOX2. Dove l’Antraciclina è legata più debolmente, si osserva una attività pressoché identica a quella mostrata dalla DOXO tal quale (“adsorbed” con “doxa”). Dove il farmaco è invece legato in modo stabile, non si osserva tossicità (“binding” con “nude”). Questi primi risultati incoraggianti vanno però contestualizzati.

Mentre, da un lato, l’effetto citotossico di LucDOX2 è certamente legato alla presenza di Doxorubicina, e questa ha certamente la possibilità di essere liberata in

7. Risultati e Discussione

un ambiente aggressivo come quello intracellulare, dall'altra l'effetto inerte di LucDOX1 può derivare sia da un forte legame della DOXO sulla superficie metallica, sia dalla scarsa presenza di farmaco nel campione. In effetti, verificare l'avvenuta reazione della Doxorubicina con il 2-iminotiolano non è stato possibile e una quantificazione della resa di coordinazione per entrambi LucDOX1 e LucDOX2, di fatto, non c'è stata.

Per quanto concerne LucDOX3, l'analisi di citotossicità pare fornire un risultato negativo. Dai dati in nostro possesso pare che sia LucDOX3, che la soluzione di riferimento di DOXO-AoA-Pep ("NPpepDOXA" e "DOXOpep") siano meno attivi della soluzione di Doxorubicina ("DOXO").

Per verificare se la natura della scarsa attività citotossica, mostrata in figura 7.21, sia dovuta alla concentrazione, è stato effettuato un test su cellule *PC3wt* unicamente con una soluzione di riferimento DOXO-AoA-Pep.

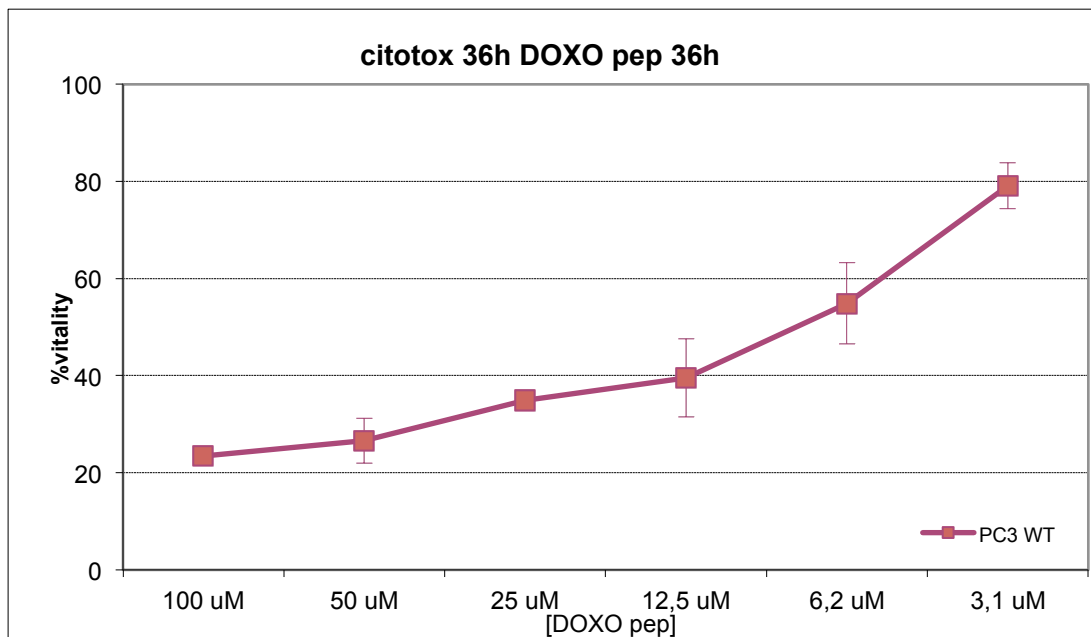


Figura 7.22, analisi di citotossicità per il campione DOXO-AoA-Pep su coltura di cellule *PC3wt*. Il protocollo adottato segue quanto descritto nel paragrafo 5.5.6.

Il grafico di figura 7.22 fornisce la prova che il substrato DOXO-AoA-Pep è potenzialmente attivo. Nei test di figura 7.21, il campione non ha mostrato la sua attività citotossica per un motivo di eccessiva diluizione, infatti il valore di maggior concentrazione, del grafico 7.21, è di circa $1\mu\text{M}$.

Sebbene i due test siano stati condotti su due differenti linee cellulari, *HELA* nel primo e *PC3wt* nel secondo, dal confronto si può trarre una importante informazione circa la diminuzione di attività della Doxorubicina se somministrata nella forma DOXO-AoA-Pep. Nel grafico di figura 7.21, la vitalità cellulare dovuta alla somministrazione della soluzione di [Doxorubicina] $\approx 0,23\mu\text{M}$ ("DOXO"), è circa del 25%. Nel grafico 7.22 si ha una vitalità del 23% dopo trattamento con la soluzione di DOXO-AoA-Pep circa $100\mu\text{M}$. L'attività del farmaco è diminuita di circa 400 volte. Il dato di diminuzione di attività rappresenta però solamente una stima, poiché le colture cellulari trattate, come già detto, e i tempi di esposizione al trattamento, sono diversi.

7. Risultati e Discussione

Per la natura di LucDOX3, che dovrebbe prevedere un metabolismo del profarmaco affinché si presenti nella sua forma attiva, non sono sufficienti queste preliminari analisi di citotossicità e avanzare qualsivoglia teoria è decisamente precoce.

Nella serie AbDOX si è sintetizzata una piccola libreria di aggregati di AuNPs funzionalizzate per mostrare *targeting*, *imaging*, citotossicità e combinazioni di queste.

La sintesi di tutti i componenti della serie è avvenuta in parallelo, così da standardizzare il più possibile le condizioni di produzione di ogni campione.

Le valutazioni delle rese di coordinazione dell'anticorpo, del Texas Red e della Doxorubicina sono state compiute secondo gli stessi principi e le stesse modalità viste già per il campione LucDOX3.

Il colorante Texas Red mostra buona affinità per le particelle e l'analisi dei surnatanti della purificazione delle AuNPs non ne mostrano alcuna traccia.

Le rese di funzionalizzazione della Doxorubicina restano in linea con i risultati ottenuti per il campione LucDOX3, con un piccolo margine di miglioramento, come mostrato in figura 7.23.

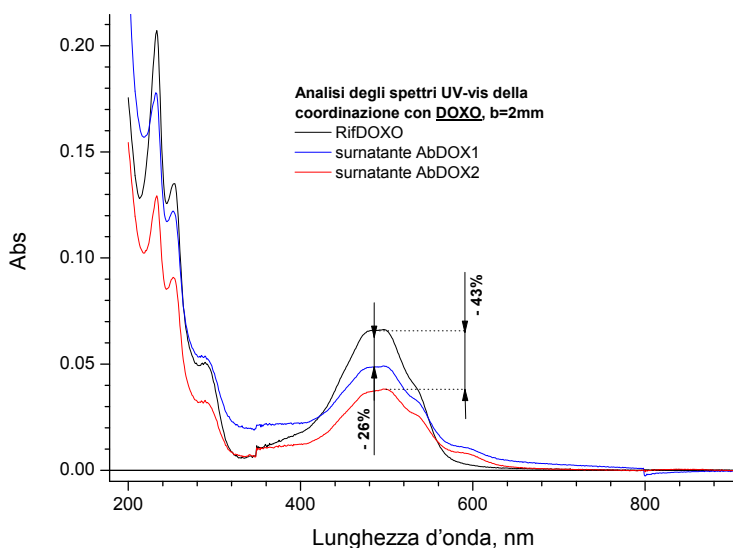


Figura 7.23, analisi della resa di coordinazione della Doxorubicina sulle AuNPs dei campioni AbDOX1 e AbDOX2. Le soluzioni surnatanti sono prese al passaggio di purificazione successivo alla reazione di coordinazione con la DOXO, vedi schema in figura 6.6.3. Il calcolo effettuato è analogo a quello per le tabelle 7.17 e 7.18.

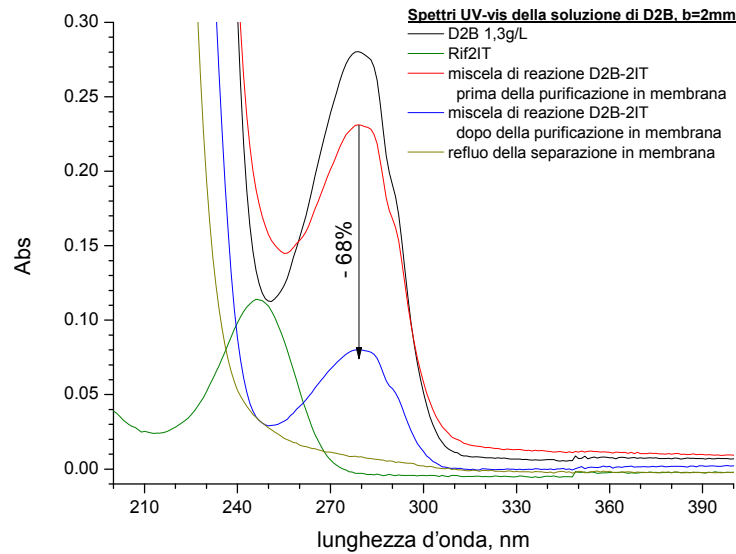
La reazione con l'anticorpo è invece quella che porta alla resa minore.

Prima di poter essere posto a reagire con le particelle, il D2B viene funzionalizzato per garantire un efficace sito di legame sulla superficie metallica. Questo avviene con il 2-iminotiolano, come spiegato nel paragrafo 5.2 e 6.7.

La reazione è semplice e si svolge a temperatura ambiente e in solvente acquoso. La miscela di reazione, prima di essere purificata, sembra non mostrare tracce di reagente 2IT non reagito ("Rif2IT") e la soluzione filtrata dalla membrana presenta un segnale molto basso sia nella zona tipica dell'anticorpo (280nm), sia in quella tipica del 2IT (250nm), come si può vedere in figura 7.24.

7. Risultati e Discussione

Figura 7.24, analisi della resa di reazione dell'anticorpo D2B con il 2IT, di cui al paragrafo 6.7. "D2B 1,3g/L" è la soluzione reagente. La miscela di reazione prima della purificazione in membrana risulta diluita rispetto alla soluzione iniziale per l'aggiunta del tampone di NaHCO_3 e del 2IT. Dopo la purificazione in membrana pososa, e raccolta del filtrato, si nota una perdita di anticorpo del 68%.



Si presume che la scarsità di anticorpo raccolto dalla membrana sia dovuta al meccanismo di purificazione. Probabilmente, il D2B è rimasto fortemente adeso nei pori del filtro a seguito del trattamento in centrifuga e non è stato più possibile recuperarlo per intero.

La resa di coordinazione con le particelle è quindi fortemente inficiata dalla perdita di substrato durante la fase di preparazione dell'anticorpo.

In figura 7.25 viene mostrata la resa di coordinazione del D2B sugli aggregati di AuNPs.

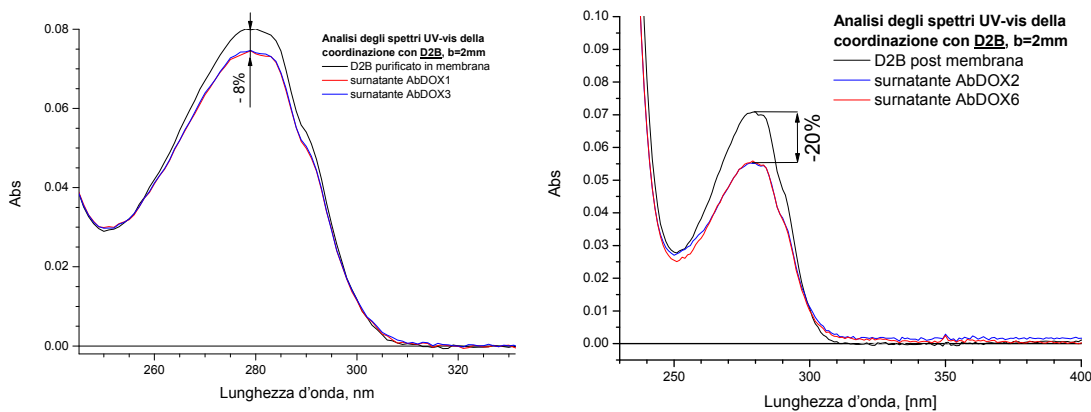


Figura 7.25,

analisi della resa di reazione dell'anticorpo D2B con le AuNPs.

I campioni sono stati trattati in coppia e si nota una migliore adesione in quella dei campioni AbDOX2 e AbDOX6, rispetto alla coppia AbDOX1 e AbDOX3. La ragione di questa diversità non è chiara.

L'evidenza più rilevante, che merita una particolare riflessione, riguarda gli spettri SERS dei campioni finiti (figure da 6.6.4 a 6.6.9).

AbDOX1, AbDOX3 e AbDOX4 mostrano il noto spettro del Texas Red, molto intenso grazie alla risonanza del colorante con il plasmon superficiale e con la radiazione laser (vedi capitolo 3).

Gli spettri dei preparati AbDOX2, AbDOX5 e AbDOX6 mostrano invece delle tracce anomale in tutto l'intervallo spettrale esaminato.

Confrontando i dati si è riscontrato che l'inquinante è probabilmente il medesimo per tutti e si presume che possa essere un altro colorante, rispetto al Texas Red, capace di generare effetto SERRS: la Malachite Green, di cui in figura 7.26.

7. Risultati e Discussione

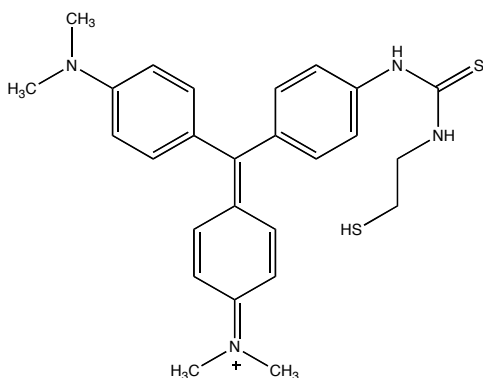


Figura 7.26,
struttura molecolare del colorante Malachite Green-SH.

Questo composto è utilizzato nello stesso laboratorio dove sono state eseguite le sintesi dei campioni della serie AbDOX. Viene utilizzato come *SERRS probe*, esattamente come il Texas Red.

L'ipotesi che l'inquinante possa essere questo, deriva dal confronto con un suo spettro SERRS su un supporto di soluzione colloidale di aggregati di AuNPs.

Posto a reagire nelle stesse condizioni e proporzioni usate per il Texas Red nel paragrafo 6.7, la Malachite Green-SH mostra uno spettro di scattering Raman molto intenso, riportato nel confronto di figura 7.27.

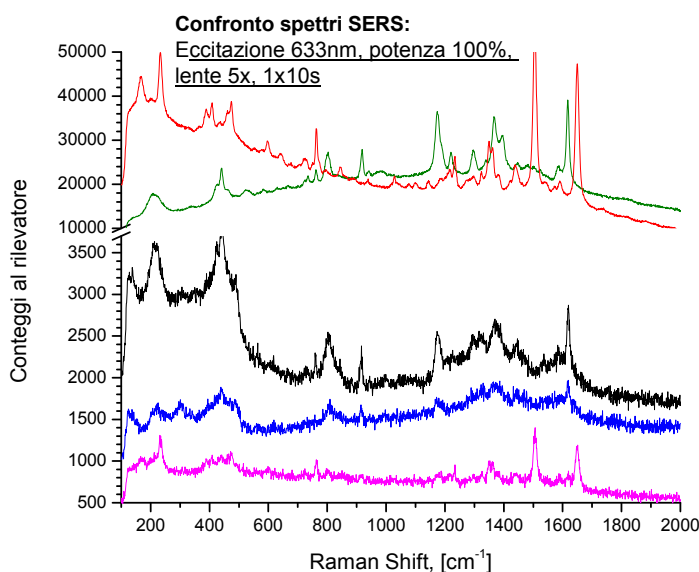


Figura 7.27,
confronto tra gli spettri SERS di:
AuNPs + MalachiteGreen-SH;
AbDOX1;
AbDOX2;
AbDOX5;
AbDOX6

Il riscontro è inequivocabile. La caratteristica di *SERRS probe* della Malachite Green fa sì che anche piccole tracce possano essere rivelabili. Lo spettro "*AuNPs+MalachiteGreen-SH*", riportato in figura 7.27, è infatti derivante da una concentrazione di colorante nel campione di circa 10^{-6} M, come del resto vale anche per il Texas Red in "*AbDOX1*".

L'inquinante potrebbe essere entrato in contatto con i campioni in qualsiasi fase della loro preparazione, tanto più se ad una concentrazione così bassa come si presume.

Lo spettro di AbDOX6 mostra un altro segnale di scattering, estraneo alla Malachite Green, intorno ai 1500cm^{-1} e 1650cm^{-1} . Questo è però riconducibile al Texas Red, anch'esso presente come contaminante in tracce.

In figura 7.28 si presentano le valutazioni di efficacia dell'anticorpo come strumento di riconoscimento di cellule che esprimono PSMA (*Prostate Specific Membran Antigen*).

7. Risultati e Discussione

Le analisi di citofluorimetria sono state compiute, secondo la metodica già descritta nel paragrafo 5.5.5, su colture di cellule della linea *LNCaP*, le quali esprimono il PSMA.

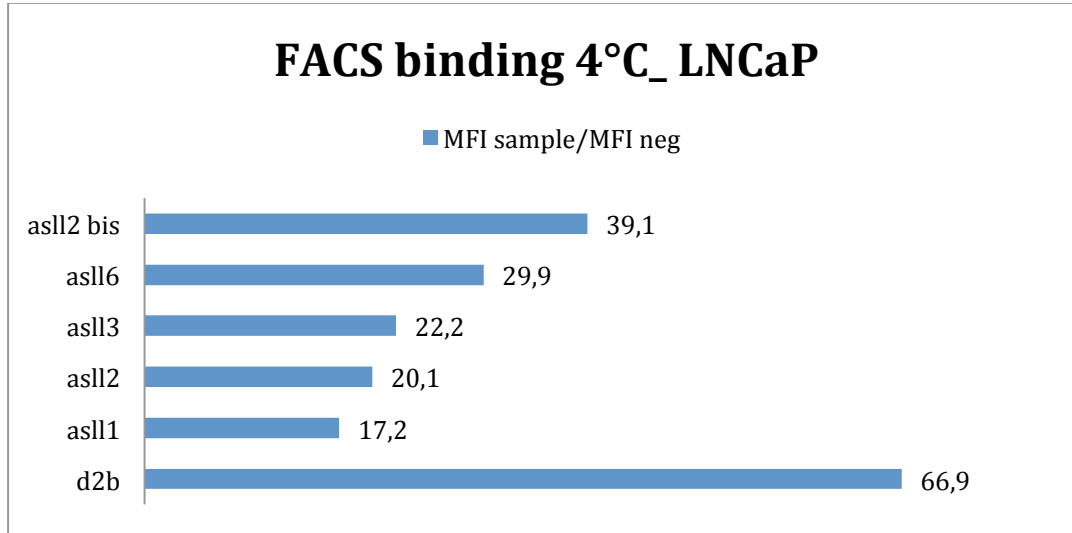


Figura 7.28, risultati dell'analisi di citofluorimetria per i campioni AbDOX1 ("asll1"), AbDOX2 ("asll2" e "asll2 bis"), AbDOX3 ("asll3") e AbDOX6 ("asll6"). Come riferimento positivo è presentato un campione di solo anticorpo D2B ("d2b"). Il dato riportato per ogni analisi corrisponde al rapporto tra il conteggio delle cellule per il campione analizzato rispetto al conteggio per un campione negativo, che non ha l'anticorpo per l'antigene PSMA.

Il dato per il campione AbDOX2 viene valutato in due analisi perché è stato preparato in due aliquote.

I preparati analizzati mostrano un efficace effetto di targeting, infatti i campioni AbDOX risultano da 17 a 39 volte più affini alle cellule che esprimono PSMA, di quanto non lo sia un campione privo di anticorpo.

La valutazione più importante che se ne trae è che l'anticorpo, una volta coordinato sui sistemi di aggregati di AuNPs, mantiene la sua attività verso l'antigene, e tutto il sistema nanometrico può beneficiare della selettività propria del D2B verso il PSMA. I campioni AbDOX4 e AbDOX5 non sono ancora stati testati in prove di citofluorimetria, ma ci si aspetta per loro un rapporto *MFI sample/MFI neg* molto prossimo ad uno.

Le proprietà di *imaging* di campioni analoghi ad AbDOX3, ovvero aggregati di AuNPs con l'anticorpo e il Texas Red coordinati sulla superficie, vengono studiate per avere una conferma della presenza di colorante sulle particelle anche successivamente all'adesione sulle cellule.

Una coltura di cellule *LNCaP*, viene trattata con AbDOX3 e poi lavata per rimuovere l'eventuale substrato non aderito alla membrana. I lavaggi assicurano che solamente un'interazione forte del tipo anticorpo/ antigene possa garantire l'adesione delle particelle alla superficie cellulare. Le stesse sono poi fissate in dei vetrini e analizzate per spettroscopia micro Raman, vedi figura 7.29.

L'analisi permette di registrare il segnale di scattering solamente dove si direziona il raggio laser. Si apprezzano spettri intensi sulle cellule e molto deboli sul fondo del vetrino. Le proprietà di *imaging* sono, quindi, confermate con ottimi risultati.

7. Risultati e Discussione

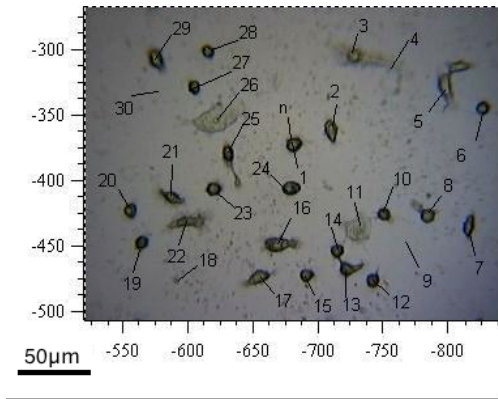
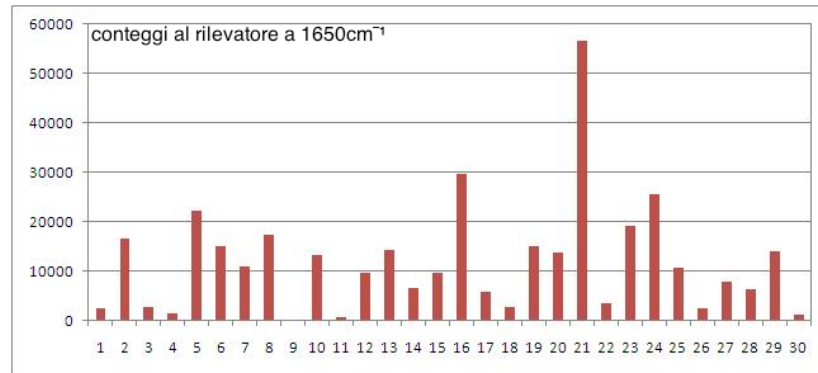


Figura 7.29, analisi micro Raman di un vetrino dove sono state depositate cellule che esprimono PSMA, trattate con un campione analogo ad AbDOX3.

A sinistra: immagine al microscopio del campione di cellule analizzato, i numeri indicano le zone analizzate con il raggio laser.

Sotto: istogramma dei segnali acquisiti in corrispondenza delle zone indicate nella foto.

Condizioni sperimentali: eccitazione 633nm, potenza 10%, lente 20x, una acquisizione da 10s.



Tutta la serie AbDOX viene quindi utilizzata per test di citotossicità, analogamente a come fatto già per i campioni della serie LucDOX.

Le analisi vengono fatte su due tipi di linee cellulari, una è del tipo *PC3wt* e non esprime l'antigene di membrana PSMA, l'altra è la linea *LNCaP*, che invece lo esprime. È chiaro quanto siano importanti queste misure, infatti possono fornire informazioni sulle capacità selettive della serie AbDOX.

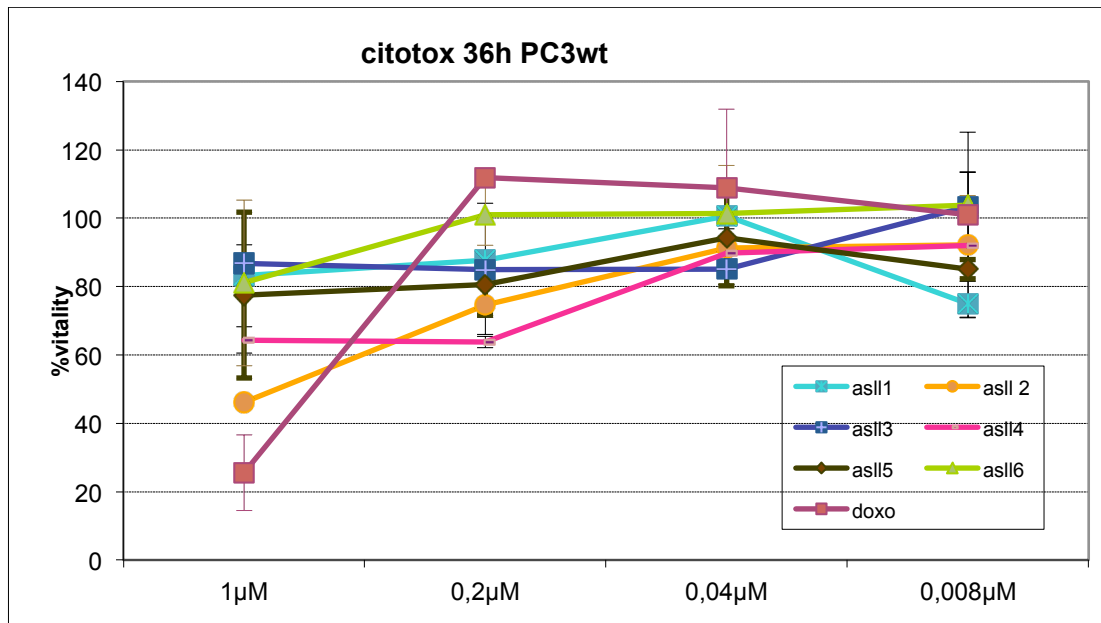


Figura 7.30, analisi di citotossicità su cellule *PC3wt* (che non esprimono PSMA) per i campioni AbDOX1 ("asll1"), AbDOX2 ("asll2"), AbDOX3 ("asll3"), AbDOX4 ("asll4"), AbDOX5 ("asll5"), AbDOX6 ("asll6") e una soluzione di riferimento di Doxorubicina 10µM ("doxo"). Il protocollo utilizzato segue i principi descritti nel paragrafo 5.5.6. In ascissa abbiamo le concentrazioni dei campioni, in ordinata la percentuale di vitalità delle cellule post-trattamento.

7. Risultati e Discussione

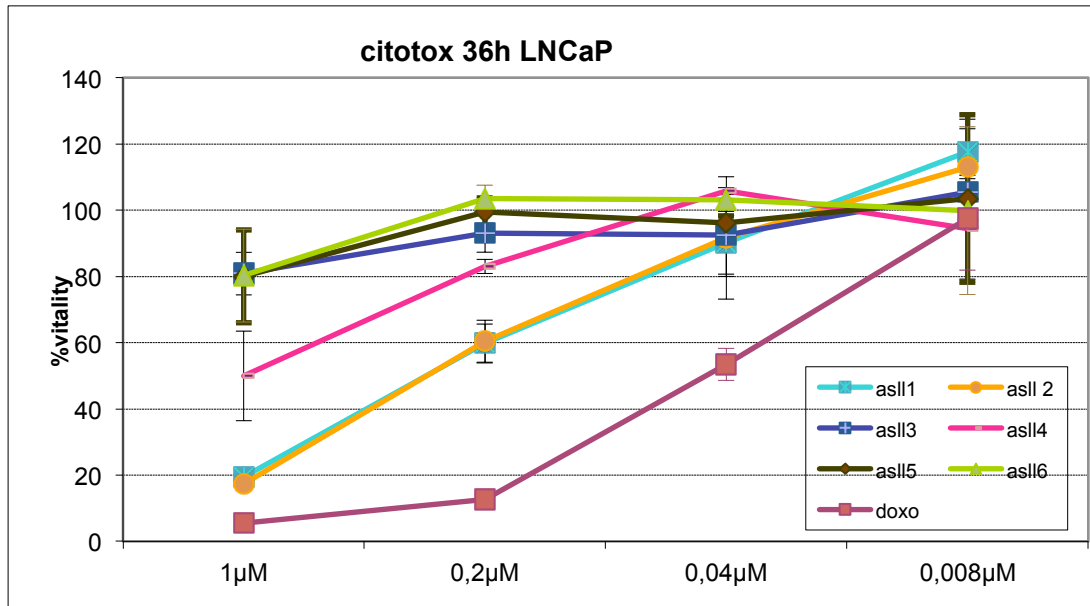


Figura 7.31, analisi di citotossicità su cellule LNCaP (che esprimono PSMA) per i campioni AbDOX1 ("asll1"), AbDOX2 ("asll2"), AbDOX3 ("asll3"), AbDOX4 ("asll4"), AbDOX5 ("asll5"), AbDOX6 ("asll6") e una soluzione di riferimento di Doxorubicina 10µM ("doxo"). Il protocollo utilizzato segue i principi descritti nel paragrafo 5.5.6. In ascissa abbiamo le concentrazioni dei campioni, in ordinata la percentuale di vitalità delle cellule post-trattamento.

Richiamando la natura dei campioni lungo la serie AbDOX, supponiamo che solo i campioni AbDOX1 e AbDOX2, che contengono Doxorubicina, debbano mostrare una certa tossicità.

I risultati mostrano un andamento pressoché uniforme per il test su cellule PC3wt. In queste, il riferimento di Doxorubicina appare il più efficace ad alte concentrazioni, mentre si uniforma rapidamente agli altri campioni quando sottoposto in soluzioni più diluite. Nella serie AbDOX non si può riconoscere nessun elemento che si differenzi univocamente dagli altri. Sia i preparati con Doxorubicina, sia quelli che ne sono privi, così come quelli con anticorpo e senza, mostrano uguale scarsità di effetti citotossici.

Nelle analisi condotte con cellule LNCaP, tuttavia, si osserva un'azione molto più decisa della Doxorubicina di riferimento e due campioni su tutti paiono differenziarsi dagli altri: AbDOX1 e AbDOX2. Questi due preparati segnano andamenti pressoché sovrapposti e costantemente meno efficaci della soluzione di Doxorubicina di un fattore ≈ 5 in concentrazione (lo stesso valore di vitalità mostrato a concentrazione 5 volte maggiore). Quando le soluzioni si fanno maggiormente diluite, le differenze si assottigliano e tutti i test mostrano scarsi effetti nocivi. Tutti gli altri campioni restano costantemente in linea con i risultati ottenuti dalle cellule PC3wt.

Un'anomalia evidente è la grande differenza di efficacia per la soluzione di Doxorubicina, passando da PC3wt a LNCaP. Essendo due linee cellulari distinte, è plausibile aspettarsi una diversa sensibilità al farmaco, ma nessuna delle analisi proposte permette di approfondire questa supposizione.

Alla luce di questa differenza si possono confrontare i diversi risultati paragonando i campioni di uno stesso esperimento.

Sicuramente, nelle cellule LNCaP, l'efficacia dell'anticorpo è già stata confermata con i test di citofluorimetria. Quindi, tutti i campioni di AbDOX, tranne forse AbDOX4 e AbDOX5, durante l'esperimento di citotossicità, si saranno trovati adesi alla membrana cellulare. Forse alcuni saranno stati internalizzati in qualche lisosoma

7. Risultati e Discussione

e altri saranno solamente rimasti attaccati alla membrana nell'ambiente extracellulare.

È ragionevole pensare che nelle cellule PC3wt, il minor numero di aggregati di particelle che si sono trovati attaccati alla membrana cellulare (a causa della mancanza dell'interazione D2B-PSMA), abbiano portato ad un minor numero di eventi di internalizzazione.

Nelle cellule LNCaP, i campioni AbDOX1 e AbDOX2 internati nei lisosomi, avranno rilasciato almeno una parte della loro Doxorubicina. È altrettanto ragionevole supporre che la Doxorubicina sia stata rilasciata anche negli esperimenti con PC3wt, ma giacché si suppone un minor numero di eventi d'internalizzazione dei campioni, il farmaco sarà stato rilasciato maggiormente nell'ambiente extracellulare, con una conseguente diminuzione di efficacia.

Questa diminuzione di attività, nelle cellule PC3wt, porta a un livellamento delle tracce dei campioni AbDOX1 e AbDOX2, con quelle degli altri elementi della serie AbDOX.

In concomitanza alla tossicità dei campioni contenenti il farmaco, si nota l'inefficacia di AbDOX5 e AbDOX6. In entrambi gli esperimenti, questi due campioni occupano sempre la parte alta del grafico, rappresentando così gli elementi più innocui di tutta la serie AbDOX. Questo dato è importante tanto quanto quello di tossicità dei campioni contenenti la DOXO. Infatti, una condizione importante è quella di verificare che il supporto di AuNPs, l'anticorpo e il colorante SERS, siano inerti verso la cellula.

In uno studio di preparazioni come queste, ogni molecola viene inserita negli aggregati di AuNPs per una particolare funzione che le compete. È quindi importante che ognuna non interferisca con le funzioni specifiche delle altre.

7. Risultati e Discussione

8. Conclusioni

Questo progetto di tesi si è occupato dell'ingegnerizzazione di sistemi nanostrutturati adatti per l'imaging di cellule tumorali, per il drug delivery e il targeting del farmaco antitumorale Doxorubicina.

Per raggiungere lo scopo è stato studiato un metodo che permettesse il rilascio selettivo del farmaco mediante un peptide *clivable*, unito a un riconoscimento delle cellule da trattare ottenuto con un anticorpo.

Il raggiungimento concomitante di questi due obiettivi definisce un sistema a doppia selezione per l'attivazione degli effetti citotossici di un farmaco, che in questo progetto è la Doxorubicina, ma che potrebbe essere variato in funzione dell'obiettivo da raggiungere.

Gli effetti collaterali dei trattamenti antitumorali chemioterapici sono spesso molto aggressivi e invalidanti (vedi capitolo 1) e l'approccio proposto potrebbe limitarli drasticamente perché alla selezione imposta dall'anticorpo segue la presenza di uno specifico enzima che possa liberare il principio attivo.

Le potenzialità di un sistema di nanoparticelle di Au sono molteplici, la loro inerzia biologica le rende ottimi candidati per il ruolo di supporto di specie interagenti con cellule ed enzimi. Unitamente all'inerzia chimica, esse presentano molte altre caratteristiche ottiche interessanti. L'organizzazione di particelle in aggregati ha permesso la registrazione di spettri di scattering Raman di cromofori nell'intervallo di concentrazioni del range nanomolare. In letteratura, la tracciabilità di composti con queste caratteristiche è stato dimostrato essere possibile persino ai livelli di singola particella ⁽⁵⁴⁾.

La sintesi per *laser ablation* si è dimostrata un metodo semplice, veloce e versatile per la produzione di soluzioni colloidali di nanoparticelle di Au estremamente reattive, ma al contempo stabili allo stoccaggio a temperatura ambiente anche per mesi.

Le particelle così ottenute vengono manipolate e funzionalizzate nel pieno rispetto dei principi della *green chemistry*. Infatti, durante tutto lo svolgimento degli esperimenti di questo lavoro di tesi, sono stati utilizzati solventi organici solamente nelle reazioni riguardanti la sintesi e la funzionalizzazione peptidica.

Il grande potenziale dei sistemi nanoparticellari ai fini del drug delivery risiede, inoltre, nella elevata quantità di farmaco liberato per ogni evento positivo di internalizzazione. In altre parole, per ognuno dei nostri sistemi di aggregati di AuNPs che riesca ad entrare nell'ambiente intracellulare, esiste la possibilità di liberare migliaia di molecole di principio attivo.

In questo lavoro di tesi sono state preparate due serie di campioni, chiamate LucDOX e AbDOX.

La prima serie si concentra sullo studio del drug delivery, LucDOX1 presenta il farmaco legato in maniera covalente alla superficie delle particelle e non mostra attività citotossica. LucDOX2 porta con se la Doxorubicina adsorbita per deboli interazioni, e mostra una tossicità paragonabile al farmaco puro. Nel campione LucDOX3 si è introdotto un carattere di selettività, ovvero un peptide con siti di riconoscimento specifici per furine intracellulari. Il suo effetto citotossico si è dimostrato decisamente inferiore a quello della Doxorubicina pura, e sono tutt'ora in

8. Conclusioni

atto degli esperimenti per indagare il meccanismo proposto per il rilascio dell'agente antitumorale.

È auspicabile, in un prossimo futuro, la pianificazione d'indagini volte a caratterizzare le proprietà di liberazione del farmaco dal sistema di aggregati di AuNPs, e la concentrazione alla quale iniziano a manifestarsi effetti citotossici verso le cellule trattate. Questo dovrebbe portare informazioni sul taglio della catena peptidica da parte degli enzimi intracellulari.

AbDOX1 rappresenta l'embrione dell'idea che sta alla base del progetto di questa tesi: la concomitanza di reali proprietà di targeting, imaging e drug delivery.

La serie dei campioni AbDOX avrà una particolare importanza nella valutazione di come i sistemi nanostrutturati sintetizzati interagiscono con le cellule.

Alcune delle prime domande alle quali si hanno, per ora, solo risposte preliminari, e quindi da confermare, sono:

- i campioni AbDOX mostrano effetti di citotossicità? E nella serie AbDOX, la citotossicità è limitata ai campioni con Doxorubicina? Alcuni dati raccolti in queste ultime settimane sembrano indicare che la presenza della Doxorubicina sia determinante perché si noti una tossicità cellulare.
- è possibile l'imaging selettivo di cellule che esprimono PSMA, grazie al segnale SERS? In questo caso vi sono un po' di più dati da studi paralleli a questo lavoro di tesi e il risultato è certamente positivo anche se la presenza del farmaco potrebbero cambiare alcune conclusioni.
- i preparati senza anticorpo, mostrano una qualche selettività? A volte ci possono essere delle interazioni aspecifiche che oscurano le proprietà di targeting degli anticorpi, ma l'uso di molecole quali i polietilenglicoli sembra molto promettente nell'aumentare la loro specificità.

Le risposte finora ottenute, anche se parziali e da confermare, sembrano delineare un percorso positivo che riuscirà alla fine a raggiungere l'obiettivo di ottenere targeting e drug delivery presenti in un unico sistema nanostrutturato che poi possa anche essere usato per imaging. E' chiaro, comunque, che ulteriore lavoro sarà necessario per avere un sistema che possa essere efficace e che abbia la prospettiva di essere usato nella pratica clinica.

9.Bibliografia

- [1]: M.A.Knowles, P.J.Selby *Introduction to the Cellular and Molecular Biology of the Cancer* 4th ed.; Oxford University Press (2005)
- [2]: G.T.Hermanson *Bioconjugate Technique* 2nd ed.; Elsevier (2008)
- [3]: J.Gabriel *The Biology of Cancer* 2nd ed.; John Wiley & Sons (2007)
- [4]: S.Sasic *Pharmaceutical Application of Raman Spectroscopy*; John Wiley & Sons (2008)
- [5]: I.R.Lewis, H.G.M.Edwards *Handbook of Raman Spectroscopy, From the Reserch Laboratory to the Process Line*; Marcel Dekker (2001)
- [6]: E.Le Ru, P.Etchegoin *Principles of Surface Enhanced Raman Spectroscopy and related plasmonic effect* 1st ed.; Elsevier (2009)
- [7]: D.A.Long *The Raman Effect, A Unified Treatment of the Theory of Raman Scattering by Molecules*; John Wiley & Sons (2002)
- [8]: B.Wang, T.Siahaan, R.Soltero *Drug Delivery: Principles and Applications*; John Wiley & Sons (2005)
- [9]: F.Kratz, A.Warnecke, B.Schmid, D.E.Chung, M.Gitzel *Prodrugs of Anthracyclines in Cancer Chemotherapy*; *Current Medicinal Chemistry* (2006) 13, 477-523
- [10]: B.Asadishad, M.Vossoughi, I.Alamzadeh *In vitro release behavior and cytotoxicity of doxorubicin-loaded gold nanoparticles in cancerous cells*; *Biotechnol Lett.* (2010) 32, 649-654
- [11]: B.Asadishad, M.Vossoughi, I.Alamzadeh *Folate-Receptor-Targeted Delivery of Doxorubicin Using Polyethylene Glycol-Functionalized Gold Nanoparticles*; *Ind.Eng.Chem.Res.* (2010) 49, 1958-1963
- [12]: I.Heisler, J.Keller, R.Tauber, M.Sutherland, H.Fuchs *A Cleavable Adapter to Reduce Nonspecific Cytotoxicity of Recombinant Immunotoxins*; *Int.J.Cancer* (2003) 103, 277-282
- [13]: G.A.Craig, P.J.Allen, M.D.Mason *Synthesis, Characterization, and Functionalization of Gold Nanoparticles for Cancer Imaging*; *Cancer Nanotechnology: Method and Protocol* (2010), 177-193
- [14]: I.Szabo, M.Manea, E.Orban, A.Csampai, S.Bosze, R.Szabo, M.Tejada, D.Gaal, B.Kapuvári, M.Przybylski, F.Hudecz, G.Mezo *Development of an Oxime Bond Containing Daunorubicin-Gonadotropin-Releasing Hormone-III Conjugate as a Potential Anticancer Drug*; *Bioconjugate Chem.* (2009) 20, 656-665
- [15]: K.K.Karukstis, E.H.Z.Thompson, J.A.Whiles, R.J.Rosenfeld *Deciphering the fluorescence signature of daunomycin and doxorubicin*; *Biophysical Chemistry* (1998) 73, 249-263
- [16]: B.Merrifield *Methods in Enzymology, Volume 289, Solid Phase Peptide Synthesis* (1997), 3-13

9. Bibliografia

- [17]: G.L.Patrick, J.Spencer *An Introduction to Medicinal Chemistry* 4th ed.; Oxford University Press (2009)
- [18]: E.J.Corey, B.Czakò, L.Kürti *Molecules and Medicine*; John Wiley & Sons (2007)
- [19]: P.M.Dewick *Medicinal Natural Product, A Biosynthetic Approach* 3rd ed.; John Wiley & Sons (2009)
- [20]: Y.Wang, L.Li, W.Jiang, Z.Yang, Z.Zhang *Synthesis and preliminary antitumor activity evaluation of a DHA and doxorubicin conjugate*; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2006) 16, 2974-2977
- [21]: Z.Jia, L.Wong, T.P.Davis, V.Bulmus *One-Pot Conversion of RAFT-Generated Multifunctional Block Copolymer of HPMA to Doxorubicin Conjugated Acid- and Reductant-Sensitive Crosslinked Micelles*; *Biomacromolecules* (2008) 9, 3106-3113
- [22]: G.Bogdanovic, V.Kojic, A.Dordevic, J.Canadanovic-Brunet, M.Vojinovic-Miloradov, V.Vit.Baltic *Modulating activity of fullerol C₆₀(OH)₂₂ on doxorubicin-induced cytotoxicity*; *Toxicology in Vitro* (2004) 18, 629-637
- [23]: H.Ali-Boucetta, K.T.Al-Jamal, D.McCarthy, M.Prato, A.Bianco, K.Kostarelos *Multiwalled carbon nanotube-doxorubicin supramolecular complexes for cancer therapeutics*; *Chem. Commun.* (2008), 459-461
- [24]: M.I.Stockman *Nanoplasmonics: The physics behind the applications*; *Physics Today* (2011), 39-44
- [25]: V.Amendola, M.Meneghetti *Laser ablation synthesis in solution and size manipulation of noble metal nanoparticles*; *Phys. Chem. Chem. Phys.* (2009) 11, 3805-3821
- [26]: V.Amendola, G.A.Rizzi, S.Polizzi, M.Meneghetti *Synthesis of Gold Nanoparticles by Laser Ablation in Toluene: Quenching and Recovery of the Surface Plasmon Absorption*; *J. Phys. Chem. B* (2005) 109 (49), 23125-23128
- [27]: V.Amendola, S.Polizzi, M.Meneghetti *Laser Ablation Synthesis of Gold Nanoparticles in Organic Solvents*; *J. Phys. Chem. B* (2006) 110 (14), 7232-7237
- [28]: V.Amendola, M.Meneghetti *Controlled size manipulation of free gold nanoparticles by laser irradiation and their facile bioconjugation*; *J. Mater. Chem.* (2007) 17, 4705-4710
- [29]: V.Amendola, S.Polizzi, M.Meneghetti *Free Silver Nanoparticles Synthesized by Laser Ablation in Organic Solvents and Their Easy Functionalization*; *Langmuir* (2007) 23 (12), 6766-6770
- [30]: S.Salmaso, P.Calicetti, V.Amendola, M.Meneghetti, J.P.Magnusson, G.Pasparakis, C.Alexander *Cell up-take control of gold nanoparticles functionalized with a thermoresponsive polymer*; *J. Mater. Chem.* (2009) 19, 1608-1615
- [31]: V.Amendola, D.Dini, S.Polizzi, J.Shen, K.M.Kadish, M.J.F.Calvete, M.Hanack, M.Meneghetti *Self-Healing of Gold Nanoparticles in the Presence of Zinc Phtalocyanines and Their Very Efficient Nonlinear Absorption Performances*; *J. Phys. Chem. C* (2009) 113 (20), 8688-8695
- [32]: S.Y.Park, J.-S.Lee, D.Georganopoulou, C.A.Mirkin, G.C.Schartz *Structures of DNA-Linked Nanoparticle Aggregates*; *J. Phys. Chem. B* (2006) 110 (25), 12673-12681

9. Bibliografia

- [33]: Z.Miklan, E.Orban, G.Csik, G.Schoessler, A.Magyar, F.Hudecz *New Daunomycin-Oligoarginine Conjugates: Synthesis, Characterization, and Effect on Human Leukemia and Human Hepatoma Cells*; *Peptide Science* (2009) 92 (6), 489-591
- [34]: M.Namavari, Z.Cheng, R.Zhang, A.De, J.Levi, J.K.Hoerner, S.S.Yaghoubi, F.A.Syud, S.S.Gambhir *A Novel Method for Direct Site-Specific Radiolabeling of Peptides Using [¹⁸F]FDG*; *Bioconjugate Chem.* (2009) 20 (3), 432-436
- [35]: N.Nagahori, M.Abe, S.-I.Nishimura *Structural and Functional Glycosphingolipidomics by Glycoblotting with an Aminoxy-Functionalized Gold Nanoparticle*; *Biochemistry* (2009) 48 (3), 583-594
- [36]: L.Brans, V.Maes, E.G.Garayoa, C.Schweinsberg, S.Daepf, P.Bläuenstein, P.A.Shubiger, R.Schibli, D.A.Tourwé *Glycation Methods for Bombesin Analogs Containing the (N^αHis)Ac chelator for ^{99m}Tc(CO)₃ Radiolabeling*; *Chem. Biol. Drug Des.* (2008) 72, 496-506
- [37]: Y.Sohoma, S.B.H.Kent *Biomimetic Synthesis of Lispro Insulin via a Chemically Synthesized "Mini-Proinsulin" Prepared by Oxime-Forming Ligation*; *J. Am. Chem. Soc.* (2009) 131 (44), 16313-16318
- [38]: A.R.Katritzky, I.Avan, S.R.Tala *Efficient Preparation of Aminoxyacyl Amides, Aminoxy Hybrid Peptides, and α-Aminoxy Peptides*; *J. Org. Chem.* (2009) 74 (22), 8690-8694
- [39]: V.Vazquez-Dorbatt, Z.P.Tolstyka, H.D.Maynard *Synthesis of Aminoxy End-Functionalized pNIPAAm by RAFT Polymerization for Protein and polysaccharide Conjugation*; *Macromolecules* (2009) 42 (20), 7650-7656
- [40]: M.O.Sydnés, A.Miyazaki, M.Isobe, H.Ohinata, M.Miyazu, A.Takai *Development of new protein labeling strategy, oxidation labeling. part 1: Preliminary evaluation and synthesis of tautomycin containing a metal coordinating unit*; *Tetrahedron* (2010) 66, 1735-1741
- [41]: M.O.Sydnés, M.Isobe *Synthesis of the second generation photoaffinity probes of tautomycin*; *Tetrahedron* (2007) 63, 2593-2603
- [42]: G.R.Braslawsky, K.Kadow, J.Knipe, K.McGoff, M.Edson, T.Kaneko, R.S.Greenfield *Adriamycin(hydrazone)-antibody conjugates require internalization and intracellular acid hydrolysis for antitumor activity*; *Cancer Immunol. Immunother.* (1991) 33, 367-374
- [43]: R.R.Webb II, T.Kaneko *Synthesis of 1-(Aminoxy)-4-[(3-nitro-2-pyridyl)dithio]butane and 1-(Aminoxy)-4-[(3-nitro-2-pyridyl)dithio]but-2-ene, Novel Heterobifunctional Cross-Linking Reagents*; *Bioconjugate Chem.* (1990) 1 (2), 96-99
- [44]: P.Ingallinella, A.Di Marco, M.Taliani, D.Fattori, A.Pessi *A New Method for Chemoselective Conjugation of Unprotected Peptides to Dauno- and Doxorubicin*; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2001) 11, 1343-1346
- [45]: H.J.Park, K.Lee, S.J.Park, B.Ahn, J.C.Lee, H.Y.Cho, K.I.Lee *Identification of antitumor activity of pyrazole oxime ethers*; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2005) 15, 3307-3312
- [46]: V.Amendola, M.Meneghetti *Size Evaluation of Gold Nanoparticles by UV-vis Spectroscopy*; *J. Phys. Chem. C* (2009) 113 (11), 4277-4285

9. Bibliografia

- [47]: W.Haiss, N.T.K.Thanh, J.Aveyard, D.G.Fernig *Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV-Vis Spectra*; *Anal.Chem.* (2007) 79 (11), 4215-4221
- [48]: R.A.Sperling, P.R.Gil, F.Zhang, M.Zanella, W.J.Parak *Biological applications of gold nanoparticles*; *Chem.Soc.Rev.* (2008) 37, 1896-1908
- [49]: M.C.Daniel, D.Astruc *Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology*; *Chem.Rev.* (2004) 104 (1), 293-346
- [50]: M.Goubert, L.Toupet, M.E.Sinibaldi, I.Canet *Synthetic studies towards 4,10-diaza-1,7-dioxaspiro[5.5]-undecanes: access to 3-aza-6,8-dioxabicyclo[3.2.1]octan-2-one and 2H-1,4-oxazin-3(4H)-one frameworks*; *Tetrahedron* (2007) 63, 8255-8266
- [51]: J.Ichikawa, K.Sakoda, J.Mihara, N.Ito *Heck-type 5-endo-trig cyclizations promoted by vinylic fluorines: Ring-fluorinated indene and 3H-pyrrole syntheses from 1,1-difluoro-1-alkenes*; *Journal of Fluorine Chemistry* (2006) 127, 489-504
- [52]: A.K.Takle, M.J.B.Brown, S.Davies, D.K.Dean, G.Francis, A.Gaiba, A.W.Hird, F.D.King, P.J.Lovell, A.Naylor, A.D.Reith, J.G.Steadman, D.M.Wilson *The identification of potent and selective imidazole-based inhibitors of B-Raf kinase*; *Bioorg.Med.Chem.Lett.* (2006) 16, 378-381
- [53]: M.Carmeli, S.Rozen *A new efficient deprotection of azines, hydrazones and oximes. An excellent route for exchanging oxygen isotopes in carbonyls*; *Tetrahedron Letters* (2006) 47, 763-766
- [54]: A.I.Henry, J.M.Bingham, E.Ringe, L.D.Marks, G.C.Schatz, R.P.Van Duyne *Correlated Structure and Optical Property Studies of Plasmonic Nanoparticles*; *J. Phys. Chem. C* (2011) 115, 9291-9305
- [55]: F.Wang, Y.C.Wang, S.Dou, M.H.Xiong, T.M.Sun, J.Wang *Doxorubicin-Tethered Responsive Gold Nanoparticles Facilitate Intracellular Drug Delivery for Overcoming Multidrug Resistance in Cancer Cells*; *ACS Nano* (2011) 5 (5), 3679-3692
- [56]: C.E.Housecroft, A.G.Sharpe *Inorganic Chemistry* 2nd ed.; Pearson Education Limited (2005)
- [57]: R.Jue, J.M.Lambert, L.R.Pierce, R.R.Traut *Addition of Sulfhydryl Groups to Escherichia coli Ribosomes by Protein Modification with 2-Iminothiolane (Methyl 4-Mercaptobutyrimidate)*; *Biochemistry* (1978) 17 (25), 5399-5406
- [58]: M.Mokotoff, Y.M.Mocarski, B.L.Gentsch, M.R.Miller, J.H.Zhou, J.Chen, E.D.Ball *Caution in the use of 2-iminothiolane (Traut's reagent) as a cross-linking agent for peptides. The formation of N-peptidyl-2-iminothiolanes with bombesin (BN) antagonist (D-Trp⁶, Leu¹³-ψ[CH₂NH]-Phe¹⁴)BN₆₋₁₄ and D-Trp-Gln-Trp-NH₂*; *J. Peptide Res.* (2001) 57, 383-389
- [59]: V.A.Khrupach, V.N.Zhabinskii, A.I.Kuchto, G.P.Fando, Y.Y.Zhiburtovich, A.S.Lyakhov, A.A.Govorova, M.B.Groen, J.van der Louw, A.de Groot *Reaction of (13S)-13-iodo-6β-methoxy-3α,5-cyclo-13,14-seco-5α-androstane-14,17-dione with hydroxylamine and its application to the synthesis of new 13,14-seco steroids*; *Steroids* (2004) 69, 511-514

9. Bibliografia

- [60]: D.B.Rubinov, T.A.Zheldakova, I.L.Rubanova, F.A.Lakhvich *Synthesis of Benzimidazolone Derivatives Based on 2-Acylcyclohexane-1,3-diones Alkoximes*; Russian Journal of Organic Chemistry (2008) 44 (7), 1024-1030
- [61]: L.E.Golubovskaya, T.A.Titova, V.M.Pzheznikov *Selective Deacetylation of 11 α -Acetoxyestrone*; Russian Journal of Organic Chemistry (2006) 42 (2), 290-291
- [62]: L.P.Reiff, H.S.Aaron *Reaction of Oxime O-Acetates with Chromous Acetate. A Method for the Conversion of Ketoximes to Ketones under Mild Condition*; JACS (1970) 92 (17), 5276-5277
- [63]: S.R.Neufeldt, M.S.Sanford *O-Acetyl Oximes as Transformable Directing Groups for Pd-Catalyzed C-H Bond Functionalization*; Org. Lett. (2010) 12 (3), 532-535
- [64]: F.A.Carey, R.J.Sundberg *Advanced Organic Chemistry, part A and part B*, 4^oed.; Carey, Sundberg (2000)
- [65]: I.Lavagnini, F.Magno, R.Seraglia, P.Traldi *Quantitative Applications of Mass Spectrometry*; John Wiley & Sons (2006)
- [66]: W.L.F.Armarego, C.L.L.Chai *Purification of Laboratory Chemicals* 6^oed.; Elsevier inc. (2009)
- [67]: S.Ai, J.Duan, X.Liu, S.Bock, Y.Tian, Z.Huang *Biological Evaluation of a Novel Doxorubicin-Peptide Conjugate for Targeted Delivery to EGF Receptor-Overexpressing Tumor Cells*; Mol. Pharmaceutics (2011) 8 (2), 375-386
- [68]: W.J.Pigram, W.Fuller, L.D.Hamilton *Stereochemistry of Intercalation: Interaction of Daunomycin with DNA*; Nature New Biology (1972) 235, 17-19
- [69]: C.a:Frederick, L.D.Williams, G.Ughetto, G.A. van der Marel, J.H. van Boom, A.Rich, A.H.-J. Wang *Structural Comparison of Anticancer Drug-DNA Complex: Adriamycin and Daunomycin*; Biochemistry (1990) 29, 2538-2549
- [70]: F.M.Veronese, O.Schiavon, G.Pasut, R.Mendichi, L.Andersson, A.Tsirk, J.Ford, G.Wu, S.Kneller, J.Davis, R.Duncan *PEG-Doxorubicin Conjugates: Influence of Polymer Structures on Release, in Vitro Cytotoxicity, Biodistribution, and Antitumor Activity*; Bioconjugate Chem. (2005) 16, 775-784
- [71]: D.Farquhar, A.Cherif, E.Bakina, J.A.Nelson *Intensely Potent Doxorubicin Analogues: Structure-Activity Relationship*; J.Med.Chem. (1998) 41, 965-972
- [72]: H.Nogusa, T.Yano, N.Kashima, K.Yamamoto, S.Okuno, H.Hamana *Structure-Activity Relationships of Carboxymethylpullulan-Peptide-Doxorubicin Conjugates-Systematic Modification of Peptide Spacers*; Bioorg.Med.Chem.Lett. (2000) 10, 227-230
- [73]: H.Morjani, J.-F.Riou, I.Nabiev, F.Lavelle, M. Manfait *Molecular and Cellular Interactions between Intoplicine, DNA, and Topoisomerase II Studied by Surface-enhanced Raman Scattering Spectroscopy*; Cancer Research (1993) 53, 4784-4790
- [74]: I.Nabiev, I.Chourpa, M.Manfait *Comparative Studies of Antitumor DNA Intercalating Agents, Aclacinomycin and Saintopin, by Means of Surface-Enhanced Raman Scattering Spectroscopy*; J. Phys. Chem. (1994) 98 (4), 1344-1350
- [75]: G.Smulevich, A.Feis *Surface-Enhanced Resonance Raman Spectra of Adriamycin, 11-Deoxycarminomycin, Their Model Chromophores, and Their Complexes with DNA*; J. Phys. Chem. (1986) 90, 6388-6392

9. Bibliografia