

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN CHIMICA

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

PROGETTAZIONE E SINTESI DI NANOSISTEMI
FUNZIONALIZZATI CON PEPTIDI PER IL TARGETING SELETTIVO
DI CELLULE TUMORALI

Relatore: Prof.ssa Gobbo Marina

Correlatore: Prof. Meneghetti Moreno

Controrelatore: Prof. Barreca Davide

LAUREANDA: Bravo Claudia

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

Indice

Capitolo 1

1. Introduzione.....	1
1.1. Nanomedicina.....	1
1.1.1. Applicazioni della nanomedicina.....	2
1.1.2. Confronto con le tecniche tradizionali e proprietà.....	2
1.1.3. Tipologie di nanostrutture.....	4
1.2. Nanoparticelle d'oro.....	6
1.2.1. Risonanza plasmonica superficiale localizzata (LSPR).....	6
1.2.2. Surface Enhanced Raman Scattering (SERS).....	7
1.3. Targeting passivo e attivo.....	9
1.4. Applicazioni di nano-sistemi in diagnostica e immunoterapia del tumore.....	12
2. Scopo della tesi.....	15

Capitolo 2

3. Risultati e Discussione.....	17
3.1. Sintesi di nano-strutture SERRS.....	17
3.2. Preparazione dei ligandi peptidici.....	19
3.3. Funzionalizzazione delle nanostrutture con i ligandi peptidici.....	22
3.4. Riconoscimento di cellule che esprimono il recettore PD-L1 da parte di nanostrutture col peptide CLP002.....	25
3.5. Funzionalizzazione di nanostrutture SERRS con ligandi peptidici diversi.....	28
3.5.1. Miscela di due ligandi peptidici.....	28
3.5.2. Miscela di due coniugati HS-PEG-peptide.....	33
4. Conclusioni.....	35

Capitolo 3

5. Parte Sperimentale.....	37
5.1. Reagenti.....	37
5.2. Strumenti di misura.....	37
5.2.1. HPLC.....	37

5.2.2. HPLC-MS.....	37
5.2.3. Spettrofotometro UV-vis-NIR.....	38
5.2.4. Dinamic Light Scattering – DLS.....	38
5.2.5. Spettroscopia SERRS.....	38
5.3. Sintesi su fase solida del peptide CLP002.....	39
5.4. Sintesi e caratterizzazione delle nanostrutture funzionalizzate con singolo ligando.....	41
5.4.1. Preparazione delle nanostrutture SERRS.....	41
5.4.2. Funzionalizzazione singola con ligandi peptidici.....	43
5.4.3. Analisi SERRS su cellule.....	45
5.5. Funzionalizzazione di nanoparticelle d'oro con due diversi ligandi peptidici....	47
5.6. Sintesi su fase solida del dipeptide funzionalizzato con 5(6)- carbossifluoresceina.....	52
Appendice.....	55
Bibliografia.....	67
Ringraziamenti.....	75

Capitolo 1

1. Introduzione

1.1 Nanomedicina

Concepita agli inizi del 1990, la nanomedicina è una delle applicazioni più rilevanti delle nanotecnologie e nanoscienze e grazie ad essa, e alla ricerca nel campo, è stato possibile sviluppare nanomateriali e nano-terapie innovativi. Alcuni di questi sono già stati approvati dalla comunità medica e scientifica per un utilizzo clinico, o stanno venendo clinicamente testati.¹

La prima genesi del concetto di nanomedicina è nata dall'idea visionaria che piccoli nanorobots e relative macchine possono essere progettati, fabbricati e introdotti nel corpo umano per riparazioni cellulari a livello molecolare. Oggi, la nanomedicina si è estesa verso diverse direzioni, ognuna delle quali include la visione chiave che i nanomateriali possono apportare benefici enormi ed immediati nella ricerca e nella pratica della medicina. La miniaturizzazione di dispositivi medici e farmaci porta ad approcci maggiormente controllati, versatili ed efficaci per l'incremento della qualità della vita.²

Una di queste direzioni è la nanomedicina applicata alla diagnosi, alla terapia e al monitoraggio dei tumori. Questo è un campo di ricerca interdisciplinare, che coinvolge ambiti di biologia, chimica, ingegneria e medicina, e che sta diventando la principale area di applicazione nella progettazione di nanoparticelle.

Il progresso storico della nanomedicina può essere suddiviso in tre fasi principali. La prima riguarda la scoperta, avvenuta nel 1964, dei liposomi, fino al 1995, anno in cui è stato approvato dalla Food and Drug Administration (FDA) la prima formulazione nanoterapeutica: il farmaco liposomiale doxorubicina. La seconda fase (1995-2007) include la validazione clinica e la commercializzazione di alcuni nano-terapici. Dal 2008 in poi (terza fase) si è osservato il rapido progresso e l'espansione di nuovi tipi di nano-terapici.¹

1.1.1 Applicazioni della nanomedicina

Gli obiettivi e le applicazioni della nanomedicina sono molteplici, ma possono essere suddivisi in alcune categorie principali.

Prima di tutto, la diagnosi *in vitro* in laboratorio, utile alla profilazione e analisi di una malattia. È possibile sfruttare diversi fluidi corporei e secrezioni, come sangue, urine, saliva, che possono interagire con nanoparticelle appositamente progettate in modo da generare responsi biologici per l'identificazione di malattie, anche a livello molecolare e cellulare. Questo può aiutare a comprendere il meccanismo di azione della malattia; inoltre, la sensibilità del rilevamento a singoli livelli cellulari può essere la chiave per una diagnosi precoce e ad una medicina molecolare personalizzata.

Si ha poi la diagnosi *in vivo*, la quale offre il beneficio di combinare diversi metodi diagnostici in una singola nanoparticella. Ciò permette di esaminare in maniera più accurata la malattia, basandosi su variazioni molecolari, strutturali e morfologiche che si verificano. Due grandi vantaggi in questo approccio sono l'incremento della sensibilità di rivelazione sul sito target e la minimizzazione del potenziale tossico dell'agente di imaging.

La funzione di *drug-delivery* nella nanomedicina è fornire nano-formulazioni che aprano la strada a nuove modalità di terapia, che incrementino l'efficacia di un trattamento già esistente, creando la prospettiva di utilizzare più di un agente terapeutico contemporaneamente.

Infine, il vantaggio maggiore della nanomedicina risiede nella realizzazione della cosiddetta teragnostica, ovvero la combinazione di terapia e diagnostica. Essa consiste nell'unire le capacità di bio-distribuzione efficace, metodi di analisi diagnostici e di trattamenti multi-abbinati. Questo approccio può consentire la possibilità di monitorare il processo terapeutico in azione e stimare la sua efficacia in tempo reale, permettendo al paziente di non aspettare il post-trattamento per conoscerne il risultato.³

1.1.2 Confronto con le tecniche tradizionali e proprietà

I vantaggi legati ai nano-sistemi sono svariati: alta stabilità, elevata capacità di portata, fattibilità di incorporazione sia di sostanze idrofiliche, sia idrofobiche, e compatibilità con diverse vie di somministrazione (orale, inalazione, ecc). Per di più le nanostrutture possono essere progettate per permettere un rilascio controllato del farmaco, mediante

diverse tipologie di stimoli. Questi possono essere interni, come ad esempio variazioni di temperatura o pH, manipolazione dei pori delle nanoparticelle; o esterni, tramite impulsi energetici (luce, campi magnetici, calore, campo di radio-frequenze).

Tutte queste proprietà possono comportare miglioramenti nella frequenza di dosaggio e nella bio-disponibilità dei farmaci, e possono anche ridurre la loro tossicità.⁴

In particolare, il cancro è una malattia dove l'adeguatezza di rilascio di agenti chemioterapici con meccanismi di azione estremamente potenti, ma anche tossici, può fare la differenza tra responso efficace e grave morbilità. Nonostante un secolo di ricerca e sviluppo continuo, le formulazioni attuali lasciano i farmaci ancora incapaci di localizzarsi in modo specifico nei siti di interesse, tramite i metodi di chemioterapia tradizionali. Le molecole semplicemente diffondono e si distribuiscono liberamente nel corpo, il che comporta spesso effetti indesiderati e limita la determinazione di una dose appropriata di farmaco per avere un responso clinico efficace. In aggiunta, l'incapacità di raggiungere i siti target contribuisce ad un altissimo tasso di insuccesso di "nuove entità chimiche" (*new chemical entities*, NCEs): solo un farmaco su 9 acquisisce l'approvazione dalle autorità regolamentari, mentre la maggior parte fallisce nei test clinici finali.⁵

L'utilizzo di nanostrutture è emerso come veicolo adatto per superare i limiti farmacocinetici e farmacodinamici associati alle formulazioni chimiche tradizionali, favorendo l'azione terapeutica e delle tecniche diagnostiche dal punto di vista selettivo e della sensibilità di imaging.

Il percorso delle nanoparticelle verso il sito desiderato è limitato da diverse barriere fisiologiche. Queste sono componenti essenziali del sistema di difesa del nostro corpo e fungono da limitatori di penetrazione di materiali estranei. Per il trasporto intravascolare delle nanoparticelle, le barriere si manifestano sotto varie forme, tra cui il filtro immunitario di fegato e milza, la permeazione attraverso l'endotelio nei tessuti target, la penetrazione attraverso l'interstizio tessutale, l'endocitosi in cellule target, diffusione attraverso il citoplasma e l'ingresso eventuale nei nuclei. Alcune applicazioni sfruttano anche il trasporto mediante diverse vie, incluse pelle e mucose. In questi casi la barriera è rappresentata dalla resistenza diffusiva dei tessuti.⁶

Nonostante tutte queste barriere fisiologiche, le nanoparticelle sono caratterizzate da una migliore penetrazione intracellulare rispetto ai farmaci convenzionali e possono fornire un targeting selettivo dei tessuti bersaglio. A ciò si somma anche la capacità di protezione dei loro *guests* dalla degradazione da parte di meccanismi di difesa endogeni, tra cui la

degradazione enzimatica, immuno-degradazione e il cosiddetto RES, ovvero il sequestro del sistema reticoloendoteliale.⁷

Come già accennato, l'applicazione di nanomateriali e nanoparticelle spesso esibisce un'efficacia terapeutica maggiore rispetto ai metodi e ai farmaci convenzionali. Questo è dovuto a proprietà e caratteristiche uniche delle nanoparticelle. Innanzitutto, i nanomateriali sono definiti come atomi, molecole, materiali con almeno una dimensione nella nanoscala (10-100 nm). Proprio per le loro dimensioni le loro proprietà possono variare e possono, inoltre, determinare dove le nanoparticelle andranno ad accumularsi nel corpo. Anche la forma può giocare un ruolo diretto nella loro funzione biologica, in quanto possono essere generate anche come nanotubi, *nanoshells*, *nanocages*, ecc. Un altro vantaggio è l'elevato rapporto superficie-volume, che le rende piattaforme versatili per l'assemblaggio di strutture multifunzionali.

Altre proprietà di rilievo sono la carica superficiale (*Zeta Potential*), la porosità, l'elasticità o la rigidità, ma risultano ancora più fondamentali nell'applicazione biomolecolare le loro proprietà ottiche e magnetiche.^{8,9}

1.1.3 Tipologie di nanostrutture

Vi sono diverse categorie di nanostrutture su cui la ricerca si concentra.

Le nanoparticelle polimeriche (PNPs) sono definite come dispersioni particellari o particelle solide con dimensioni nell'intervallo 10-1000 nm. Possono essere sia nanosfere sia nanocapsule, e sono state impiegate nel trasporto di formulazioni farmaceutiche sfruttando metodi di assorbimento, dissoluzione, intrappolamento, incapsulamento o attraverso un legame chimico delle molecole di farmaco sulla superficie.¹⁰

Un'altra classe è quella delle nanoparticelle a base lipidica, che vantano benefici dati dalla loro abilità di caricare sia molecole idrofile, sia idrofobiche, tra cui vaccini, insulina, proteine, enzimi. Inoltre, si sono dimostrati efficaci nel trattamento dell'Alzheimer, del cancro e del diabete, oltre al fatto che possono essere somministrati in diversi modi (endovena, orale, transdermico). Un sottogruppo importante è quello dei liposomi, descritti per la prima volta nel 1960 da Alec Bangham, e rimasti al centro dell'interesse scientifico per decenni, tanto da ottenere l'approvazione del Doxil[®] dalla FDA. I liposomi sono vescicole di forma sferica formati da fosfolipidi e steroidi, il che li rende biocompatibili, biodegradabili e adeguati al trasporto attraverso le membrane. Un altro tipo di nanostruttura molto conosciuta è quella dei dendrimeri. Questi hanno una struttura

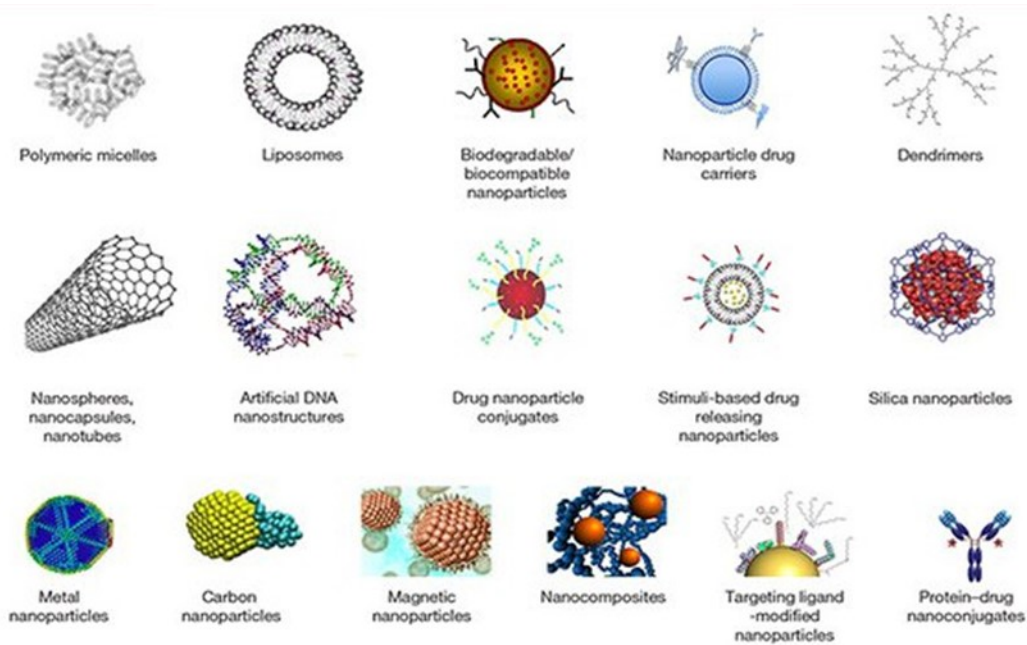


Figura 1: Tipologie di nanostrutture usate in nanomedicina

tridimensionale multi-ramificata, che possiede bassa poli-dispersione ed elevata funzionalità. Infatti, presentano svariati vantaggi: alta penetrabilità attraverso membrane cellulari per la loro piccola dimensione; non sono riconosciuti dal sistema immunitario; migliore penetrazione e ritenzione nella struttura vascolare; metodi ben definiti di preparazione.^{10,11}

Altro interessante gruppo di nanoparticelle sono quelle magnetiche (MNPs), impiegate nell'imaging, nella diagnosi, come carriers di farmaci e trattamento del cancro. Le nanostrutture devono essere biocompatibili e non comportare reazioni infiammatorie e citotossiche nel corpo, per queste proprietà le migliori risultano essere costituite da due ossidi di ferro (magnetite Fe_2O_3 e maghemite Fe_3O_4).¹² Le MNPs sono applicate sia nella diagnosi, mediante biosensing e separazione magnetica, sia nella terapia, sfruttando l'ipertermia. Infatti, si sono rivelate promettenti nel distruggere cellule tumorali mediante danneggiamento termico, approfittando delle loro proprietà magnetiche e di stimoli esterni dati da campi magnetici.¹¹

Infine, un'ultima categoria è quella delle nanoparticelle metalliche di oro e argento. In particolare, le nanoparticelle d'oro (AuNPs) hanno dato il via ad una "rivoluzione dell'immunochimica", grazie agli studi biologici di Faulks e Taylor, che hanno sfruttato per tecniche di imaging la coniugazione di oro colloidale con anticorpi per rilevare la presenza degli antigeni superficiali della salmonella mediante microscopio elettronico.¹³ Si presuppone che nanoparticelle metalliche possano essere applicate a tutti i campi della

nanomedicina. Attualmente, perciò, la preparazione di soluzioni colloidali e nanostrutture metalliche rappresenta una delle discipline più all'avanguardia nella comunità scientifica.¹¹

Le nanoparticelle d'oro possono essere inoltre facilmente ingegnerizzate con degli specifici ligandi, che fungono da agenti di targeting. Alcuni esempi sono piccole molecole, anticorpi, aptameri e acidi nucleici, proteine, peptidi e zuccheri.⁸

1.2 Nanoparticelle d'oro

Al giorno d'oggi, c'è un crescente interesse per le nanoparticelle di metalli nobili, in particolare l'attenzione è rivolta alle nanoparticelle d'oro (AuNPs). Queste sono caratterizzate da proprietà versatili: forma flessibile e controllabile, dimensione, chimica di superficie, inerzia biologica, non-tossicità e buona biocompatibilità. Queste caratteristiche rendono le AuNPs estremamente eclettiche, con molteplici promettenti applicazioni nella chimica clinica, nel bio-imaging, nella terapia antitumorale, e nel drug-delivery selettivo.¹⁴ Le AuNPs si dimostrano quindi eccellenti per la teranostica.¹⁵

1.2.1 Risonanza plasmonica superficiale localizzata (LSPR)

Le AuNPs sono nanoparticelle plasmoniche. Questo tipo di nanostrutture possiede una proprietà foto-fisica unica, chiamata risonanza plasmonica superficiale localizzata (LSPR), che può essere eccitata dall'interazione delle nanoparticelle con radiazione elettromagnetica alla frequenza di risonanza.

A seguito dell'assorbimento gli elettroni liberi del metallo mostrano un'oscillazione collettiva coerente. L'oscillazione elettronica attorno alla superficie della nanoparticella causa una separazione di carica, formando un'oscillazione di dipolo lungo la direzione del campo elettrico della luce incidente.

Tale oscillazione rappresenta la LSPR e genera una forte banda di estinzione ad una lunghezza d'onda di 520 nm, misurabile con spettrofotometria UV-vis. Ragione per cui l'oro colloidale appare di colore rosso. La LSPR dipende da fattori che influiscono sulla densità di carica elettronica superficiale, come per esempio la forma e le proprietà dielettriche dell'intorno, ma soprattutto le dimensioni delle nanoparticelle o di loro aggregazioni che consentono eccitazioni anche multipolari. Modificando le caratteristiche delle particelle si osserva che la frequenza di LSPR può essere spostata

nella regione del vicino infrarosso (NIR), dove la penetrazione della luce attraverso i tessuti è ottimale.^{16,17}

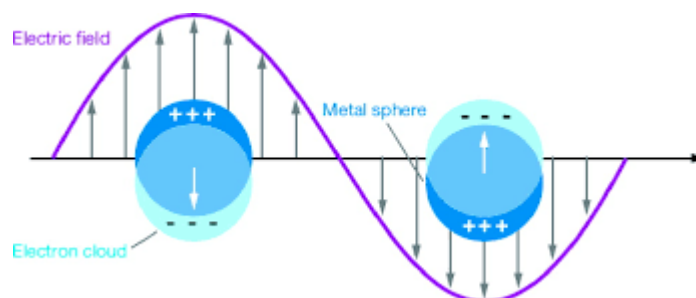


Figura 2: Rappresentazione dell'effetto di LSPR

L'aggregazione di nanoparticelle induce variazioni nello spettro di assorbimento, accompagnate da un significativo cambio di colore. L'aggiunta di un analita, che avvia l'aggregazione delle AuNPs, induce perciò una variazione del colore della soluzione colloidale.¹⁸ Generalmente, l'aggregazione in soluzione è influenzata da specie cationiche e oligocationiche. Un'assorbanza plasmonica *red-shifted* viene attribuita all'accoppiamento dei plasmoni localizzati delle nanoparticelle presenti nell'aggregato. Maggiore è l'aggregazione e maggiore è il *red-shift*. Un agente di “cross-linking” che aumenta l'aggregazione genera quindi la comparsa di una banda plasmonica che risulta di particolare interesse nel campo del SERS, strumento utile nel campo della diagnostica in nanomedicina.¹⁹

1.2.2. Surface enhanced Raman scattering (SERS)

La *surface enhanced Raman spectroscopy* (SERS) è diventata sempre più popolare per applicazioni di imaging *in vivo*. Il Raman scattering si osserva per via dell'accoppiamento dei modi vibrazionali delle molecole con i fotoni della luce vis-NIR del laser utilizzato. In realtà, la probabilità di scattering Raman è 10-12 ordini di grandezza minore della fluorescenza. Nonostante ciò, quando le molecole sono localizzate vicino ad una superficie metallica confinata, come appunto una nanoparticella, il campo elettromagnetico generato dall'eccitazione della LSPR potenzia grandemente il Raman scattering, da cui si ottiene un incremento sostanziale del segnale che può diventare confrontabile con quello di fluorescenza.^{11,37}

Il meccanismo del SERS rimane ancora un argomento di ricerca attivo, ma sono principalmente due quelli proposti: l'amplificazione chimica e l'amplificazione

elettromagnetica. Nella prima si crea uno stato di trasferimento di carica (CT) tra il metallo e le molecole adsorbite. L'esistenza di questo stato di CT genera Raman risonante amplificato. Tuttavia, il contributo di amplificazione del segnale risulta dell'ordine di 100 volte. Nell'amplificazione elettromagnetica, la radiazione che colpisce la nanoparticella eccita l'LSPR, e questo genera un campo elettromagnetico locale amplificato di qualche ordine di grandezza rispetto al campo elettromagnetico del laser eccitante. Molecole che si trovino nelle vicinanze della superficie delle particelle plasmoniche risentono del campo elettromagnetico amplificato e lo scattering Raman, che è proporzionale alla quarta potenza del campo elettromagnetico di eccitazione risulta essere fortemente amplificato. L'amplificazione elettromagnetica contribuisce all'incremento del segnale Raman con un fattore che può arrivare a 10^{14} , anche se usualmente si osservano facilmente amplificazioni dell'ordine di 10^9 .^{20,38} Accanto all'amplificazione dei segnali Raman la tecnica SERS consente anche di attuare un quenching della fluorescenza, dal momento che i due fenomeni sono in competizione. Questo aspetto è molto importante nelle tecniche di imaging.

Le AuNPs sono state ampiamente usate con lo scopo di incrementare il segnale Raman di analiti che altrimenti non sarebbero rilevabili. Questo tipo di rivelazione è riferita generalmente come *detection* diretta, in cui i segnali SERS raccolti sono caratteristici della molecola di interesse. Recentemente, è emerso il concetto di *SERS tag*, impiegato nell'identificazione indiretta di uno specifico bersaglio, che mostrerebbe in ogni caso uno scattering Raman basso, come ad esempio una biomolecola.²¹ In questo caso il SERS tag e la biomolecola devono essere ingegnerizzati sulla stessa nanostruttura. È possibile amplificare di molto il segnale SERS se il SERS tag si localizza negli hot spots cioè negli spazi tra nanoparticelle aggregate o in zone appuntite di nanostrutture.²²

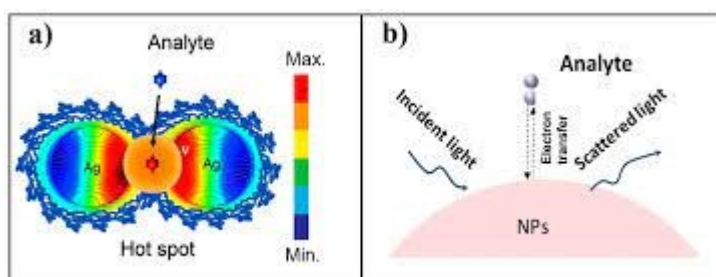


Figura 3: a) Rappresentazione del campo elettromagnetico di interazione tra due plasmoni e della formazione di un hot-spot, b) dettaglio sulla superficie del plasmone, che evidenzia la generazione di scattering

Le amplificazioni maggiori del segnale Raman (fino a 10^{14} volte), si ottengono quando il SERS tag assorbe alla stessa frequenza, o ad una frequenza prossima, a quella del laser utilizzato per eccitare il plasmone localizzato. In questo caso si parla di *surface enhanced resonance Raman scattering* (SERRS).²³

La spettroscopia SERS (e SERRS) è impiegata in un'ampia varietà di applicazioni biomediche diagnostiche. L'imaging biomedico basato sul SERS ha il potenziale di renderlo un importante strumento clinico complementare all'imaging a risonanza magnetica (MIR), a fluorescenza, o alla tomografia computerizzata. Le applicazioni dimostrate in letteratura sono *in vitro*, *ex vivo*, ed *in vivo*. Ad esempio, nell'imaging *in vitro* vengono utilizzati SERRS reporters per identificare cellule tumorali che sono riconosciute da agenti di targeting presenti sulle stesse nanostrutture in cui è anche presente un SERS tag. Questa possibilità rende attuabile l'imaging come mappatura sulla singola cellula degli antigeni tumorali.²¹

1.3 Targeting passivo e attivo

È stato dimostrato che i nanosistemi si accumulano nel tumore grazie al cosiddetto effetto di targeting. Il targeting può essere di due tipi: passivo o attivo. Il targeting passivo è legato alle variazioni morfologiche del sistema vascolare nel tumore. A seguito di ipossia, i tumori generano ipervascolarizzazione, ovvero nuovi vasi sanguigni, in quanto la rapida e incontrollata crescita tumorale richiede grandi quantità di nutrienti e ossigeno. Questi nuovi vasi hanno una struttura approssimativa e non sono impermeabili. Essi permettono, appunto, la permeazione amplificata e selettiva fino allo stroma tumorale, di macromolecole più grandi di 40 kDa e di nanosistemi, a differenza delle cellule normali che non lasciano passare le nanostrutture. In aggiunta, l'assenza di un normale drenaggio linfatico contribuisce alla ritenzione delle NPs. Questo fenomeno è meglio conosciuto con il nome di effetto di *enhanced permeability and retention* (EPR).^{24,25}

La funzionalizzazione delle AuNPs è uno degli aspetti chiave, insieme alla dimensione e alla forma, che determina il destino delle nanostrutture per effetto EPR dopo la somministrazione. Le modificazioni della superficie nanoparticellare hanno effetti significativi sulla bio-distribuzione, tossicità, e biocompatibilità. Inoltre, la funzionalizzazione ha la capacità di nascondere le nanoparticelle al sistema reticoloendoteliale (RES), assicurando un incremento del tempo di circolazione nel sangue e permettendo loro di raggiungere il sito bersaglio.²⁶

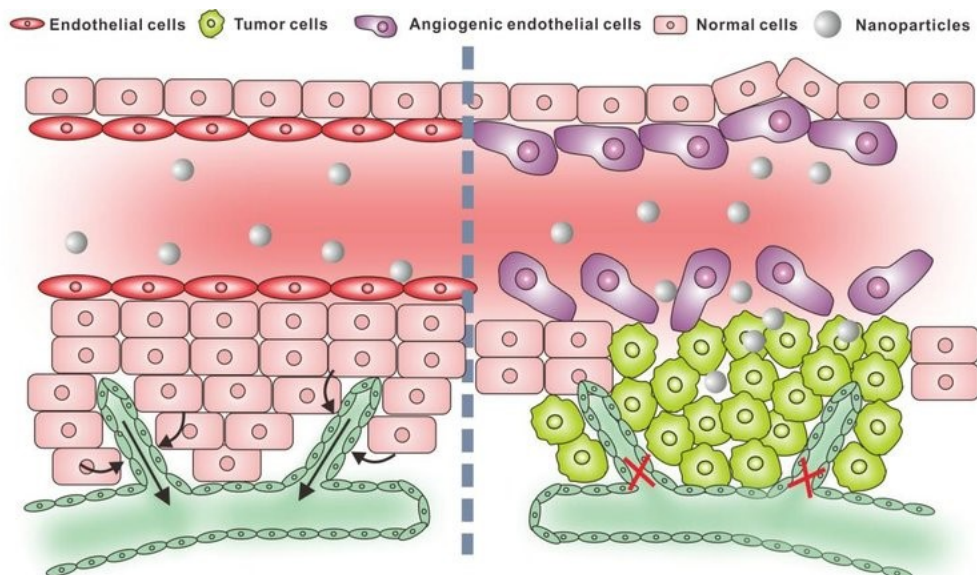


Figura 4: Illustrazione dell'effetto EPR. A sinistra è rappresentato un tessuto normale, a destra un tessuto malato. Le croci rosse evidenziano l'assenza di drenaggio linfatico, che impedisce l'eliminazione delle NPs.

La funzionalizzazione può avvenire mediante adsorbimento fisico o attacco covalente dei ligandi sulla superficie delle nanostrutture sfruttando, nel caso di AuNP, la formazione di legami Au-S con una molecola tiolata. Uno dei composti più utilizzati è il polietilenglicole (PEG), polimero eccellente nel prolungare la ritenzione delle nanostrutture nel sangue, prevenirne la rimozione da parte del RES e incrementare le loro proprietà idrofile. Per di più, AuNPs sferiche ricoperte con PEG non hanno esibito effetti citotossici su linee cellulari umane *in vitro*.^{14,27} Il targeting passivo di AuNPs, che sfrutta l'effetto EPR, è stato negli anni ampiamente esplorato, ma la sua funzione potrebbe rivelarsi insufficiente.

Con il sempre maggiore interesse per la medicina personalizzata, l'attenzione si è spostata verso il targeting attivo. Questo tipo di targeting consiste nell'attacco di un agente di targeting sulla nanoparticella, in grado di riconoscere uno specifico recettore sovra-espresso dalle cellule tumorali.

Gli agenti di targeting possono essere catalogati in anticorpi, proteine, peptidi, aptameri, carboidrati e piccole molecole.²⁸

Grazie alla loro elevata specificità gli anticorpi risultano la classe di agenti di targeting più studiata. Quelli più usati sono gli anticorpi IgG, i quali assumono una forma a Y, costituita da una regione costante (Fc) e una variabile (Fab), unica per ogni anticorpo. AuNPs funzionalizzate con anticorpi sono state testate per la prima volta nel 2008, per

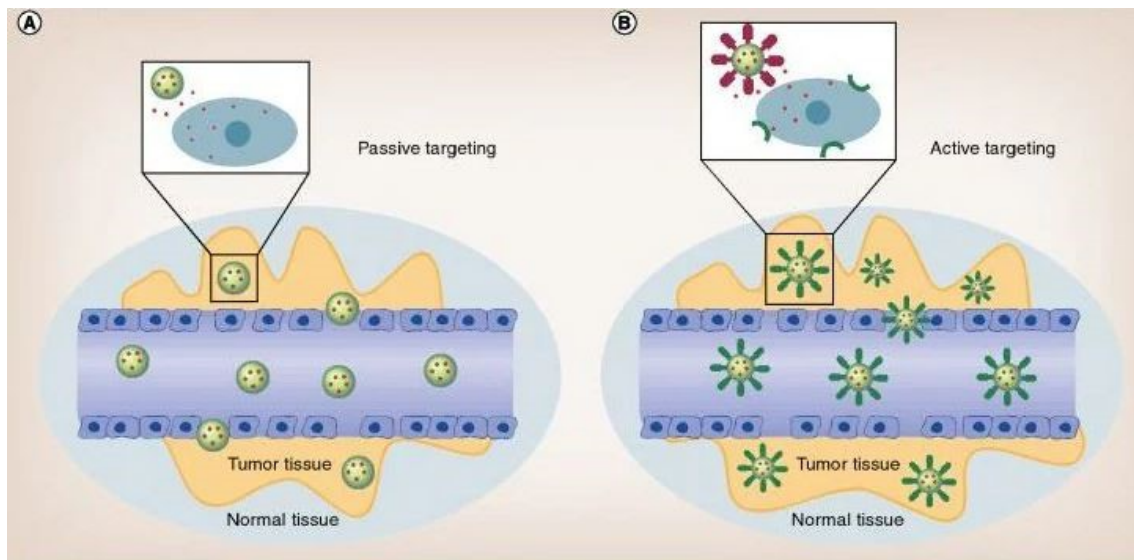


Figura 5: Immagini di confronto tra a) targeting passivo e b) targeting attivo.

trasportare la gemcitabina verso l'adenocarcinoma pancreatico, mediante nanoparticelle d'oro legate all'anticorpo monoclonale cetuximab.²⁹ Tuttavia la produzione di anticorpi è costosa e dagli studi sono emerse alcune problematiche riguardo al loro utilizzo, come eventi avversi dovuti alla risposta immunitaria nei tessuti sani, e la loro bassa capacità di penetrazione del tumore, causata dalle loro grandi dimensioni.³⁰

Negli ultimi anni sempre più peptidi, corte sequenze di amminoacidi, si sono dimostrati validi agenti di targeting per nanosistemi. Infatti, nonostante generalmente mostrino una minore affinità verso i recettori degli anticorpi, date le loro piccole dimensioni possono essere presenti in migliaia di copie sul nanosistema, il che ne aumenta l'avidità per il bersaglio. Inoltre, non sono immunogenici, possono essere ottenuti con procedure standardizzate, a costi contenuti e date le loro piccole dimensioni hanno una capacità di penetrazione più profonda nei tessuti. Infine, la loro sensibilità alla degradazione enzimatica sembra essere fortemente ridotta quando sono presenti su nanostrutture.³⁹ I peptidi sono prodotti sinteticamente, perciò la loro struttura può essere progettata e modificata in maniera semplice e mediante l'aggiunta di una cisteina, che presenta in catena laterale un gruppo tiolico, è possibile legarli covalentemente alle AuNPs.²⁸

1.4 Applicazioni di nano-sistemi in diagnostica e immunoterapia del tumore

Rispetto alle cellule sane le cellule tumorali hanno la particolare caratteristica di sovra-esprimere alcuni recettori, una particolare classe di proteine, che ne favoriscono la crescita e la diffusione.

Il recettore del fattore di crescita epidermico (*epidermal growth factor receptor*, EGFR), ne è un esempio. Nel tumore contribuisce ad una complessa combinazione di segnali che modulano crescita, differenziazione, adesione, migrazione e sopravvivenza delle cellule cancerogene. L'EGFR è presente in diversi tumori umani, tra cui il cancro al seno. Sfruttando tale recettore come sito bersaglio, è possibile impiegare AuNPs opportunamente funzionalizzate per il targeting selettivo del tumore.^{31,32}

Grande attenzione è stata rivolta negli ultimi anni ai meccanismi attraverso i quali le cellule tumorali inibiscono l'azione del sistema immunitario, e che riducono in molti casi l'efficacia delle terapie immunitarie. In particolare, si è visto che alcuni tipi di cellule tumorali sovraesprimono proteine di "checkpoint" che di norma garantiscono la tolleranza del sistema immunitario verso le proprie cellule. Tra i diversi checkpoints immunitari identificati, la coppia *programmed cell death 1* (PD-1) e *programmed cell death-ligand 1* (PD-L1) e tra quelle più studiate.

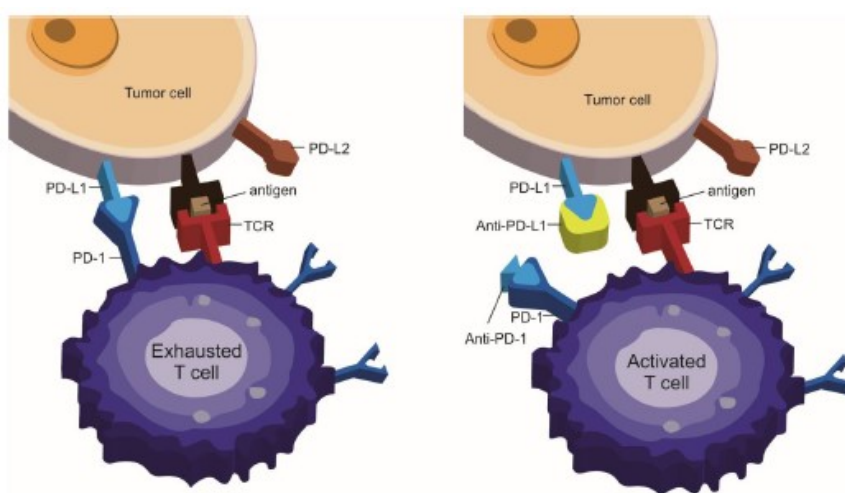


Figura 6: a sinistra è rappresentata l'interazione PD-1/PD-L1 che inibisce la cellula T. A destra è mostrato il blocco dell'interazione tra i recettori e l'attivazione del linfocita T.

Il PD-1 è un recettore espresso su linfociti T attivati, che interagisce con il PD-L1 espresso su alcuni tipi di cellule inibendo l'azione dei linfociti T e mantenendo così l'omeostasi immunitaria. Il recettore PD-L1 è anche sovra-espresso su alcune cellule tumorali e interagendo col PD-1 dei linfociti T ne inibisce l'azione citotossica, permettendo al tumore di evadere la sorveglianza immunitaria e di proliferare.³⁴

Per questo l'inibizione dell'interazione tra PD-1 e PD-L1 è emersa come strategia interessante e promettente per l'immunoterapia del cancro. Gli anticorpi monoclonali sono stati finora i candidati più promettenti per questo tipo di trattamento ma la loro scarsa penetrazione nel tumore e gli importanti effetti avversi associati all'uso di anticorpi ha stimolato la ricerca verso inibitori di piccole dimensioni, tra cui quelli di natura peptidica.^{33,40}

2. Scopo della tesi

Il laboratorio in cui ho svolto il lavoro di tesi si occupa da diversi anni della funzionalizzazione di nanostrutture SERS con agenti di targeting peptidici in grado di rilevare con grande sensibilità e specificità cellule tumorali. In particolare come agenti di targeting sono stati utilizzati peptidi contenenti la sequenza Arg-Gly-Asp, capaci di riconoscere integrine di tipo $\alpha_v\beta_3$ sovraesprese in cellule e tessuti tumorali⁴¹, e il peptide GE11 (Tyr-His-Trp-Tyr-Gly-Tyr-Thr-Pro-Gln-Asn-Val-Ile) che si lega all'EGFR senza attivarlo e quindi non favorisce la crescita tumorale.³¹ In un precedente lavoro di tesi sono state inoltre preparate nanostrutture SERS funzionalizzate con il peptide CLP002 (Trp-His-Arg-Ser-Tyr-Tyr-Thr-Trp-Asn-Leu-Asn-Thr), recentemente proposto come inibitore dell'interazione PD1/PDL-1.³⁵

Un primo scopo della presente tesi è di preparare nuovamente nanostrutture funzionalizzate con analoghi del peptide CLP002 e di verificare, grazie alla tecnica SERS, la loro capacità di riconoscere il recettore PDL-1 sovraespresso su alcuni tipi di cellule tumorali fornite dal Centro oncologico di Aviano.

Benché un singolo agente di targeting permetta una buona selettività delle nanostrutture nel riconoscere una cellula tumorale, la mancanza di recettori specifici rende possibile anche l'interazione delle nanostrutture con cellule che esprimono in quantità limitata lo stesso recettore, con effetti indesiderati. Per questo i risultati non soddisfacenti spesso osservati *in vivo* con nanostrutture targettizzate sono da imputarsi anche alla disomogeneità delle matrici biologiche malate, costituite da diversi tipi di cellule e complessi microambienti. Considerando questi aspetti, l'uso di nanosistemi capaci di riconoscere due o più recettori espressi sulla cellula tumorale potrebbe essere la giusta strada da intraprendere per aumentare ulteriormente selettività e l'efficacia dei nanosistemi.³⁶ Nel corso di questa tesi si prepareranno nanostrutture funzionalizzate con 2 diversi peptidi bioattivi (GE11 e CLP002) e si verificherà la possibilità di valutare in modo accurato la quantità di ciascun peptide caricata sulla superficie delle nanoparticelle. Diversi peptidi possono interagire con diversi recettori del tumore. In particolare, due tra i recettori sovra-espressi di maggiore interesse e più studiati sono il PD-L1 e l'EGFR. Lo scopo della presente tesi è quello di progettare e sintetizzare nanostrutture specifiche per la diagnostica *in vitro* del cancro. In particolare, queste nanostrutture sono costituite da nanoparticelle d'oro funzionalizzate con peptidi, i quali fungono da agenti di targeting

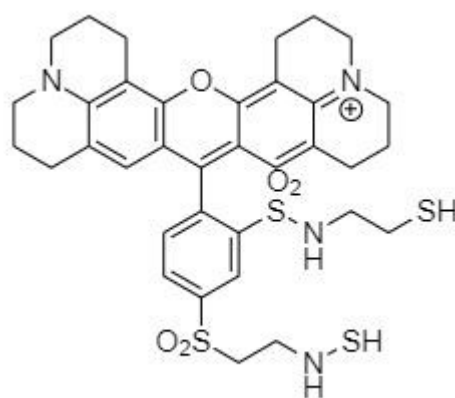
attivo verso recettori sovra-espressi dalle cellule tumorali, e da un SERRS reporter, in modo da poter sfruttare la spettroscopia Raman come metodo di imaging.

Capitolo 2

3. Risultati e discussione

3.1 Sintesi di nano-strutture SERRS

Per rilevare l'interazione delle nanostrutture con le cellule è stata utilizzata la tecnica SERS indiretta, che consiste nel preparare aggregati di AuNPs, contenenti un SERS tag (nello specifico un derivato del Texas Red, Figura 7), e funzionalizzati col peptide di targeting.



*Figura 7: Struttura del derivato ditiolato di Texas Red
(TR-SH)*

Le nanoparticelle d'oro erano state precedentemente sintetizzate mediante tecnica di ablazione laser LASiS (Laser Ablation Synthesis in Solution)^{38,42,43} che fornisce soluzioni colloidali di nanoparticelle sferiche, prive di qualsiasi legante superficiale, e cariche negativamente. Lo spettro UV-vis caratteristico delle nanoparticelle d'oro non aggregate presenta un'unica banda plasmonica centrata a 520 nm (Figura 8).

L'aggiunta di una minima quantità di un derivato ditiolato del Texas Red, seguita da centrifugazione, induce la formazione di piccoli aggregati di nanoparticelle. Il Texas red è un colorante fluorescente, di colore fucsia, ideale come SERS tag di AuNPs perché la sua banda di assorbimento (centrata a 589 nm)⁴⁴ si sovrappone in modo parziale a quella

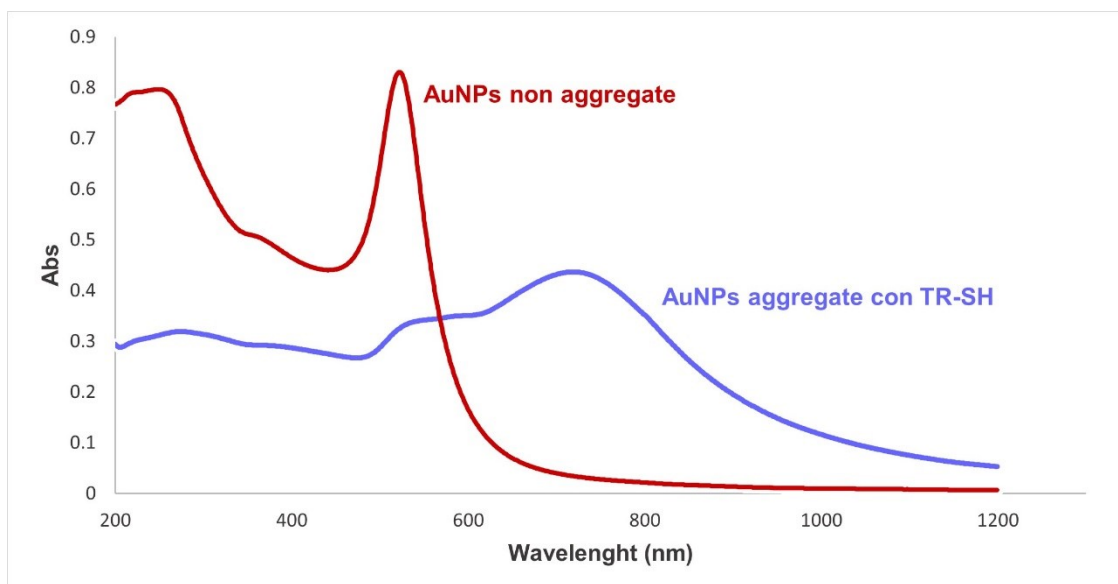


Figura 8: Spettri UV-vis-NIR di soluzioni di nanoparticelle d'oro non aggregate (in rosso) e aggregate dopo aggiunta di Texas Red ditiolato (in blu)

di LSPR dell'oro, aumentando la sensibilità della tecnica (SERRS). La presenza nel colorante dei due gruppi tiolici (Figura 7) gli permette di legarsi stabilmente alle nanoparticelle d'oro, formando legami Au-S.⁴⁵

L'aggregazione delle nanoparticelle comporta due effetti. Innanzitutto, lo spostamento della banda plasmonica verso la regione del NIR (Figura 8). Le dimensioni degli aggregati influenzano in maniera significativa l'effetto di LSPR. Con la formazione di aggregati avviene uno spostamento del picco di estinzione, che subisce un *red-shift*, cadendo ad energie minori (dai 600 ai 900 nm).^{46,47,48} Inoltre, l'aggregazione crea *hot spots* nei quali le molecole di colorante sperimentano un campo elettromagnetico molto elevato con conseguente l'amplificazione del segnale Raman.^{18,22}

L'aggregazione delle nanoparticelle può essere osservata già ad occhio nudo, in quanto la soluzione colloidale passa da un colore rosso vivo a blu-viola. La conferma è data dallo spettro UV-vis-NIR (200-1200 nm).

Oltre allo spettro di estinzione UV-vis-NIR, la conferma definitiva della generazione di nanostrutture SERRS aggregate arriva proprio dalla spettroscopia SERRS. Lo spettro Raman caratteristico del Texas Red mostra due segnali stretti e intensi a 1505 cm^{-1} (stretching dei legami carbonio-azoto) e a 1649 cm^{-1} (stretching legami carbonio-carbonio) (Figura 9).⁴⁹ Se presenti, la formazione delle nanostrutture è avvenuta correttamente e possono essere ulteriormente modificate con i ligandi di targeting.

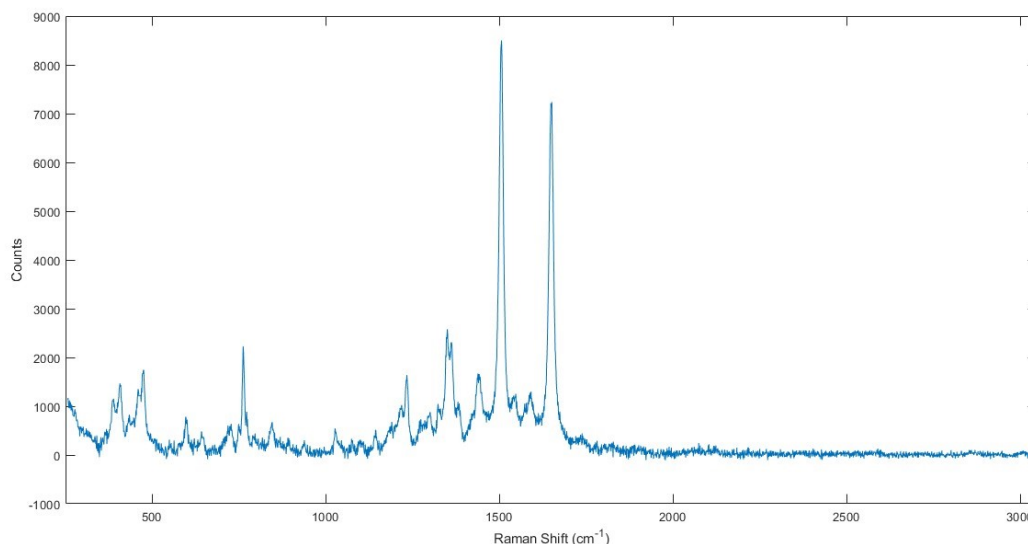


Figura 9: Spettro SERRS di AuNPs dopo l'aggiunta di SERRS reporter, con segnali caratteristici del Texas Red

Dallo spettro UV-vis-NIR, sfruttando l'assorbanza a 400 nm, è possibile valutare la concentrazione delle nanoparticelle d'oro in soluzione, dal momento che in questa zona dello spettro non ci sono contributi dovuti all'assorbimento dei peptidi, né agli aggregati di nanoparticelle.

3.2 Preparazione dei ligandi peptidici

Per la funzionalizzazione delle nanostrutture SERRS con il peptide sono stati utilizzati i ligandi di Tabella 1 alcuni dei quali erano stati preparati in un precedente lavoro di tesi.

Tabella 1: Sequenze dei peptidi utilizzati nelle funzionalizzazioni. Ac: gruppo acetilico; (O₂OC): -NH(CH₂CH₂O)₂CH₂CO-

Peptide	Sequenza
CLP002	H-Trp-His-Arg-Ser-Tyr-Tyr-Thr-Trp-Asn-Leu-Asn-Thr-NH ₂
C-CLP002	Ac-Cys-(O ₂ OC) ₂ -Trp-His-Arg-Ser-Tyr-Tyr-Thr-Trp-Asn-Leu-Asn-Thr- NH ₂
N-CLP002	Ac-Trp-His-Arg-Ser-Tyr-Tyr-Thr-Trp-Asn-Leu-Asn-Thr--Cys-(O ₂ OC) ₂ -NH ₂
PEG-CLP002	HS-PEG ₃₀₀₀ -Lys ₃ -Gly ₂ -Trp-His-Arg-Ser-Tyr-Tyr-Thr-Trp-Asn-Leu-Asn-Thr-NH ₂
PEG-SCLP002	HS-PEG ₃₀₀₀ -Lys ₃ -Gly ₂ -Thr-Arg-Trp-Ser-His-Tyr-Asn-Thr-Leu-Trp-Tyr-Asn-NH ₂
GE11	H-Tyr-His-Trp-Tyr-Gly-Tyr-Thr-Pro-Gly-Asn-Val-Ile-NH ₂
N-GE11	H-Tyr-His-Trp-Tyr-Gly-Tyr-Thr-Pro-Gly-Asn-Val-Ile-(O ₂ OC)-Cys-NH ₂

Sono stati usati 3 diversi ligandi contenenti il peptide CLP002, un possibile inibitore dell'interazione PD1/PDL1, e un ligando contenente la sua sequenza mescolata (SCLP002). Del peptide GE11, che riconosce la proteina EGFR, è stato usato un ligando modificato all'estremità C-terminale.

Tutti questi ligandi presentano un residuo di cisteina, all'estremità N-terminale o C-terminale, per legare il peptide alle nanoparticelle. Con lo scopo di aumentare la flessibilità del ligando e favorire l'esposizione dei peptidi bioattivi sulla superficie delle AuNPs, tra la cisteina e la sequenza peptidica è stato aggiunto uno spaziatore derivato dal dietilenglicole. Due ligandi hanno una lunga catena di PEG₃₀₀₀ tiolato all'estremità N-terminale che serve ad aumentare la stabilità delle nanostrutture in ambiente biologico, mantenendo una buona esposizione del peptide sulla superficie della nanoparticella necessaria per avere un targeting efficace.^{50,51,52}

Tutte le sequenze peptidiche sono state sintetizzate mediante il procedimento di sintesi su fase solido (Solid Phase Peptide Synthesis, SPPS). Questo è un metodo di sintesi veloce e molto efficiente per la sintesi di sequenze peptidiche costituite fino a 30 amminoacidi. Come suggerito dal nome, questa procedura è basata sull'utilizzo di una resina come supporto solido. Su di essa vengono aggiunti in maniera sequenziale gli amminoacidi, in modo da far accrescere il peptide. La sintesi su fase solida presenta dei vantaggi rispetto a quella in soluzione. I principali sono la semplice purificazione delle sequenze intermedie per filtrazione dei reagenti, e la possibilità di rendere automatica la procedura di sintesi.^{53,54}

La resina è una *Rink Amide MBHA*, che permette la formazione di un peptide con un gruppo ammidico C-terminale, costituita da polistirene reticolato all'1% con divinilbenzene. La resina è funzionalizzata con un linker bifunzionale, che ha la funzione di legare il peptide alla resina stessa. Infatti, il grado di sostituzione della resina (indicato come mmol/g) sta ad indicare la densità del linker e quindi quanto peptide può legarsi sulla resina. In particolare, nella sintesi del peptide CLP2 si è utilizzata una resina con un basso grado di sostituzione, perché permettono poi l'ingresso del polimero PEG₃₀₀₀, costituito da catene lunghe ed ingombranti.

La strategia di sintesi su fase solida utilizzata è quella che sfrutta il gruppo Fmoc (gruppo fluorenilmetossicarbonilico) come protettore dell' α -ammina dell'amminoacido, e che sintetizza il peptide dall'estremità C-terminale verso quella N-terminale. Lo Fmoc viene

rimosso in condizioni basiche, perciò il linker è invece acido labile: il peptide completato può essere slegato dalla resina mediante condizioni acide moderate.^{55,56}

In Figura 10 viene mostrato lo schema generale degli step che compongono la procedura di SPPS.

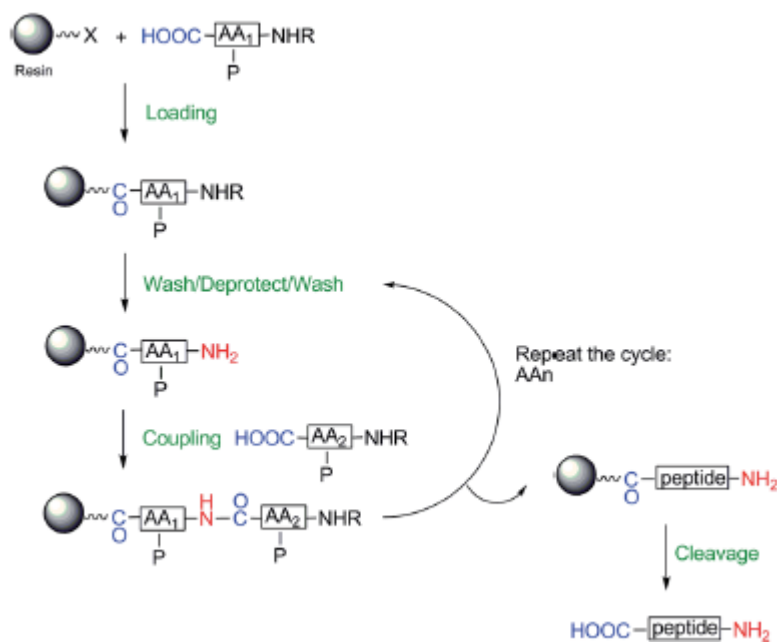


Figura 10: Schema generale di sintesi su fase solida di peptidi

Ogni ciclo è costituito da i) rimozione del gruppo protettore sull' α -ammina esposta, ii) il *coupling* del nuovo amminoacido, la cui estremità C-terminale è stata attivata, sulla funzione amminica precedentemente deprotetta. Nello specifico, il gruppo protettore Fmoc viene rimosso con ammine secondarie, come piperidina.

Anche le eventuali catene laterali degli amminoacidi devono essere protette, per evitare reazioni competitive di formazione di legami ammidici. Nello specifico, lisina e triptofano sono stati protetti con gruppo *tert*-butilossicarbonilico (Boc); istidina e asparagina con gruppo tritilico (Trt); arginina con gruppo 2,2,4,6,7-pentametildiidrobenzofuran-5-sulfonile (Pbf); serina e treonina con gruppo *tert*-butilico (tBu).

Per effettuare il *coupling* degli Fmoc-amminoacidi aggiunti alla resina e al peptide in crescita, il loro gruppo carbossilico è stato attivato come estere attivo, usando gli esteri di idrossibenzotriazolo (HOBt), preparati in situ con O-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio esafluorofosfato (HBTU), in presenza di N-etildiisopropilammina (DIPEA).

Per verificare la sintesi del peptide desiderato si è effettuato il distacco dalla resina con acido trifluoroacetico (TFA), mediante il quale si ha anche l'eliminazione dei gruppi protettori laterali. Questo viene effettuato in presenza di un cosiddetto *scavenger*, un nucleofilo sacrificale, che blocca specie carbocationiche che possono generarsi dalla rimozione dei diversi gruppi protettori. In questo caso si è utilizzato il triisopropilsilano (TIS).⁵⁷

Nel corso della tesi ho sintetizzato nuovamente il peptide CLP2 che è stato ottenuto con una resa superiore all'80% ed è stato caratterizzato con analisi HPLC e di massa.

3.3 Funzionalizzazione delle nanostrutture con i ligandi peptidici

La funzionalizzazione dei nanosistemi è stata ottenuta semplicemente incubando le nanostrutture SERRS con una soluzione acquosa del ligando peptidico tiolato. La determinazione della concentrazione di ligando da utilizzare è stata valutata considerando che una molecola di peptide è in grado di occupare 1 nm^2 sulla superficie della nanoparticella. Pertanto, il numero minimo di ligandi è uguale all'area superficiale delle nanoparticelle. Questa è stata valutata grazie ad un programma di fitting dello spettro UV-vis delle nanoparticelle iniziali, sviluppato dal Dr. Lucio Litti. Volendo usare un eccesso di ligando si è valutato che per 1 pmole di nanoparticelle d'oro, si possono aggiungere da 10 nmoli a 50 nmoli di peptide.

Dopo incubazione le nanostrutture sono state separate per centrifugazione e il surnatante raccolto per determinare la frazione di peptide non legata. Trattandosi di peptidi

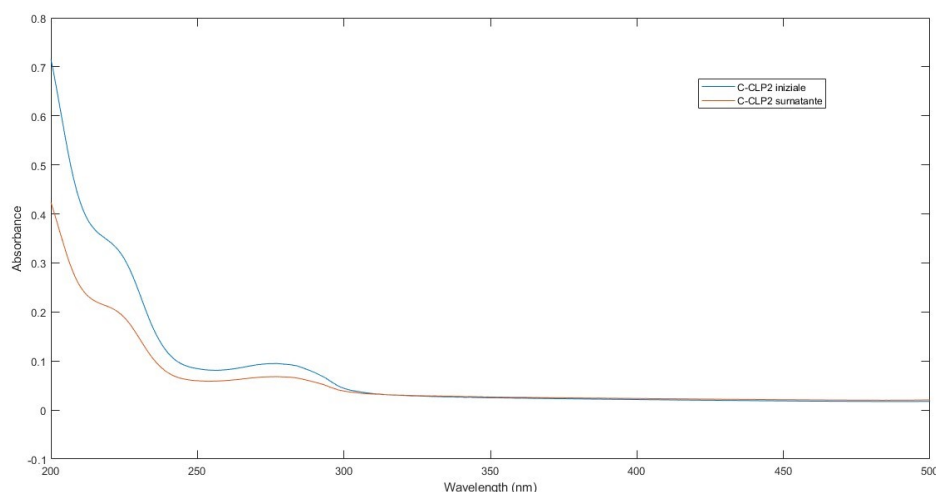


Figura 11: Esempio di confronto degli spettri UV-vis della soluzione di CCLP2 iniziale e quella raccolta dopo incubazione

contenenti uno o più amminoacidi aromatici, la quantità di peptide legato alle nanoparticelle può essere ottenuta dal confronto tra gli spettri di assorbimento UV-vis della soluzione di partenza del ligando (a concentrazione nota) e quella raccolta dopo centrifugazione delle nanostrutture (Figura 11). Grazie alla legge di Lambert-Beer, è possibile determinare la quantità di peptide presente nel surnatante e, di conseguenza, quella legata alle nanoparticelle.

Le nanostrutture così funzionalizzate sono quindi ridisperse in acqua e caratterizzate mediante spettrofotometria UV-vis-NIR, che conferma la presenza di nano-aggregati, e spettroscopia Raman che verifica la presenza dei segnali SERRS.

Si riporta di seguito la sovrapposizione dei diversi spettri UV-vis-NIR registrati durante la funzionalizzazione, che mostrano l'evoluzione e le variazioni delle nanoparticelle d'oro funzionalizzate con il peptide 3.

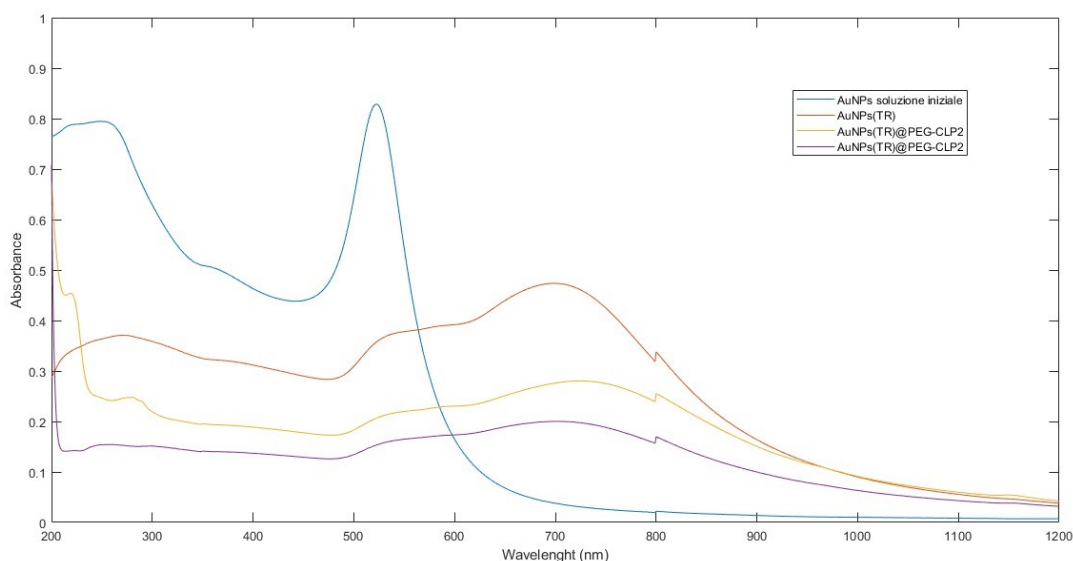


Figura 12: Spettri UV-vis-NIR registrati durante la funzionalizzazione di AuNPs con PEG-CLP2

Le nanostrutture sono formate generalmente da qualche decina di nanoparticelle (Figura 13) e le loro dimensioni e carica superficiale sono state determinate rispettivamente mediante Dinamic Light Scattering (DLS) e misura di ζ -potential come riportato nella Tabella seguente.

Tabella 2: Dati di caratterizzazione dei nanosistemi oro-peptide

Nanostruttura	N° peptidi per nanoparticella	Diametro idrodinamico (nm)	Diametro idrodinamico dopo BSA (nm)	ζ -potential (mV)	ζ -potential dopo BSA (mV)
AuNP@C-CLP2	11125	-	350.2	-	-23.3
AuNP@N-CLP2	11386	167	-	-11.5	
AuNP@PEG-CLP2	21761	-	393.7	-	-20.9
AuNP@PEG-SCLP2	5865	-	282	-	-19

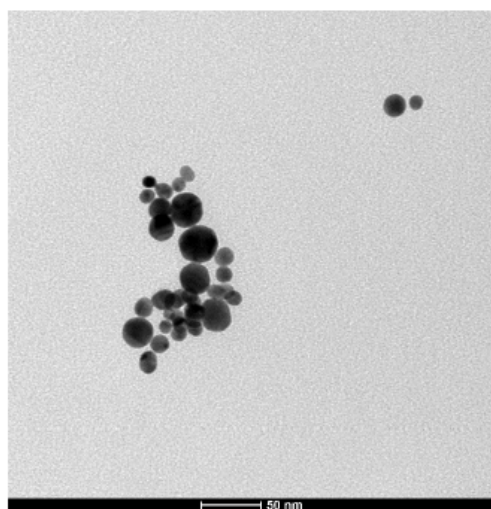


Figura 13: Immagine TEM di AuNPs funzionalizzate con PEG-CLP2

Per la conservazione delle nanostrutture, queste vengono disperse in una soluzione di tampone salino fosfato (PBS) a pH neutro, e viene loro aggiunta l'albumina di siero bovino (BSA). L'albumina è una proteina globulare, non tossica, idrosolubile, stabile a pH tra 4 e 9 e in solventi organici. La BSA ricopre la superficie delle nanostrutture e ha la funzione di incrementare la stabilità colloidale, la solubilità in acqua e l'assorbimento da parte delle cellule tumorali.^{58,59,60} Nello specifico, la BSA impedisce ulteriori aggregazioni ed eventuali precipitazioni delle nanostrutture.³¹ Dalle misure con DLS, si può notare che tutte le nanostrutture presentano un valore di ζ -potential negativo. Nel caso di AuNP@N-CLP2, analizzato prima dell'aggiunta della BSA, si registra un valore

meno negativo. La BSA negli altri tre casi sembra invece renderla più negativa, e quindi più stabile, le nanostrutture.

Si è osservata una grossa differenza nel numero di peptidi legati nel caso delle nanostrutture contenenti il PEG con un numero molto elevato di ligandi nel caso di AuNP@PEG-CLP2. Questo dato potrebbe indicare una maggiore tendenza all'aggregazione del ligando col peptide CLP002 rispetto alla sequenza mescolata, ma dovrà essere verificato.

3.4 Riconoscimento di cellule che esprimono il recettore PDL-1 da parte di nanostrutture funzionalizzate col peptide CLP002

Le nanostrutture sintetizzate sono state testate sulle cellule tumorali del cancro al seno, MDA-MB-231, per verificare la capacità di targeting verso il recettore PD-L1. Il cancro al seno può essere classificato in tumori ormonali (ER/PR) positivi (Luminali A e B), tumori HER2 positivi e tumori triplo negativo. Circa il 70% sono estrogeno-recettori α -positivi (ER α -positivi), e generalmente presentano una prognosi migliore di quelli estrogeno recettori α -negativi (ER α -negativi). Diversi studi hanno dimostrato che questi ultimi sono caratterizzati da una sovra-espressione del PD-L1.⁶¹ Proprio le MDA-MB-231 sono cellule del carcinoma mammario triplo negativo (TNBC) e sono infatti ER α -negative. Il TNBC è un tipo di cancro molto aggressivo, in cui la mancanza di recettori ormonali e la sovra-espressione di HER2 limita fortemente le opzioni di trattamento e spesso necessita di chemioterapia, tossica per il paziente.⁶² La ricerca di maggiori e più sicure alternative è quindi di fondamentale importanza e interesse.

La preparazione delle cellule tumorali e la loro incubazione con diverse concentrazioni di nanostrutture funzionalizzate col peptide CLP002 sono state eseguite dalla Dott.ssa Caligiuri presso il Centro Oncologico di Aviano.

La rilevazione attraverso la tecnica SERRS delle nanostrutture legate alle cellule è stata eseguita nel laboratorio del Prof. Meneghetti. Le cellule erano distribuite in diversi pozzetti e ogni pozzetto era stato incubato con una certa nanostruttura ad una certa concentrazione.

Si è realizzata una mappa per ogni pozzetto, registrando lo spettro Raman di un centinaio di cellule selezionate con attenzione. Infatti, per una buona caratterizzazione, le cellule

devono essere poco o per niente aggregate, il più possibile piccole, e di forma circolare. Questo perché, talvolta, le cellule hanno la tendenza a crescere in strati sovrapposti e la misura verrebbe falsata dal contributo di più cellule in contemporanea.

La figura 14 mostra la foto della porzione di un pozzetto di cellule MDA-MB-231, scattata con la telecamera abbinata al microscopio dello spettroscopio Raman, con obiettivo 20x. Si nota che alcune cellule appaiono abbastanza separate e poco sovrapposte per essere selezionate e analizzate.

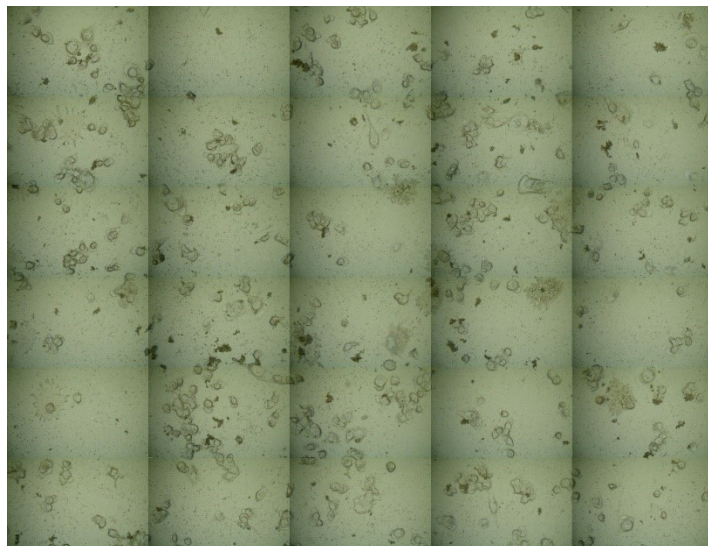


Figura 14: Istantanea scattata con obiettivo 20x di una porzione di pozzetto contenente cellule MDA-MB-231 incubate con AuNP@PEG-SCLP2 25 pM

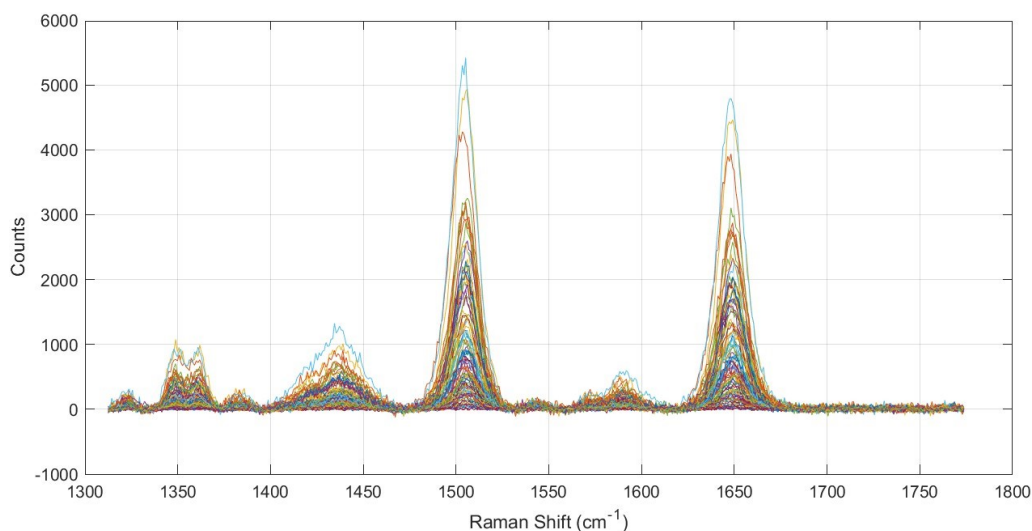


Figura 15: Spettri SERRS di un centinaio di cellule

In figura 15 sono invece riportati gli spettri Raman ottenuti dall'analisi di un centinaio di cellule. Si riconoscono i segnali a 1505 cm^{-1} e a 1649 cm^{-1} del SERRS tag che dimostrano

l'interazione delle nanostrutture funzionalizzate col CLP002 con le cellule e presumibilmente con recettore PDL-1.

In Figura 16 sono confrontate le capacità di targeting delle diverse nanostrutture verso le cellule MDA-MB-231. Per ogni concentrazione di nanostrutture, la capacità di targeting è espressa come percentuale di cellule su cui sono stati rilevati i segnali SERRS.

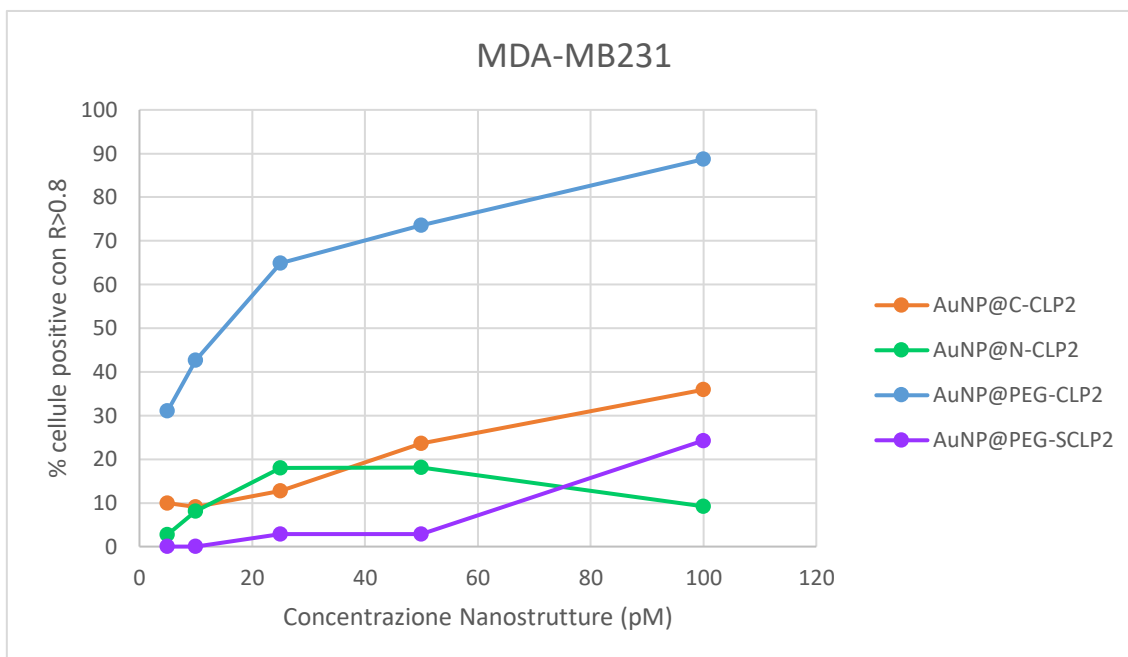


Figura 16: Grafico di confronto delle capacità di targeting delle diverse nanostrutture

È evidente che anche se tre delle quattro nanostrutture presentano il peptide bioattivo la loro capacità di targeting è molto diversa. In particolare, la nanostruttura in cui il peptide CLP002 è legato alla lunga catena di PEG esibisce una più efficiente attività di targeting rispetto alle altre due varianti. Questo può essere attribuito ad una migliore esposizione del peptide bioattivo sulla superficie delle nanoparticelle, dal momento che le due nanostrutture in cui il peptide CLP002 è legato all'oro tramite un piccolo spaziatore dimostrano una bassa capacità di targeting. Ma il dato più significativo è che l'interazione tra le nanostrutture AuNP@PEG-CLP2 e le cellule MDA-MB-231 è specifica e mediata dall'interazione del peptide col recettore PDL-1. Infatti, le nanostrutture con il peptide "mescolato" (SCLP002), sempre legato col PEG all'oro, mostrano una capacità di targeting molto modesta. Questo risultato apre la possibilità che le nanostrutture funzionalizzate con CLP002, opportunamente ingegnerizzate, possano effettivamente competere nell'interazione PD-1/PDL-1.

3.5 Funzionalizzazione di nanostrutture SERRS con ligandi peptidici diversi

Migliorare la selettività verso le cellule target è una delle sfide che riguarda la diagnostica e la terapia del cancro.³⁶ Una maggiore selettività non viene tuttavia raggiunta con un elevato numero di agenti di targeting sulla nanoparticella perché un'alta densità spesso impedisce il riconoscimento del ligando da parte del recettore. Per questo emerge l'idea che sia più favorevole avere ligandi capaci di interagire, anche debolmente, con diversi recettori piuttosto che un solo ligando che riconosca con grande affinità un solo recettore. La funzionalizzazione di AuNP con ligandi diversi richiede di approfondire il modo attraverso il quale può essere valutata la presenza dei diversi ligandi sulle nanostrutture.

3.5.1 Miscela di due ligandi peptidici

Nel caso in cui il ligando contenga un cromoforo rilevabile con tecniche spettroscopiche, la valutazione del grado di sostituzione può essere semplicemente fatta confrontando le proprietà delle soluzioni del ligando pre- e post-funzionalizzazione delle nanoparticelle. Si tratta della procedura descritta al paragrafo 3.3, che difficilmente può essere applicata a miscele di ligandi peptidici poiché gli amminoacidi aromatici (triptofano, tirosina e fenilalanina) che sono i cromofori utilizzati, sono frequenti in tutti i peptidi. In questo lavoro di tesi si è cercata una strategia per valutare la funzionalizzazione di AuNPs con due ligandi peptidici specifici per due diversi recettori. Il primo è il CLP002 che, come già detto, è specifico per il PD-L1. Il secondo è un peptide, denominato GE11, che riconosce l'EGFR, altro recettore sovra-espresso dalle cellule tumorali che è stato già utilizzato come agente di targeting su nanostrutture SERRS.³¹ Di seguito è riportata la sequenza dei 2 ligandi peptidici:

N-GE11: H-Tyr¹-His-Trp-Tyr-Gly-Tyr-Thr-Pro-Gln-Asn-Val-Ile¹²-O₂oc-Cys-NH₂

C-CLP2: Ac-Cys-O₂oc-O₂oc-Trp¹-His-Arg-Ser-Tyr-Tyr-Thr-Trp-Asn-Leu-Asn-Thr¹²-NH₂.

Dato che in entrambi sono presenti lo stesso numero di amminoacidi aromatici la spettrofotometria UV-vis non è in grado di discriminarli. Per questo si è pensato di usare la tecnica HPLC per analizzare le soluzioni del ligando pre- e post-incubazione e di preparare nanostrutture funzionalizzate con diversi rapporti tra i due peptidi. In figura 17

sono riportati i cromatogrammi dei due ligandi e della miscela 1:1 usata nell'incubazione delle nanoparticelle.

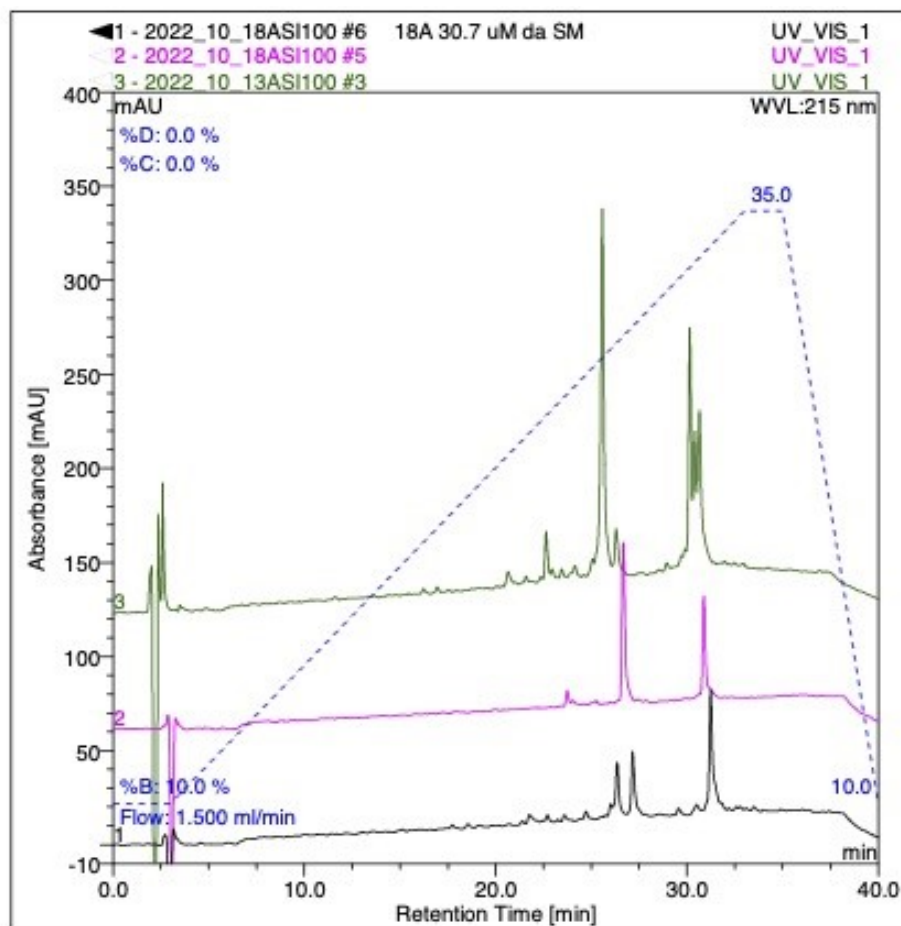


Figura 17: Cromatogrammi di CCLP2 (nero), NGE11 (rosa), miscela di CCLP2 e NGE11 (verde)

I ligandi utilizzati erano già disponibili in laboratorio e l'N-GE11 (il secondo dal basso) anche purificato in HPLC; tuttavia, si osservano 2 serie di segnali: a circa 27 min e oltre 30 min. Trattandosi di ligandi contenenti una cisteina non è da sorprendersi che sia presente sia il peptide singolo sia il suo dimero, che deriva dall'ossidazione del tiolo delle cisteine a ponti disolfuro, e che eluisce oltre i 30 min. Per la miscela 1:1 dei due ligandi (cromatogramma in alto) si osservano addirittura tre picchi cromatografici dovuti alla formazione sia disolfuri simmetrici, sia misti. È noto che anche i disolfuri reagiscono con l'oro formando legami S-Au⁶³, ma è evidente che il confronto tra soluzioni di più componenti, pre- e post-funzionalizzazione delle nanostrutture, è molto complicata. Il sistema può essere semplificato se l'analisi cromatografica viene condotta sulle soluzioni trattate con un riducente (come la tris-2-carbossietilfosfina, TCEP) che converte i punti

disolfuro a tioli, liberando i ligandi peptidici monomeri. Il TCEP ha un buon potere riducente, alta stabilità, ampio range di pH ed è inodore.⁶⁴ In effetti il trattamento delle soluzioni con un eccesso di TCEP ha liberato le cisteine e per questo è stato aggiunto alla miscela iniziale dei ligandi e del surnatante raccolto dopo incubazione, prima dell'iniezione in HPLC (Figura 18)

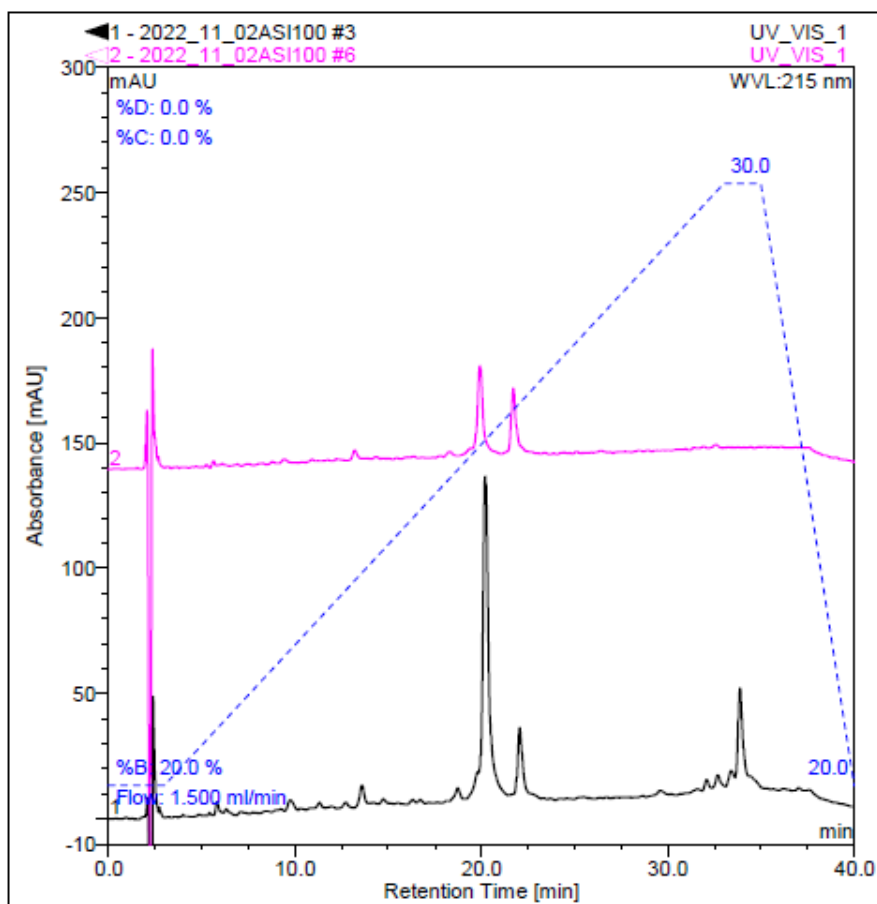


Figura 18: Cromatogramma della miscela CCLP2 e NGE11 (nero) e della miscela in presenza di TCEP (rosa)

Dai cromatogrammi HPLC della miscela iniziale e del surnatante dopo incubazione delle nanostrutture si è ricavata l'area dei picchi corrispondenti a ciascun peptide, e per differenza si è ottenuta l'area del ligando sulle nanoparticelle. Le prove sono state effettuate con i due ligandi in rapporto 1:1 e 2:1.

Nelle figure seguenti sono mostrati i risultati finora raccolti.

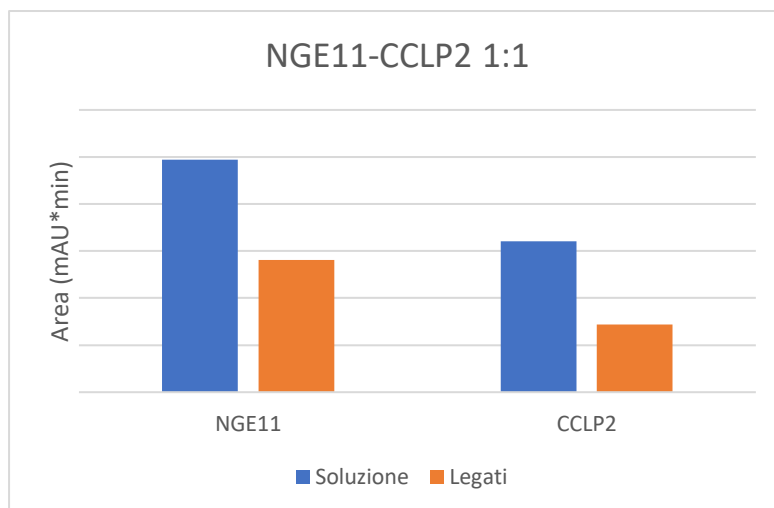


Figura 19: Area di picco dei peptidi NGE11-CCLP2 in miscela 1:1 iniziale (blu) e legata alle AuNPs (arancio)

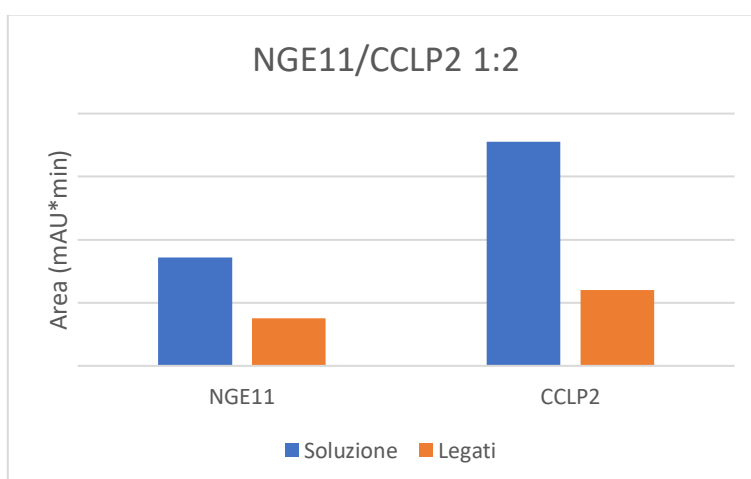


Figura 20: Area di picco dei peptidi NGE11-CCLP2 in miscela 1:2 iniziale (blu) e legata alle AuNPs (arancio)

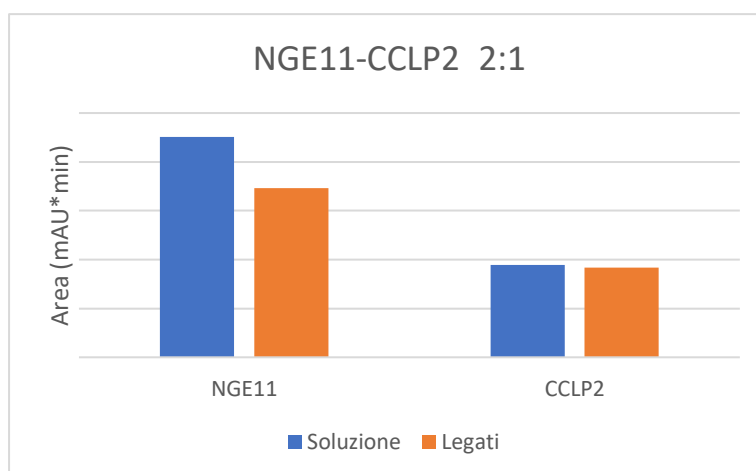


Figura 21: Area di picco dei peptidi NGE11-CCLP2 in miscela 2:1 iniziale (blu) e legata alle AuNPs (arancio)

I dati raccolti sono molto preliminari e dovranno essere ripetuti prima di trarre conclusioni. Quello che si può dire è che le nanostrutture presentano entrambi i ligandi peptidici e questo è sicuramente una caratteristica importante per aumentare la specificità del targeting. Dai grafici si vede che nelle miscele in cui uno dei due peptidi è in eccesso, lo stesso rapporto viene all'incirca mantenuto nella quantità di peptide legato alle AuNPs. Invece nella miscela con quantità uguale di ligandi N-GE11 si lega in quantità doppia rispetto al C-CLP2.

Per verificare se questo risultato possa dipendere dal rapporto tiolo-disolfuro nella miscela iniziale, le nanostrutture sono state incubate con una soluzione 1:1 dei due leganti e TCEP. Come si vede nel grafico sotto riportato, questa volta il C-CLP2 si è legato in quantità più che doppia rispetto all'N-GE11 e non abbiamo una spiegazione per questo risultato.

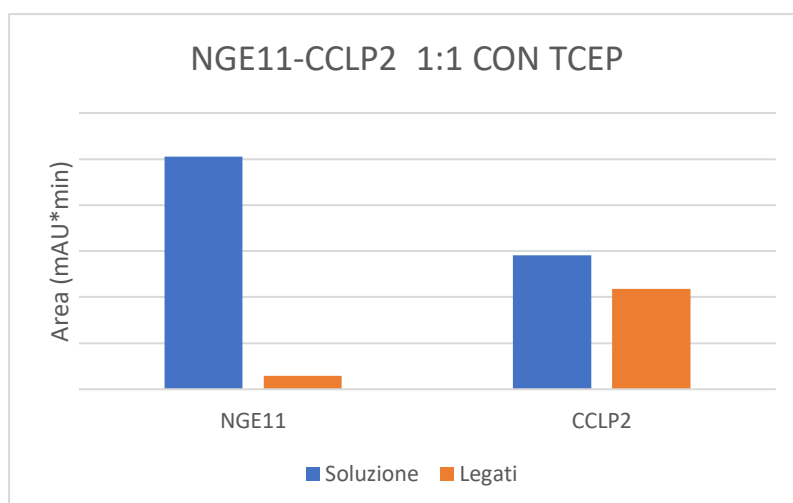


Figura 22: Area di picco dei peptidi NGE11-CCLP2 in miscela 1:1 incubata in presenza di TCEP iniziale (blu) e legata alle AuNPs (arancio)

3.5.2 Miscela di due coniugati HS-PEG-peptide

Nel caso di peptidi coniugati a lunghe catene di PEG (PMM 3000) è probabile che la tecnica HPLC usata per i peptidi non permetta di distinguere i due componenti la miscela. Un metodo alternativo per distinguere i due ligandi in soluzione potrebbe essere quello di usare per un ligando la spettroscopia UV-vis e per l'altro la fluorescenza. Un altro aspetto da indagare è se possa essere controllata la funzionalizzazione di AuNPs con due tipi di molecole di così grandi dimensioni. In questo lavoro di tesi abbiamo cominciato a Per studiare questo secondo aspetto si è pensato di preparare un HS-PEG-peptide coniugato ad un gruppo fluorescente. La 5(6)-carbossifluoresceina (Figura 23), è molto utilizzata in biologia per la sua biocompatibilità e basso costo.⁶⁵ La sua banda di assorbimento cade i 494 nm, mentre quella di emissione a 518 nm.⁶⁶ Per la sintesi del ligando fluoresceinato è stato previsto lo schema seguente.

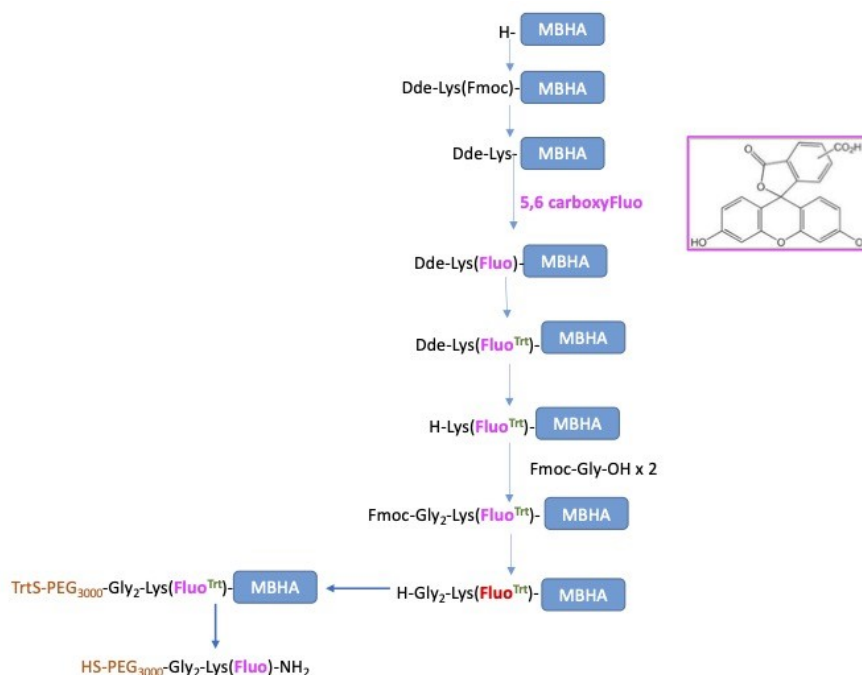


Figura 23: Schema di sintesi del peptide con 5(6)-carbossifluoresceina

La sintesi del dipeptide H-Gly-Lys(5(6)-carbossifluoresceina)-NH₂ secondo la procedura riportata in letteratura⁶⁵ è risultata più problematica del previsto. In particolare l'attacco quantitativo di Dde-Lys(Fmoc)-OH è stato ottenuto solo con un agente attivante più energetico rispetto ad HBTU/HOBt; il (1-ciano-2-etossi-2-ossotilidenamminoossi)dimetilammomorfolinocarbenio esafluorofosfato (COMU).⁶⁷ Per mancanza di tempo si è arrivati al dipeptide C-terminale che è stato caratterizzato come in HPLC e massa.

4. Conclusioni

Nel presente progetto di tesi sono state sintetizzate e caratterizzate nanostrutture SERRS d'oro, funzionalizzate col peptide CLP002, per il targeting del cancro al seno tramite riconoscimento del recettore proteico PD-L1 coinvolto nell'inibizione della risposta immunitaria dei linfociti T. Grazie alla spettroscopia SERRS questi nanosistemi potrebbero essere utili come agenti di *biosensing* e teranostica del cancro.

Per consentire il legame con le nanoparticelle d'oro, si sono utilizzati dei coniugati del CLP002 sintetizzati in un precedente lavoro di tesi. In due varianti del CLP002 era stato introdotto un residuo di cisteina all'estremità carbossilica in uno e all'estremità amminica in un altro. Per favorire l'esposizione della catena peptidica verso il recettore cellulare un altro coniugato contiene catene polimeriche di PEG con un gruppo tiolico terminale per legarsi alle AuNPs, legato al CLP002 mediante uno spaziatore cationico pentapeptidico. L'ultimo coniugato corrisponde al peptide appena descritto, ma nella versione "*scrambled*", ovvero con la sequenza amminoacidica mischiata.

Le nanoparticelle d'oro sintetizzate tramite ablazione laser in soluzione, sono state funzionalizzate con un derivato tiolato del Texas Red, che porta all'aggregazione e alla creazione di *hot spots* per l'amplificazione dei suoi segnali SERRS caratteristici. I nanoaggregati SERRS sono stati poi funzionalizzati con i quattro diversi peptidi in quattro distinte funzionalizzazioni. Le nanostrutture risultanti sono state sottoposte a caratterizzazione con spettrofotometria UV-vis-NIR, spettroscopia SERRS e DLS.

Le nanostrutture sono state testate sulle cellule tumorali MDA-MB-231 del cancro al seno, in collaborazione con il Centro di Riferimento Oncologico di Aviano e hanno dimostrato l'importanza della presenza del PEG nel ligando peptidico per ottenere una buona efficacia di targeting. Infatti, la nanostruttura AuNP@PEG-CLP2 raggiunge una capacità di targeting dell'88% a concentrazione 100 pM, a differenza degli altri coniugati che arrivano al massimo al 30%. In particolare, lo "*scrambled*" del peptide esibisce un'efficacia molto bassa; ciò conferma l'importanza della sequenza amminoacidica selezionata nell'attività di targeting specifica. Uno studio più approfondito è sicuramente necessario, ed altre prove e caratterizzazioni sono necessario per arrivare ad un'applicazione preclinica. La prospettiva migliore è il suo utilizzo negli studi *in vivo*, che confermino anche la sua capacità di bloccare l'interazione PD-1/PD-L1 ed essere usato come terapia del cancro.

Tuttavia, anche cellule sane esprimono checkpoints del sistema immunitario, sebbene in misura minore. Per aumentare la selettività delle nanostrutture verso le cellule tumorali sarebbe utile la progettazione di nanosistemi funzionalizzati con due agenti di targeting differenti.

Sono state sintetizzate e caratterizzate nanostrutture SERRS d'oro funzionalizzate con una miscela di due diversi peptidi (CLP002 e GE11), in grado di riconoscere due recettori sovraespressi dalle cellule tumorali: PD-L1 e EGFR.

La doppia funzionalizzazione di nanoparticelle d'oro con due ligandi peptidici differenti sono delle prove preliminari, che restituiscono però dei risultati incoraggianti. Le nanoparticelle vengono legate da entrambi i ligandi in buona misura, il che permette di aumentare la selettività delle nanostrutture verso le cellule tumorali.

Allo scopo di effettuare in futuro la doppia funzionalizzazione peptidica di nanoparticelle d'oro con ligandi fluoresceinati in modo da distinguere le quantità dei due peptidi aggiunti mediante spettroscopia di assorbimento e fluorescenza, è stata preparata una resina funzionalizzata con *probe* fluorescente su cui si potrà continuare la sintesi della sequenza peptidica.

Questo progetto di tesi dimostra infine come l'interdisciplinarietà sia fondamentale nel campo della ricerca e quanto sia importante la collaborazione e l'unione di diversi ambiti scientifici per uno studio completo ed efficace.

Capitolo 3

5. Parte sperimentale

5.1 Reagenti

Gli Fmoc-amminoacidi e la resina Rink Amide MBHA con grado di sostituzione 0.35 mmol/g sono prodotti Novabiochem. I reagenti usati nella sintesi su fase solida, l'albumina di siero bovino (BSA), la tri(carbossietil)fosfina (TCEP) e la 5,6-carbossifluoresceina sono prodotti Sigma-Aldrich. Tutti i ligandi peptidici erano disponibili da una precedente tesi e il derivato ditiolato del Texas Red (TR-SH) è stato fornito dal Prof. Meneghetti.

5.2 Strumenti di misura

5.2.1 HPLC

Lo strumento è costituito da: cromatografo HPLC Dionex (serie P680); autocampionatore Dionex ASI-100; detector UV a quattro lunghezze d'onda (215, 254, 280, 420 nm); il programma di elaborazione dei cromatogrammi, interfacciato allo strumento, è Chromeleon versione 6.60.

La colonna cromatografica è una colonna Vydac 218TP54 C18 polimerica a fase inversa, di dimensioni 250x4.6 mm, con particelle di diametro 5 μ m sferoidali, basata su silice 300Å, per la quale è stato usato un flusso 1.5 mL/min.

Le analisi cromatografiche sono state condotte con eluizione a gradiente utilizzando le seguenti fasi mobili:

- A) TFA 0.1% v/v in acqua
- B) Acetonitrile 90% v/v, TFA 0.1% v/v in acqua

5.2.2 HPLC-MS

Per le analisi di spettrometria di massa si è utilizzato un HPLC-UV-ESI. Lo strumento è un HPLC Agilent Technologies 1260 Infinity II, composto da: autocampionatore Agilent 1260 Infinity II Vialsampler; detector UV-Vis a due lunghezze d'onda (220 e 280nm);

sorgente di ionizzazione ESI, analizzatore a singolo quadrupolo MS 6130, fotomoltiplicatore DAD HS; computer d'interfaccia. La colonna è una Phenomenex Kinetex 3.5 μm XB-C18 100 Å, di dimensioni 100x4.6 mm, a fase inversa (flusso 1 mL/min). Nell'eluizione a gradiente le fasi mobili erano costituite da:

- A) TFA 0.1% v/v in acqua
- B) TFA 0.1% v/v in acetonitrile

5.2.3 Spettrofotometro UV-vis

Si sono registrati gli spettri UV-vis-NIR mediante spettrofotometro Agilent Cary 5000, a doppio raggio, con computer all'interfaccia. Il software accoppiato è il Cary WinUV. Si sono utilizzate cuvette di quarzo con cammino ottico pari a 0.2 cm.

5.2.4 Dinamic Light Scattering – DLS

Il diametro idrodinamico e lo ζ -potential sono stati misurati mediante DLS, con lo strumento Nano-ZetaSizer.

I parametri impostati per la misura del diametro idrodinamico sono: indice di rifrazione dell'oro a 400 nm, pari a 0.197; solvente acqua; "cuvetta di dimensionamento monouso a basso volume".

Per la misura di ζ -potential i parametri impostati sono: indice di rifrazione di Au a 400 nm, ovvero 0.197; solvente acqua; cella capillare ripiegata. Lo strumento sfrutta per l'interpretazione il modello Smoluchowski, con funzione di Henry ($f(ka)$)=1.5.

5.2.5 Spettroscopia SERRS

Le misure Raman effettuate sulle nanostrutture e sulle cellule sono state eseguite mediante spettrometro Raman InVia Basis Renishaw, costituito da: microscopio Leica confocale con obiettivi 10x e 20x e telecamera per focalizzazione del laser; rivelatore CCD. La sorgente laser è ad He-Ne a 633 nm, 12 mW di potenza, con riduzione al 10%. Si è utilizzato un reticolo a 1800 righe/mm. Per calibrare lo strumento si è utilizzato un riferimento interno di silicio. Per gli spettri delle nanostrutture si sono effettuate misure con obiettivo 10x e tempo di acquisizione di 10s. Per le mappe Raman 2D di imaging delle cellule si è utilizzato l'obiettivo 10x, con tempo di acquisizione di 1s.

5.3 Sintesi su fase solida del peptide CLP002

Il peptide CLP002 è stato sintetizzato su fase solida con il sintetizzatore automatico Advanced ChemTech 348Ω costituito da:

- i. Reattore agitato meccanicamente, costituito da 96 pozzetti (2 mL ciascuno);
- ii. Provette dove si inseriscono i reagenti in soluzione;
- iii. Braccio meccanico dotato di ago di iniezione dei reagenti nei pozzetti;
- iv. Bottiglie di vetro contenenti i solventi di lavaggio (DMF, DCM);
- v. Sistema di flusso di azoto per il filtraggio della resina.

Vi è poi un computer all'interfaccia, con un software per controllare lo strumento. Il procedimento consiste nel creare un file dove si specificano la sequenza peptidica, il numero del pozzetto da utilizzare, e gli step che lo strumento deve eseguire in ogni ciclo di reazione. In tal maniera, il software calcola la quantità di Fmoc-amminoacidi e reagenti necessaria. Da questi calcoli si preparano le soluzioni amminoacidiche e degli altri composti di reazione.

Inizialmente, è indispensabile rigonfiare la resina con DMF per un'ora circa, in maniera che tutti i suoi siti attivi siano esposti. Dopodiché, è possibile far partire la sintesi automatica.

Ogni ciclo di reazione consiste nell'attacco di uno Fmoc-amminoacido alla sequenza e si compone di due passaggi:

- i. Deprotezione della funzione α -amminica dell'ultimo amminoacido aggiunto dal gruppo Fmoc. Viene effettuata con due trattamenti con piperidina al 20% v/v in DMF (5 minuti il primo, 20 minuti il secondo), e successivo filtraggio e lavaggio della resina con DMF.
- ii. *Coupling* del nuovo Fmoc-amminoacido. Per farlo si usa una soluzione attivante 0.5 M di HBTU/HOBt in DMF, una soluzione 0.5 M di Fmoc-amminoacido e una di DIPEA 2 M in n-pirrolidone (NMP). Si utilizza un eccesso di 5 equivalenti di Fmoc-amminoacido, con miscela di HBTU : HOBt : DIPEA 5:5:10 eq (tempo di reazione 45 minuti).

La sintesi è stata eseguita partendo da 0.04 mmol di resina Rink Amide MBHA con grado di sostituzione 0.35 mmol/g. Nei passaggi critici dopo l'attacco del nuovo amminoacido è stata eseguita un'acetilazione dei gruppi amminici terminali non reagiti per addizione

di una soluzione 0.5 M di anidride acetica (eccesso di 5 equivalenti) e 0.25 M di DIPEA in DMF (tempo di reazione 30 minuti). Si sono ottenuti 213 mg di Fmoc-peptide-resina, con una resa del 87.3 %.

Terminata la sintesi, si è effettuato lo sblocco in piccolo del peptide, in seguito all'essiccazione della resina, per verificare che la sintesi sia avvenuta correttamente. Il distacco è stato eseguito per 1 ora e 30 minuti, sotto agitazione in vortex, con una soluzione di sblocco composta da TFA/TIS/acqua in rapporto 95:2.5:2.5 v/v/v. Dopodiché, la resina viene filtrata, con restituzione della soluzione acida contenente il peptide. Dopo evaporazione con azoto della miscela acida, il peptide è stato fatto precipitare con addizione di dietil etere a freddo. Si ottiene così il peptide sottoforma di sale trifluoroacetato dei gruppi basici presenti. Esso è stato caratterizzato in HPLC e all'HPLC-massa.

HPLC: Eluizione: 3 min 5%B; 5-60% di B in 30 minuti. tR 16.50 minuti. Si riporta il cromatogramma in Figura 24.

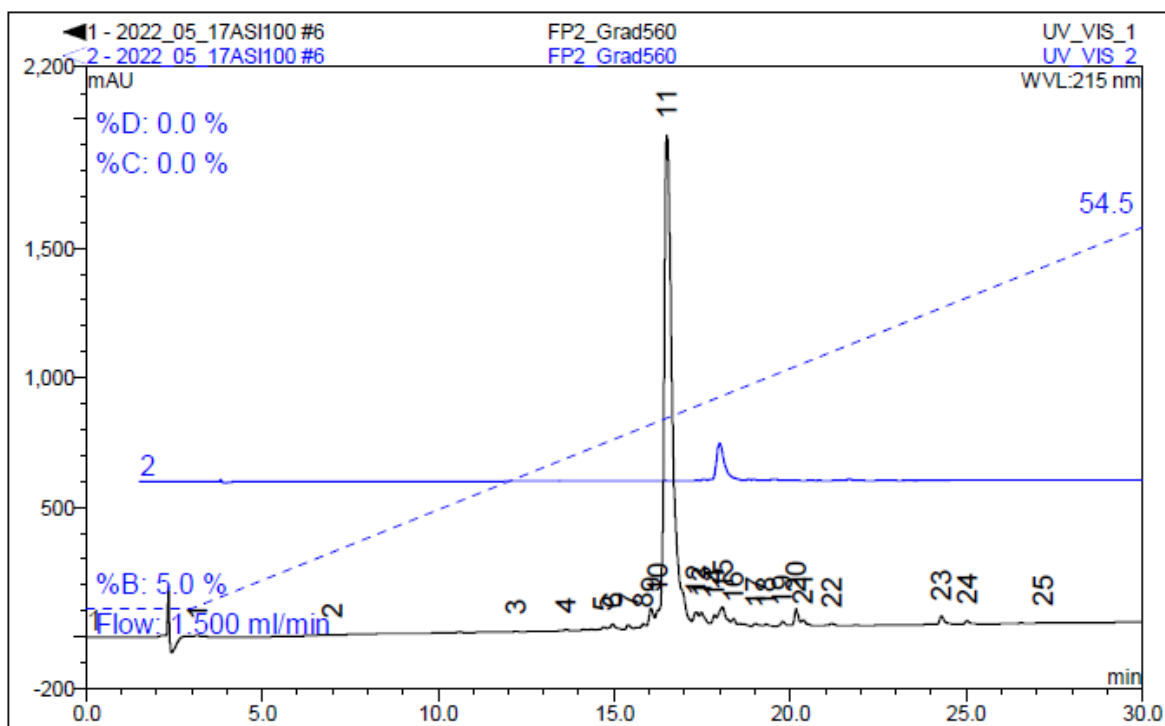


Figura 24: Cromatogramma HPLC di CLP002

HPLC-UV-ESI: Eluizione: 5-95% B in 30 minuti. tR 14.44 minuti; Mi calcolata per CHNO 2136 Da, trovato $[M+H]^+$ 2137 m/z, $[M+2H]^{2+}$ 1069 m/z. Si riportano il cromatogramma e lo spettro di massa in Figura 25.

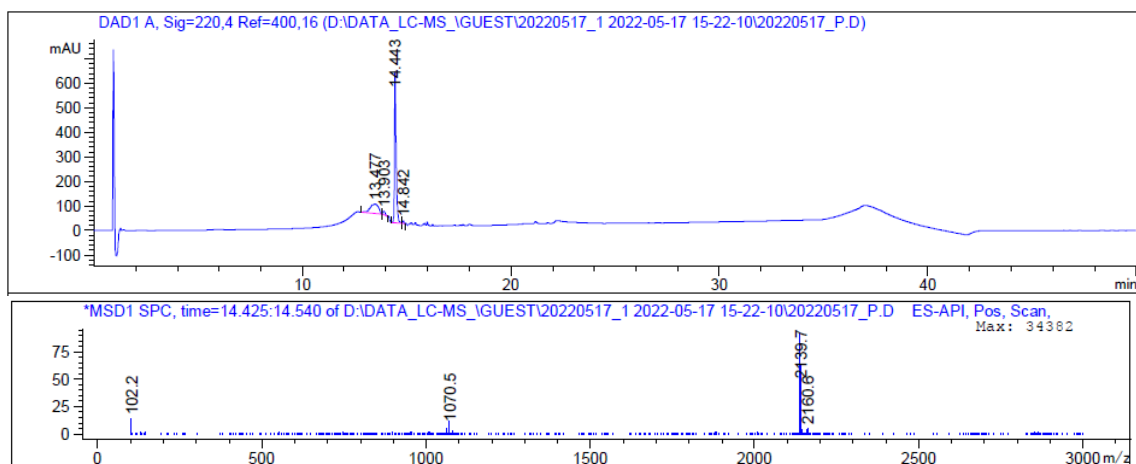


Figura 25: Cromatogramma e spettro di massa di CLP002

5.4 Sintesi e caratterizzazione delle nanostrutture d'oro funzionalizzate con singolo ligando

5.4.1 Preparazione delle nanostrutture SERRS

Ad 1 mL di soluzione acquosa 1.5 nm di AuNPs, ottenute con la tecnica LASIS si sono aggiunti 50 μ L di una soluzione 34 μ M di TR-SH in MeOH. Dopo agitazione manuale per qualche decina di secondi, si è osservata la formazione immediata di un colloide blu-grigio. Dopo centrifugazione (5000 rcf per 10 min) il surnatante è stato rimosso e il precipitato blu scuro (AuNP(TR)), è stato ripreso con 1 mL di acqua milliQ, sonicando e usando il vortex per massimo 30 s per staccare le nanoparticelle dal fondo. Questa procedura è stata ripetuta per ogni nuova nanostruttura. La soluzione colloidale risultante è stata di volta in volta caratterizzata con uno spettro UV-vis-NIR (200-1200 nm) e uno spettro Raman. Nelle Figure 26 e 27 sono mostrati gli spettri ottenuti per un tipo di nanostrutture.

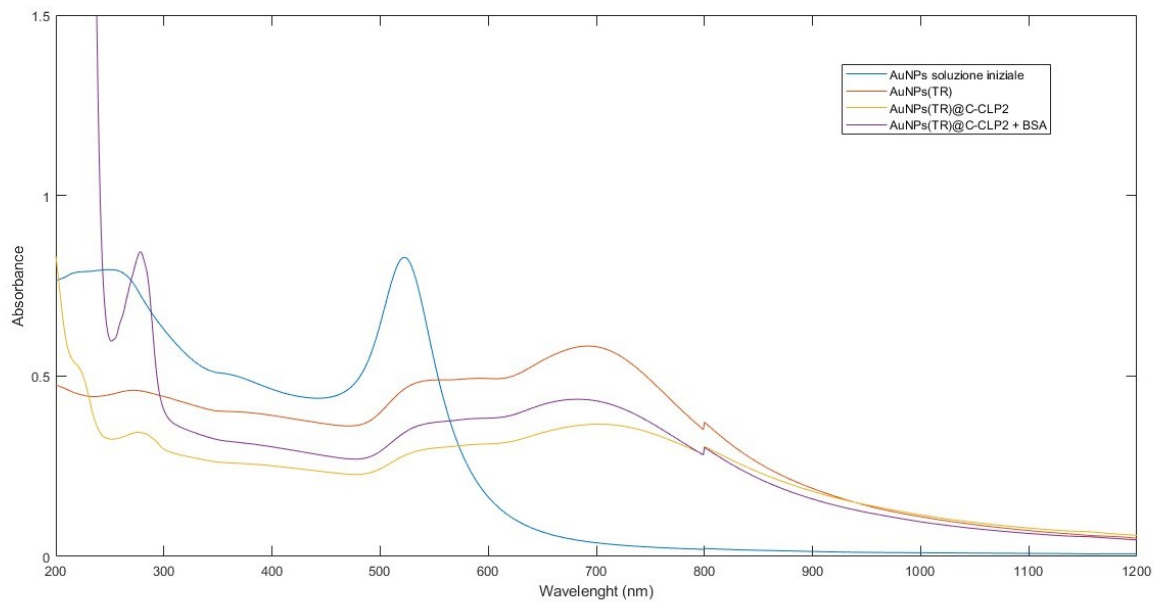


Figura 26: Spettri UV-vis-NIR registrati durante la funzionalizzazione di AuNPs con CCLP2

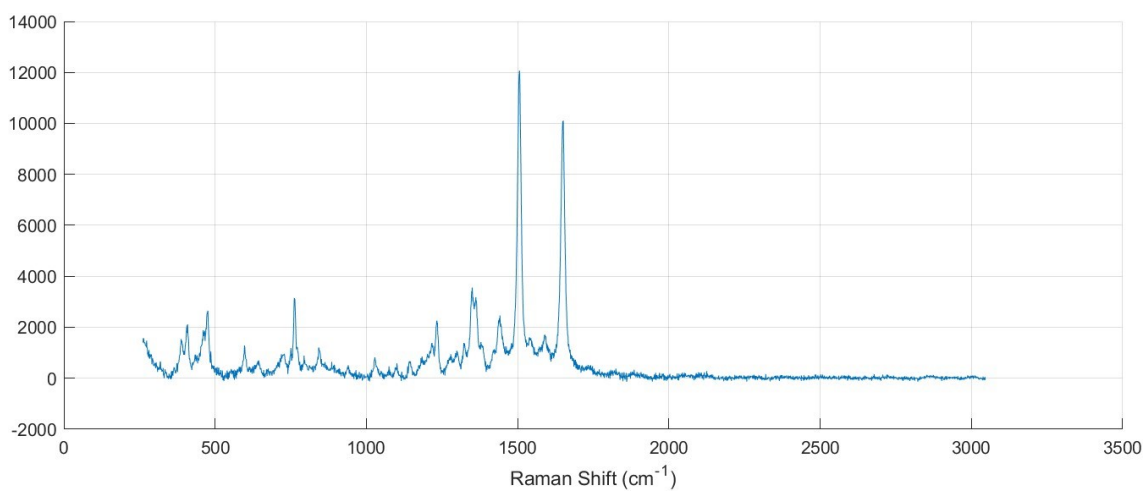


Figura 26: Spettro SERRS registrato dopo la funzionalizzazione di AuNPs con CCLP2

5.4.2 Funzionalizzazione singola con ligandi peptidici

Per ogni ligando, si è preparata una soluzione acquosa a concentrazione nota che è stata diluita con acqua alle concentrazioni indicate in Tabella 3.

Tabella 3: Peptidi usati nella funzionalizzazione di AuNPs e relative concentrazioni molari.

Peptide	Concentrazione molare aggiunta ($\mu\text{mol/L}$)
C-CLP2	20
N-CLP2	15
PEG-CLP2	20
PEG-SCLP2	25

1 mL della soluzione diluita del ligando è stata aggiunta alle nanoparticelle AuNPs(TR) e il tutto è stato lasciato in incubazione circa 20 minuti, sonicando di tanto in tanto. La miscela è stata poi centrifugata (5000 rcf, 10 minuti) e il surnatante è stato raccolto e analizzato con spettrofotometria UV-vis-NIR, per verificare la quantità di peptide non legato. Questo si è calcolato conoscendo il coefficiente di estinzione molare a 280 nm dei peptidi (ricavato mediante retta di taratura) e i valori di assorbanza a 280 nm delle soluzioni dei ligandi prima e dopo funzionalizzazione delle nanoparticelle d'oro. A titolo di esempio, nella preparazione delle NS funzionalizzate con C-CLP2 lo spettro UV-vis delle soluzioni del ligando prima e dopo incubazione è mostrato in Figura 28.

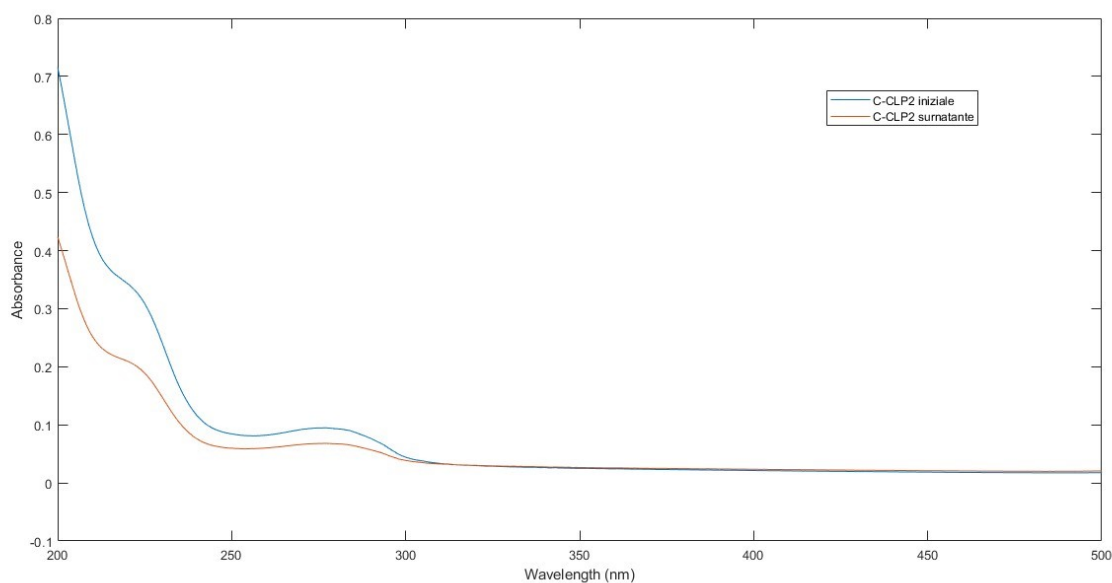


Figura 28: Spettri UV-vis di CCLP2 prima e dopo l'incubazione con AuNPs

Col coefficiente di estinzione molare, ricavato per C-CLP2 ($\epsilon_{277}=12231 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$), e la differenza di assorbanza a 277 nm ottenuta dagli spettri, in Figura 28 si è ricavata la concentrazione di peptide legato alle nanostrutture (10.94 μM) ovvero in 1 mL di soluzione 10.94 nmoli.

Dagli spettri UV-vis delle nanostrutture (Figura 26) è sempre possibile ricavare la concentrazione di AuNPs in soluzione, confrontando i valori di assorbanze a 400 nm (dove assorbe solo l'oro e non i ligandi) con quelli a 400 nm della soluzione Lasis per la quale era nota la concentrazione iniziale. Nell'esempio citato (C-CLP2) la concentrazione di AuNPs funzionalizzate era 0.9834 nM, che corrisponde a 0.9834 pmol di AuNPs in 1 mL di soluzione di AuNP@C-CLP2. Il rapporto tra moli di AuNPs e le moli di peptide legato all'ora fornisce il numero di molecole di peptide legate per nanoparticella:

$$N \text{ molecole di C - CLP2} = \frac{n(\text{C - CLP2 legato})}{n(\text{AuNPs funzionalizzate})} = 11125$$

Le nanostrutture funzionalizzate sono state lavate con acqua e ridisperse in tampone fosfato contenente un eccesso di BSA per essere consegnate al Centro Oncologico di Aviano per i test cellulari.

Le nanostrutture funzionalizzate sono state ulteriormente caratterizzate mediante DLS e misura di ζ -potential. Nelle figure seguenti sono mostrati i valori di raggio idrodinamico e di ζ -potential ottenuti per AuNP@C-CLP2.

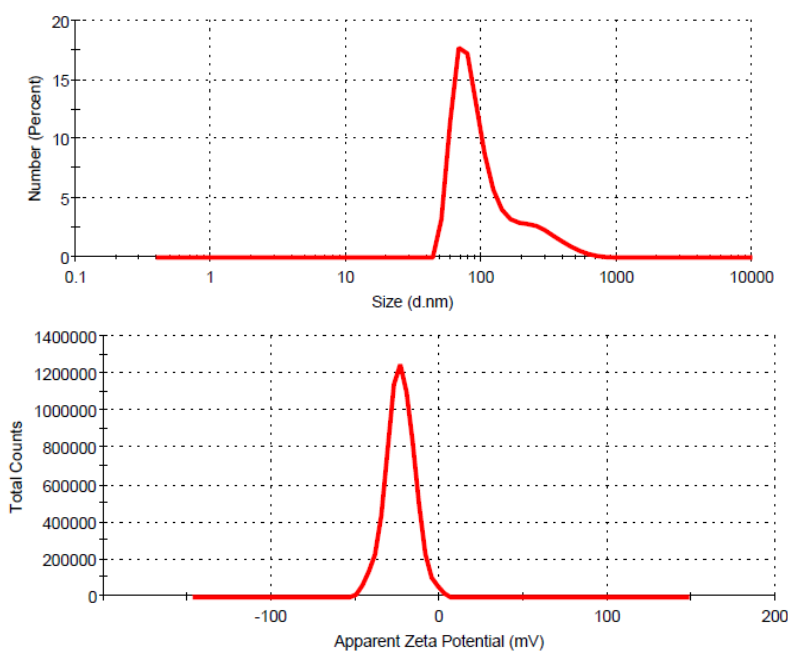


Figura 29: Spettri DLS di misura del diametro idrodinamico (in alto) e di Zeta Potential (in basso)

Nella Tabella seguente sono riassunti i risultati ottenuti nella caratterizzazione delle diverse nanostrutture. I relativi spettri sono riportati in appendice.

Tabella 4: Dati di caratterizzazione dei nanosistemi oro-peptide

Nanostruttura	N° peptidi per nanoparticella	Diametro idrodinamico (nm)	Diametro idrodinamico dopo BSA (nm)	ζ-potential (mV)	ζ-potential dopo BSA (mV)
AuNP@C-CLP2	11125	-	350.2	-	-23.3
AuNP@N-CLP2	11386	167	-	-11.5	
AuNP@PEG-CLP2	21761	-	393.7	-	-20.9
AuNP@PEG-SCLP2	5865	-	282	-	-19

5.4.3 Analisi SERRS su cellule

Si è verificata l'efficacia di targeting delle nanostrutture andando a rilevare il numero e l'intensità dei segnali SERRS presenti sulle cellule tumorali MDA-MB-231 dopo incubazione con concentrazioni diverse di nanostrutture, (5, 10, 25, 50, 100 pM). Le cellule erano state trattate con le nanostrutture in pozzetti contenenti ciascuno una popolazione di 10'000 cellule e l'incubazione condotta a 37 °C in atmosfera controllata per 1 ora.

Per ogni pozzetto sono state selezionate un centinaio di cellule, scelte il più possibile disaggregate e piccole, di cui si sono registrati gli spettri SERRS. Grazie al programma MatLab "Mappa2D" scritto dal Dr. Lucio Litti è stata effettuata l'elaborazione degli spettri. L'analisi restituisce il valore di Pearson R, che correla lo spettro di riferimento del Texas Red con quello del campione registrato, in maniera tale da riconoscere lo spettro del SERRS reporter in quello della cellula. Ciò significa che la nanostruttura in questione è riuscita a legare le cellule in modo specifico, mediante il peptide. Più alto è il valore di Pearson R (che varia da 0 a 1), maggiore risulta la correlazione; perciò, si è valutato di considerare come cellule che danno correlazione positiva quelle con $R > 0.8$.

Un fattore importante per l'affidabilità della misura è la valutazione del contributo “di fondo” del segnale. Per tale ragione per ogni pozzetto, si sono registrati un centinaio di punti esterni alle cellule, in modo da verificare se anch'essi dessero segnali SERRS, dovuti alla presenza di Texas Red non eliminato correttamente dai lavaggi con PBS. Per rimuovere il contributo di fondo, si sono quindi presi in considerazione i valori di *counts* dati dagli spettri SERRS negli spazi vuoti tra le cellule, di cui si è effettuata una media aritmetica. Il valore medio ottenuto è stato quindi sottratto ad ogni valore di *counts* risultante dagli spettri delle cellule. Questa procedura è stata eseguita per ogni pozzetto. A questo punto si ottiene un grafico, in cui si evidenzia il numero di punti che danno correlazione positiva (valori di *counts* positivi e Pearson $R > 0.8$), ovvero il numero di cellule riconosciute. Da qui si è valutata l'efficacia di targeting di ogni nanostruttura.

A titolo di esempio, si riporta un grafico di counts corretti vs Pearson R delle cellule funzionalizzate con AuNP@PEG-CLP2 50 pM.

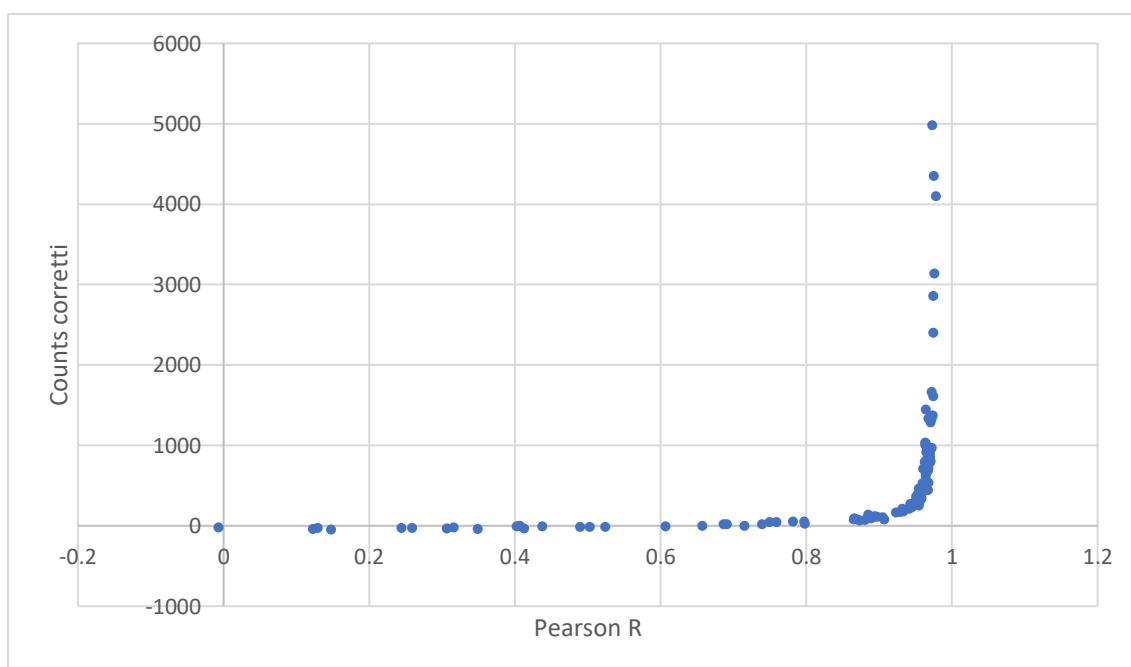


Figura 30: Grafico dei valori di counts corretti dal contributo di fondo del pozzetto in funzione dei valori di Pearson R

5.5 Funzionalizzazione di nanoparticelle d'oro con due diversi ligandi peptidici

Per la funzionalizzazione duale di nanoparticelle d'oro si sono selezionati i peptidi seguenti:

N-GE11: H-Tyr¹-His-Trp-Tyr-Gly-Tyr-Thr-Pro-Gln-Asn-Val-Ile¹²-O₂oc-Cys-NH₂

C-CLP2: Ac-Cys-O₂oc-O₂oc-Trp¹-His-Arg-Ser-Tyr-Tyr-Thr-Trp-Asn-Leu-Asn-Thr¹²-NH₂.

0.40 mg di NGE11 (PM 1787 g/mol) e 0.49 mg di CCLP2 (PM 2189 g/mol) sono stati sciolti in 1 mL di acqua deaerata ottenendo le soluzioni madri rispettivamente 224 μ M e 224 μ M.

A partire da queste sono state preparate le soluzioni (1.5 mL) di miscele di ligandi nei rapporti seguenti:

Tabella 5: Rapporti di miscela e relative concentrazioni di NGE11 e CCLP2

Rapporto	NGE11 (μM)	CCLP2(μM)
1:1	29	29
1:2	29	58
2:1	58	29

Da queste soluzioni, 1 mL è stato usato nell'incubazione delle nanoparticelle (0.98 nM), condotta a temperatura ambiente, sotto agitazione, per 30 min. Le nanoparticelle sono state quindi separate per centrifugazione, come descritto precedentemente, e il surnatante è stato controllato in HPLC analitico usando le condizioni di eluizione seguenti: 3 min al 20% B; 30 min dal 20 al 30% B; 2 min al 30% B. Rivelazione a 215 nm.

Per l'analisi HPLC a 200 μ L di soluzione della miscela di peptidi (pre-incubazione o post-incubazione) sono stati aggiunti 200 μ L di una soluzione di TCEP (0.62 mM) e 100 μ L della miscela risultante sono stati iniettati in HPLC 30 min dopo l'aggiunta.

Nelle Figure seguenti, per diversi rapporti dei due peptidi, sono messi a confronto i cromatogrammi registrati per la soluzione iniziale della miscela di ligandi e per quella raccolta a seguito dell'incubazione. In Tabella sono riportate le aree dei picchi (mAU*min) ottenuti nelle diverse analisi.

MISCELA NGE11/CCLP2 1:1

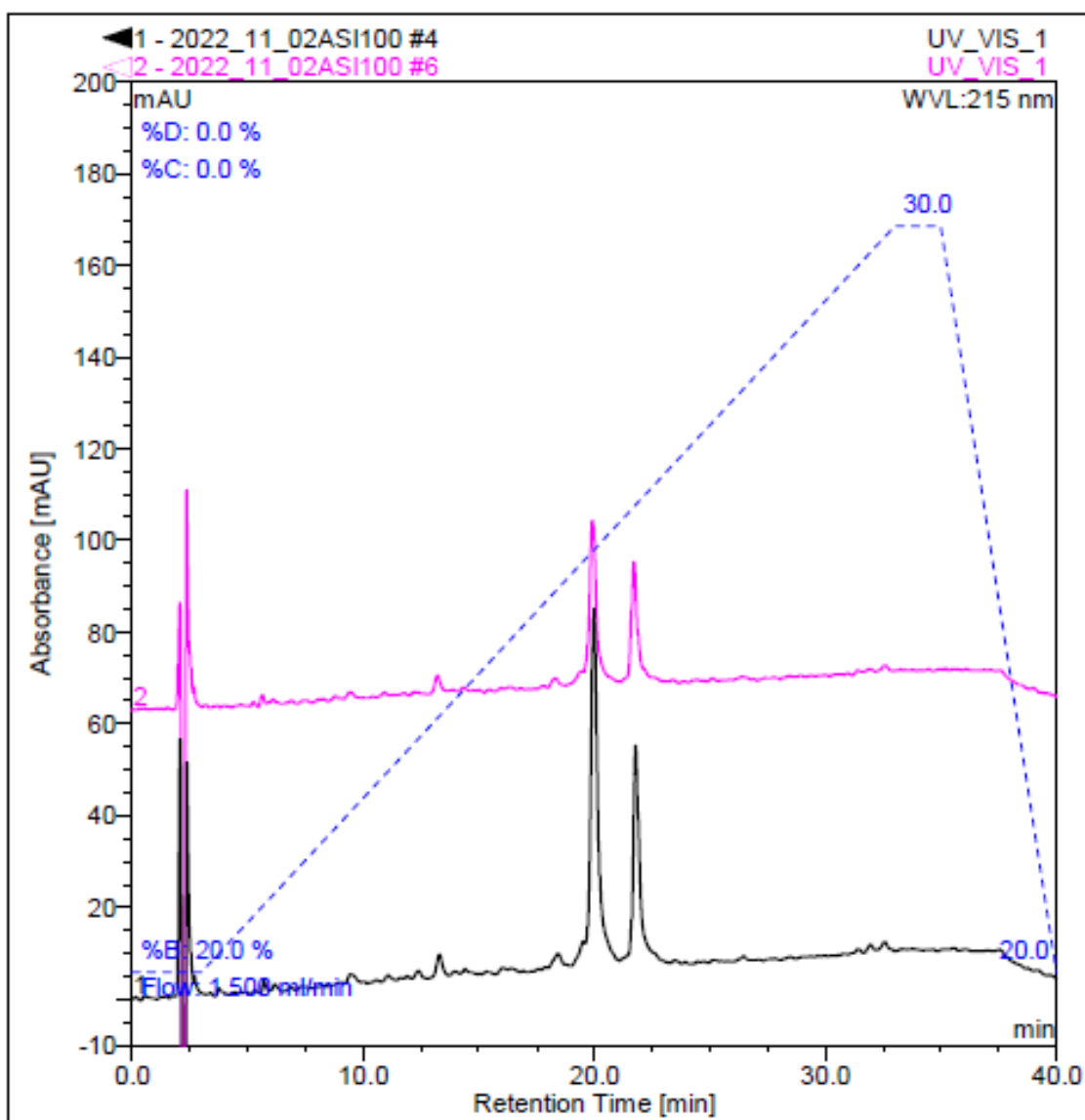


Figura 31: HPLC della soluzione iniziale (nero) e raccolta dopo incubazione (rosa) della miscela 1:1

Tabella 6: Area (mAU*min) dei picchi registrati in HPLC della miscela 1:1

NGE11/CCLP2 1:1			
Area (mAU*min)	Area peptide iniziale	Area peptide non legato	Area peptide legato
NGE11	24.72	10.67	14.05
CCLP2	16.01	8.82	7.19

Per la miscela 1:1 dei due ligandi (ciascuno 29 μ M) l'incubazione delle nanostrutture è stata fatta anche in presenza di TCEP (202 μ M). I dati ottenuti sono di seguito riportati

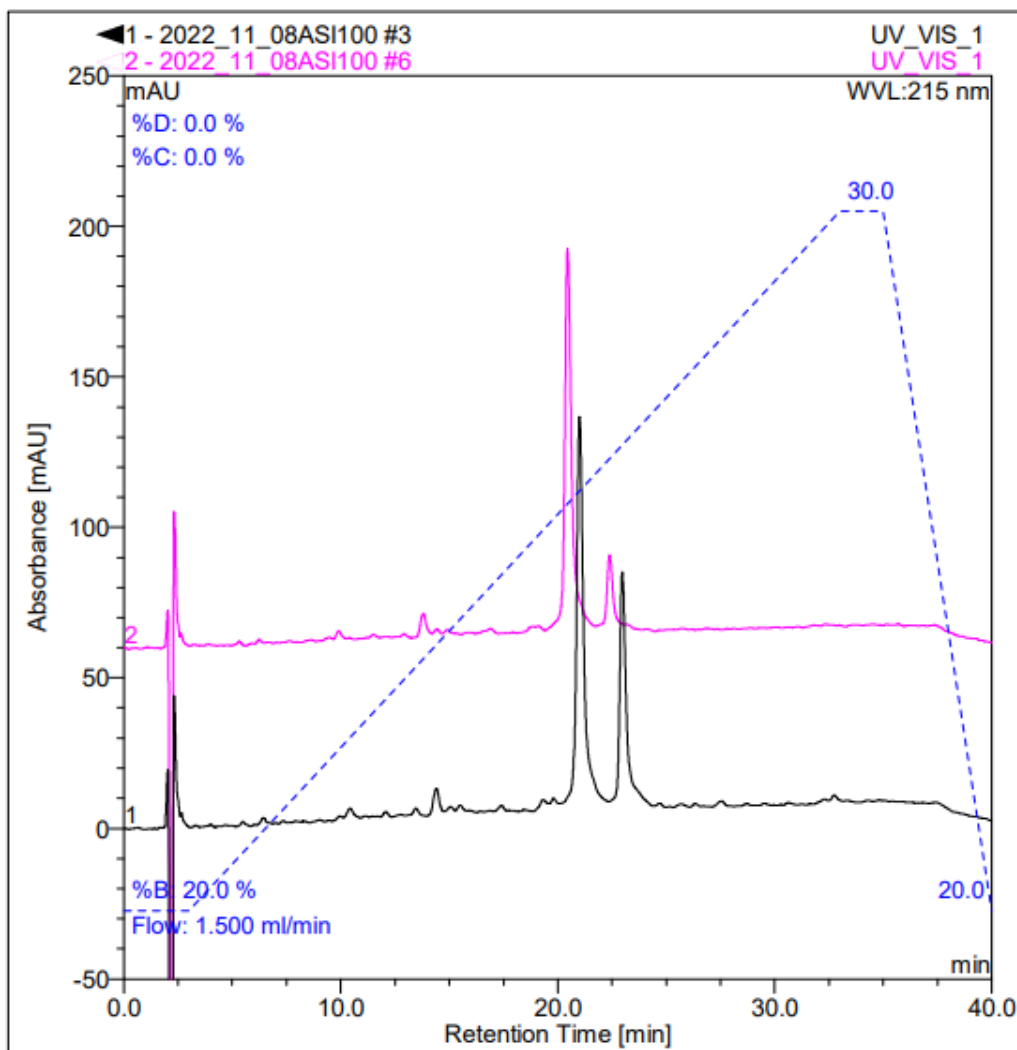


Figura 32: HPLC della soluzione iniziale (nero) e raccolta dopo incubazione (rosa) della miscela 1:1 in presenza di TCEP

Tabella 7: Area (mAU*min) dei picchi registrati in HPLC della miscela 1:1 in presenza di TCEP

NGE11/CCLP2 1:1 + TCEP			
Area (mAU*min)	Area peptide iniziale	Area peptide non legato	Area peptide legato
NGE11	50.50	47.55	2.95
CCLP2	29.06	7.32	21.74

MISCELA NGE11/CCLP2 1:2

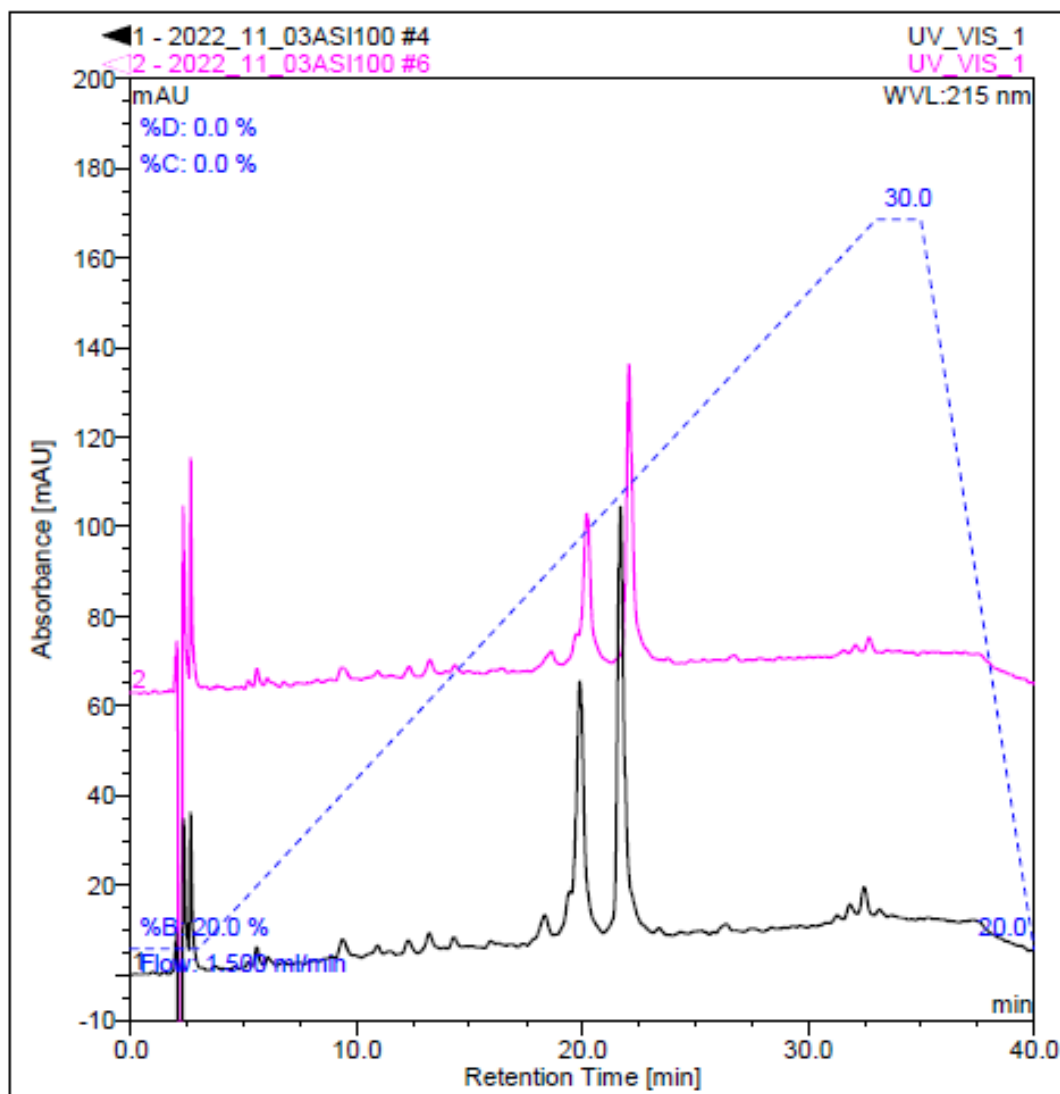


Figura 33: HPLC della soluzione iniziale (nero) e raccolta dopo incubazione (rosa) della miscela 1:2

Tabella 8: Area (mAU*min) dei picchi registrati in HPLC della miscela 1:2

NGE11/CCLP2 1:2			
Area (mAU*min)	Area peptide iniziale	Area peptide non legato	Area peptide legato
NGE11	17.17	9.62	7.54
CCLP2	35.51	23.39	12.02

MISCELA NGE11/CCLP2 2:1

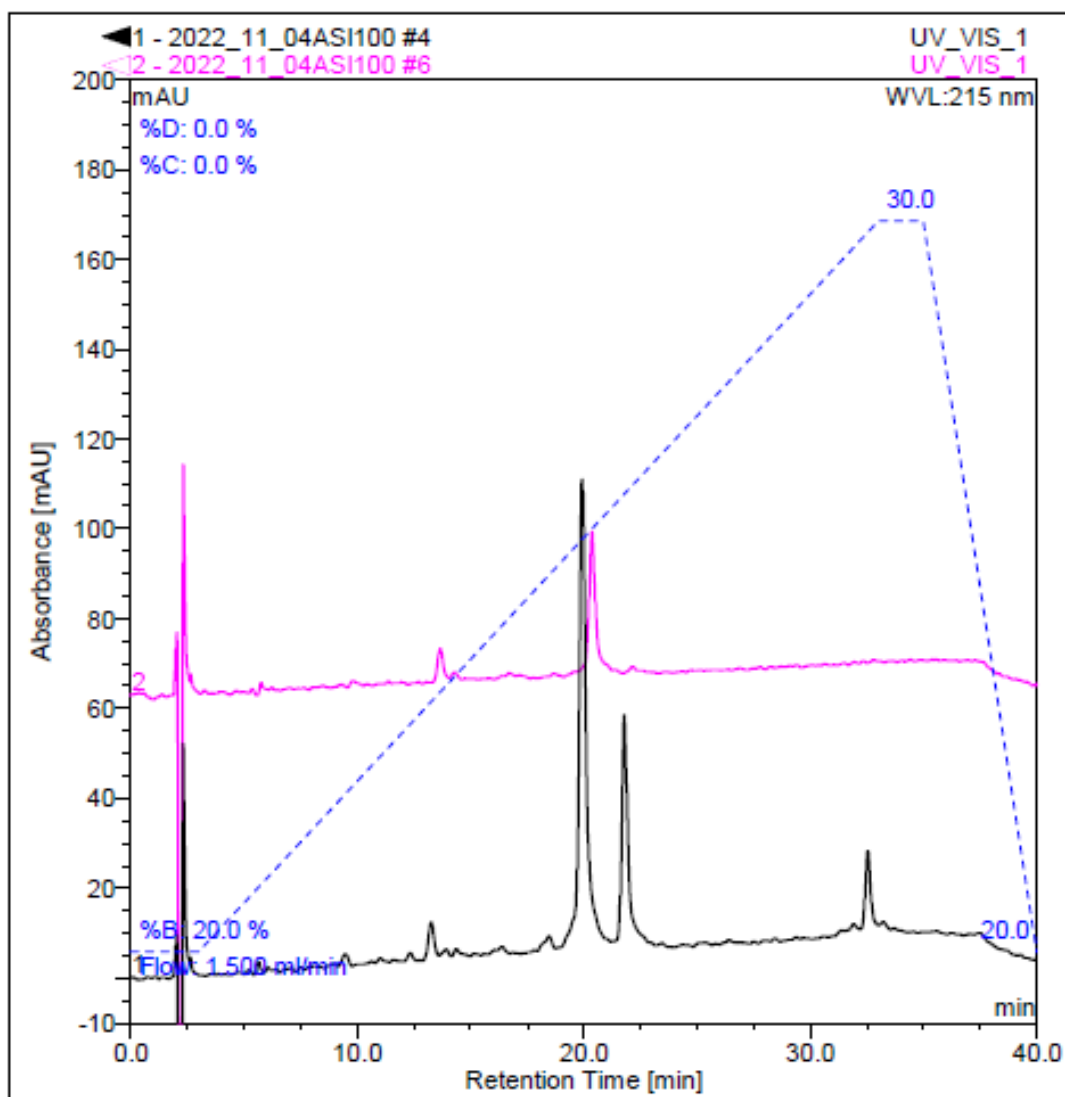


Figura 34: HPLC della soluzione iniziale (nero) e raccolta dopo incubazione (rosa) della miscela 2:1

Tabella 9: Area (mAU*min) dei picchi registrati in HPLC della miscela 2:1

CCLP2/NGE11 1:2			
Area (mAU*min)	Area peptide iniziale	Area peptide non legato	Area peptide legato
NGE11	45.13	10.55	34.58
CCLP2	18.86	0.50	18.36

5.6 Sintesi su fase solida del dipeptide funzionalizzato con 5(6)-carbossilfluoresceina

Il dipeptide funzionalizzato con 5(6)-carbossilfluoresceina H-Gly-Lys(Fluo)-NH₂ è stato sintetizzato mediante sintesi su fase solida manuale. La procedura si basa sempre sul ciclo deprotezione-coupling, ma differisce dalla sintesi su fase solida automatica principalmente per il fatto che le operazioni vengono eseguite manualmente; inoltre, il reattore è costituito da una siringa da 4 mL, in cui viene inserito un filtro sul fondo, su cui viene posta la resina e avviene la crescita del peptide.

La sintesi è stata condotta partendo da 37 µmol di Rink Amide MBHA con grado di sostituzione 0.35 mmol/g.

Dopo aver rigonfiato la resina per circa un'ora in DMF, si è effettuata la deprotezione con piperidina al 20% v/v in DMF, eliminando lo Fmoc. A questo punto si è effettuato il coupling di Dde-Lys(Fmoc)-OH (4 equivalenti), in presenza di HBTU, HOBt e DIPEA (4:4:12 equivalenti) in DMF (18 h in agitazione).

Si è verificato che il coupling dell'amminoacido fosse avvenuto completamente mediante un test di Kaiser,⁶⁸ che rileva gruppi amminici primari liberi. Dato il risultato positivo del test, si è reso necessario ripetere lo step di coupling in presenza di un attivante del gruppo carbossilico più forte. Perciò si sono aggiunti altri 3 equivalenti di lisina, 3 equivalenti di COMU e 6 equivalenti di DIPEA in NMP (22 h in agitazione). Il test di Kaiser ha poi dato esito negativo, confermando la completa addizione dell'amminoacido alla resina.

Per evitare reazioni competitive date dai possibili gruppi amminici della resina non reagiti, si è effettuato un capping con 5 equivalenti di anidride benzoica 2.5 equivalenti (rispetto all'anidride) di piridina in DMF anidra (30 minuti in agitazione).

A questo punto si è deprotetta la lisina dallo Fmoc e si è eseguito il coupling con la 5,6-carbossilfluoresceina (2.5 equivalenti), in presenza di HOBt (2.7 equivalenti) e N,N'-diisopropilcarbodiimmide DIC (2.7 equivalenti) in DMF/DCM (1:1 v/v) (20 h in agitazione).

La resina di colore arancio è stata poi trattata con piperidina al 20% per 40 minuti in agitazione in vortex. Questo passaggio risulta importante per eliminare la presenza di sottoprodotti costituiti da unità di carbossilfluoresceina addizionali.⁶⁵

Si è reso necessario proteggere la carbossilfluoresceina mediante due trattamenti, ciascuno con 10 equivalenti di tritilcloruro e 10 equivalenti di DIPEA in DCM (18 h sotto agitazione). Il gruppo Dde è rimosso selettivamente con idrazina monoidrata al 2% in

DMF, ma questa reagisce con la carbossifluoresceina formando un idrazone o un'idrazide. Il gruppo tritilico protegge il fluorescente sui suoi gruppi idrossi-fenolici, convertendolo nella sua forma lattonica, visibile dal cambiamento di colore da arancio a giallo.

A questo punto si è deprotetta la lisina dal Dde mediante due trattamenti con idrazina (3 min ciascuno). La deprotezione è stata confermata dall'analisi UV-vis dei filtrati dopo i trattamenti con idrazina e i lavaggi con DMF. Il picco di assorbimento relativo al Dde (305 nm) diminuisce sempre di più.

Si è infine effettuato il coupling della Fmoc-Gly-OH con HBTU, HOBt e DIPEA (4:4:4:12 equivalenti, 16 h in agitazione).

Sul prodotto ottenuto si è effettuato lo sblocco in piccolo dalla resina per verificare la formazione del dipeptide fluoresceinato, con TFA/TIS/acqua (95:2.5:2.5 v/v/v). In seguito a precipitazione con etere etilico, si è eseguita l'analisi HPLC e HPLC-UV-ESI.

HPLC: Eluizione: 3 min 5%B; 5-60% di B in 30 minuti. tR 15 minuti. Si riporta il cromatogramma in Figura 35.

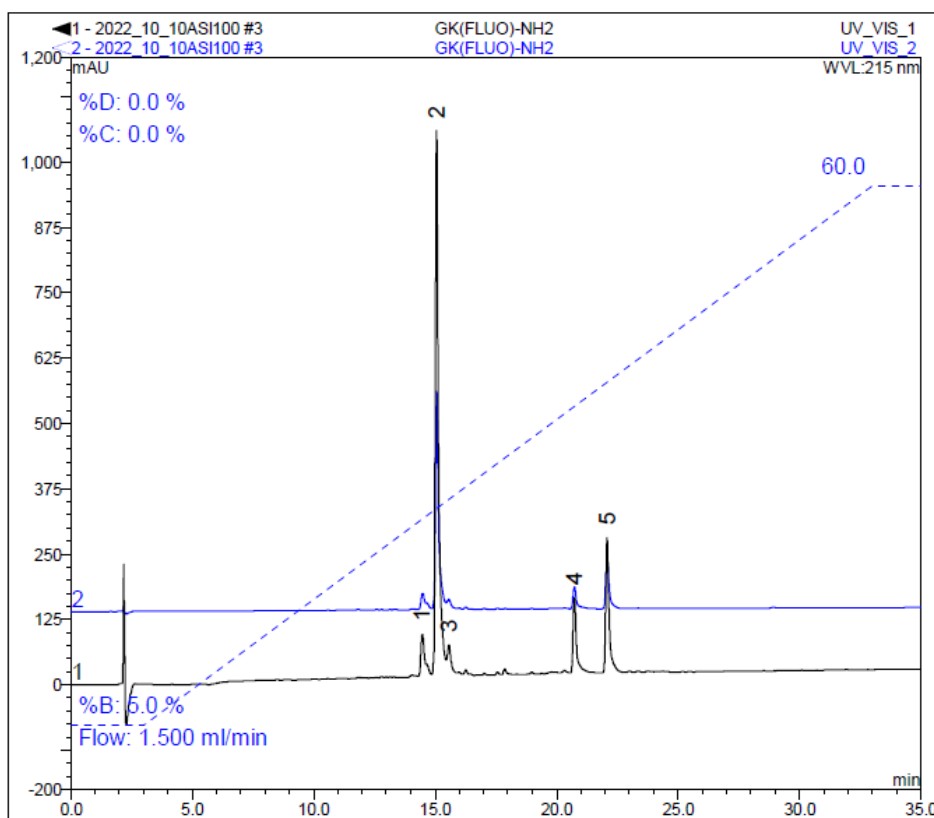


Figura 35: HPLC di H-GK(Fluo)-NH₂

HPLC-UV-ESI: Eluizione: 5-% B in 30 minuti. tR 13.33 minuti; Mi calcolata per CHNO 561 Da, trovato $[M+H]^+$ 562 m/z. Si riportano il cromatogramma e lo spettro di massa in Figura 36.

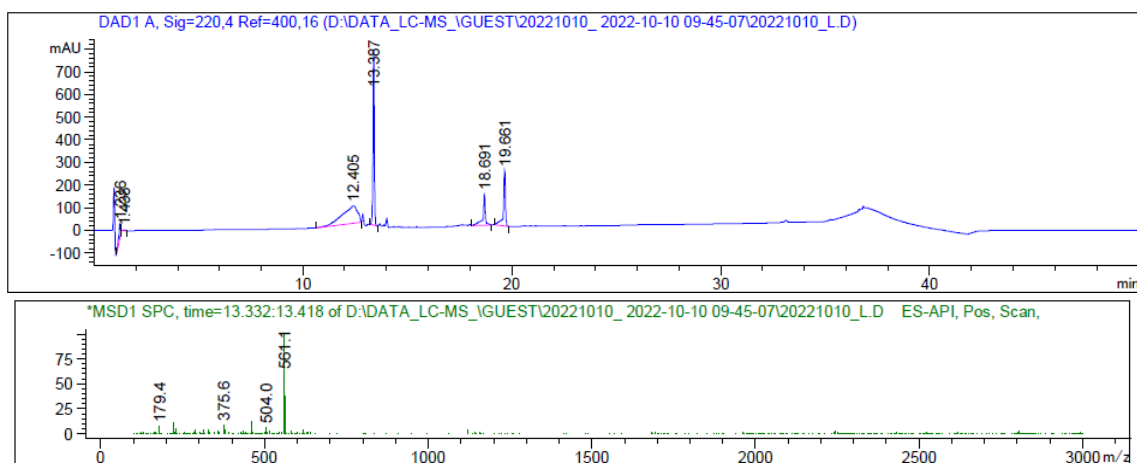


Figura 36: HPLC-UV-ESI di H-GK(Fluo)-NH₂

Appendice

Caratterizzazioni di AuNP@C-CLP2

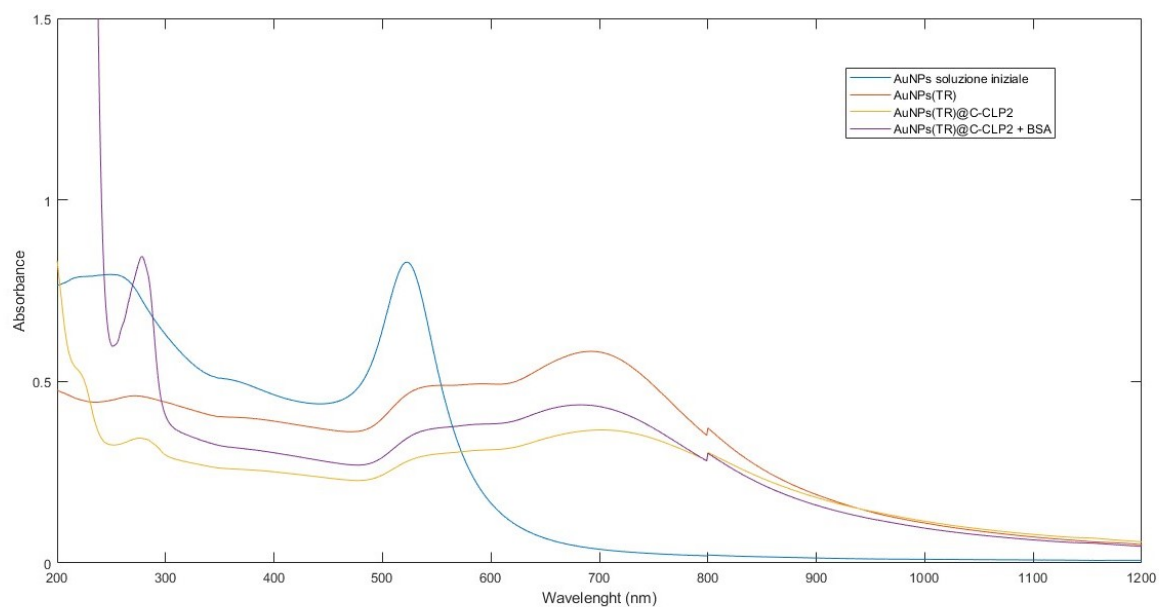


Figura 37: Spettri UV-vis-NIR registrati durante la sintesi di AuNP@C-CLP2

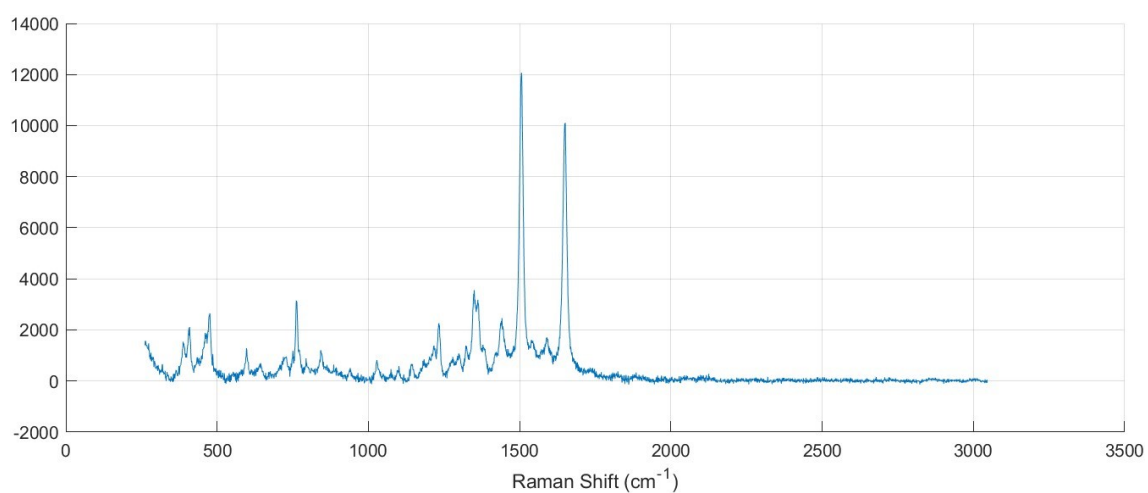


Figura 38: Spettro SERRS di AuNP@C-CLP2 con BSA

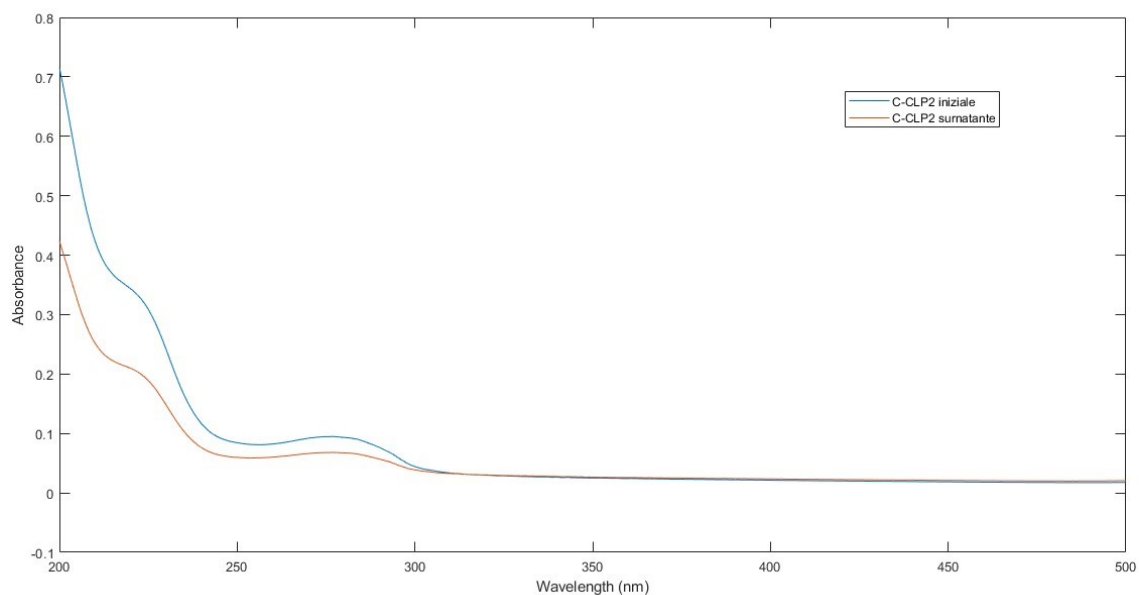


Figura 39: Spettri UV-vis di confronto tra C-CLP2 iniziale (blu) e C-CLP2 raccolto dopo incubazione (rosso)

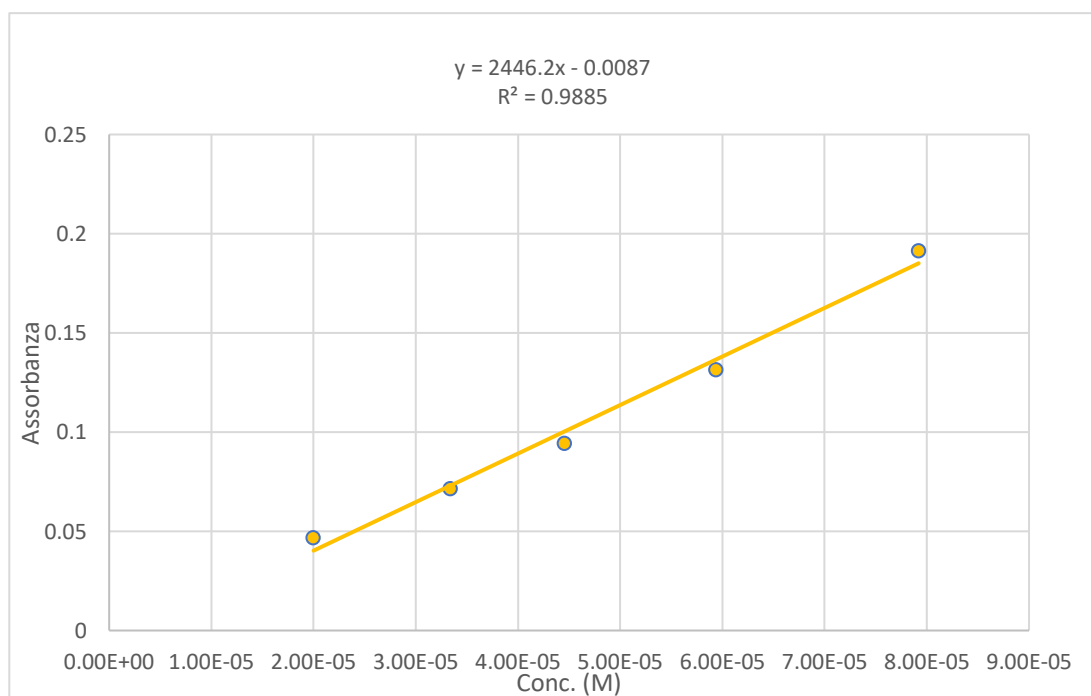


Figura 40: Retta di taratura di C-CLP2

Coefficiente di estinzione molare, ricavato dalla retta di taratura: $\epsilon_{277} = 12231 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$.

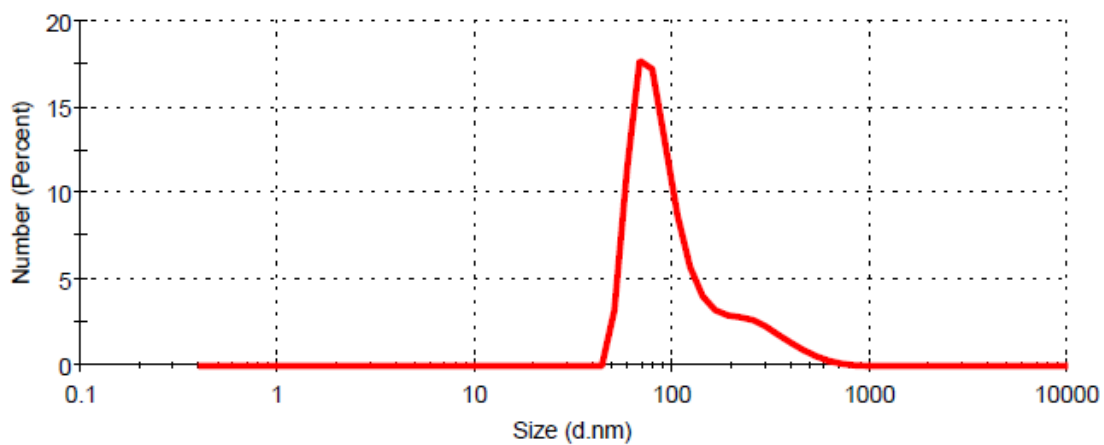


Figura 41: Spettro DLS di misura del diametro idrodinamico di AuNP@C-CLP2

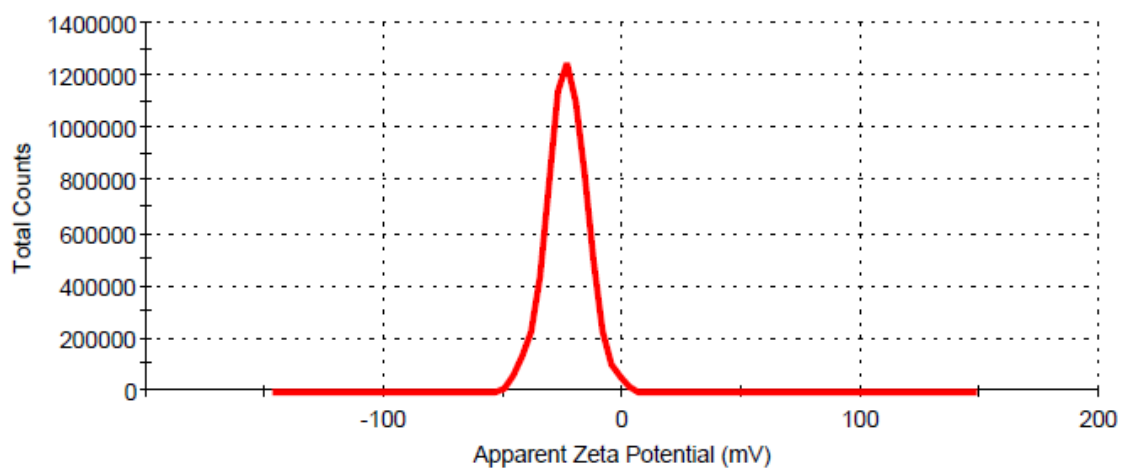


Figura 42: Spettro DLS di misura di ζ -Potential di AuNP@C-CLP2

Caratterizzazioni di AuNP@N-CLP2

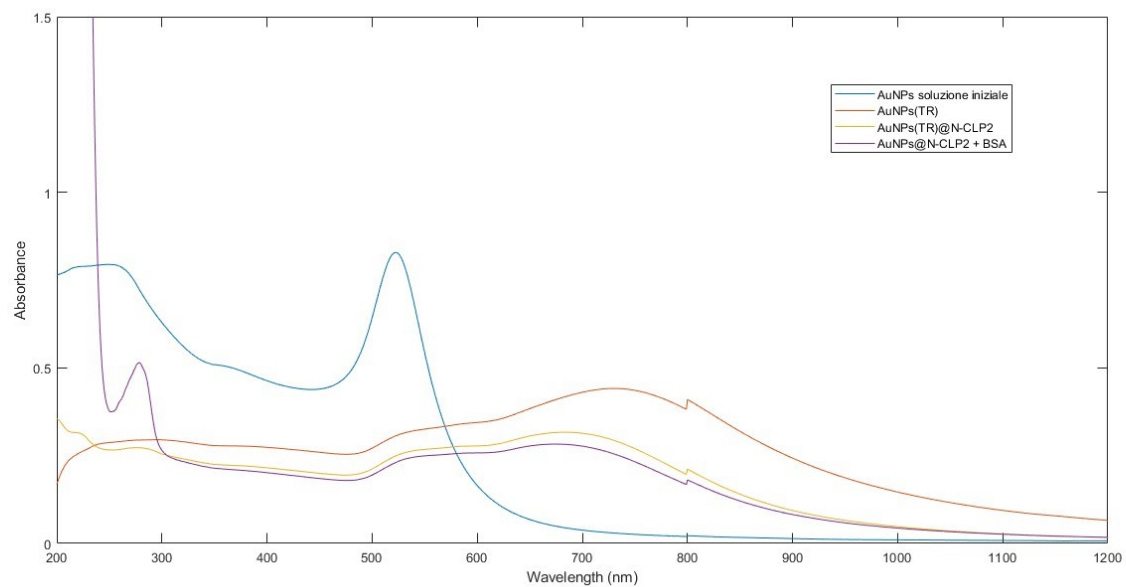


Figura 43: Spettri UV-vis-NIR registrati durante la sintesi di AuNP@N-CLP2

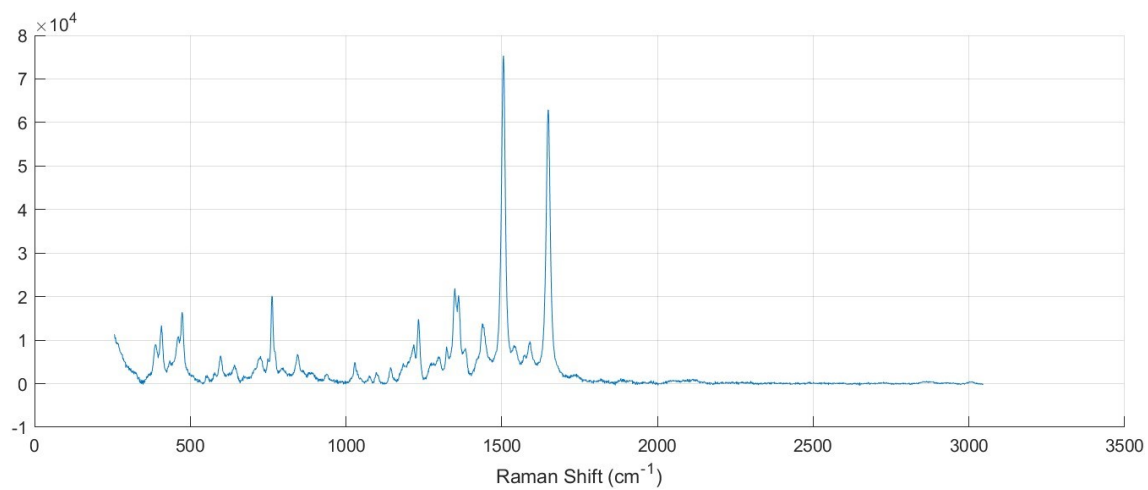


Figura 44: Spettro SERRS di AuNP@N-CLP2

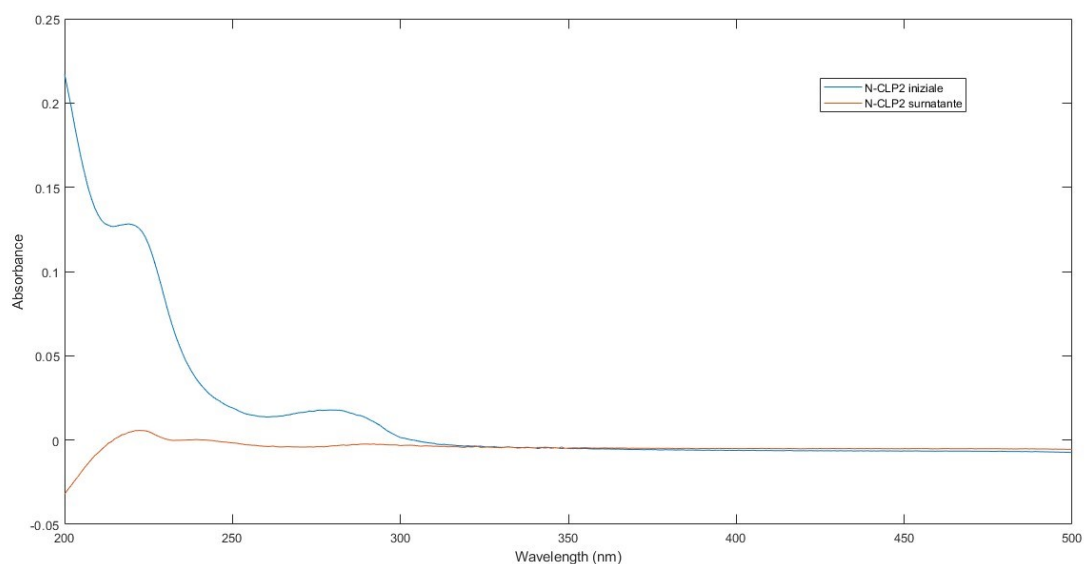


Figura 45: Spettri UV-vis di confronto tra N-CLP2 iniziale (blu) e N-CLP2 raccolto dopo incubazione (rosso)

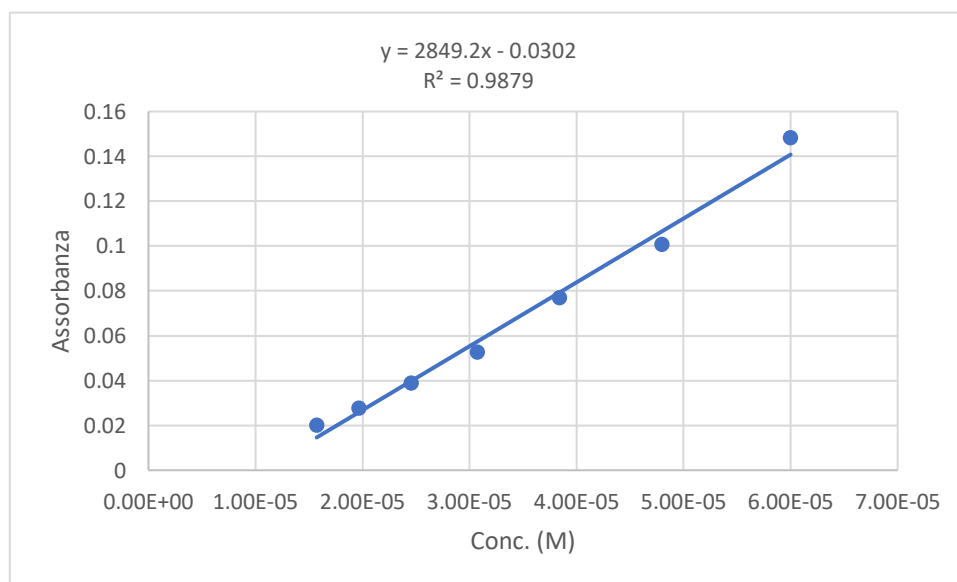


Figura 46: Retta di taratura di N-CLP2

Il coefficiente di estinzione molare, ricavato dalla retta di taratura: $\epsilon_{280}=14246 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$.

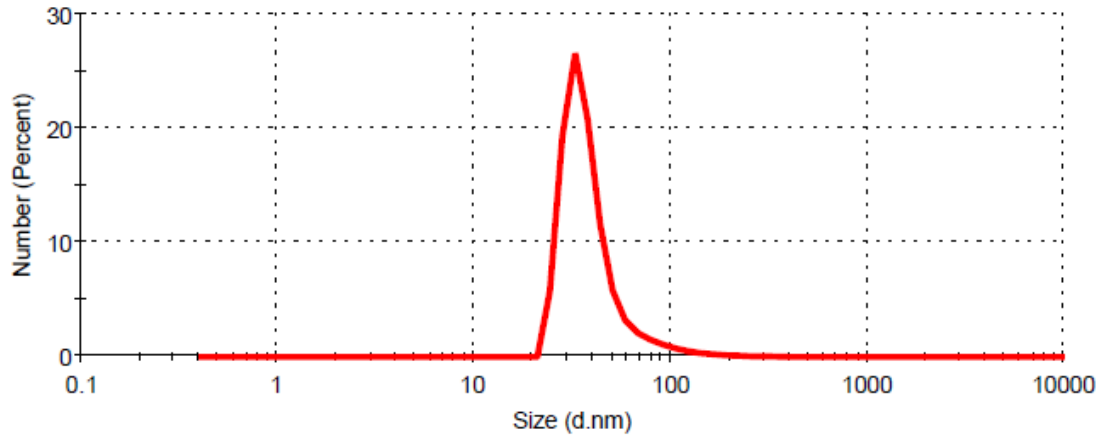


Figura 47: Spettro DLS di misura del diametro idrodinamico di AuNP@N-CLP2

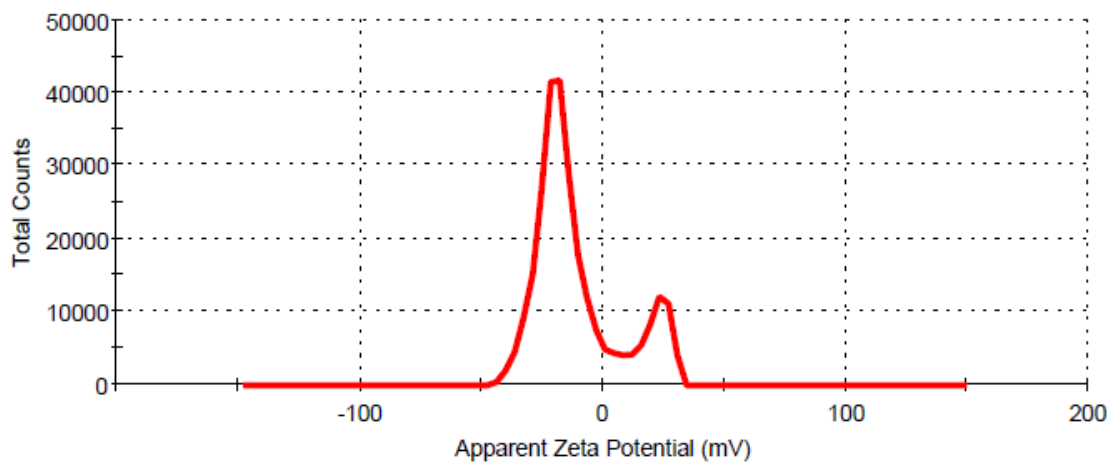


Figura 48: Spettro DLS di misura di ζ -Potential di AuNP@N-CLP2

Caratterizzazioni di AuNP@PEG-CLP2

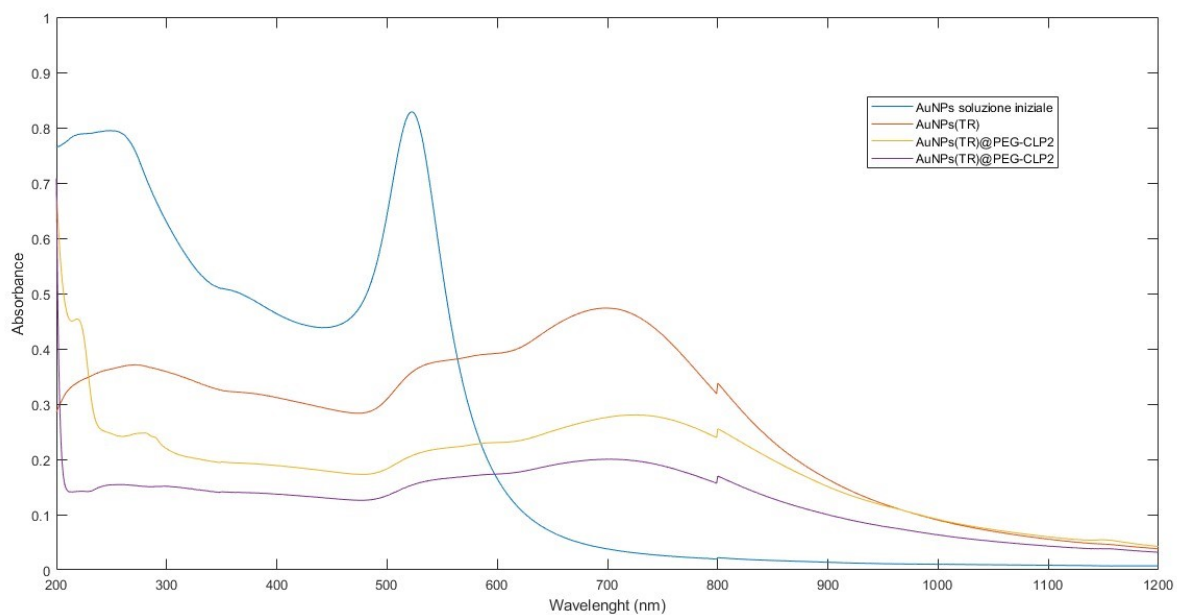


Figura 49: Spettri UV-vis-NIR registrati durante la sintesi di AuNP@PEG-CLP2

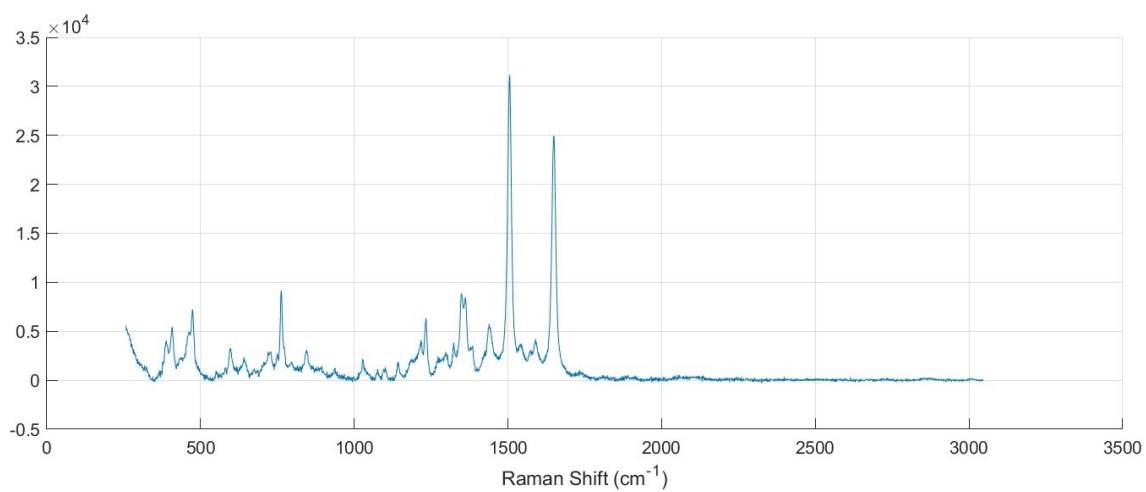


Figura 50: Spettro SERRS di AuNP@PEG-CLP2

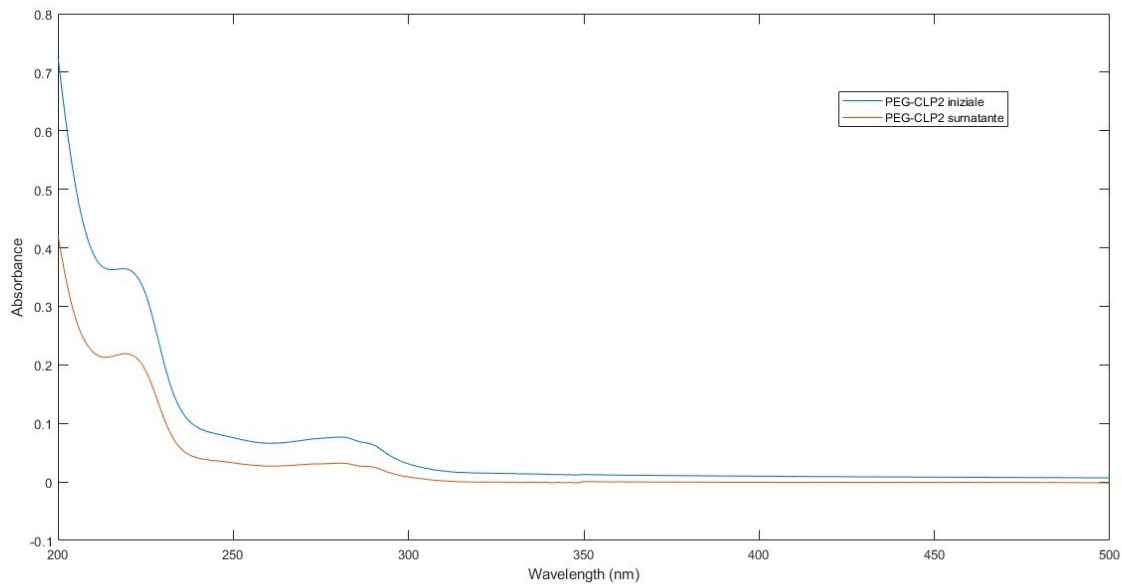


Figura 51: Spettri UV-vis di confronto tra PEG-CLP2 iniziale (blu) e PEG-CLP2 raccolto dopo incubazione (rosso)

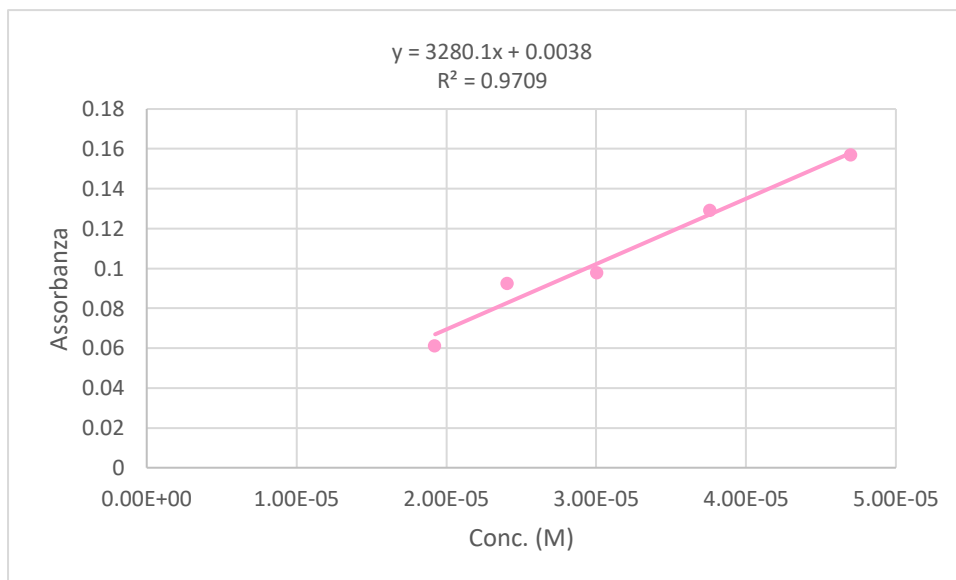


Figura 52: Retta di taratura di PEG-CLP2

La retta ha dato un valore di ϵ_{278} pari $16400.5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

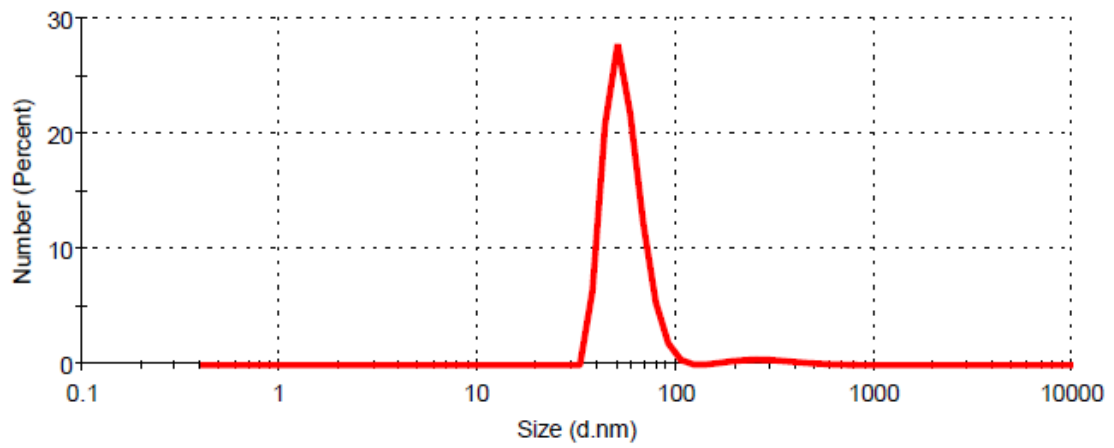


Figura 53: Spettro DLS di misura del diametro idrodinamico di AuNP@PEG-CLP2

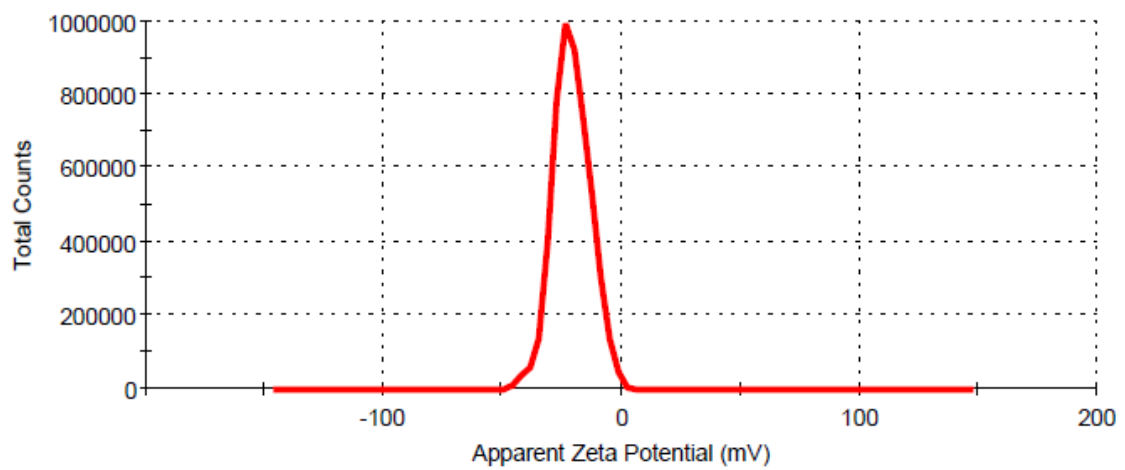


Figura 54: Spettro DLS di misura di ζ -Potential di AuNP@PEG-CLP2

Caratterizzazioni di AuNP@PEG-SCLP2

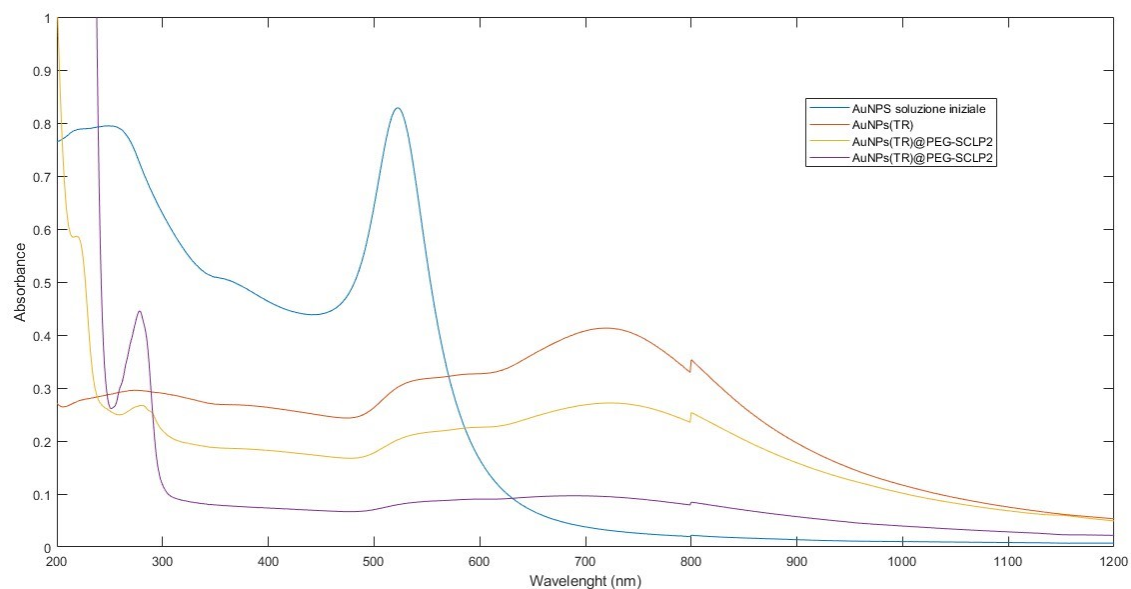


Figura 55: Spettri UV-vis-NIR registrati durante la sintesi di AuNP@PEG-SCLP2

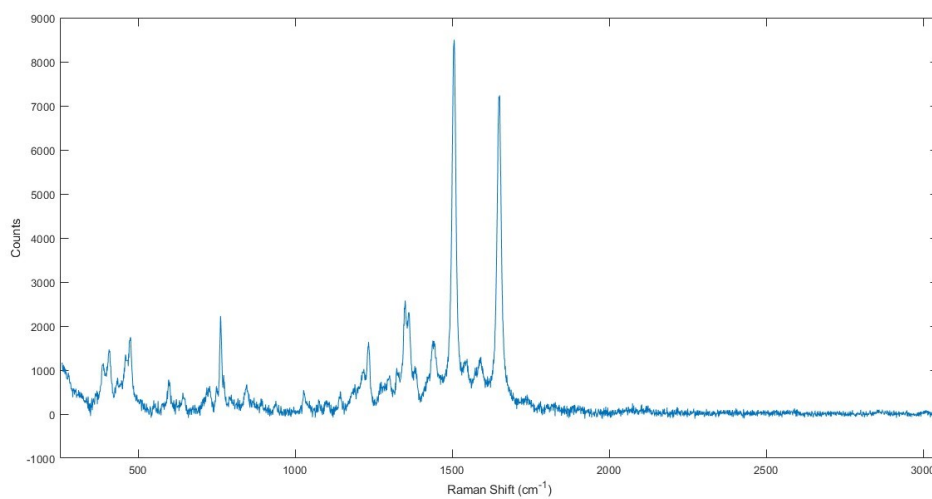


Figura 56: Spettro SERRS di AuNP@PEG-SCLP2

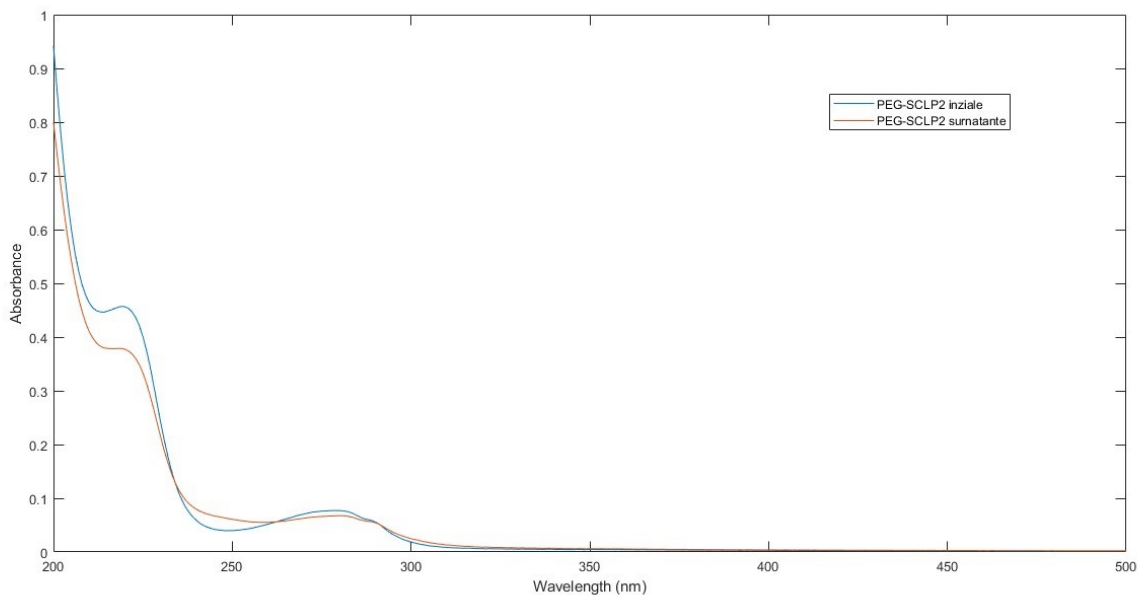


Figura 57: Spettri UV-vis di confronto tra PEG-SCLP2 iniziale (blu) e PEG-SCLP2 raccolto dopo incubazione (rosso)

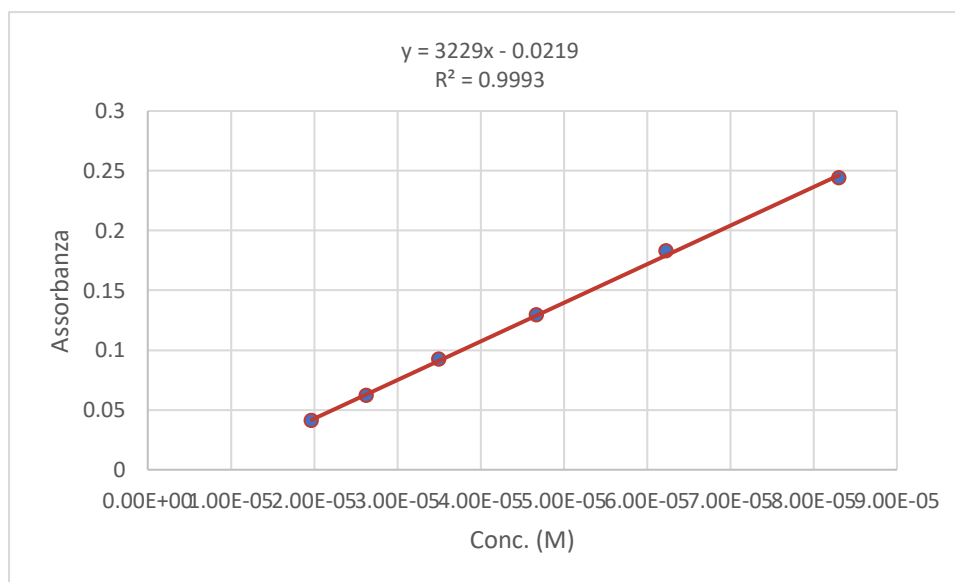


Figura 58: Retta di taratura di PEG-SCLP2

La retta ha dato un valore di ϵ_{280} pari $16145 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

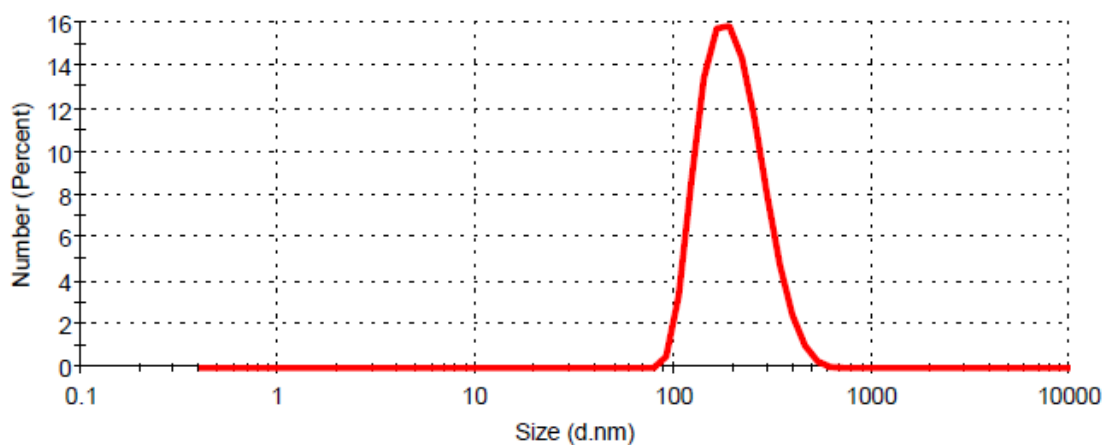


Figura 59: Spettro DLS di misura del diametro idrodinamico di AuNP@PEG-SCLP2

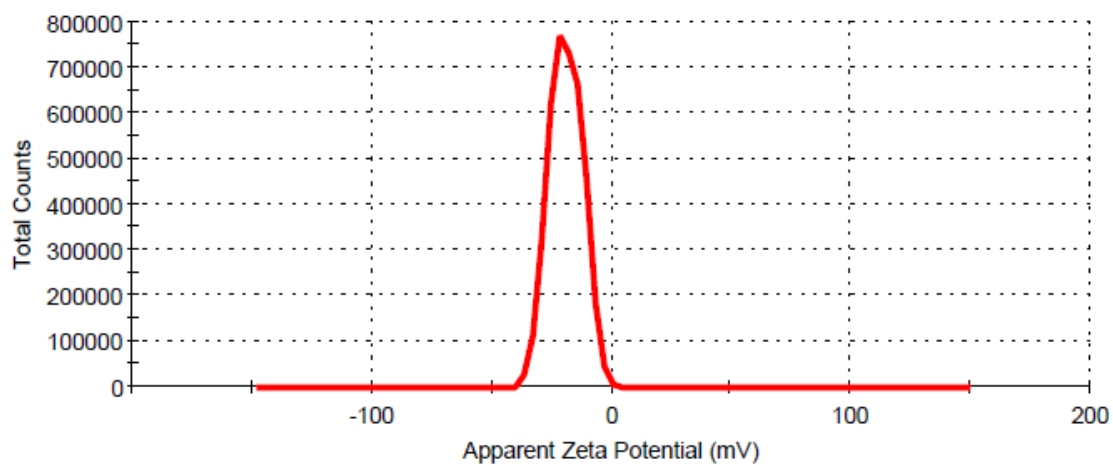


Figura 60: Spettro DLS di misura di ζ -Potential di AuNP@PEG-SCLP2

Bibliografia

- [1] Zhang, C., Yan, L., Wang, X., Zhu, S., Chen, C., Gu, Z., Zhao, Y., Progress, challenges, and future of nanomedicine, *Nano Today*, **2020**, *35*, 101008
- [2] Freitas, R.A., What is Nanotechnology? *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, **2005**, *1*, 2–9
- [3] Prasad, P. N., Introduction to Nanomedicine and Nanobioengineering, *John Wiley & Sons, Inc*, **2012**, 1-13
- [4] Fadeel, B., Garcia-Bennett, A. E., Better safe than sorry: Understanding the toxicological properties of inorganic nanoparticles manufactured for biomedical applications, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2010**, *62*, 362–374
- [5] Blanco, E., Shen, H., Ferrari, M., Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery, *Nature Biotechnology*, **2015**, *33*, 941-951
- [6] Barua, S., Mitragotri, S., Challenges associated with penetration of nanoparticles across cell and tissue barriers: A review of current status and future prospects, *Nano Today*, **2014**, *9*, 223-243
- [7] Chen, G., Roy, I., Yang, C., Prasad, P. N., Nanochemistry and Nanomedicine for Nanoparticle-based Diagnostics and Therapy, *Chem. Rev.*, **2016**, *116*, 2826–2885
- [8] Shi, J., Kantoff, P. W., Wooster, R., Farokhzad O. C., Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities, *Nature*, **2017**, *17*, 20-37
- [9] Doane, T. L., Burda, C., The unique role of nanoparticles in nanomedicine: imaging, drug delivery and therapy, *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, *41*, 2885–2911
- [10] Ali, E. S., Sharker, S. Md., Islam, M. T., Khan, I. N., Shaw, S., Rahman, Md. A., Uddin, S. J., Shill, M. C., Rehman, S., Das, N., Ahmad, S., Shilpi, J. A., Tripathi, S., Mishra, S. K., Mubarak, M. S., Targeting cancer cells with nanotherapeutics and nanodiagnostics: current status and future perspectives, *Seminars in Cancer Biology*, **2021**, *69*, 52–68
- [11] Abdel-Mageeda, H. M., AbuelEzzb, N. Z., Radwanc, R. A., Mohameda, S. A., Nanoparticles in nanomedicine: a comprehensive updated review on current

status, challenges and emerging opportunities, *Journal of Microencapsulation*, **2021**, *38*, 414-436

[12] Li, X., Wei, J., Aifantis, K. E., Fan, Y., Feng, Q., Cui, Watari, F., F., Current investigations into magnetic nanoparticles for biomedical applications, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, **2016**, *104*, 1285-1296

[13] Faulk, W. P., Taylor, G. M., Communication to the editors: An immunocolloid method for the electron microscope, *Immunochemistry*, **1971**, *8*, 1081-1083

[14] Sztandera, K., Gorzkiewicz, M., Klajnert-Maculewicz, B., Gold Nanoparticles in Cancer Treatment, *Mol. Pharmaceutics*, **2019**, *16*, 1-23

[15] Wang, W., Wang, J., Ding, Y., Gold nanoparticle-conjugated nanomedicine: design, construction, and structure–efficacy relationship studies, *J. Mater. Chem. B.*, **2020**, *8*, 4813-4830

[16] Huang, X., El-Sayed, M. A., Plasmonic photo-thermal therapy (PPTT), *Alexandria Journal of Medicine*, **2011**, *47*, 1-9

[17] Huang, X., El-Sayed, M. A., Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy, *Journal of Advanced Research*, **2010**, *1*, 13-28

[18] Chegel, V., Rachkov, O., Lopatynskiy, A., Ishihara, S., Yanchuk, I., Nemoto, Y., Hill, J. P., Ariga, K., Gold Nanoparticles Aggregation: Drastic Effect of Cooperative Functionalities in a Single Molecular Conjugate, *J. Phys. Chem. C*, **2012**, *116*, 2683–2690

[19] Yang, Y., Matsubara, S., Nogami, M., Shi, J., Controlling the aggregation behavior of gold nanoparticles, *Materials Science and Engineering B*, **2007**, *140*, 172–176

[20] Haynes, C. L., McFarland, A. D., Van Duyne, R. P., Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, *Anal. Chem.*, **2005**, *77*, 338 A–346 A

[21] Fabris, L., Gold-based SERS tags for biomedical imaging, *J. Opt.*, **2015**, *17*, 114002

[22] Kleinman, S. L., Frontiera, R. R., Henry A., Dieringer, J. A., Van Duyne, R. P., Creating, characterizing, and controlling chemistry with SERS hot spots, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2013**, *15*, 21-36

- [23] McNay, G., Eustace, D., Smith W. E., Faulds, K., Graham D., Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) and Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering (SERRS): A Review of Applications, *Applied Spectroscopy*, **2011**, *65*, 825-837
- [24] Clemons, T. D., Singh, R., Sorolla, A., Chaudhari, N., Hubbard, A., Iyer, K. S., Distinction between Active and Passive Targeting of Nanoparticles Dictate Their Overall Therapeutic Efficacy, *Langmuir*, **2018**, *34*, 15343–15349
- [25] Attia, M. F., Anton, N., Wallyn, J., Omran, Z., Vandamme, T. F. (2019). An overview of active and passive targeting strategies to improve the nanocarriers efficiency to tumour sites, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **2019**, *71*, 1185–1198
- [26] Owens, D. E., Peppas, N. A., Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, **2006**, *307*, 93–102
- [27] Khan, J. A., Pillai, B., Das, T. K., Singh, Y., Maiti, S., Molecular effects of uptake of gold nanoparticles in HeLa cells, *ChemBioChem*, **2007**, *8*, 1237–1240
- [28] Goddard, Z. R., Marín, M. J., Russell, D. A., Searcey, M., Active targeting of gold nanoparticles as cancer therapeutics, *Chemical Society Reviews*, **2020**, *49*, 8774–8789
- [29] Patra, C. R., Bhattacharya, R., Wang, E., Katarya, A., Lau, J. S., Dutta, S., Muders, M., Wang, S., Buhrow, S. A., Safgren, S. L., Yaszemski, M. J., Reid, J. M., Ames, M. M., Mukherjee, P., Mukhopadhyay, D., Targeted delivery of gemcitabine to pancreatic adenocarcinoma using cetuximab as a targeting agent, *Cancer Research*, **2008**, *68*, 1970–1978
- [30] Sasikumar, P. G., Ramachandra, M., Small-molecule antagonists of the immune checkpoint pathways: concept to clinic, *Future Medicinal Chemistry*, **2017**, *9*, 1305–1308
- [31] Biscaglia, F., Rajendran, S., Conflitti, P., Benna, C., Sommaggio, R., Litti, L., Mocellin, S., Bocchinfuso, G., Rosato, A., Palleschi, A., Nitti, D., Gobbo, M., Meneghetti, M., Enhanced EGFR targeting activity of plasmonic nanostructures with engineered GE11 peptide, *Advanced Healthcare Materials*, **2017**, *6*, 1700596
- [32] Normanno, N., de Luca, A., Bianco, C., Strizzi, L., Mancino, M., Maiello, M. R., Carotenuto, A., de Feo, G., Caponigro, F., Salomon, D. S., Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer, *Gene*, **2006**, *366*, 2–16

- [33] Chang, H.-N., Liu, B.-Y., Qi, Y.-K., Zhou, Y., Chen, Y.-P., Pan, K.-M., Li, W.-W., Zhou, X.-M., Ma, W.-W., Fu, C.-Y., Qi, Y.-M., Liu, L., Gao, Y.-F., Blocking of the PD-1/PD-L1 Interaction by a D-Peptide Antagonist for Cancer Immunotherapy, *Angewandte Chemie*, **2015**, *127*, 11926–11930
- [34] Ganesan, A., Ahmed, M., Okoye, I., Arutyunova, E., Babu, D., Turnbull, W. L., Kundu, J. K., Shields, J., Agopsowicz, K. C., Xu, L., Tabana, Y., Srivastava, N., Zhang, G., Moon, T. C., Belovodskiy, A., Hena, M., Kandadai, A. S., Hosseini, S. N., Hitt, M., Barakat, K., Comprehensive in vitro characterization of PD-L1 small molecule inhibitors. *Scientific Reports*, **2019**, *9*, 12392
- [35] Liu, H., Zhao, Z., Zhang, L., Li, Y., Jain, A., Barve, A., Jin, W., Liu, Y., Fetse, J., Cheng, K., Discovery of low-molecular weight anti-PD-L1 peptides for cancer immunotherapy, *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, **2019**, *7*, 270
- [36] Forest, C. R., Silva, C. A. C., Thordarson, P., Dual-peptide functionalized nanoparticles for therapeutic use, *Peptide Science*, **2020**, *113*, 24205
- [37] Litti, L., Meneghetti, M., Predictions on the SERS enhancement factor of gold nanosphere aggregate samples, *Physical Chemistry Chemical Physics*, **2019**, *21*, 15515–15522
- [38] Amendola, V., Meneghetti, M. Laser ablation synthesis in solution and size manipulation of noble metal nanoparticles, *Physical Chemistry Chemical Physics*, **2009**, *11*, 3805–3821
- [39] Biscaglia, F., Caligiuri, I., Rizzolio, F., Ripani, G., Palleschi, A., Meneghetti, M., Gobbo, M., Protection against proteolysis of a cell targeting peptide on gold nanostructures, *Nanoscale*, **2021**, *13*, 10544 – 10554
- [40] Yang, J., Hu, L., Immunomodulators targeting the PD-1/PD-L1 protein-protein interaction: From antibodies to small molecules, *Med Res Rev.*, **2019**, *39*, 265-301
- [41] Biscaglia, F., Ripani, G., Rajendran, S., Benna, C., Mocellin, S., Bocchinfuso, G., Meneghetti, M., Palleschi, A., Gobbo, M., Gold Nanoparticle Aggregates Functionalized with Cyclic RGD Peptides for Targeting and Imaging of Colorectal Cancer Cells, *ACS Applied Nano Materials*, **2019**, *2*, 6436–6444

- [42] Fojtik, A., Henglein, A., Laser ablation of films and suspended particles in a solvent - formation of cluster and colloid solutions, *Berichte Der Bunsen-Gesellschaft-Physical Chemistry Chemical Physics*, **1993**, *97*, 252-254
- [43] Sylvestre, J. P., Poulin, S., Kabashin, A. v., Sacher, E., Meunier, M., Luong, J. H. T., Surface chemistry of gold nanoparticles produced by laser ablation in aqueous media, *Journal of Physical Chemistry B*, **2004**, *108*, 16864–16869
- [44] Naphade, B.S., Kigerl, K. A., Jakeman, L. B., Kostyk, S. K., Popovich, P. G., Kuret, J., Progranulin expression is upregulated after spinal contusion in mice, *Acta Neuropathol*, **2010**, *119*, 123–133
- [45] Wu, Z., Jin, R., Stability of the Two Au–S Binding Modes in Au₂₅(SG)₁₈ Nanoclusters Probed by NMR and Optical Spectroscopy, *ACS Nano*, **2009**, *3*, 2036–2042
- [46] Vishnoi, R., Chaudhary, V., Dixit, H., Bhardwaj, J., Salim, A., Sharma, G. D., Singhal, R., Tuning of structural and optical properties of Au nanoparticles in amorphous-carbon, *Physica Scripta*, **2020**, *95*, 105002
- [47] Niu, J., Shin, Y. J., Son, J, Lee, Y., Ahn., J-H., Yang, H., Shifting of surface plasmon resonance due to electromagnetic coupling between graphene and Au nanoparticles, *Opt. Express*, **2012**, *20*, 19690-19696
- [48] Okamoto, T., Yamaguchi, Y., Optical Absorption Study of the Surface Plasmon Resonance in Gold Nanoparticles Immobilized onto a Gold Substrate by Self-Assembly Technique, *J. Phys. Chem.*, **2003**, *107*, 10321–10324
- [49] Jiang, L., Liu, W., Song, Y., He, X., Wang, Y., Wang, C., Wu, H., Yang, F., Yang, Y.G., Photoinduced intermolecular electron transfer and off-resonance Raman characteristics of Rhodamine 101/N,N-diethylaniline, *Chemical Physics*, **2014**, *429*, 12–19
- [50] Suk, J. S., Xu, Q., Kim, N., Hanes, J., Ensign, L. M., PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2016**, *99*, 28–51
- [51] Jokerst, J. v., Lobovkina, T., Zare, R. N., Gambhir, S. S., Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy, *Nanomedicine*, **2011**, *6*, 715–728

- [52] Shi, L., Zhang, J., Zhao, M., Tang, S., Cheng, X., Zhang, W., Li, W., Liu, X., Peng, H., Wang, Q., Effects of polyethylene glycol on the surface of nanoparticles for targeted drug delivery, *Nanoscale*, **2021**, *13*, 10748–10764
- [53] Merrifield, R. B., Solid Phase Peptide Synthesis. The Synthesis of a Tetrapeptide, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, *85*, 2149–2154
- [54] Palomo, J. M., Solid-phase peptide synthesis: An overview focused on the preparation of biologically relevant peptides, *RSC Advances*, **2014**, *4*, 32658–32672
- [55] Carpino, L. A., Han, G. Y., 9-Fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group, *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 3404–3409
- [56] Behrendt, R., White, P., Offer, J., Advances in Fmoc solid-phase peptide synthesis, *Journal of Peptide Science*, **2016**, *22*, 4–27
- [57] Emma, E. J., Hondal, R. J., Reduction of cysteine-S-protecting groups by triisopropylsilane, *Journal of Peptide Science*, **2018**, *24*
- [58] Matei, I., Buta, C. M., Turcu, I. M., Culita, D., Munteanu, C., Ionita, G., Formation and stabilization of gold nanoparticles in bovine serum albumin solution, *Molecules*, **2019**, *24*, 3395
- [59] Bolaños, K., Kogan, M. J., Araya, E., Capping gold nanoparticles with albumin to improve their biomedical properties, *International Journal of Nanomedicine*, **2019**, *14*, 6387–6406
- [60] Khodashenas, B., Ardjmand, M., Sharifzadeh Baei, M., Shokuhi Rad, A., Akbarzadeh Khiyavi, A., Bovine serum albumin/gold nanoparticles as a drug delivery system for Curcumin: experimental and computational studies, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, **2020**, *38*, 4644–4654
- [61] Liu, L., Shen, Y., Zhu, X., Lv, R., Li, S., Zhang, Z., Shi, Y. G., Tan, L., ER α is a negative regulator of PD-L1 gene transcription in breast cancer, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2018**, *505*, 157–161
- [62] Date, J., Hon, C., Singh, B., Sahin, A., Du, G., Wang, J., Wang, V. Y., Deng, M., Zhang, D. Y., Monaco, M. E., Lee, P., Breast cancer molecular subtypes: from TNBC to QNBC, *Am J Cancer Res*, **2016**, *6*, 1864–1872

- [63] Porter, L. A., Ji, D., Westcott, S. L., Graupe, M., Czernuszewicz, R. S., Halas, N. J., Lee, T. R., Gold and silver nanoparticles functionalized by the adsorption of dialkyl disulfides, *Langmuir*, **1998**, *14*, 7378–7386
- [64] Liu, P., O'Mara, B. W., Warrack, B. M., Wu, W., Huang, Y., Zhang, Y., Zhao, R., Lin, M., Ackerman, M. S., Hocknell, P. K., Chen, G., Tao, L., Rieble, S., Wang, J., Wang-Iverson, D. B., Tymiak, A. A., Grace, M. J., Russell, R. J., A Tris (2-Carboxyethyl) Phosphine (TCEP) Related Cleavage on Cysteine-Containing Proteins, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **2010**, *21*, 837–844
- [65] Fischer, R., Mader, O., Jung, G., Brock, R., Extending the applicability of carboxyfluorescein in solid-phase synthesis, *Bioconjugate Chemistry*, **2003**, *14*, 653–660
- [66] Fülöp, L., Penke, B., Zarándi, M., Synthesis and fluorescent labeling of beta-amyloid peptides, *Journal of Peptide Science*, **2001**, *7*, 397–401
- [67] El-Faham, A., Albericio, F., COMU: A third generation of uronium-type coupling reagents. *Journal of Peptide Science*, **2010**, *16*, 6–9
- [68] Kaiser, E., Colescott, R. L., Bossinger, C. D., Cook, P. I., Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides, *Analytical Biochemistry*, **1970**, *34*, 595–598

Ringraziamenti

Prima di tutto, ringrazio la Prof.ssa Gobbo e il Prof. Meneghetti per avermi guidato e aiutato nel corso del mio lavoro di tesi.

Ringrazio anche il Dr. Litti per avermi fornito i programmi MatLab utili al mio progetto; il Prof. Mancin per l'utilizzo dello strumento DLS; Luana e Claudia per lo strumento di HPLC-MS.

Ringrazio infinitamente mia madre, mio padre e Giada per avermi sempre sostenuta e incoraggiata, soprattutto nei periodi più difficili e intensi, quando sembrava impossibile farcela. Non hanno mai smesso di credere in me.

Uno speciale ringraziamento va sicuramente a mia nonna e alle sue candele accese per ogni esame. Non ho mai dubitato del loro potere.

Ringrazio Andrea, che nell'ultimo anno mi ha donato la sua comprensione e il suo continuo sostegno, ricordandomi che la determinazione è fondamentale per raggiungere i propri obiettivi.

Ringrazio di cuore le mie amiche Alice, Chiara e Martina per i tantissimi momenti di svago passati assieme e per le "aule studio", in presenza e online, con pause merenda un po' troppo lunghe.

Ringrazio i miei compagni di corso "dipoli", con cui ho condiviso gran parte del mio percorso universitario, per gli scambi di appunti, i ritrovi disperati preesame, gli aperitivi dopo laboratorio "ai chimici" e i risotti.

Una menzione speciale va a Lisa, che è sempre stata al mio fianco. Non a caso finiamo questo lungo cammino nello stesso giorno, ma non finiranno di certo qui le nostre (dis)avventure insieme.

Ringrazio i miei coinquilini di Padova, Cristiano e Benedetta, con cui ho vissuto in periodi diversi, ma ugualmente felici e indimenticabili.

Infine, una dedica speciale va a mio nonno, che mi ha sempre teso la mano nei momenti di bisogno e le cui parole di incoraggiamento porterò sempre con me.