



Università degli Studi di Padova

Facoltà di Ingegneria

Corso di Laurea Triennale in Ingegneria dell'Informazione

tesi di laurea

Magneto fluido ipertermia

Rivestimento delle nanoparticelle magnetiche
per il targeting di cellule tumorali

Relatore: Michele Forzan

Correlatore: Elisabetta Sieni, Paolo Sgarbossa

Laureando: Lucia Moro

26 settembre 2013

Prefazione

L'ipertermia é un tipo di trattamento del cancro in cui i tessuti dell'organismo sono esposti a temperature in grado di danneggiare e uccidere le cellule tumorali. La magneto fluido ipertermia, in particolare, é una tecnica che sfrutta la capacità di produrre calore da parte di nanoparticelle magnetiche emulsionate in un fluido quando sottoposte a un campo magnetico tempo variante.

L'effetto citotossico della magneto fluido ipertermia é stato dimostrato in numerosi studi in vitro e in vivo, ma questa tecnica richiede ancora numerose ricerche per essere inserita su larga scala nel protocollo terapeutico.

Il principale motivo d'interesse della comunità scientifica per questa tecnica é la sua potenzialità di colpire selettivamente il tessuto tumorale, risparmiando il più possibile quello sano e limitando gli effetti collaterali. Questo é possibile, principalmente, perché la sorgente di calore può essere localizzata direttamente nel tumore, grazie ad alcune caratteristiche del ferrofluido, in modo da controllare la temperatura raggiunta nelle zone da trattare.

Scopo principale di questo lavoro é raccogliere alcuni importanti esperimenti volti a indirizzare i ferrofluidi nei tessuti tumorali e, in particolare, a favorire l'ingresso delle nanoparticelle all'interno delle cellule che si desidera colpire.

Il primo capitolo presenterá , quindi, alcuni concetti fondamentali di magneto fluido ipertermia con particolare interesse rivolto alle proprietà delle nanoparticelle, distinte in proprietà fisiche e di biocompatibilità. A fine capitolo saranno introdotti gli ossidi superparamagnetici di ferro che sono usati, nella maggior parte delle applicazioni, come sostanza costitutiva delle nanoparticelle.

Cuore di questo lavoro é il secondo capitolo in cui ci si concentra sulla magneto fluido ipertermia intracellulare, ottenuta mediante il rivestimento delle nanoparticelle. Sono considerate le due diverse vie metaboliche che permettono l'ingresso delle nanoparticelle nel citoplasma, l'endocitosi specifica e quella aspecifica. Viene spiegato, poi, come sono sfruttate per posizionare in modo preferenziale le nanoparticelle all'interno delle cellule tumorali.

Sempre all'interno del secondo capitolo sono proposte alcune tabelle riassuntive che descrivono i principali limiti e punti di forza delle scelte sperimentali operate dai diversi laboratori di ricerca nel campo della funzionalizzazione della superficie delle nanoparticelle. Si é scelto, inoltre, di presentare nel dettaglio due esperienze sperimentali d'interesse.

Il terzo capitolo dá un breve accenno a una via di piú recente applicazione per l'ipertermia intracellulare, basata sui liposomi. Questa tecnica sfrutta la funzionalizzazione di superficie applicandola, invece che alle nanoparticelle, ai liposomi contenenti del ferro fluido.

Attraverso questi contenuti l'obiettivo finale del lavoro é di fornire una visione organica del ruolo del rivestimento delle nanoparticelle nel targeting delle cellule tumorali e nel conseguimento dell'ipertermia intracellulare. Si é voluto presentare, in questo senso, i risultati ottenuti da diversi gruppi di ricerca, nella speranza di costruire un quadro, il piú completo possibile, che servisse d'orientamento in un campo ancora del tutto aperto e che riserva molte sfide e potenzialità.

L'autore.

Indice

Prefazione	III
1 Nozioni di magneto fluido ipertermia	1
1.1 Gli effetti dell'ipertermia	1
1.2 Le proprietà fisiche delle MNP	2
1.3 Le proprietà di biocompatibilità delle MNP	4
1.4 Un buon compromesso: gli SPIONs	6
2 MNP funzionalizzate tramite un apposito rivestimento	9
2.1 Generalità sull'endocitosi	9
2.2 Targeting delle cellule tumorali e ipertermia intracellulare	14
2.3 Ipertermia intracellulare per endocitosi aspecifica	14
2.3.1 Un esempio sperimentale	18
2.4 Ipertermia intracellulare per endocitosi specifica	19
2.4.1 Targeting tramite acido folico	23
2.4.2 Targeting tramite proteine	23
2.4.3 Targeting tramite aptametri	27
2.4.4 Targeting eteromultivalente	28
2.5 Rivestimenti combinati	32
2.5.1 Un esempio sperimentale	32
2.5.2 Analisi comparata dei due esperimenti esposti	34
2.6 Stabilità e capacità di internalizzazione al variare del ph	34
3 Un'alternativa alla funzionalizzazione di superficie: i liposomi.	41
Introduzione	41
3.0.1 Un esempio sperimentale	41
Bibliografia	45

Capitolo 1

Nozioni di magneto fluido ipertermia

Introduzione

Il termine ipertermia si riferisce a una serie di tecniche di riscaldamento terapeutico utilizzate in combinazione con strategie convenzionali, come la radioterapia e la chemioterapia, per il trattamento di alcuni tipi di tumore .

Il National Cancer Institute riconosce tre tipi di ipertermia terapeutica:

- l'ipertermia locale, in cui il calore è trasferito a un'area piccola, come un tumore.
- l'ipertermia regionale, che interessa ampie aree di tessuto.
- l'ipertermia applicata all'intero organismo, sviluppata per il trattamento di tumori metastatici.

La magneto fluido ipertermia (MFH) fa parte delle tecniche riconosciute d'ipertermia locale mediate magneticamente. Tra tutte le strategie d'ipertermia tra cui le microonde, il laser e gli ultrasuoni, la magneto fluido ipertermia, pur riservando molte sfide tecnologiche, è quella che ha migliori possibilità di raggiungere selettivamente le cellule tumorali, limitando i danni al tessuto sano e gli effetti collaterali [1].

1.1 Gli effetti dell'ipertermia

Il motivo primario per il quale l'ipertermia è utile alla terapia del cancro sono i suoi effetti citotossici. I danni creati dall'ipertermia, infatti, possono condurre sia alla necrosi sia all'apoptosi cellulare.

Per necrosi s'intende la morte cellulare passiva conseguente a un danno molto esteso con lisi delle cellule. Essa è seguita da una risposta infiammatoria dei

tessuti circostanti. L'apoptosi, invece, è un programma di morte geneticamente controllata che la cellula avvia in caso di un danneggiamento che essa riconosce come irreparabile. Entrambi questi eventi, quindi, sfociano nella morte cellulare, ma si preferisce perseguire clinicamente il secondo perché non crea stadi infiammatori. Per conseguire efficacemente l'apoptosi è necessario controllare la temperatura raggiunta dai tessuti e la sua uniformità.

Oltre agli effetti citotossici, l'ipertermia produce tutta una serie di risposte metaboliche di più difficile investigazione, in quanto non sono riproducibili in vitro, dipendono fortemente dal tipo di tessuto in cui si vuole indurre ipertermia e sembrano avere una forte influenza da variazioni di temperature anche piccole.

Questi effetti sono stati ampiamente discussi da Hildebrandt e altri [2] che ne individuano alcuni esempi, come gli effetti sul flusso del sangue, sul sistema immunitario, sul pH intercellulare, sulla resistenza ai farmaci. Lo studio di questi risultati è di centrale importanza quando si usa l'ipertermia combinata a radioterapie o chemioterapie perché sono in grado di modificare gli effetti della cura primaria. La tecnica più frequente è l'uso di ipertermia combinata con radioterapia. Dai risultati clinici, infatti, sembra provata un'interazione positiva tra ipertermia e, la radioterapia, molto è ancora da determinare sulle cause della maggior efficacia della radioterapia dopo l'ipertermia nonché sui tempi ottimali a cui somministrarle e sulle temperature da raggiungere.

Le nanoparticelle magnetiche sono una classe di nanoparticelle sviluppate anche per la terapia del cancro mediante calore. Ai fini di indurre il riscaldamento del tessuto esse sono utilizzate in sospensione in un gel, o in acqua e sottoposte a un campo magnetico tempo variante che permette la generazione di calore. Il colloide magnetico così ottenuto è adatto a essere introdotto nel tumore iniettandolo nei vasi sanguigni che riforniscono la massa o direttamente in essa, oppure a essere guidato, con metodi fisici o biologici, che si discuteranno più avanti, fino al tumore.

Per essere utilizzate in vivo queste particelle devono riuscire a eludere i controlli del sistema immunitario in modo da non essere rimosse prima di ultimare gli scopi terapeutici, ma, allo stesso tempo, devono essere facilmente smaltibili a lungo termine.

Un buon compromesso tra biocompatibilità e proprietà fisiche, associate a un'alta generazione di potenza dissipata è alla base del successo della terapia sviluppata. Per questo ci soffermeremo a descrivere separatamente le due necessità, per poi indicare quali approcci siano riusciti a perseguirle più efficacemente.

1.2 Le proprietà fisiche delle MNP

La teoria classica del magnetismo divide le sostanze in tre categorie: diamagnetiche, paramagnetiche e ferromagnetiche. Il diamagnetismo è un fenomeno che compare in presenza di un campo magnetico ed è tipico delle sostanze prive di momento di dipolo magnetico. Il paramagnetismo, al contrario, è tipico delle

sostanze dipolari immerse in un campo magnetico. Le sostanze ferromagnetiche sono caratterizzate, invece, in assenza di campo magnetico esterno, da zone, dette domini di Weiss, in cui tutti i momenti magnetici restano paralleli tra loro. Il momento magnetico totale, però, è, complessivamente trascurabile per il fatto che i momenti di dominio complessivi sono orientati in modo casuale. [3]

Quando si riduce la dimensione di una particella ferromagnetica, essa presenta, sotto a un raggio critico, una configurazione a singolo dominio. In questo modo la magnetizzazione totale della particella risulta uniforme e molto forte. Il suo comportamento, immersa in un campo, è simile a quello di un dipolo paramagnetico, per questo si parla di superparamagnetismo.[3]

Le nanoparticelle magnetiche sono sintetizzate in modo di avere dimensioni inferiori al raggio critico e da avere comportamento, quindi, superparamagnetico.

Sotto l' influsso di un campo magnetico tre sono, approssimativamente, gli effetti che spiegano la generazione di calore quando le nanoparticelle sono sottoposte ad un campo magnetico tempo variante: la perdita per isteresi, quella per risonanza e quella per rilassamento. Di questi meccanismi quello di maggior importanza per le applicazioni delle nanoparticelle in ipertermia è il rilassamento.[4]

Le perdite di calore per rilassamento sono di due tipi: perdite di Brown e di Néel. La prima è causata da una rotazione della particella, la seconda dal riorientamento del momento magnetico della particella.

Il tempo di rilassamento Browniano è dato, in dipendenza dal volume della particella V_h , da:

$$\tau_{Brown} = \frac{3\mu V_h}{k_B T}$$

Vediamo che esso è dipendente da μ viscosità del mezzo in cui è inserito. Il calore in questo caso è prodotto per attrito della particella con il mezzo in cui è immersa. [4]

Il tempo di rilassamento di Néel è descrivibile come:

$$\tau_{Néel} = \tau_0 \exp \frac{KV}{k_B T}$$

Dove K è un fattore che tiene conto di eventuali anisotropie delle nanoparticelle, V è il volume del materiale magnetico, indipendente dai rivestimenti non magnetici. Vediamo che in questo caso non c'è dipendenza dalle caratteristiche dal mezzo in cui la particella è inserita.[4]

Il tempo di rilassamento totale è dato dalla sovrapposizione di questi due effetti. Esiste un valore critico del diametro interno della particella, d_t , per il quale il contributo del tempo di rilassamento Browniano e di quello di Néel si eguagliano, sopra d_t è maggiore il contributo del primo, al di sotto del secondo.[4]

Il principale vantaggio di lavorare sotto al valore critico consiste nel fatto che il rilassamento di Néel non dipende dal mezzo in cui la particella è inserita, in

particolare dalla sua viscosità, e quindi è più facile determinare a priori il campo a cui va sottoposta. In ogni caso, per modellizzare correttamente il comportamento delle particelle, soprattutto alle basse frequenze, bisogna tener conto di entrambi i contributi.

Quando si desidera utilizzare l'ipertermia in un tessuto in vivo, bisogna tener conto che, se da una parte il ferro fluido è in grado di fornire una certa energia termica, con un processo di generazione del calore, dall'altra il corpo tende sempre a riportarsi all'equilibrio termico cioè temperatura fisiologica di 37°, con un processo di tipo dissipativo.[5]

La misura che quantifica l'effettiva capacità termica di un ferrofluido, calcolata prima che sia utilizzata all'interno di un tessuto, è la perdita di potenza specifica (SLP). Un ferrofluido con alto SLP, infatti, permette di inserirne meno nel tessuto per ottenere i risultati preposti.

La perdita di potenza specifica è proporzionale all'intensità e dalla frequenza del campo magnetico, potrebbe sembrare quindi una buona soluzione aumentare questi valori per innalzare l'SLP. D'altra parte però, non è possibile innalzarli indefinitamente quando si pratica l'ipertermia in vivo, perché questo aumenterebbe l'effetto dissipativo nei tessuti circostanti. Per questo per innalzare l'SLP è necessario lavorare sulle proprietà geometriche delle nanoparticelle. Il diametro medio ottimale per le particelle è ancora da delineare in modo chiaro. Quello che sembra confermato è che più stretta è la sua distribuzione statistica delle dimensioni delle nanoparticelle che compongono il magnetofluido più alto è l'SLP. La dimensione, quindi, deve essere il più possibile omogenea.

Una volta inserito il fluido nel tessuto, il parametro da considerare, diventa invece il tasso di assorbimento specifico (SAR) che è definito come il tasso a cui l'energia elettromagnetica è assorbita da una massa unitaria di tessuto biologico. [4]. Alle basse frequenze (100-400 kHz) è determinato mediante un modello, se si conosce il rapporto di volume dei cristalli magnetici nel tessuto.

$$SAR = 4.1868\pi\mu_0^2 \frac{\varphi M_s^2 V}{1000kT} H_0^2 \frac{2\pi\nu\tau}{1 + (2\pi\nu\tau)^2}$$

Dove τ è il tempo di rilassamento totale, V è la frazione di materiale superparamagnetico nel tessuto, ν è la frequenza d'oscillazione del campo magnetico, H_0 l'intensità del campo magnetico.[1]

1.3 Le proprietà di biocompatibilità delle MNP

Oltre a rispondere a caratteristiche fisiche, per prendere in considerazione l'uso terapeutico delle MNP è necessario che esse rispondano a stringenti caratteristiche di interazione con l'organismo. Laurent e altri [1] individuano queste richieste in:

- biocompatibilità

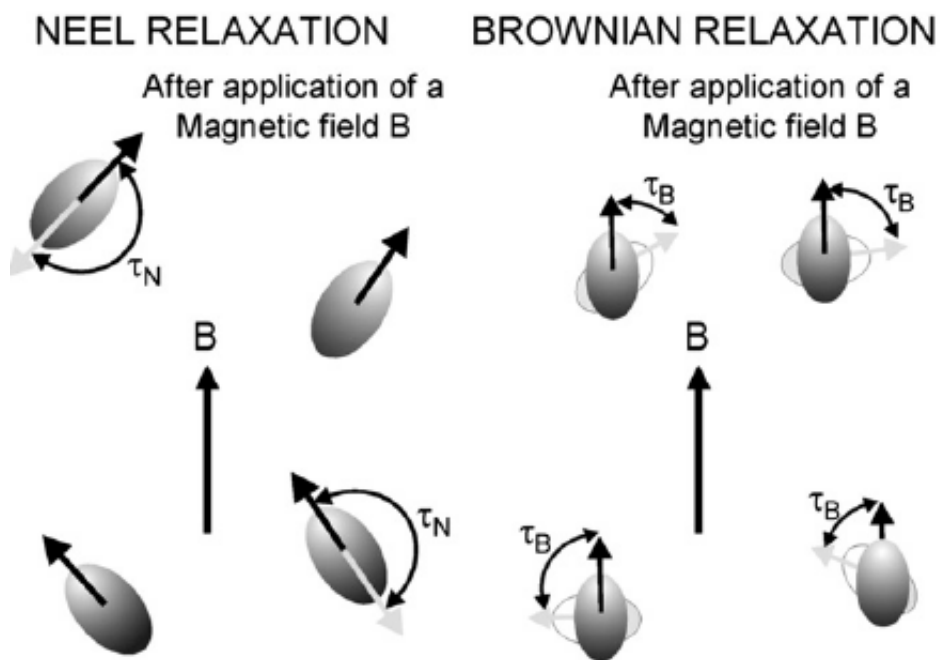


Figura 1.1: Uno schema comparativo tra rilassamento browniano e di Néel[1]

- non tossicità
- capacità di sfuggire al sistema reticoloendoteliale
- basso assorbimento di proteine all'interno del sangue, così da risultare più difficilmente riconoscibili dal sistema reticoloendoteliale

Inoltre, come valore aggiunto per limitare l'invasività della terapia sono indicate come preferibili particelle in grado di combinare diversi scopi terapeutici e diagnostici.

Oltre ai danni che possono causare le nanoparticelle all'organismo, bisogna tenere conto delle modificazioni, di svariata natura, che l'ambiente organico può introdurre sulla particella. Ad esempio, le MNP, avendo un altro rapporto superficie/volume, perdono facilmente le loro proprietà magnetiche per ossidazione.[6]

Le necessità di lavorare con nanoparticelle che non danneggino e non siano danneggiate dai tessuti biologici, strettamente legate tra loro, sono, in prima istanza, risolte applicando al cuore della particella, di tipo magnetico, un rivestimento di diversa natura. I gusci protettivi utilizzati si dividono in due categorie:

- **Organici:** sono particolarmente adatti a proteggere la nanoparticella da agenti ossidativi e sono più stabili, perché non sono aggredibili dagli enzimi.
- **Inorganici:** aumentano l'emivita nel sangue e permettono di applicare sulla superficie recettori specifici per il targeting delle cellule tumorali.

A lungo termine, è bene ricordare che le particelle, che sono agenti estranei all'organismo, devono essere smaltite dal metabolismo o incorporate al normale ferro metabolico.

1.4 Un buon compromesso: gli SPIONs

Nonostante esistano molte classi di nanoparticelle utilizzabili per l'ipertermia, la maggior parte dei prodotti attualmente in commercio utilizza come materiale magnetico le nanoparticelle di ossidi superparamagnetici di ferro (SPIONs) con, eventualmente, la superficie trattata.

Gli SPIONs sono composti essenzialmente di due ossidi: la magnetite (Fe_3O_4) e maghemite ($\gamma - Fe_2O_3$).

Questi ossidi, comparati ad altre sostanze, innalzano la temperatura in modo mediamente efficiente e non facilmente controllabile, rispetto ad altri composti magnetici. Ciò nonostante, il loro utilizzo rappresenta, al momento, il miglior compromesso tra richieste di biocompatibilità e di efficienza termica. La citotossicità degli SPIONs, infatti, è stata testata fino a centinaia di volte il dosaggio applicato per l'ipertermia, senza riscontrare tossicità non trascurabili, a differenza della maggior parte degli altri composti magnetici al momento disponibili.

Gli SPIONs, comportandosi da materiali superparamagnetici, non dovrebbero presentare proprietà magnetiche in assenza di campo. Interviene, però, una certa magnetizzazione residua dovuta all'isteresi. Questo fenomeno, pur aumentando la capacità di trasferire calore delle nanoparticelle, causa una certa tendenza d'aggregazione che può causare embolie nei capillari e quindi va evitato. Per contrastare questa tendenza è utile il guscio protettivo che, oltre ad aumentare le biocompatibilità e proteggere le nanoparticelle, le tiene abbastanza distanti da contrastare le forze attrattive.

Gli SPIONs si prestano, inoltre, a tutta una serie di altre applicazioni che, combinate all'ipertermia, potrebbero permettere una minor invasività delle cure. Campi su cui si sta sviluppando l'uso di queste MNP comprendono la raccolta d'immagini per risonanza magnetica, la riparazione di tessuti, il trasporto mirato di farmaci. Quest'ultimo in particolare si presterebbe ad essere combinato con l'ipertermia. A questo fine sono state sviluppate nanoparticelle di ossidi di ferro dotate di un guscio sensibile al calore che sia in grado di proteggere uno strato interno di farmaco finché esse non abbiano raggiunto la loro destinazione. Tramite il calore indotto dalla parte ferromagnetica, il guscio è in grado di alterare la sua conformazione o la sua struttura e rilasciare il farmaco.

Capitolo 2

MNP funzionalizzate tramite un apposito rivestimento

2.1 Generalità sull'endocitosi

L'endocitosi è il processo mediante il quale la cellula assume sostanze di varia natura presenti nell'ambiente extracellulare. Grazie all'endocitosi la cellula mantiene l'omeostasi e si procura le sostanze necessarie alle sue attività metaboliche. Questo processo può essere di due tipi: specifico o aspecifico.

Si parla di endocitosi aspecifica quando la cellula ingloba sostanze indipendentemente dalla loro esatta natura. Processi aspecifici sono la pinocitosi e la fagocitosi, la prima permette alla cellula di ingerire liquidi e sostanze in soluzione, la seconda è tipica di alcune cellule del sistema immunitario.

Un processo più complesso è l'endocitosi specifica, detta anche mediata da recettori, che permette alla cellula di internalizzare in modo selettivo le sostanze di cui ha necessità. Principali protagonisti di questo processo sono le proteine di membrana che fungono da recettori in particolari zone della cellula, dette fossette rivestite in quanto all'interno presentano un rivestimento di clatrina. Quando la sostanza lega il recettore, la membrana si invagina fino a formare una vescicola rivestita che conduce la sostanza legata all'interno della cellula. Quest'ultima ne estrae, così, i nutrienti necessari ai suoi processi metabolici e alla proliferazione.

Nelle cellule tumorali sia l'endocitosi specifica che quella aspecifica si comportano in modo anomalo, in particolare a causa della necessità della cellula di sostenere un ritmo di proliferazione accelerato, tipico dei tessuti cancerosi. Si nota, cioè, un generale aumento della pinocitosi e alcuni recettori risultano iperesperessi, mentre altri inibiti, con il risultato che la cellula tumorale tende ad assorbire maggiormente alcune sostanze e in quantità minori altre. Queste anomalie si prestano bene a raggiungere selettivamente il tessuto malato e a forzare l'internalizzazione delle nanoparticelle.

Le cellule cancerogene, ad esempio, sono caratterizzate da un tasso di crescita maggiore delle altre, questo fa sì che sulla loro superficie siano iperesperessi i

recettori per l'assorbimento di fattori di crescita, come ad esempio quelli per l'acido folico. A questa crescita incontrollata è riconducibile anche un maggior richiamo di glucosio e altre sostanze essenziali per la proliferazione, fattore che fa aumentare l'endocitosi aspecifica. Le cellule, inoltre, acquisiscono l'abilità di contrastare l'apoptosi esprimendo un ormone detto survivina, tipico della fase embrionale.

Nella tabella 2.1 viene dato un elenco di alcuni recettori iperespressi da classi di cellule tumorali, con particolare attenzione a quelli adatti al targeting attivo.

Classe di tumore	Linea cellule	Recettori iperespressi
Leucemia	CCRF-CEM	Aptamers sga16 and sgc8 antigen
	SUP-B15	Aptamers sgc4 antigen
	NB-4	Aptamers sgc4, sgd2 antigen
	K562	Aptamer Kk1H08 antigen
	Sup-T1	Aptamers sgc8, sgc4, sgd2, sgd3 antigen
	Jurkat	Aptamers sgc8, sgc3, sgc4, sgd2, sgd3 antigen
Linfoma	Molt-4	Aptamers sgc8, sgc3, sgc4, sgd2, sgd3 antigen
	R AMOS	Aptamers TD05, TD02, TE03 antigen
Adenocarcinoma al seno	Toledo	Aptamers sgc4, sgd2
	AU-565	HER2/neu receptor
Carcinoma al seno	SKBR-3	HER2/neu receptor
	BT-20	$\alpha_v\beta_3$ Integrin Transferrin receptor Folate Receptor [39]
	MDAMB-435	$\alpha_v\beta_3$ Integrin
Carcinoma alla cervice	BT549	Transferrin receptor
	C33A	Folate Receptor
Adenocarcinoma alla cervice	HeLa	Folate Receptor
Adenocarcinoma del colon		EGFR
	LS174T	CEA
Carcinoma del colon	Caco-2	Folate Receptor
	C-3347	MAb L6 antigen
	H3347	MAb L6 antigen
	WiDr	MAb A7 antigen
Carcinoma del pancreas	MiaPaca1	Transferrin receptor
	KCI MOH1	Transferrin receptor
	PaTu8988	Transferrin receptor
Adenocarcinoma del pancreas	Capan-1	HER2/neu
Carcinoma dell'endometrio	AN3CA	Folate receptor
Glioblastoma	U87MG	$\alpha_v\beta_3$ Integrin

Cancro al fegato	HepG2	Aptamers S11e, S6, S15 antigen Transferrin receptor
Cancro ai polmoni	Huh7	Aptamer TLS11 antigen
	MDAMB-231 A549	Folate receptor Folate receptor
Cancro ai polmoni tipo NSCLC	NCI-125	MABs L15 and L17 antigen
	A549	Aptamers S1, S6, S11e, S15 antigen
	HLAMP	Aptamers S11e, S6, S15 antigen
	NCIH460	Aptamers S11e, S6, S15 antigen
	NCIH157	Aptamer S11e
	H1299	Folate receptor
	NCIH522	Folate receptor
Cancro ai polmoni tipo SCLC 6SW2	EGP-2	
	NCIH446	Aptamer S11e antigen
Adenocarcinoma ai polmoni6 L-2981	MAB L6 anti- gen	
	H2981	MABs L6 and L20 antigen
Adenocarcinoma al- la mammella	MCF-7	Transferrin receptor
	HBL100	Transferrin receptor
	HS578t	Folate receptor
Melanoma	C8161	MAB MG-21 antigen
	M-2669	$\alpha_v\beta_3$ Integrin
Carcinoma alle cel- lule squamose orali	SCC15	$\alpha_v\beta_3$ Integrin
Adenocarcinoma al- le ovaie	SKOV-3	HER2/neu
Cancro alle ovaie	IGROV1	Folate receptor
	OVCAR-3	Folate receptor
Cancro alla prosta- ta	LNCaP	PSMA (Aptamer A10 antigen)
Carcinoma delle cel- lule squamose	HaCaTras- A-5RT3	$\alpha_v\beta_3$ Integrin
	A431	Transferrin receptor $\alpha_v\beta_3$ Integrin
		EGFR
	TE8	EGFR

Tabella 2.1: Recettori iperespressi da alcune comuni cellule tumorali

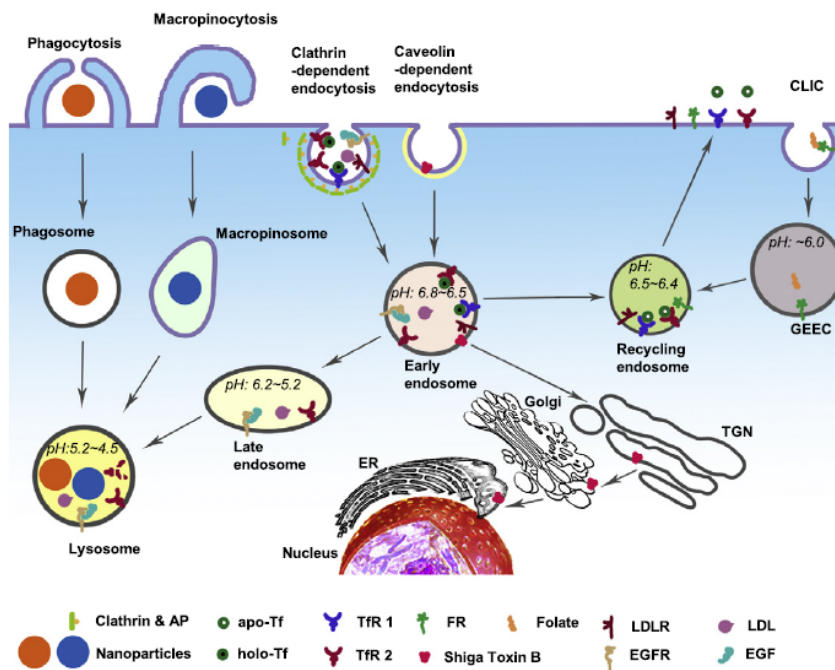


Figura 2.1: Schema delle principali vie di endocitosi [7]

2.2 Targeting delle cellule tumorali e ipertermia intracellulare

Un modo per immettere le particelle nel tumore è iniettarle nel sistema circolatorio. Tuttavia è noto che i tessuti tumorali sono caratterizzati da una sostenuta e caotica angiogenesi.[3]. Questo porta a una vascolarizzazione poco efficiente che non rende molto agevole introdurre le nanoparticelle nel tumore con concentrazione adeguata per via vascolare. Inoltre l'utilizzo del sistema circolatorio per portare le nanoparticelle nel tumore permette che esse possano essere assorbite. Una strategia che ridurrebbe l'assorbimento da parte delle cellule sane sarebbe quella di funzionalizzare le particelle in modo che leghino preferenzialmente le cellule tumorali. Questo permetterebbe raggiungere in modo efficace e omogeneo le cellule tumorali, cosa essenziale per ottenere buoni risultati applicando l'ipertermia.[3]

Oltre a distribuire uniformemente il ferro fluido, per rendere più efficace l'ipertermia e limitare l'eliminazione delle nanoparticelle da parte dei macrofagi, è utile sviluppare nanoparticelle magnetiche con la capacità di penetrare nelle cellule tumorali, attraverso la membrana. Questo tipo d'ipertermia, detta intercellulare si distingue da quella intracellulare o interstiziale che si ottiene iniettando il ferrofluido in loco, senza specifici accorgimenti che potenzino la capacità della nanoparticella di entrare nel citoplasma della cellula.

Esistono due possibili approcci al problema del targeting tumorale che sfruttano le due diverse classi di endocitosi, illustrate in precedenza, con la quale le cellule umane provvedono ai loro fabbisogni. Il primo metodo è detto targeting passivo e sfrutta l'endocitosi aspecifica, il secondo è detto attivo e sfrutta quella specifica, o mediata da recettori.

La tecnica utilizzata per ottenere il targeting delle cellule tumorali nell'ipertermia intracellulare è la funzionalizzazione di superficie. Abbiamo già visto come per mantenere le proprietà delle nanoparticelle sia utile ricoprirle con un guscio protettivo, la funzionalizzazione di superficie consiste nel legare su di esso sostanze che, sfruttando alcune caratteristiche endocitotiche tipiche delle cellule tumorali, permettano l'accumulo delle nanoparticelle all'interno delle sole cellule malate. Queste caratteristiche dipendono spesso dal tipo di tessuto che sviluppa il tumore.

2.3 Ipertermia intracellulare per endocitosi aspecifica

Le strategie di targeting passivo si basano sulla crescita incontrollata delle cellule tumorali per distinguerle da quelle sane con particolare attenzione all'innalzamento della permeabilità e della ritenzione. Le cellule tumorali, infatti, pur avendo bisogno di maggiori quantità di sostanze nutritive, sono approvvigionate in modo poco funzionale e tendono ad assorbire più sostanze per endocitosi aspecifica. Per di più, una volta che il tessuto ha assorbito una sostanza non

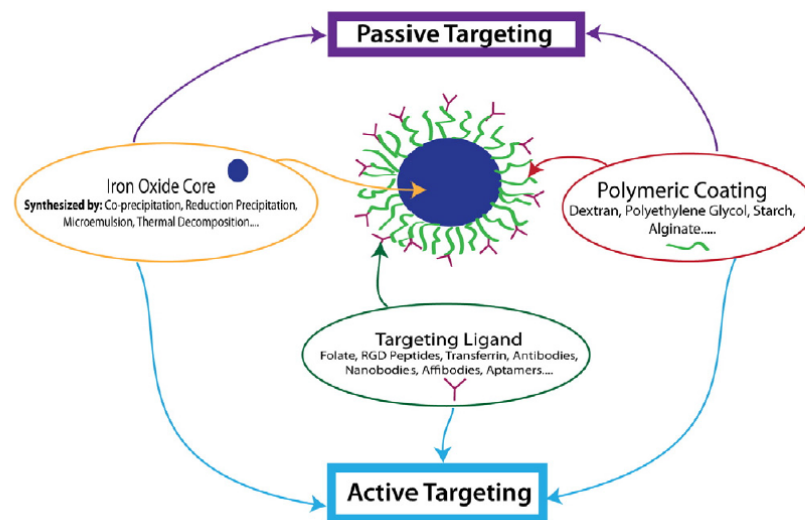


Figura 2.2: Schema riassuntivo della tecnica di funzionalizzazione di superficie [8]

necessaria il sistema di drenaggio linfatico è spesso insufficiente e permette un accumulo per tempi prolungati.

Queste caratteristiche permettono a macromolecole, come gli SPIONs, di penetrare le cellule del tumore più facilmente rispetto a quelle del tessuto sano. Questo comportamento è causato principalmente dalla mancanza o alla scarsa efficienza del sistema vascolare nei tessuti maligni.

Le nanoparticelle, per penetrare nelle cellule mediante endocitosi aspecifica ed essere utilizzate per il trattamento di ipertermia intracellulare, vengono rivestite da uno strato polimerico che aumenta la loro biocompatibilità e l'emivita nel sangue e permette il targeting passivo delle cellule. Le nanoparticelle, così lavorate, tendono a essere assorbite tramite fagocitosi o pinocitosi, nel tentativo delle cellule di assicurarsi il giusto provento di sostanze nutritive.

L'approccio tramite endocitosi aspecifica è stato a lungo l'unico praticabile perché richiede minor lavorazione delle particelle e al momento è il principale metodo nell' utilizzo come mezzo di contrasto nella risonanza magnetica. Nella tabella 2.2 vengono indicate le sostanze maggiormente utilizzate in letteratura per ricoprire gli SPIONs:

- Destrano¹.
- Amminosilano².
- Polietilene glicole (PEG)³.
- Surfactant-coated poly con Poloxamine⁴ 908.
- Starch-coated MNPs cross-linked aminate and modificate con PEG⁵.
- Carboxymethyl polyvinyl alcohol (CMPVA) polymers⁶.
- Amino-PVA⁷.
- Chitosano⁸.

¹Polimero del glucosio di peso molecolare variabile, derivato dalla digestione dell'amilopectina.

²Un silano legato a un'ammina primaria o secondaria.

³Un polimero preparato per polimerizzazione dell'ossido di etilene.

⁴Copolimeri di tre catene di ossido di etilene e di una singola catena di ossido di propilene.

⁵Particolare preparazione delle nanoparticella a base di polietilene glicole aminato.

⁶Un derivato dell'alcol polivinilico (PVA), un composto chimico ottenuto per idrolisi alcalina degli esteri polivinilici.

⁷Un derivato dell'alcol polivinilico (PVA), un composto chimico ottenuto per idrolisi alcalina degli esteri polivinilici.

⁸Un polisaccaride lineare composto da D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina.

Rivestimento	Campione	Caratteristiche	Ref
Destrano	Cellule di tumore alla mammella umano in vitro	Facile da legare alla superficie della MNP. Ottima biocompatibilità, stabilità e alta emivita nel sangue. Una volta internalizzato viene sciolto dagli enzimi dei lisosomi creando agglomerati.	[9]
Amminosilano	Cellule di tumore alla mammella umano in vitro	Resistente agli attacchi enzimatici. Essendo carico positivamente lega le membrane cellulare.	[9]
Polietilene glicole (PEG)	Fibroblasti umani	Alta biocompatibilità e tempo di circolazione. Efficiente internalizzazione.	[10]
Surfactant-coated poly with Poloxamine 908	Cellule dei polmoni	Aumenta la concentrazione di nanoparticelle nei polmoni solo se la Poloxamine è concentrata tra l'1 e il 5%	[11]
Starch-coated MNPs cross-linked, aminated, and modified with PEG	Cellule di tumore al cervello	Test in vitro incoraggianti per stabilità nel plasma e targeting dei tessuti tumorali	[12]
Carboxymethyl polyvinyl alcohol (CMPVA) polymers	Cellule HeLa e fibroblasti NIH/3T3	Non particolarmente adatta a un'endocitosi specifica Ottima come sostegno di recettori specifici. Resistente a alte temperature, non tossico, facilmente solubile e resistente in soluzione senza precipitare.	[13]
Amino-PVA	Melanoma umano Me275, Me237	Internalizzate con successo dalle cellule tumorali. Bassa tossicità.	[14]
Chitosan	Cellule L929 e KB Bassa tossicità.	Ampiamente disponibile, biodegradabile ed economico. Dimostra buona capacità nel legare le cellule tumorali.	[15]

Tabella 2.2: Targeting passivo

2.3.1 Un esempio sperimentale

I primi tentativi di aumentare l'emivita nel sangue delle nanoparticelle portarono al ricoprimento delle nanoparticelle con uno strato di destrano, un polimero del glucosio derivato dell'amilopectina, una forma di accumulo dell'amido. Già nel 1979 Gordon e altri ipotizzarono che alcune particelle così preparate, oltre ad aumentarne la biocompatibilità, fossero assorbite dalle cellule, perché scambiate per sostanze nutritive, permettendo in questo modo un'ipertermia intracellulare.

Il principale limite all'utilizzo del destrano è rappresentato dalla sua digeribilità da parte dei lisosomi. Le particelle, infatti, che entrano nelle cellule perdono il proprio rivestimento e finiscono in grande percentuale per aggregarsi, perdendo la capacità di produrre la stessa densità di potenza che produrrebbero non aggregate. Questo ha portato alla necessità di individuare un'alternativa al destrano che presentasse la stessa proprietà di far penetrare le nanoparticelle nel citoplasma.

Nel 1991 Jordan e altri [9], all'interno di un lavoro finalizzato all'individuazione di metodi non chirurgici per la rimozione di tumori alla mammella, proposero di sostituire il destrano con l'amminosilano fissato artificialmente per silanizzazione. Questo tipo di rivestimento è resistente agli attacchi enzimatici dei lisosomi, coniugando le proprietà di un guscio organico e quelle di uno inorganico.

Lo studio ha comparato l'efficacia dell'ipertermia intracellulare ottenuta per mezzo di un magneto fluido con le nanoparticelle di magnetite rivestite di destrano (d'ora in poi particelle P6), e uno di amminosilano, ottenuto per silanizzazione (d'ora in poi particelle BU48). La tabella 2.3 riassume le principali caratteristiche chimiche e fisiche d'interesse per le nanoparticelle P6 e BU48.

Come primo passaggio è stato testato l'assorbimento delle P6 e delle BU48 in fibroblasti umani. Il risultato è stato un rapido e massiccio assorbimento delle prime, e uno lento e meno ingente per le seconde. Per le P6, infatti, dopo sei ore l'assorbimento raggiunge i 200pg/cell e arriva ad un picco, dopo 192 ore di 500pg/cell. Per le BU48, invece, un assorbimento di 200pg/cell si raggiunge solo in 144 ore e il picco è, comunque, più basso (400pg/cell). Il processo è stato ripetuto su cellule di adenocarcinoma ottenendo per entrambi i tipi di nanoparticelle un assorbimento massimo di 50pg/cell con scarsa dipendenza dal tempo.

Lo stesso esperimento è stato riproposto per cellule neuronali della corteccia cerebrale comparate con cellule di glioma maligno. In questo caso si è visto un basso assorbimento nelle cellule sane di entrambi i ferrofluidi (picco a 50pg/cell). Per le cellule maligne il tasso d'assorbimento rilevato è molto più alto, in particolare per le BU48 si è raggiunto un picco di 400pg/cell quasi raggiunto dopo sei ore, mentre le P6 sono state assorbite progressivamente e richiedendo tempi maggiori, fino ad arrivare a 120pg/cell dopo 168 ore.

Questi dati indicano che è possibile ottenere un buon tasso d'assorbimento specifico per cellule tumorali utilizzando un rivestimento di amminosilano

per alcuni tipi di cellule, soprattutto tumorali. Utilizzando particelle BU48, ad esempio, si ottiene un assorbimento maggiore nelle cellule di glioma rispetto ai neuroni.

Alcune ipotesi sono state proposte per spiegare questa differente endocitosi di particelle P6 e BU48 tra cellule sane e tumorali e tra differenti specie di tumori.

Le BU48 si prestano meglio all'endocitosi in quanto dotate di maggior carica superficiale a pH fisiologico permettendo legami elettrostatici con le strutture di membrana, a loro volta cariche. Un fattore che sembra determinare una maggior endocitosi aspecifica da parte delle cellule e, quindi, un maggior assorbimento di nanoparticelle, nelle cellule è un alto tasso di crescita. Questo spiegherebbe l'alto assorbimento nei fibroblasti e nelle cellule maligne, che hanno la tendenza alla proliferazione.

I risultati ottenuti da questo studio hanno evidenziato com'è possibile raccogliere un'ampia quantità di nanoparticelle ricoperte di amminossilano all'interno delle cellule di un tessuto sfruttando l'endocitosi aspecifica. Queste nanoparticelle, una volta internalizzate, non verranno degradate dagli attacchi enzimatici e, quindi, risulteranno adatte per l'uso in magneto fluido ipertermia.

I casi maggiormente adatti risultano essere quelli, come il glioma maligno, in cui cellule malate ad alta proliferazione siano circondate da cellule sane a bassa o nulla proliferazione, come i neuroni. In questo caso si potrà colpire selettivamente le cellule maligne sfruttando la loro tendenza all'endocitosi aspecifica.

Lo studio di Jordan e altri evidenzia quindi la fattibilità di un'ipertermia intracellulare per quanto siano necessari ulteriori studi, specialmente in vivo.

2.4 Ipertermia intracellulare per endocitosi specifica

Un'ardua sfida è rappresentata dall'ipertermia intracellulare ottenuta per assorbimento delle nanoparticelle mediante endocitosi specifica. Questo processo è mediato da recettori in grado di riconoscere le sostanze utili alla cellula e guidare il loro accesso attraverso la membrana. L'endocitosi specifica, a differenza della fagocitosi e la pinocitosi, rimane un processo ancora non del tutto chiaro, in quanto molto complesso e differente tra tipi di cellule diverse.

Le cellule cancerogene a seconda del tipo di tumore esprimono diverse classi di recettori specifici, come si è già visto nella tabella 2.3. Quando le nanoparticelle vengono funzionalizzate con sostanze in grado di riconoscere e legare selettivamente questi recettori, e quindi le cellule che li esprimono, si parla di targeting attivo. Un approccio di questo tipo, però, richiede una specifica conoscenza della particolare cellula tumorale e una conseguente preparazione delle nanoparticelle.

Una volta individuato il recettore che si vuole utilizzare per legare la cellula e, in particolare, l'energia del legame che esso crea col legando esistono dei modelli matematici in grado di fissare il raggio minimo delle nanoparticelle e quello ottimo per avere endocitosi, nonché l'ottimale densità superficiale di legami.[16] In questi calcoli è necessario tenere conto sia dell'attrazione specifica con i recettori che

Caratteristica del ferrofluido	P6	BU48
Diametro medio interno	3,3 nm	13,1 nm
Diametro idrodinamico medio	50 nm	17nm
Tipo di rivestimento	Destrano	Amminosilano
Stabilità in sospensione del fluido sterilizzato	Anni	Mesi
Formazione di agglomerati intracellulari	Sì	No
Superparamagnetico	Sì	Sì
Suscettibilità	117.2 emu/g	50-100 emu/g
Carica superficiale	Negativa	Altamente positiva
Tasso d'assorbimento specifico (SAR)	120 mW/mg Fe	146 mW/mg Fe

Tabella 2.3: Caratteristiche delle particelle BU48 e P6

BU48	Fibroblasti umani	Sei ore: <20pg/cell. Picco: 168 ore <400pg/cell.
	Adenocarcinoma	Sei ore: 50pg/cell. Picco: 6 ore 50pg/cell.
	Cellule neuronali	Sei ore: 0pg/cell. Picco: 171 <60 ore di pg/cell.
	Glioma maligno	Sei ore: 350pg/cell. Picco: 168 ore <420 pg/cell.
P6	Fibroblasti umani	Sei ore: 200pg/cell. Picco: 192 ore >500pg/cell
	Adenocarcinoma	Sei ore: <10pg/cell. Picco: 168 ore 20pg/cell
	Cellule neuronali	Sei ore: 0pg/cell. Picco: 144 ore di <60pg/cell
	Glioma maligno	Sei ore: 0pg/cell. Picco: <120 ore di 500pg/cell.

Tabella 2.4: Risultati comparati dell'esperimento con particelle BU48 e P6

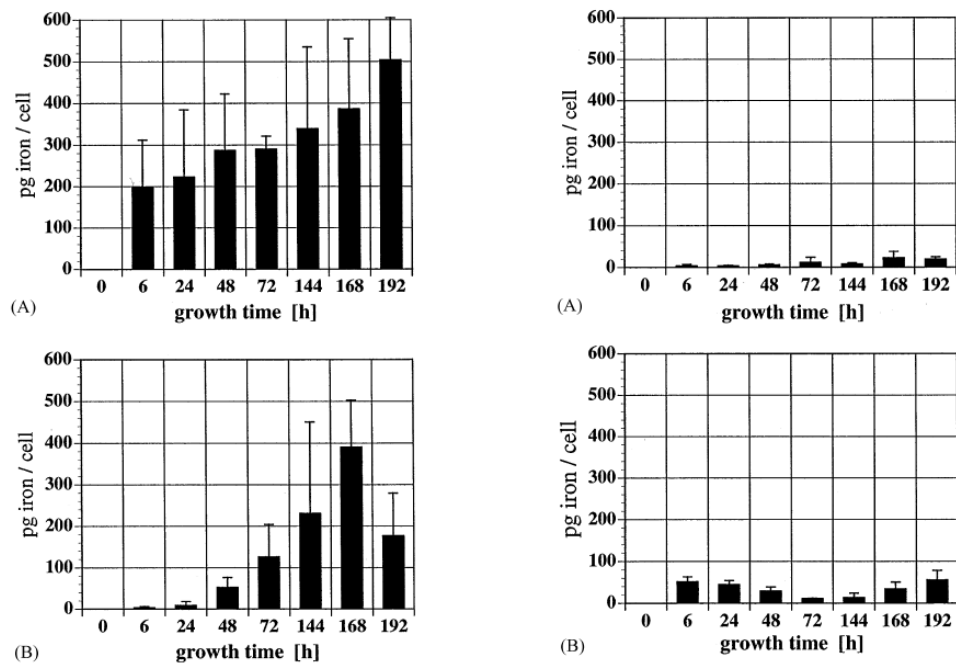


Figura 2.3: Assorbimento in dipendenza del tempo delle particelle P6(A) e delle BU48(B) nei fibroblasti umani, a sinistra, e nelle cellule di adenocarcinoma umano del colon, a destra. [9]

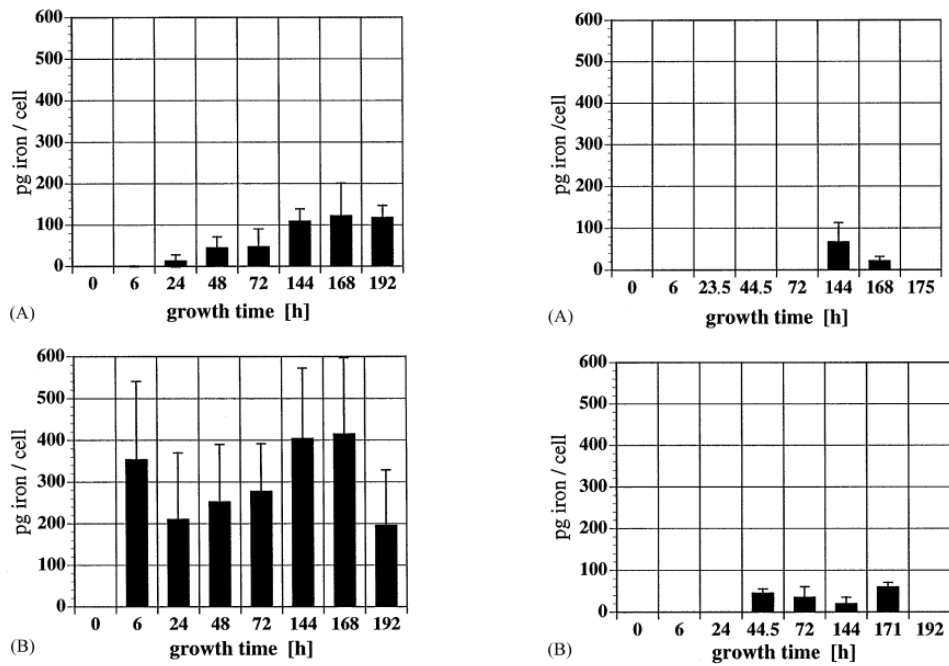


Figura 2.4: Assorbimento in dipendenza del tempo delle particelle P6(A) e delle BU48(B) nelle cellule di glioma umano, a sinistra, e nei neuroni corticali, a destra. [9]

quella aspecifica con la membrana cellulare. È possibile dar una descrizione analitica del raggio critico, R_{th} , sotto il quale non avviene endocitosi, sapendo che il raggio che minimizza il tempo di ingresso nella cellula è subito al di sopra.

$$R_{th} = \sqrt{\frac{B}{(2m_b)}} \left[C - \frac{1}{2}G(\tilde{s}_{eq} - \tilde{\xi})^2 - \frac{F}{\tilde{s}_{eq}} \exp(-\tilde{s}_{eq}) \frac{L^2}{\tilde{s}_{eq}} + 1 + (\log m - \tilde{m}) \right]^{1/2}$$

Dove B è l'energia di curvatura del legame, m_b è la densità di legami con i recettori nella zona legata; C è l'energia di legame; G, F e L sono dei parametri adimensionali che descrivono rispettivamente il legame con i recettori, il legame aspecifico e la fluttuazione termica; \tilde{s}_{eq} è la distanza di separazione all'equilibrio normalizzata, $\tilde{\xi}$ è il rapporto tra la lunghezza del legante e del recettore e \tilde{m} è la densità molecolare sulla superficie della nanoparticella.

Esistono alcuni metodi di particolare rilevanza per il targeting attivo delle cellule tumorali che sono stati studiati da diversi gruppi con varie finalità, tra cui non sempre compare l'ipertermia. Si darà una breve discussione delle loro caratteristiche e si presenterà una tabella (2.5) riassuntiva degli esperimenti proposti in letteratura.

2.4.1 Targeting tramite acido folico

Il recettore dell'acido folico è una particolare proteina di membrana in grado di legare e internalizzare il folato. Questo recettore è espresso in quantità limitate dal tessuto epiteliale delle reni, della tiroide, dei polmoni e del cervello ed è normalmente iperespresso dai tessuti cancerosi associati a una prognosi negativa, a causa del suo ruolo nella proliferazione cellulare. L'acido folico ha quindi la potenzialità di individuare molti tipi di tumori, anche tra le forme più gravi.

L'acido folico è stato coniugato con successo a diversi rivestimenti degli SPIONs tra cui il destrano, il PEG e il 2-carboxetil acido fosforico. In generale è più facile da ottenere e da trattare su scala industriale di molte altre molecole proposte allo stesso fine. Studi in vitro hanno dimostrato che il legame con il folato non aumenta la tossicità delle particelle.

Ulteriori studi hanno evidenziato che l'acido folico innalza da 3 a 16 volte l'assorbimento delle particelle rispetto a quelle senza specificità. Dopo l'internalizzazione nelle cellule, gli SPIONs sono stati trovati negli endosomi e nel citoplasma, confermando l'ipotesi che il processo di assorbimento sia effettivamente l'endocitosi specifica. Le particelle così preparate, inoltre, hanno dimostrato di avere un basso tasso d'assorbimento in vitro da parte dei macrofagi. [7] [17]

2.4.2 Targeting tramite proteine

Le proteine sono tra i composti organici più complessi che svolgono molte funzioni all'interno dell'organismo. Proprio per ricoprire differenti ruoli nei processi metabolici le proteine hanno natura anche molto diversa. Moltissimi composti proteici

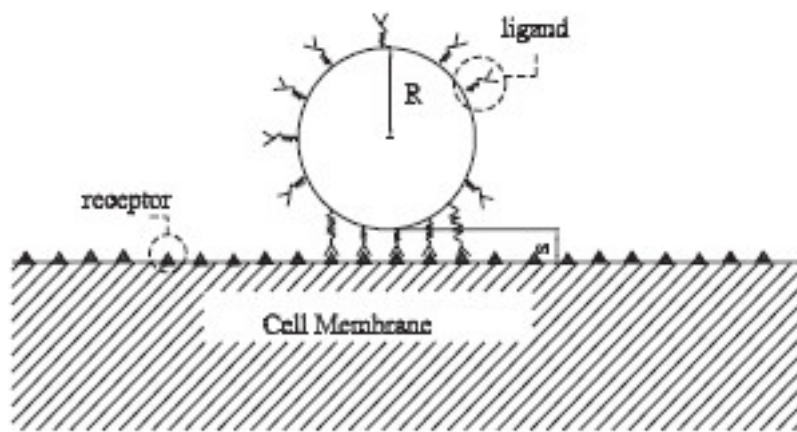


Figura 2.5: Aggancio della cellula precedente all'endocitosi specifica [16]

sono stati utilizzati per la funzionalizzazione delle nanoparticelle dimostrandosi adatti a legare selettivamente alcuni tipi di recettori.

Nella tabella 2.5 sono illustrate le proprietà molti composti di natura proteica:

- TAT protein-derived peptide⁹,
- lipoproteine a bassa densità,
- transferrina¹⁰,
- lactoferrina¹¹,
- ceruloplasmina¹²,
- insulina¹³,
- peptidi ciclici con sequenza RGD¹⁴,
- EGFRvIII antibody¹⁵,
- CEA antibody¹⁶,
- atrial natriuretic peptide¹⁷,
- monoclonal antibody CHL6¹⁸,
- bombesina¹⁹,
- trastuzumab²⁰,
- peptide GE11²¹,
- peptide NGR²².

⁹Peptide derivato dal transattivatore di trascrizione (TAT) di virus dell'immunodeficienza umana.

¹⁰La principale glicoproteina di trasporto del ferro.

¹¹Una classe particolare di transferrina.

¹²Una proteina prodotta dal fegato per legare il rame nel sangue.

¹³Nota ormone proteico dalle proprietà anaboliche

¹⁴Arginina-Glicina-Acido Aspartico.

¹⁵Anticorpo dell'epidermal growth factor.

¹⁶Anticorpo dell'antigene carcino embrionario.

¹⁷Un ormone di origine peptidica coinvolto nel controllo omeostatico di acqua, sodio, potassio e grasso presenti nell'organismo.

¹⁸L6 chimerico.

¹⁹Peptide vasoattivo, costituito da 14 amminoacidi isolato in alcune specie di anfi.

²⁰Un anticorpo monoclonale umanizzato utilizzato per combattere il carcinoma mammario avanzato.

²¹

²²Asparagina-Glicina-Arginina.

Di queste proteine alcune risultano particolarmente promettenti e per questo se ne illustrerà più precisamente l'utilizzo, per tutte le altre si rimanda alla bibliografia illustrata nella tabella.

Targeting tramite transferrina

Il recettore della transferrina (Tfr) è una proteina di superficie che media l'assorbimento della proteina transferrina. Questa proteina è una di quelle glicoproteine in grado di legare il ferro presente nel siero per facilitare l'ingresso degli ioni ferro nel citoplasma. L'approvvigionamento di questa sostanza, infatti, è essenziale per i processi metabolici, di replicazione del DNA e di riproduzione cellulare. Il recettore della transferrina è generalmente iperespresso sulle cellule tumorali che necessitano del ferro per sostenere la loro incontrollata proliferazione.

L'internalizzazione della transferrina è molto rapida e, normalmente, i suoi recettori, dopo averla legata, ritornano nuovamente disponibili. Questo comportamento può facilitare un grande accumulo degli SPION nei lisosomi.

Il principale svantaggio nell'uso di questa strategia risiede nell'alto assorbimento dei Tfr-SPIONs da parte del sistema reticoloendoteliale.[7] [17]

Targeting tramite anticorpi monoclonali

Gli anticorpi monoclonali (mAbs) comprendono diverse sostanze adatte al targeting tumorale. Possono legare moltissimi ricettori e sono al momento la classe più studiata per il targeting attivo.

A risultati incoraggianti, anche in vivo, su questa strategia si uniscono, però, dubbi sulla dimensione degli anticorpi. Questi composti, infatti, hanno un grosso ingombro sterico che provoca un aumento del diametro delle particelle le quali, pur legando solo pochi mAbs, risultano troppo grosse per passare agilmente attraverso i vasi sanguigni. Gli anticorpi inoltre sono fragili, sensibili ad alterazioni e devono essere legati alle nanoparticelle facendo attenzione al loro orientamento rispetto alla superficie. Esiste, poi, il rischio di provocare una forte reazione immunitaria nel paziente.

Un esempio di questo approccio mira a legare la classe dei recettori dei fattori di crescita epidermica, la cui massiccia espressione è collegata a tipi di cancro particolarmente aggressivi. La possibilità di usare direttamente il fattore di crescita epidermica come sostanza adatta al targeting è limitata dai rischi clinici collegati all'introdurre EFG (Epidermal Growth Factor) esogeno in un organismo, per questo si sono sviluppate tecniche di targeting tramite anticorpi. Nanoparticelle funzionalizzate con Herceptin, anticorpo per EGFRvIII e anticorpo per VEGFR (fattore di crescita epidermica vascolare) sono in buona fase sperimentale.[17] [7]

Targeting rivolto alle integrine

Le integrine sono una classe di glicoproteine di membrana che fungono da recettori per molecole della matrice extracellulare e facilitano l'adesione cellula-matrice, facendo da via di comunicazione tra cellula e matrice extracellulare. Delle 24 forme di integrine conosciute, la $\alpha_v\beta_3$ è iperespressa nelle cellule tumorali in quanto è tipica di cellule endoteliali in proliferazione, come quelle collegate all'angiogenesi.

I peptidi con la sequenza di aminoacidi RGD, sia in versione lineare sia ciclica si sono dimostrati particolarmente adatti al targeting di alcune integrine tra cui la $\alpha_v\beta_3$. La versione ciclica è preferibile perché più stabile in vivo. Le $\alpha_v\beta_3$, inoltre, sono espresse nelle porzioni apicali a basolaterali dei vasi in proliferazione e quindi sono accessibili direttamente dal sistema di vascolarizzazione tumorale. Le particelle funzionalizzate con sequenze RGD non devono diffondere dai vasi alle cellule per portare a termine il targeting. [17] [7]

Targeting tramite lipoproteine a bassa densità

Il recettore delle lipoproteine a bassa densità (LDL) è iperespresso dalle cellule cancerose a rapida proliferazione perché richiedono un alto quantitativo di colesterolo per la sintesi di membrana. Utilizzare LDL per il targeting delle cellule tumorali ha dato buoni risultati in test in vitro e su topi. Introdurre questo tipo di sostanze non dovrebbe causare complicanze in quanto si tratta di lipoproteine tipiche degli alimenti.

2.4.3 Targeting tramite aptametri

Gli aptametri sono sequenze di oligonucleotidi selezionati artificialmente per legare particolari obiettivi con alta specificità e affinità. Risultano facilmente applicabili agli ossidi di ferro, con tecniche che assicurano il permanere delle loro capacità di targeting dopo la coniugazione con gli SPIONs.

Un iniziale dubbio sull'utilizzo degli aptametri di RNA era la loro deperibilità ad opera delle nucleasi. Questi enzimi, infatti, rompono i legami tra le subunità nucleotidiche facendo perdere il rivestimento alle nanoparticelle e quindi le loro proprietà. Questo rischio, però è stato ridotto apportando delle apposite modifiche alle pirimidine, cioè modificando alcuni legami in modo da impedire la catalizzazione.

L'alta specificità degli aptametri permette un targeting molto preciso, ma nelle applicazioni in vivo può risultare un limite in quanto non si riesce a costruire così precisamente la sequenza da essere sicuri che sia adatta a legare le cellule di quel particolare paziente, senza conoscerne moltissime specifiche. [17]

2.4.4 Targeting eteromultivalente

Questo targeting si basa sulla funzionalizzazione della particella con diversi elementi di riconoscimento. Esse possono quindi raggiungere e legare diversi tipi di recettori sulla superficie cellulare. In questo modo sarebbe possibile, a livello teorico, bersagliare le cellule con maggior specificità qualora dimostrassero di esibire particolari combinazioni di ricettori.

Al momento sono state testate, ad esempio, combinazioni di Tf e RGD, di aptametri e RGD, di RGD e antagonist peptide anginex su tessuto endoteliale. Tutti e tre questi composti hanno dato risultati positivi. In particolare l'ultimo ha dimostrato uno straordinario tasso d'internalizzazione nelle cellule endoteliali.

Sul targeting multivalente c'è ancora molto da studiare. Non si è ancora chiarito in che modo, e in particolare a quale distanza, vadano distribuite queste molecole per massimizzare l'internalizzazione e minimizzare le interazioni tra le diverse sostanze legate alla stessa particella.[17] [7]

Rivestimento	Campione	Caratteristiche	Ref
Tat protein-derived peptide (polipeptide)	cellule CD34+ ematopoietiche umane, cellule progenitrici neurali di topo linfociti CD4+ umani, splenociti di topo	Buona internalizzazione per endocitosi aspecifica. Bassa citotossicità.	[18]
Phosphorylcholine PC	Nessuna	Troppo sensibili a variazione di Ph, impraticabili per lo studio in vivo.	[19]
Lipoproteine a bassa densità(LDL)	Cellule HepG2 sane e tumorali	Adatto all'endocitosi specifica e al targeting delle cellule tumorali che iperesprimono i recettori LDL per sostenere l'alto tasso di generazione di membrana.	[7]
Pullulan	Fibroblasti umani	Alta stabilità a pH neutro. Adatto all'endocitosi specifica (affine ai recettori dell'asialoglicoproteina, da test su cellule epatiche di ratto). Alta solubilità in acqua, non tossico, non immunogeno, non antigenico.	[20]
Transferrina	Ampie classi di cellule, comprese tumorali e leucemiche.	È una proteina naturalmente deputata a legare il ferro. Adatto all'endocitosi specifica. Alta espressione dei recettori della transferrina sulle cellule tumorali.	[21]
Lactoferrina	Fibroblasti umani	Simile alla transferrina, ma con più capacità di legare il ferro. Studi di tossicità non ancora disponibili.	[22]
Ceruloplasmina	Fibroblasti umani	Adatto all'endocitosi specifica. Studi di tossicità non ancora disponibili.	[22]
Insulina	Fibroblasti umani	Alta adesione alla membrana cellulare. Citotossico sopra la concentrazione di 250µg/ml.	[23]

Acido Folico	Ampie classi di cellule, comprese tumorali e leucemiche.	Adatto all'endocitosi specifica e al targeting delle cellule tumorali. Poco immunogeno. Facile da produrre.	[7]
Peptidi ciclici con sequenza RGD	Glioblastomi	Adatto all'endocitosi specifica e al targeting delle cellule tumorali tramite i ricettori dell'integrina. Interferisce con l'angiogenesi.	[7]
EFR	Cellule di cancro ai polmoni	Aumenta la specificità della cura quando somministrato ai polmoni via aerosol. Non è stato testato in particolare per le nanoparticelle magnetiche per i rischi legati alla somministrazione.	[7]
EGFRvIII Antibody	Glioblastomi	Adatto all'endocitosi specifica e al targeting delle cellule tumorali tramite i ricettori dell'fattore di crescita epidermica(EGFR).	[24]
CEA Antibody (carcinoembryonic antigen)	Adenocarcinoma umano A549 al polmone, e una linea di cellule umane diploidi del polmone (WI-38) per il gruppo di controllo.	Adatto all'endocitosi specifica e al targeting delle cellule tumorali.	[25]
Atrial natriuretic peptide (ANP)	HEK293hcg cell line e HEK293 (human embryonic kidney 293) per il gruppo di controllo.	Adatto all'endocitosi specifica e al targeting delle cellule tumorali.	[25]
Monoclonal antibody (mAb) CHL6	Cancro al seno umano HBT 3477	Eccellente targeting tumorale. Lunga emivita nel sangue. Testato specificamente per l'ipertermia.	[26]

Bombesina	Cellule PC-3 di cancro umano alla prostata	In grado di legare i recettori di rilascio della gastrina (GRP) iperespersi nel cancro alla prostata, al seno, ai polmoni e al pancreas.	[27]
Trastuzumab (Herceptin)	BT474, SK-Br-3 e MCF7 (tumore al seno umano)	Adatta al targeting specifico di cellule che sovraesprimono il recettore2 per il fattore di crescita epidermico umano (EGFR-2). Buona internalizzazione. Già in uso clinico per tumori al seno metastatici.	[28] [29]
Peptide GE11	SMMC-7721 (epitoma umano)	Adatta al targeting specifico di cellule che sovraesprimono il recettore1 per il fattore di crescita epidermico umano (EGFR-1).	[30]
Peptide NGR	HT-1080 (cellule di fibrosarcoma umano)	Lega a un fattore che causa l'angiogenesi caotica nei tumori (CD13) e ai recettori dell'integrina. Ottima internalizzazione.	[31]
A10 PSMA aptamer	LNCaP cellule epiteliali di tumore alla prostata e PC3 sane	Adatto al targeting attivo delle cellule che sovraesprimono le proteine PSMA.	[32]

Tabella 2.5: Targeting attivo

2.5 Rivestimenti combinati

Quando si funzionalizzano le nanoparticelle con sostanze adatte al targeting attivo è particolarmente importante il processo tramite il quale tali sostanze vengono fissate alla nanoparticella. In alcuni casi è possibile fissare il composto direttamente sulla superficie dell'ossido di ferro, ma spesso è preferibile, per sfruttare reazioni più controllabili e per aumentare la stabilità e la biocompatibilità, ricoprire di uno strato polimerico la particella e ad esso fissare la componente funzionalizzante.

La decisione di come combinare il primo e il secondo strato di ricoprimento varia di ricerca in ricerca, con risultati diversi per le varie combinazioni. Nella tabella 2.6 si trovano alcuni esempi delle scelte fatte in letteratura.

2.5.1 Un esempio sperimentale

Dei tanti approcci per ricoprire e funzionalizzare le nanoparticelle uno particolarmente diffuso consiste nel ricoprirle con uno strato di polietilenglicole a cui vengono legate le sostanze adatte al targeting attivo. In particolare Kohler, Zhang e altri hanno messo a punto un semplice metodo di dialisi per legare il PEG alla nanoparticella e ad esso l'acido folico per la funzionalizzazione. Questo metodo è risultato particolarmente versatile, in grado di ottenere nanoparticelle con una distribuzione stretta delle dimensioni e di prevenirne gli agglomerati.

Il polietilenglicole che normalmente viene utilizzato per aumentare l'emivita nel sangue e la resistenza al sistema immunitario presenta dei limiti in quanto se è funzionalizzato con gruppi amminici o carbossilici è costoso, spesso disponibile solo a peso molecolare alto, non adatto ad applicazioni nanometriche e in grado di legare solo composti funzionalizzanti con gruppi o amminici o carbossilici.

L'alternativa studiata da Kohler ha permesso di sviluppare una tecnica a basso costo basata sul trifluoroetilene (TFEE) PEG silano. Il TEE PEG:

- Ha un basso peso molecolare.
- Permette un'ottima solubilizzazione delle particelle.
- Lega sia composti con gruppi amminici che carbossilici.

All'interno dello studio di Kohler, Zhang e altri sono state testate su cellule BT20 di cancro al seno tre classi di nanoparticelle: nanoparticelle ricoperte di PEG, nanoparticelle funzionalizzate con acido folico, e nanoparticelle ricoperte di PEG e funzionalizzate con acido folico. Queste ultime hanno dimostrato una particolare capacità di penetrare le cellule, con un picco di più di 700pg/cell dopo 48 ore, mentre le altre due classi hanno raggiunto al massimo 250pg/cell dopo 72 ore quelle non funzionalizzate e 150pg/cell dopo 48 ore le altre. Una visione comparata di questi risultati è riportata nella tabella 2.4

Rivestimento	Funzionalizzazione
Destrano	Tat protein-derived peptide (polipeptide)
	Monoclonal antibody CHL6
PEG	Trastuzumab
	Transferrina
	Acido folico
	Peptidi cilici con sequenza RGD
	A10 PSMA aptamer
	Lipoproteine a bassa densità
	Citosan Peptidi cilici con sequenza RGD
Direttamente	Atrial natriuretic peptide (ANP)
	Polluan
	CEA Antibody (carcinoembryonic antigen)
	Bombesina
	Transferrina
	Lactoferrina
	Ceruloplasmina
	Insulina
Lipoproteine a bassa densità	

Tabella 2.6: Rivestimento e funzionalizzazione

Le nanoparticelle ricoperte di polietilenglicole sono risultate, in culture in vitro, poco riconoscibili dal sistema immunitario. L'assorbimento da parte dei macrofagi si è dimostrato di 2.3 pg/cell il primo giorno, contro i 12pg/cell delle nanoparticelle non ricoperte di PEG. Nessuna influenza, né in negativo né in positivo, sembra avere, nel caso della riconoscibilità da parte del sistema immunitario, l'ulteriore funzionalizzazione con acido folico.

Questo studio, come molti altri, guarda solamente al tasso di internalizzazione delle nanoparticelle ottenute. Il campo di applicazione a cui si rivolgono più naturalmente gli autori è la risonanza magnetica con contrasto, ma l'aver ottenuto particelle omogenee per dimensioni, con bassa tendenza ad agglomerarsi, poco riconoscibili dal sistema immunitario e in grado di penetrare selettivamente nelle cellule tumorali, dà buone speranze nella loro applicazione in magneto fluido ipertermia o per tecniche miste di ipertermia e rilascio mirato di farmaci citotossici. [33] [34]

2.5.2 Analisi comparata dei due esperimenti esposti

Nei paragrafi 2.5.1 e 2.3.1 sono stati descritti due esempi sperimentali di come due gruppi di ricerca hanno studiato la praticabilità e l'efficienza dell'ipertermia intracellulare.

Questi due esperimenti sono stati scelti in questa analisi perché particolarmente significativi e simili per metodologie. I risultati, quindi, pur essendo relativi a linee cellulari differenti possono essere comparati. In particolare è possibile paragonare il massimo assorbimento di nanoparticelle raggiunto nei diversi tessuti per i rivestimenti considerati e il tempo necessario per raggiungerlo correlando i risultati anche al tipo di cellule. Una tabella (2.8) riassuntiva di questi risultati viene proposta di seguito.

Si nota chiaramente, dalla tabella 2.8, che la situazione più favorevole si ha con l'utilizzo di nanoparticelle funzionalizzate con polietilene glicole e acido folico. Con questo rivestimento l'internalizzazione avviene principalmente per endocitosi mediata da recettori. Questo è coerente con la tendenza della comunità scientifica negli ultimi anni di riservare maggiori sforzi su tecniche di internalizzazione delle nanoparticelle tramite endocitosi specifica.

2.6 Stabilità e capacità di internalizzazione al variare del pH

Uno dei problemi riscontrati nell'applicazione in vivo dei ferrofluidi magnetici è la variabilità del pH dei tessuti in cui le particelle sono iniettate. A differenza di quanto avviene nei test in vitro, infatti, il pH può andare incontro ad improvvise variazioni dovute anche a modifiche del micromilieu tipico dei tessuti tumorali.

Quando si ricopre e funzionalizza una nanoparticella è quindi necessario testare la sua stabilità alle variazioni di pH, in particolare assicurarsi che i legami

Acido folico	Cellule BT20	Dodici ore: <100pg/cell. Picco: 48 ore <150pg/cell
PEG	Cellule BT20	Dodici ore: 80pg/cell. Picco: 72 ore 250pg/cell
PEG e acido folico	Cellule BT20	Dodici ore: 480pg/cell. Picco: 48 ore <720pg/cell

Tabella 2.7: Risultati della funzionalizzazione con PEG e/o con acido folico

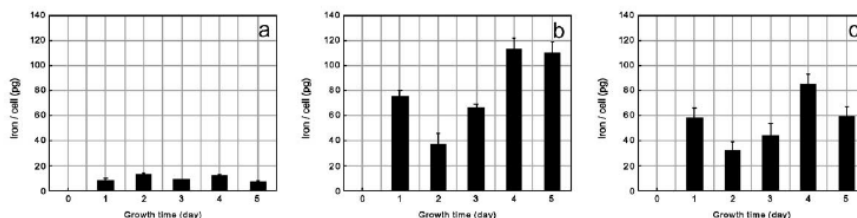


Figura 2.6: Assorbimento in dipendenza del tempo delle particelle non rivestite (a), ricoperte di PEG (b) e funzionalizzate con PEG e acido folico (c) nelle cellule BT20 [9]

Nanoparticella	Tessuto	Tempo	Quantità
BU48	Fibroblasti umani	168 ore	<400pg/cell
	Adenocarcinoma	6 ore	50pg/cell
	Cellule neuronali	171 ore	<60pg/cell
	Glioma maligno	168 ore	<420pg/cell
P6	Fibroblasti umani	192 ore	500pg/cell
	Adenocarcinoma	168 ore	20pg/cell
	Cellule neuronali	144 ore	<60pg/cell
	Glioma maligno	120 ore	500pg/cell
Acido Folico	Cellule BT20	48 ore	<150pg/cell
PEG	Cellule BT20	72 ore	250pg/cell
PEG e Acido Folico	Cellule BT20	48 ore	<720pg/cell

Tabella 2.8: Risultati comparati dei due esperimenti esposti

formati non si degradino. La variazione del pH ha un'influenza anche nelle forze elettrostatiche all'interno del ferro fluido, che a loro volta sono fortemente legate alla stabilità della soluzione colloidale e alla sua interazione con le cellule e con il plasma.[35] [36]

Una misura della carica superficiale delle nanoparticelle è il potenziale Zeta che viene abitualmente calcolato in funzione del pH per gli ossidi di ferro. Il potenziale Zeta descrive le interazioni elettrostatiche all'interno di un fluido. Se sulla superficie di una nanoparticella si ritrova una certa carica essa attirerà gli ioni presenti nel fluido. In particolare si creano due strati: uno in cui gli ioni sono fortemente legati (strato di Stern) e uno in cui sono associati tramite legami meno forti (strato diffusivo). Nello strato diffusivo si definisce un confine teorico all'interno del quale gli ioni e la particella definiscono un'unità stabile. Il potenziale calcolato a livello di questo confine è il potenziale Zeta.

Un semplice modo per calcolare il potenziale Zeta consiste nel misurarlo tramite elettroforesi. Infatti se si sottopone un campione a un campo elettrico, le nanoparticelle saranno attratte da uno o l'altro elettrodo a seconda della loro carica. La velocità con cui si muovono sarà funzione dell'intensità di campo, della viscosità e della costante dielettrica del mezzo e del potenziale Zeta, secondo la relazione

$$U_E = \frac{2\epsilon z f(\kappa a)}{3\eta}$$

Dove U_E è la mobilità elettroforetica, ϵ è la costante dielettrica, z è il potenziale Zeta, η è la viscosità e $f(\kappa a)$ la funzione di Henry che tiene conto del doppio strato di ioni e per la quale vengono spesso usati, a livello pratico, modelli semplificati. Ottenuta U_E dall'elettroforesi è possibile determinare il valore del potenziale Zeta.

Le cellule e le nanoparticelle interagiscono in funzione del potenziale Zeta e non della carica superficiale delle nanoparticelle. Il valore del potenziale Zeta influenza i rapporti tra nanoparticelle all'interno del fluido, tra nanoparticella e cellula, può avere effetti sul targeting delle cellule tumorali e, se assume valori piccoli, può causare l'assorbimento di proteine e quindi una maggior riconoscibilità da parte del sistema immunitario.

Il potenziale Zeta in funzione del pH assume normalmente valori che vanno dal positivo al negativo con l'aumento della basicità passando per un punto, detto isoelettrico, in cui esso è nullo.

Il punto isoelettrico è particolarmente delicato perché causa la degradazione della soluzione colloidale. È il punto in cui comincia la flocculazione, cioè si va incontro all'aggregazione delle nanoparticelle, qualora la stabilità del colloide sia da attribuirsi alle forze elettrostatiche.

La carica negativa delle membrane cellulari farebbe pensare che particelle con un potenziale Zeta negativo interagiscano peggio con il tessuto, è stato però dimostrato che il valore a cui corrisponde il tasso minimo di internalizzazione è il punto isoelettrico. Alcune ricerche indicano che l'endocitosi aspecifica è aumen-

tata da una carica superficiale elevata, sia essa negativa o positiva. Al contrario, però, maggiore è la carica superficiale in modulo, minore è la permanenza degli SPIONs nel plasma.

Queste conoscenze sul comportamento delle nanoparticelle al variare del loro potenziale Zeta vanno integrate con conoscenze sul raggio idrodinamico al variare del pH. [37]

Se il passaggio per il punto isoelettrico coincide con un innalzamento del raggio idrodinamico, la stabilità dell' emulsione colloidale è dovuta a forze elettrostatiche. Il caso tipico, ma non unico, è quello delle nanoparticelle non ricoperte. In queste condizioni se si arriva al punto isoelettrico e si accosta un magnete al ferro fluido si assiste ad un' immediata precipitazione delle nanoparticelle. Volendo lavorare con particelle di questo tipo, la priorità sarà evitare la degradazione del fluido tenendosi a valori del potenziale Zeta alti in modulo, si potrà contare su interazioni favorevoli con le membrane cellulari, ma si dovrà competere con una scarsa stabilità nel sangue.[38]

Per le nanoparticelle ricoperte, che vengono tenute separate dal loro guscio protettivo, il passaggio per il punto isoelettrico non coincide con un innalzamento del raggio idrodinamico. Ad esempio, le nanoparticelle magnetiche ricoperte di PEG hanno un potenziale Zeta completamente schiacciato attorno al valore zero a cui però corrisponde un raggio idrodinamico uniformemente basso. È chiaro che in questo caso non avremmo flocculazione dovuta al potenziale nullo. Le nanoparticelle con queste caratteristiche avranno una vita più lunga nel sangue, ma dovranno basarsi su altri tipi di forze per legare le membrane cellulari e favorire l' internalizzazione. [37]

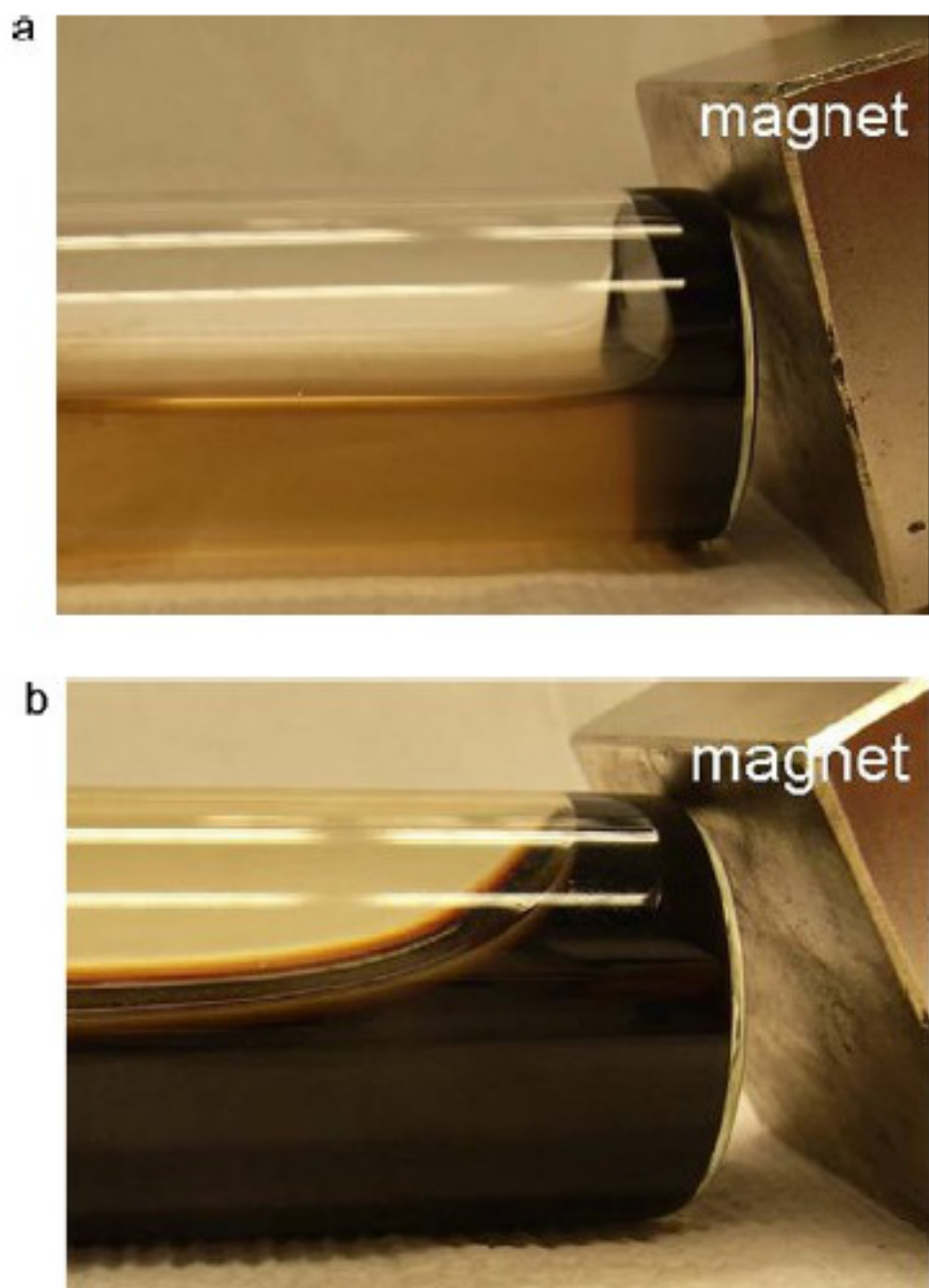


Figura 2.7: Due ferrofluidi [35] (a) instabile, soggetto a precipitazione se esposto ad un campo magnetico (b) stabile

Nanoparticelle non ricoperte	<p>Il raggio idrodinamico aumenta in corrispondenza del punto isoelettrico.</p> <p>Stabilità dovuta a forze elettrostatiche.</p> <p>Il potenziale Zeta va mantenuto alto per evitare la flocculazione.</p> <p>Interazioni favorevoli con la membrana cellulare.</p> <p>Scarsa stabilità nel sangue.</p>
Nanoparticelle ricoperte (PEG)	<p>Il raggio idrodinamico non aumenta in corrispondenza al punto isoelettrico.</p> <p>Stabilità dovuta alla presenza del rivestimento, non c'è flocculazione dovuta al potenziale nullo.</p> <p>Il potenziale Zeta è uniformemente piccolo in modulo.</p> <p>Le interazioni con la membrana cellulare non sono regolate da forze elettrostatiche.</p> <p>Buona stabilità nel sangue</p>

Tabella 2.9: Stabilità dei ferrofluidi al variare del pH

Capitolo 3

Un'alternativa alla funzionalizzazione di superficie: i liposomi.

Introduzione

I liposomi sono stati ampiamente studiati come mezzo di distribuzione mirata di farmaci, con buon successo nel raggiungimento delle zone tumorali. L'approccio classico presuppone di inglobare un farmaco citotossico all'interno di una doppia membrana fosfolipidica che permetta al farmaco di essere iniettato nel sistema circolatorio senza venire disperso e di raggiungere il tessuto a cui è destinato.

La maggior permeabilità dei vasi nei tessuti tumorali, insieme a tecniche di targeting specifico permette di accumulare un grande numero di liposomi nel tessuto tumorale, questo però non garantisce l'effettiva efficacia del rilascio del farmaco che può risultare troppo lenta. Per questo sono stati introdotti liposomi termosensibili per i quali il calore è in grado di innescare il processo di rilascio.

In questa tecnica all'interno dei liposomi viene racchiusa della soluzione colloidale contenente sia il farmaco sia le nanoparticelle magnetiche. In questo modo, quando si applica il campo magnetico variabile, assistiamo a due risultati: viene indotta ipertermia nel tessuto maligno e i liposomi si deteriorano per effetto del calore fino a rilasciare il farmaco.

Questa strategia apre la strada a un più semplice targeting delle cellule tumorali. Invece di funzionalizzare le nanoparticelle, infatti, si fissano i recettori sulla superficie dei liposomi. Le molecole che si possono legare sono, in molti casi, le stesse che si fissano direttamente sulla superficie delle particelle.

3.0.1 Un esempio sperimentale

In diversi studi sulle proprietà dei liposomi nella lotta al cancro Ito e altri [40] hanno sviluppato una terapia combinata basata su antibiotici e magneto fluido

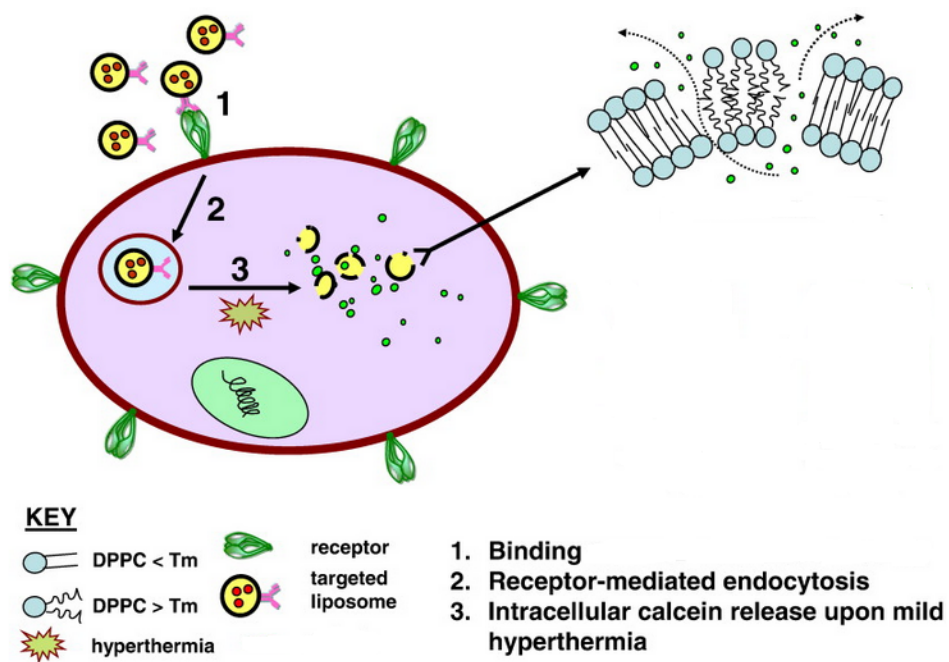


Figura 3.1: Funzionamento dei liposomi a rilascio controllato tramite ipertermia [39]

ipertermia. A tale fine sono stati utilizzati lisosomi coniugati con anti-HER2 e carichi di nanoparticelle magnetiche. In un secondo momento è stata inserita la erceptina¹ insieme al ferro fluido all'interno del liposoma.

I risultati ottenuti indicano un elevato tasso d'ingresso nelle cellule di tumore alla mammella SKBr3. Queste cellule iperesprimono il recettore 2 per il fattore di crescita epidermico umano. I lisosomi funzionalizzati con anti-Her2 sono quindi adatti al targeting e, allo stesso tempo, impegnano i recettori impedendo l'approvvigionamento di fattore di crescita della cellula tumorale.

L'esperimento di Ito ha dimostrato, in un primo momento che il trattamento con liposomi anti-HER2 risulta più efficace su cellule precedentemente trattate con erceptina e, quindi, ha studiato dei magneto liposomi erceptina-coniugati confrontandoli con magneto liposomi Rituxan²-coniugati per il gruppo di controllo.

I risultati hanno indicato una percentuale di assorbimento della magnetite attorno al 50% per i liposomi coniugati con erceptina, mentre attorno al 10% nel gruppo di controllo. Il tasso di sopravvivenza è risultato essere attorno al 40% nei primi, con massima efficacia per una concentrazione di 0.5 mg antibody/ml, mentre pari a circa il 100% nei secondi.

Questi dati risultano incoraggianti nella prospettiva di sviluppare tecniche combinate di ipertermia e di distribuzione farmacologica tramite liposomi.

¹Un anticorpo monoclonale umanizzato utilizzato per combattere il carcinoma mammario avanzato

²Un anticorpo monoclonale contro la proteina CD20, che si trova primariamente sulla superficie dei linfociti B

Liposoma	Assorbimento magnetite	Tasso di so- pravvivenza
Herceptin-conjugated magnetoliposome	50%	10%
Rituxan-conjugated magnetoliposome	40%	100%

Tabella 3.1: Risultati trattamento con liposomi

Bibliografia

- [1] S. Laurent, S. Dutz, U. Hafeli, and M. Mahmoudi, "Magnetic fluid hyperthermia: Focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles," *Elsevier*, 2011.
- [2] B. Hildebrandt, P. Wust, O. Ahlers, A. Dieing, G. Sreenivasa, T. Kerner, R. Felix, and H. Riess, "The cellular and molecular basis of hyperthermia," *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2001.
- [3] G. F. Goya, V. Grazu, and Ibarra, "Magnetic nanoparticles for cancer therapy," *Current Nanoscience*, 2008.
- [4] R. Hergt, R. Hiergeist, I. Hilger, W. A. Kaiser, Y. Laoatnikov, S. Margel, and U. Richter, "Magnetite nanoparticles with very high ac-losses for application in rf-magnetic hyperthermia," *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2003.
- [5] R. Hergt, R. Hiergeist, M. Zeisberger, G. Glockel, W. Weitschies, L. P. Ramirez, I. Hilger, and W. A. Kaiser, "Enhancement ac-losses of magnetic nanoparticles for heating applications," *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2004.
- [6] A.-H. Lu, E. L. Salabas, and F. Schth, "Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application," *Angew. Chem.*, 2007.
- [7] Xu, Olenyuk, Okamoto, and Hamm-Alvarez, "Targeting receptor-mediated endocytotic pathways with nanoparticles: rationale and advances," *Biomaterials*, 2005.
- [8] J. E. Rosen, L. Chan, D.-B. Shieh, and F. X. Gu, "Iron oxide nanoparticles for targeted cancer imaging and diagnostics," *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2011.
- [9] A. Jordan, R. Scholz, P. Wust, H. Schirra, T. Schiestel, H. Schmidt, and R. Felix, "Endocytosis of dextran and silan-coated magnetite nanoparticles and the effect of intracellular hyperthermia on human mammary carcinoma cells in vitros," *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2004.

- [10] A. K. Gupta and S. Wells, "Surface-modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: Preparation, characterization, and cytotoxicity studies," *IEEE TRANSACTIONS ON NANOBIOSCIENCE*, 2004.
- [11] S. Azarmi, W. H. Roa, and R. Lobenberg, "Targeted delivery of nanoparticles for the treatment of lung diseases," *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008.
- [12] A. J. Cole, J. W. Allan E. David and, C. J. Galban, H. L. Hill, and V. C. Y, "Polyethylene glycol modified, cross-linked starch-coated iron oxide nanoparticles for enhanced magnetic tumor targeting," *Biomaterials*, 2011.
- [13] H. S. Monty Liong, J. B. Haun, H. Lee, and R. Weissleder, "Carboxymethylated polyvinyl alcohol stabilizes doped ferro fluids for biological applications," *Advanced materials*, 2010.
- [14] A. Petri-Finka, M. Chastellaina, L. Juillerat-Jeanneretb, A. Ferrara, and H. Hofmanna, "Development of functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for interaction with human cancer cells," *Biomaterials*, 2005.
- [15] D.-H. Kim, K.-N. Kim, K.-M. Kim, and Y.-K. Lee, "Targeting to carcinoma cells with chitosan- and starch-coated magnetic nanoparticles for magnetic hyperthermia," *Wiley*, 2008.
- [16] Decuzzi and Ferrari, "The role of specific and non-specific interactions in the receptor-mediated endocytosis of nanoparticles," *Biomaterials*, 2007.
- [17] A. K. Gupta and M. Gupta, "Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications," *Biomaterials*, 2005.
- [18] M. Lewin, N. Carlesso, C.-H. Tung, X.-W. Tang³, D. Cory, D. T. Scadden, and R. Weissleder, "Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells," *Nature America*, 2000.
- [19] B. Denizot, G. le Tanguy, F. Hindre, E. Rump, J. J. L. Jeune, and P. Jallet, "Phosphorylcholine coating of iron oxide nanoparticles," *Journal of Colloid and Interface Science*, 1999.
- [20] A. K. Gupta and M. Gupta, "Cytotoxicity suppression and cellular uptake enhancement of surface modified magnetic nanoparticles," *Biomaterials*, 2004.
- [21] Z. M. Qian, H. Li, H. Sun, and K. Ho, "Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway," *Pharmacol Review*, 2002.
- [22] A. K. Gupta and A. S. Curtis, "Lactoferrin and ceruloplasmin derivatized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for targeting cell surface receptors," *Biomaterials*, 2004.

- [23] A. K. Gupta, C. Berry, M. Gupta, and A. S. Curtis, "Receptor-mediated targeting of magnetic nanoparticles using insulin as a surface ligand to prevent endocytosis," *IEEE TRANSACTIONS ON NANOBIOSCIENCE*, 2003.
- [24] C. G. Hadjipanayis, R. Machaidze, and M. Kaluzova, "Egfrviii antibody-conjugated iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging-guided convection-enhanced delivery and targeted therapy of glioblastoma," *Cancer Res*, 2010.
- [25] A. Kumar, P. K. Jena, S. Behera, R. F. Lockey, S. Mohapatra, and S. Mohapatra, "Multifunctional magnetic nanoparticles for targeted delivery," *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2010.
- [26] S. J. DeNardo, G. L. DeNardo, and L. A. Miers, "Development of tumor targeting bioprobes for alternating magnetic field cancer therapy," *Clin Cancer Res*, 2005.
- [27] A. L. Martin, J. L. Hickey, A. L. Ablack, and J. D. L. et al, "Synthesis of bombesin-functionalized iron oxide nanoparticles and their specific uptake in prostate cancer cells," *J Nanopart Res.*, 2009.
- [28] T.-J. Chen, T.-H. Cheng, C.-Y. Chen, S. C. N. Hsu, T.-L. Cheng, G.-C. Liu, and Y.-M. Wang, "Targeted herceptinâdextran iron oxide nanoparticles for noninvasive imaging of her2/neu receptors using mri," *J Biol Inorg Chem*, 2009.
- [29] H. Wartlick, K. Michaelis, S. Balthasar, K. Strebhardt, J. Kreuter, and K. Langer, "Highly specific her2-mediated cellular uptake of antibody-modified nanoparticles in tumour cells," *Journal of Drug Targeting*, 2004.
- [30] Z. Li, R. Zhao, X. Wu, Y. Sun, M. Yao, J. Li, Y. Xu, , and J. Gu, "Identification and characterization of a novel peptide ligand of epidermal growth factor receptor for targeted delivery of therapeutics," *The FASEB Journal*, 2005.
- [31] Y. Chen, J. J. Wu, and L. Huang, "Nanoparticles targeted with ngr motif deliver c-myc sirna and doxorubicin for anticancer therapy," *The American Society of Gene Cell Therapy*, 2009.
- [32] O. C. Farokhzad, S. Jon, and A. Khademhosseini, "Nanoparticle-aptamer bioconjugates : A new approach for targeting prostate cancer cells," *Cancer Res*, 2004.
- [33] Y. Zhang and J. Zhang, "Surface modification of monodisperse magnetic nanoparticles for improved intracellular uptake to breast cancer cells," *Journal of Colloid and Interface Science*, 2004.

- [34] N. Kohler, G. E. Fryxell, and M. Zhang, "A bifunctional poly(ethylene glycol) silane immobilized on metallic oxide-based nanoparticles for conjugation with cell targeting agents," *JACS articles*, 2004.
- [35] M. Pavlin and V. B. Bregar, "Stability of nanoparticle suspensions in different biologically relevant media," *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 2012.
- [36] T. Neubergera, B. Schopfa, H. Hofmannb, M. Hofmannc, and B. von Rechenberga, "Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system," *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2005.
- [37] N. Griffete, M. J. Clift, A. Lamouric, R. G. Digigowa, A. M. Mihuta, A. Finka, B. Rothen-Rutishausera, and H. Dietsch, "Amino covalent binding approach on iron oxide nanoparticle surface: Toward biological applications," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2012.
- [38] L. Zhu, D. Wang, X. Wei, X. Zhu, J. Li, C. Tu, Y. Su, J. Wu, B. Zhu, and D. Yan, "Multifunctional pH-sensitive superparamagnetic iron-oxide nanocomposites for targeted drug delivery and mr imaging," *Journal of Controlled Release*, 2012.
- [39] B. Smith, I. Lyakhov, K. Loomis, D. Needle, U. Baxa, A. Yavlovich, J. Capala, and R. B. A. Puri, "Hyperthermia-triggered intracellular delivery of anticancer agent to her2+ cells by her2-specific affibody (zher2-gscys)-conjugated thermosensitive liposomes (her2+ affisomes)s," *Journal of Controlled Release*, 2011.
- [40] A. Itoa, Y. Kugaa, H. Hondaa, H. Kikkawab, A. Horiuchib, Y. Watanabeb, and T. Kobayashi, "Magnetite nanoparticle-loaded anti-her2 immunoliposomes for combination of antibody therapy with hyperthermia," *Cancer Letters*, 2004.