

**Alma Mater Studiorum – Università di Bologna**

---

**FACOLTÀ DI CHIMICA INDUSTRIALE**  
**Corso di Laurea Magistrale in:**  
**CHIMICA INDUSTRIALE**  
**Classe LM-71 Scienze e Tecnologie della Chimica Industriale**

***SINTESI E CARATTERIZZAZIONE DI SISTEMI***  
***NANOSTRUTTURATI***  
***PER IL TRATTAMENTO DEL GLIOBLASTOMA***  
***MULTIFORME***

**TESI DI LAUREA SPERIMENTALE**

**Presentata da:**  
*VALERIO MOLINARI*

**Relatore:**  
PROF. MAURO COMES  
FRANCHINI

**Correlatori:**  
DOTT.SSA ERICA  
LOCATELLI

**Sessione II**

---

**Anno Accademico 2011-2012**

## **Sommario:**

La nanomedicina si occupa della fabbricazione di nanosistemi adatti per applicazioni biomedicali. È possibile incapsulare all'interno di un *carrier* diversi tipi di farmaci, aumentandone la concentrazione presso il tessuto malato grazie ad un approccio di *drug delivery*. Materiali polimerici come il PLGA-*b*-PEG si sono rivelati particolarmente efficaci per l'assemblamento di nanoparticelle polimeriche, le quali fungono da *carrier* per i farmaci. Sulle superfici dei *carrier* è inoltre possibile coniugare dei vettori che sono in grado di interagire selettivamente con le cellule malate. In questo lavoro di tesi sono stati incapsulati all'interno di nanoparticelle polimeriche di PLGA-*b*-PEG diversi principi attivi, quali nanoparticelle d'argento e farmaci commerciali come Temsirolimus ed Alisertib. Sulla superficie di questi nanosistemi si è inoltre coniugata la Clorotossina, peptide specifico per tumori cerebrali. Si è quindi studiata la citotossicità di questi nanosistemi su cellule di Glioblastoma umano riprodotte *in vitro*.

## **Abstract:**

Nanomedicine is a science based on the preparation of nanosystems for biomedical application. The drugs can be entrapped inside the nanocarriers to improve the drug concentration in the diseased issue through a drug delivery approach; polymeric materials as PLGA-*b*-PEG has been revealed good properties for this purpose. To improve the nanosystem efficiency it is possible to bind a targeting agent on the carrier surface. In this thesis work silver nanoparticles or drugs as Temsirolimus and Alisertib have been entrapped in PLGA-*b*-PEG carriers. Chlorotoxin has been linked on the carrier surface as a specific targeting agent for brain tumors. Cytotoxicity *in vitro* of the nanosystems on Glioblastoma cells has been studied.

## **INDICE**

**pag. 1:** Introduzione

**pag. 16:** Obiettivi della ricerca

**pag. 17:** Discussione dei risultati

**pag. 35:** Conclusioni e prospettive future

**pag. 36:** Parte sperimentale



# 1: INTRODUZIONE

## 1.1 Nanotecnologia e nanomedicina

Cosa si intende attualmente per nanotecnologia? Il termine è stato usato per la prima volta nel libro *'Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology'* (1986) dal professor Norio Taniguchi dell'università di Tokyo per descrivere la preparazione di particelle di silicio di dimensioni inferiori ad un micron (1 micron =  $10^{-6}$  m). Attualmente si preferisce definire la nanotecnologia come una scienza polidisciplinare atta alla fabbricazione di oggetti di dimensioni comprese tra uno e qualche centinaio di nanometri (1 nanometro =  $10^{-9}$  m). È interessante notare che un nanometro è circa la lunghezza di sei atomi di carbonio (o di dieci atomi di idrogeno) allineati; sono oggetti impossibili da vedere a occhio nudo, ma è necessario ricordare che sono molto grandi se confrontati con singole molecole. Questo aspetto si rivelerà fondamentale, come vedremo nei prossimi capitoli, per le applicazioni di oggetti nanometrici in nanomedicina. Queste dimensioni permettono alla nanoparticella di acquisire proprietà diverse rispetto allo stesso materiale in forma aggregata (dimensioni maggiori di 1 micron); in particolare il materiale può cambiare alcune proprietà quali: assorbimento, potenziale ossido-riduttivo, magnetismo, attività catalitica, temperatura di fusione etc. La possibilità di variare le caratteristiche di un materiale modificandone forma e dimensioni conferisce grande versatilità e flessibilità alla nanotecnologia, la quale si estende in svariati campi applicativi come elettronica, catalisi, sviluppo di nuovi materiali ed infine all'applicazione in medicina.<sup>1</sup> La nanomedicina è una disciplina relativamente nuova che recentemente ha avuto un così grande successo da portare Stati Uniti e Comunità Europea a investire miliardi di dollari per ricerche riguardanti lo sviluppo e l'applicazione di nanoparticelle.<sup>2</sup> Questi forti investimenti sono dovuti agli innovativi meccanismi con cui le nanoparticelle agiscono all'interno dell'organismo, alla possibilità di ottenerle con elevata biocompatibilità ed ai molteplici usi con cui possono essere utilizzate per il trattamento di patologie comuni, quali ad esempio i tumori. Le nanoparticelle

---

<sup>1</sup> J.M. Wilkinson; Nanotechnology applications in medicine. *Med. Device Technol*, **2003**, 14 (5), 29-31.

<sup>2</sup> R.A.Freitas Jr; What is nanomedicine?. *Nanotech., Biol., and Med.*, **2005**, 1, 2-9.

possono infatti essere utilizzate sia come strumento di diagnosi<sup>3</sup> che come strumento terapeutico<sup>4</sup> ed è per questo motivo che si associa spesso il termine teranostica alla nanomedicina; la teranostica prevede la fusione di terapia e diagnostica in un unico sistema,<sup>5</sup> semplificando in questo modo il trattamento della malattia e riducendone la tossicità. Il punto di forza della nanomedicina consiste proprio nel diminuire gli effetti collaterali del trattamento,<sup>6</sup> i quali possono essere particolarmente dannosi, specialmente per terapie legate alla cura di malattie come i tumori. I classici trattamenti prevedono infatti la somministrazione di farmaci non specifici che attaccano sia le cellule malate sia quelle sane, provocando danni ingenti al paziente. La nanomedicina può limitare questo problema, sia attraverso una riduzione del dosaggio di farmaco grazie alle proprietà teranostiche delle nanoparticelle, sia attraverso un approccio di ‘*drug delivery*’, ovvero ‘trasporto del farmaco’, che permette il rilascio controllato del farmaco nella zona malata dell’organismo.

## 1.2 *Drug delivery*

*Il drug delivery*, traducibile come trasporto del farmaco, è una tecnica che consiste nell’aumentare la concentrazione di farmaco presso la zona malata dell’organismo grazie ad un rilascio controllato e selettivo del principio attivo. Questo concetto è forse il più importante della nanomedicina e vi sono già diversi prodotti approvati per uso clinico<sup>7</sup> che sfruttano questo principio: i vantaggi del *drug delivery* si traducono infatti in un incremento del tempo di vita del farmaco all’interno della circolazione sanguigna e nell’aumento dell’efficacia terapeutica dello stesso, fattori che possono condurre ad una significativa riduzione dei dosaggi di farmaco.<sup>8</sup>

---

<sup>3</sup> K.K. Jain; Nanodiagnostics: application of nanotechnology in molecular diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn*, **2003**, 3, 153-161.

<sup>4</sup> J.M. Wiklkinson; Nanotechnology applications in medicine. *Med. Device Technol*, **2003**, 14 (5), 29-31.

<sup>5</sup> B.Sumer, J.Gao; Theranostic nanomedicine for cancer. *Nanomedicine*, **2008**, 3(2), 137-140.

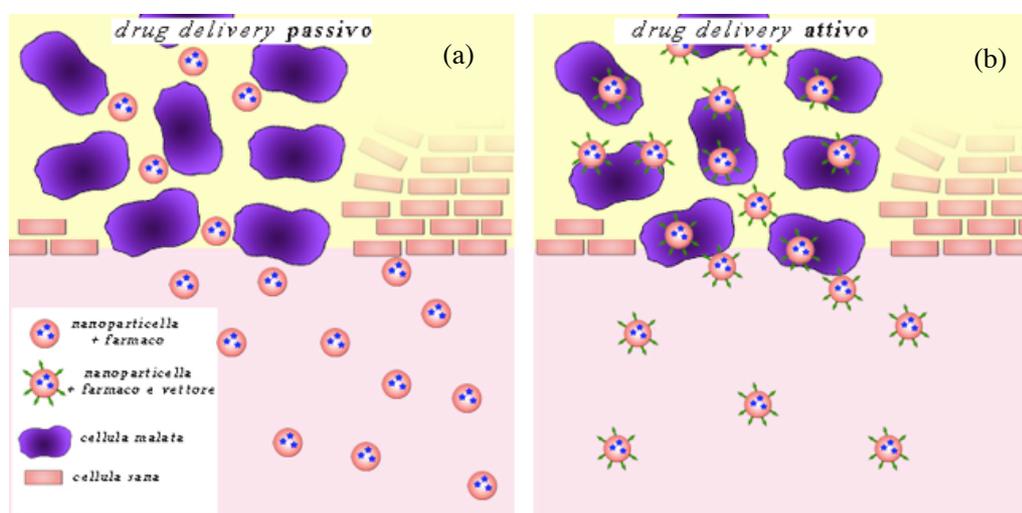
<sup>6</sup> M.C. Roco, W. Bainbridge; Social Implications of Nanoscience and Technology. *National Science Foundation Report*, **2001**.

<sup>7</sup> V. Wagner, A. Dullaart, A.-K. Bock, A. Zweck; The emerging Nanomedicine Landscape. *Nat. Biotechnol*, **2006**, 24, 1211-1217.

<sup>8</sup> S.K. Sahoo, V. Labhasetwar; Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug Discovery Today*, **2003**, 8, 1112-1120.

### 1.2.1 *Drug delivery* passivo e attivo

Il *drug delivery* passivo sfrutta la naturale diversità tra cellule sane e cellule cancerose: un tessuto tumorale infatti, a causa dell'elevata proliferazione cellulare, presenta un'eccessiva vascolarizzazione e grosse anomalie che portano ad una disposizione cellulare discontinua e disomogenea. La nanoparticella, composta dal farmaco e dal cosiddetto *carrier* riesce così ad entrare per diffusione passiva negli spazi vuoti tra le cellule tumorali, rilasciando il farmaco soprattutto nella zona di crescita del tumore (**figura 1.1 (a)**)<sup>9</sup>.



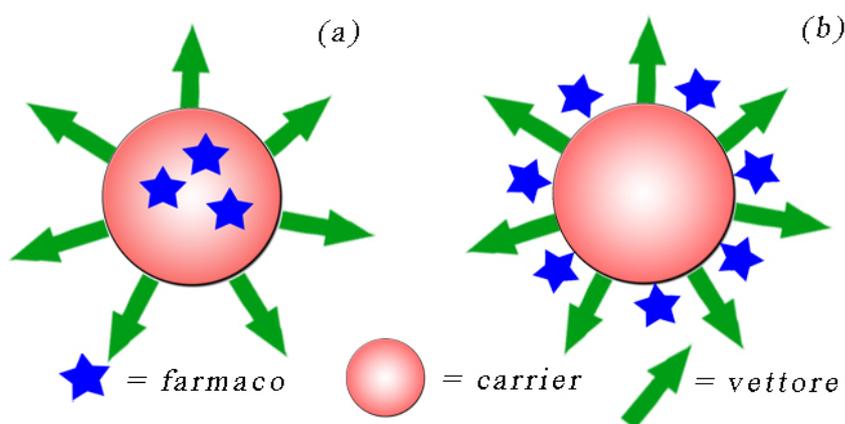
**figura 1.1:** differenza tra *drug delivery* attivo (a) e passivo (b)

Un sistema di *drug delivery* attivo è composto anch'esso da *carrier* e farmaco, ma sulla superficie della nanoparticella è coniugato un 'vettore', ovvero un agente in grado di riconoscere e interagire con un sito attivo della cellula bersaglio. In questo modo si ottiene un trasporto preferenziale verso il tessuto malato, come per il *drug delivery* passivo, ma molto più efficace grazie alla permanenza prolungata del nanosistema presso la cellula malata (**figura 1.1(b)**). Ne risulta che quasi tutto il farmaco viene rilasciato nel sito bersaglio, aumentando la citotossicità del nanosistema per quel determinato obiettivo e migliorando la terapia.

<sup>9</sup> S.M. Moghimi, A. C. Hunter, J.C. Murray; Nanomedicine:current status and future prospects. *The FASEB Journal*, **2005**, 19 (3), 311-330.

### 1.3 Sistemi nanostrutturati

Un sistema nanostrutturato per *drug delivery* è composto generalmente da un farmaco che può essere incorporato (**figura 1.2(a)**) in una nanoparticella trasportatrice (*carrier*) o assorbito sulla sua superficie<sup>10</sup> (**figura 1.2(b)**), e nel caso di sistemi per *drug delivery* attivo il *carrier* presenta sulla superficie un vettore (**figura 1.2**). Il farmaco può essere una molecola organica con proprietà antitumorali o una nanoparticella inorganica in grado di essere usata come agente diagnostico o terapeutico.



**figura 1.2:** farmaco incapsulato dentro una nanoparticella (a) o assorbito sulla sua superficie (b)

#### 1.3.1 Nanoparticella trasportatrice o *carrier*

La nanoparticella trasportatrice deve possedere determinate caratteristiche: deve essere stabile in ambiente fisiologico, non deve essere tossica per l'organismo, deve risultare 'invisibile' ovvero non deve essere riconosciuta dal sistema immunitario e quindi opsonizzata (eliminata dalla circolazione sanguigna) e deve riuscire a oltrepassare le barriere biologiche presenti tra i capillari e l'obiettivo.<sup>11,12</sup> Per soddisfare queste caratteristiche si sono studiati diversi materiali, ma le più efficienti

<sup>10</sup> I. Brigger, C. Dubernet, P. Couvreur; Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, 54, 631-651.

<sup>11</sup> M.P. Desai; The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent. *Pharm. Res.*, **1997**, 14, 1568-1573.

<sup>12</sup> J. Panyam; Fluorescence and electron microscopy probes for cellular and tissue uptake of poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, **2003**, 262, 1-11.

attualmente si rivelano essere le nanoparticelle polimeriche.<sup>13,14,15</sup> Tramite l'utilizzo di polimeri è possibile ottenere nanoparticelle biodegradabili e biocompatibili, stabili in ambiente acquoso e non rilevabili come intruse dagli agenti del sistema immunitario. In questo modo, inoltre, il farmaco all'interno del *carrier* può essere protetto dalla sua eventuale opsonizzazione. Per poter intrappolare farmaci poco solubili in acqua, dunque non somministrabili per vie convenzionali, è necessario che il nanosistema formi al suo interno una tasca idrofoba che possa ospitare il farmaco stesso durante il trasporto nella circolazione sanguigna. Molti studi in letteratura concordano sul fatto che per rendere il sistema invisibile ai macrofagi è necessario che esso abbia dimensioni di circa 70-140 nm ed una superficie idrofila,<sup>16</sup> che la renda inoltre disperdibile e stabile in ambiente fisiologico. In questo modo si ottiene un aumento della vita del nanosistema all'interno del circolo sanguigno che promuove un incremento della selettività: infatti se il sistema venisse degradato prima di raggiungere il sito di interesse buona parte del farmaco verrebbe rilasciato in zone diverse dal tessuto malato, riducendo anche l'efficacia terapeutica.

Polimeri particolarmente interessanti sono il copolimero dell'acido lattico e glicolico (PLGA) ed il polietilenglicole (PEG) (**figura 1.3**). Il PLGA è un poliestere biodegradabile e la sua eliminazione da parte dell'organismo avviene tramite l'idrolisi del legame estereo presente tra i monomeri; tale processo rilascia acido lattico e glicolico, molecole facilmente metabolizzabili dall'organismo.<sup>17</sup> Un'altra grande capacità del PLGA è quella di autoassemblarsi in nanosfere, rendendo questo materiale particolarmente adatto per applicazioni in nanomedicina.<sup>18</sup>

---

<sup>13</sup> I., Brigger; Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2002**, 54, 631-651.

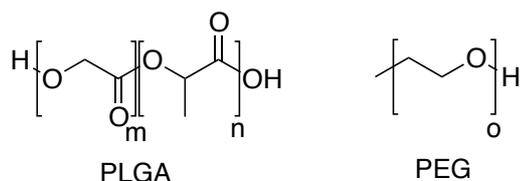
<sup>14</sup> J. Panyam; Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2003**, 55, 329-347.

<sup>15</sup> A. Lamprecht; Biodegradable nanoparticles for targeted drug delivery in treatment of inflammatory bowel disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2001**, 299, 775-781.

<sup>16</sup> G. Storm, S.O. Belliot, T. Daemen, D.D. Lasic; Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **1995**, 17, 31-48.

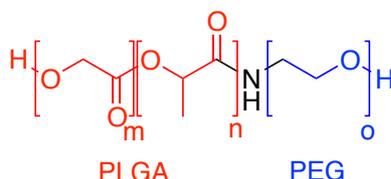
<sup>17</sup> M.S., Muthu; Nanoparticles based on PLGA and its co-polymer: An overview. *Asian J Pharm*, **2009**, 3, 266-277.

<sup>18</sup> J.M., Lu, X. Wang, C. Marin-Muller, H. Wang, P.H. Lin, Q. Yao, C. Chen; Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, **2009**, 9, 325-341.



**figura 1.3:** esempi di polimeri per nanomedicina, PLGA e PEG

Il PEG, grazie alla sua idrofilicità, può essere usato per stabilizzare le nanoparticelle, aumentando la loro dispersione in ambiente acquoso e prevenendone l'aggregazione. Un'importante caratteristica di questo polimero idrosolubile è di rendere la nanoparticella invisibile al sistema immunitario, aumentando così il tempo di circolazione del nanosistema all'interno dell'organismo.<sup>19</sup>



**Figura 1.4:** copolimero anfifilico PLGA-*b*-PEG

È possibile unire i due polimeri, ottenendo un copolimero a blocchi PLGA-*b*-PEG (**figura 1.4**) che si sta rivelando molto efficace per applicazioni in *drug delivery*.<sup>20</sup> Questo materiale mantiene la biodegradabilità e biocompatibilità del PLGA, ma non viene opsonizzato dall'organismo grazie al PEG presente in superficie. Il risultato è un polimero diviso in due blocchi distinti: uno lipofilo formato da PLGA e uno idrofilo composto da PEG (**figura 1.5**). Questa caratteristica dona al polimero una proprietà anfifilica, che gli conferisce la capacità di autoassemblarsi per formare nanoparticelle che presentano al loro interno una tasca idrofoba, mentre l'esterno rimane idrofilo. È dunque possibile intrappolare all'interno di queste capsule, in fase di formazione, molecole o nanoparticelle idrofobiche. Inoltre è possibile modificare la parte terminale del PEG con gruppi funzionali quali acidi carbossilici, ammine

<sup>19</sup> K. Know, R. Hoogenboom, D. Fischer, U.S. Schubert; Poly(ethylene glycol) in Drug Delivery: Pros and Cons as Well as Potential Alternatives. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, 49, 6288-6308.

<sup>20</sup> M.F. Zambaux, F. Bonneaux, R. Gref, P. Maincent, E. Dellacherie, M.J. Alonso, P. Labrude; Influence of experimental parameters on the characteristic of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method. *J. Control Release*, **1998**, 50, 31-40.

etc., che, rimanendo poi esposti sulla superficie esterna delle nanoparticelle, possono essere sfruttati per coniugarvi proteine o peptidi.<sup>21</sup>

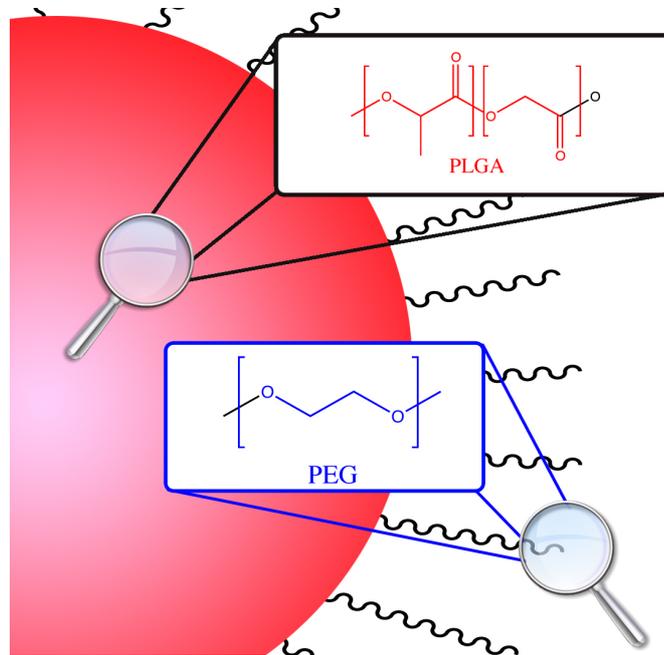


figura 1.5: nanoparticella anfifilica di PLGA-*b*-PEG

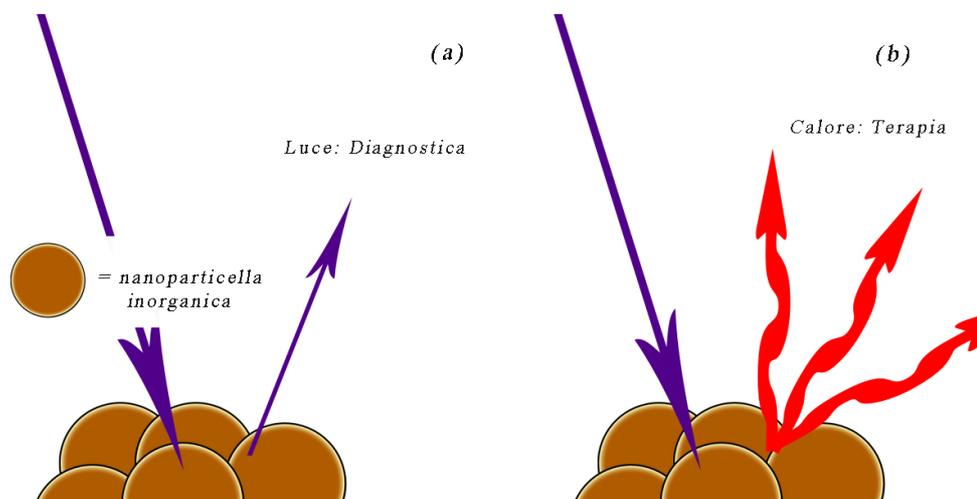
### 1.3.2 Agenti terapeutici incapsulabili nella nanoparticella trasportatrice

Il farmaco che viene intrappolato all'interno del *carrier* può essere una molecola del tutto nuova o una molecola già progettata, testata ed infine approvata per la terapia della malattia in questione, ma anche una molecola scartata. Il vantaggio della nanomedicina e del *drug delivery* è proprio rendere possibile il riutilizzo di questo tipo di molecole.

<sup>21</sup> J. Kreuter; Nanoparticles as Drug Delivery Systems. *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, **2004**, 7, 161-180. 7: 161-180.

### 1.3.3 Nanoparticelle inorganiche come farmaci o agenti di *imaging*

È possibile utilizzare nanoparticelle inorganiche, specialmente oro, argento e ossidi di ferro per applicazioni sia in campo diagnostico, sia terapeutico.<sup>22</sup> Alcuni di questi nanomateriali presentano infatti proprietà ottiche particolari dovute al fenomeno della risonanza plasmonica superficiale; questo fenomeno conferisce un intenso picco di assorbimento di radiazione luminosa, variabile a seconda delle dimensioni e della forma della nanoparticella. Tramite un laser tarato su questi picchi di assorbimento è possibile visualizzare le nanoparticelle grazie alla riemissione di luce (**figura 1.6 (a)**) e dunque usarle come agenti di contrasto per *imaging* diagnostico. Inoltre è possibile fare accumulare energia luminosa alla nanoparticella e farla rilasciare poi sotto forma di calore (**figura 1.6 (b)**) per danneggiare le cellule malate vicine: questo è possibile grazie all'ipertermia sviluppata da queste strutture nanoparticellari se esposte ad un'opportuna radiazione luminosa.



**figura 1.6:** possibilità di utilizzare le nanoparticelle inorganiche come agente diagnostico (a) o terapeutico (b)

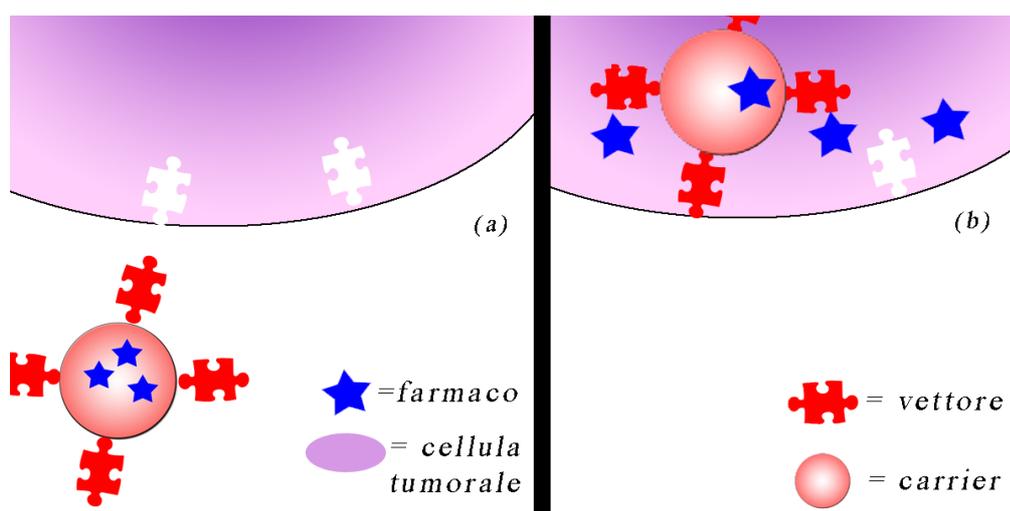
La biocompatibilità delle nanoparticelle inorganiche citate, rispetto ai normali agenti di contrasto utilizzati, le rende promettenti per utilizzi in *imaging*; inoltre il costo

<sup>22</sup> M.Liong, J. Lu, M. Kovichich, T. Xia, S.G. Ruehm, A.E. Nel, F. Tamanoi, J.I. Zink; Multifunctional Inorganic Nanoparticles for Imaging, Targeting, and Drug Delivery. *ACS Nano*, **2008**, 2 (5), pp 889–896.

relativamente basso, se paragonato alle molecole attualmente usate, le rende interessanti anche per utilizzi terapeutici di malattie come i tumori.

### 1.3.4 Agenti per *drug delivery* attivo

Solitamente proteine, anticorpi,<sup>23</sup> frammenti di DNA, RNA etc. si rivelano essere vettori efficienti per il *targeting* di cellule malate. Essi possono essere coniugati sulla superficie esterna della nanoparticella tramite classiche reazioni della chimica organica ed hanno la capacità di riconoscere uno specifico sito attivo presente sulla cellula bersaglio. Dovendo essere molto specifici per il sito ricettivo bersaglio spesso possiedono una struttura terziaria complessa che li rende unici per quel recettore. I vettori sono i veri responsabili del veicolamento e dell'internalizzazione del nanosistema nella cellula obiettivo (**figura 1.7**) e quindi del conseguente aumento della citotossicità del sistema sulla cellula bersaglio. Se è conosciuta la struttura del sito ricettivo è possibile progettare peptidi sintetici da utilizzare come vettori: questa possibilità diventa interessante soprattutto se per un particolare sito bersaglio non è conosciuto nessun vettore naturale, o se questo risulta notevolmente più costoso del rispettivo sintetico.



**figura 1.7:** internalizzazione del farmaco nella cellula tumorale grazie all'azione del vettore

<sup>23</sup> V.P. Torchlin; Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. *J. Control. Release*, **2001**, 73, 137-172.

## 1.4 Confronto tra nanomedicina e cure convenzionali per trattamento di glioblastoma

### 1.4.1 Glioblastoma

Il glioblastoma multiforme è uno dei più comuni e aggressivi tumori primari cerebrali nell'uomo (tumori del sistema nervoso centrale) e manifesta una grossa resistenza alle tecniche di cura convenzionali come radio- e chemioterapia.<sup>24</sup> Questo tipo di tumore è comunemente letale entro due anni dalla manifestazione, anche con trattamenti specializzati;<sup>25</sup> la terapia standard consiste nella rimozione chirurgica seguita da radio- e chemioterapia, ma come risultato porta in genere solo ad un piccolo prolungamento della vita del paziente.

### 1.4.2 Trattamenti convenzionali

Il trattamento chirurgico deve rimuovere la maggior parte della massa tumorale, preservando il sistema nervoso da possibili danni derivanti dall'intervento. Questo tipo di approccio non risolve la malattia che, anche in caso di intervento riuscito, si ripresenta nella quasi totalità dei casi: dopo un primo intervento chirurgico è dunque spesso necessario compierne un secondo, oppure continuare la cura con trattamenti radio- e chemioterapici.

Il trattamento tramite radioterapia è spesso usato per la cura di glioblastoma, specialmente dopo l'intervento chirurgico. Lo scopo è di danneggiare le cellule tumorali rimaste nel sistema nervoso prima che riescano a riprendere la

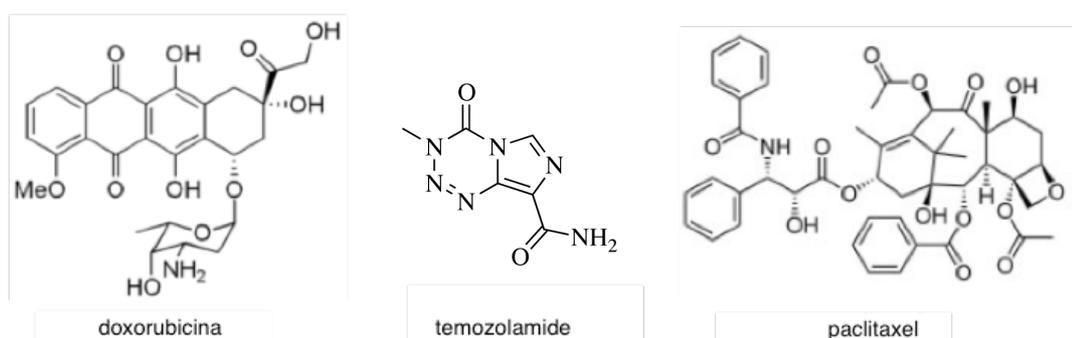
---

<sup>24</sup> F.B. Furnari, T. Fenton, R. M. Bachoo, A. Mukasa, J.M. Stommel, A. Stegh, W.C. Hahn, K.L. Ligon, D.N. Louis, C. Brennan, L. Chin, R.A. Depinho, W.K. Cavenee; Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev.*, **2007**, 21, 2683-2710.

<sup>25</sup> B.A. Kohler, E. Ward, B.K. McCarthy, M.J. Schymura, L.A.G. Ries, C. Ehemann, A. Jemal, R.N. Anderson, U.A. Ajani, B.K. Edwards; Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975–2007, Featuring Tumors of the Brain and Other Nervous System. *J. Natl. Cancer. Inst.*, **2011**, 103, 1-23.

proliferazione. Questa tecnica riesce ad attaccare principalmente le cellule malate focalizzando i raggi ionizzanti nella zona di interesse, lasciando esposte le cellule sane solo a pochi raggi. Anche questo tipo di trattamento non porta a una cura definitiva, ma aiuta a prolungare la sopravvivenza del paziente e a migliorare la sua qualità di vita.<sup>26</sup>

L'approccio chemioterapico è molto comune nel trattamento di tumori ma a causa della scarsa selettività dei farmaci impiegati non discrimina le cellule sane dalle malate, arrecando così gravi danni all'organismo. Esistono svariate molecole testate e approvate in grado di attaccare le vie metaboliche del processo di crescita delle cellule tumorali o direttamente il loro DNA, facendo della chemioterapia l'arma più importante per sconfiggere i tumori. Le cellule tumorali riescono però a sviluppare meccanismi di resistenza verso alcuni farmaci, rendendo necessari incrementi di dosaggi o somministrazione di molecole diverse.

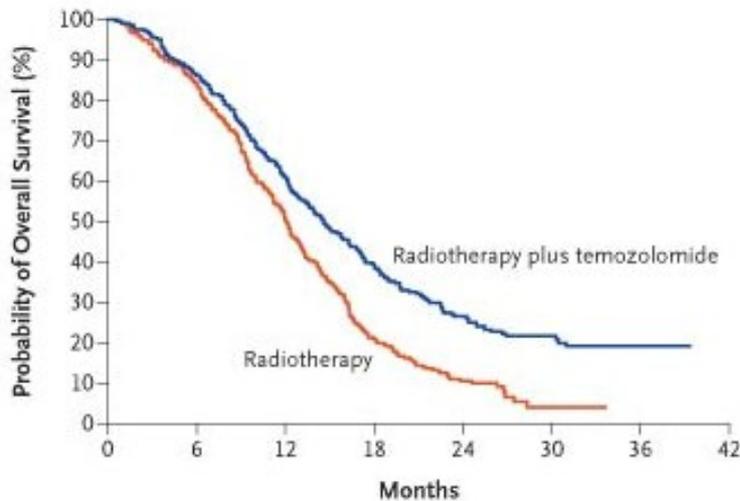


**figura 1.8:** alcuni esempi di farmaci antitumorali

Nel caso del glioblastoma la chemioterapia ha lo scopo di danneggiare le cellule rimaste nel sistema nervoso dopo l'intervento chirurgico. Purtroppo l'unico beneficio di questa cura è il prolungamento della vita del paziente, in quanto non esiste ancora una cura definitiva. Tra i farmaci usati su pazienti affetti da glioblastoma vi sono doxorubicina, paclitaxel e temozolamide (**figura 1.8**); questo ultimo in particolare si

<sup>26</sup> H.A. Fine; The basis for current treatment recommendations for malignant gliomas. *J Neurooncol*, 1994, 20, 111–120.

è rivelato efficiente se utilizzato in combinazione con la radioterapia, aumentando le aspettative di vita del paziente (**figura 1.9**).<sup>27</sup>



**figura 1.9:** effetto sinergico di radio- e chemioterapia

La ridotta efficacia della chemioterapia per il glioblastoma può essere determinata dalla scarsa capacità del farmaco di diffondere verso la zona tumorale. La presenza di una barriera naturale tra la rete sanguigna e il sistema nervoso centrale (*blood brain barrier* o barriera emato-encefalica) rende difficile una diffusione efficace del farmaco verso la zona malata. Da studi effettuati *in vitro*, ad esempio, si è dimostrato che la doxorubicina risulta effettivamente efficace contro cellule di glioblastoma,<sup>28</sup> ma a causa della sua bassa lipoficità e del suo alto peso molecolare non riesce ad oltrepassare la barriera emato-encefalica in maniera efficace, giungendo nella zona del glioblastoma con una concentrazione troppo bassa.<sup>29</sup> Purtroppo le tecniche tradizionali per incrementare l'accumulo di farmaco nella zona tumorale, come la distruzione della barriera emato-encefalica o iniezione intraventricolare, sono molto invasive e non sono quindi applicabili per trattamenti a lungo termine.<sup>30</sup> L'intervento

<sup>27</sup> R. Stupp, W.P. Mason, M.J. van den Bent, M. Weller, B. Fisher, M.J.B. Taphoorn, K. Belanger, A.A. Brandes, C. Marosi, U. Bogdahn, J. Curschmann, R.C. Janzer, S.K. Ludwin, T. Gorlia, A. Allgeier, D. Lacombe, J.G. Cairncross, E. Eisenhauer, R. O. Mirimanoff; Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N. Eng. J. Med.*, **2005**, 352, 987-996.

<sup>28</sup> A.C. Stan, S. Casares, D. Radu, G.F. Walter, T.D. Brumeanu; Doxorubicin-induced cell death in highly invasive human gliomas. *Anticancer Res.*, **1999**, 19(2A), 941-950.

<sup>29</sup> M.S. Lesniak, U. Upadhyay, R. Goodwin, B. Tyler, H. Brem; Local Delivery of Doxorubicin for the Treatment of Malignant Brain Tumors in Rats. *Anticancer Res.*, **2005**, 25, 3825-3832.

<sup>30</sup> V.G. Roullin, J.R. Deverre, L. Lemaire, F. Hindre, M.C. Venier-Julienne; Anti-cancer drug diffusion within living rat brain tissue: an experimental study using [3H](6)-5fluorouracil-loaded PLGA microspheres. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2002**, 53, 293-299.

della nanomedicina potrebbe ovviare questi problemi caratteristici della chemioterapia convenzionale.

#### 1.4.2 Nanomedicina

Uno degli approcci più promettenti per la cura del glioblastoma è l'iniezione intravenosa di nanoparticelle polimeriche contenenti farmaci; questi sistemi sono capaci di oltrepassare la barriera emato-encefalica e di rilasciare la maggior parte del farmaco presso il tessuto malato.<sup>31,32</sup>

Nanosistemi come doxorubicina incapsulata in nanoparticelle polimeriche sono già stati studiati e testati *in vitro* su cellule di glioblastoma ed *in vivo* su animali. Sebbene il nanosistema si sia dimostrato più efficace rispetto al solo farmaco<sup>33,34</sup> il risultato finale non ha portato ancora ad una distruzione permanente del tumore, ma solo al rallentamento temporaneo della crescita.

Se i promettenti sistemi nanoparticella-farmaco non hanno ancora dato i risultati sperati, esistono altri approcci, che sfruttano la nanotecnologia, che hanno ottenuto migliori risultati. Nanocilindri d'oro ricoperti da polimero sono già stati testati *in vivo* sfruttando l'elevata ipertermia che essi generano e in alcuni casi questa tecnica ha portato alla rimozione completa del tumore;<sup>35</sup> purtroppo non sono ancora presenti dati in letteratura di terapie analogamente efficaci per glioblastoma.

Un approccio interessante, già testato per il glioblastoma, prevede l'utilizzo di nanoparticelle di magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) e di maghemite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ): queste nanoparticelle composte da ossidi di ferro sono altamente biocompatibili e possono anche essere iniettate direttamente nel tessuto tumorale (**figura 1.10(a)**). La distruzione delle

---

<sup>31</sup> J.Kreuter; Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2001**, 47, 65-81.

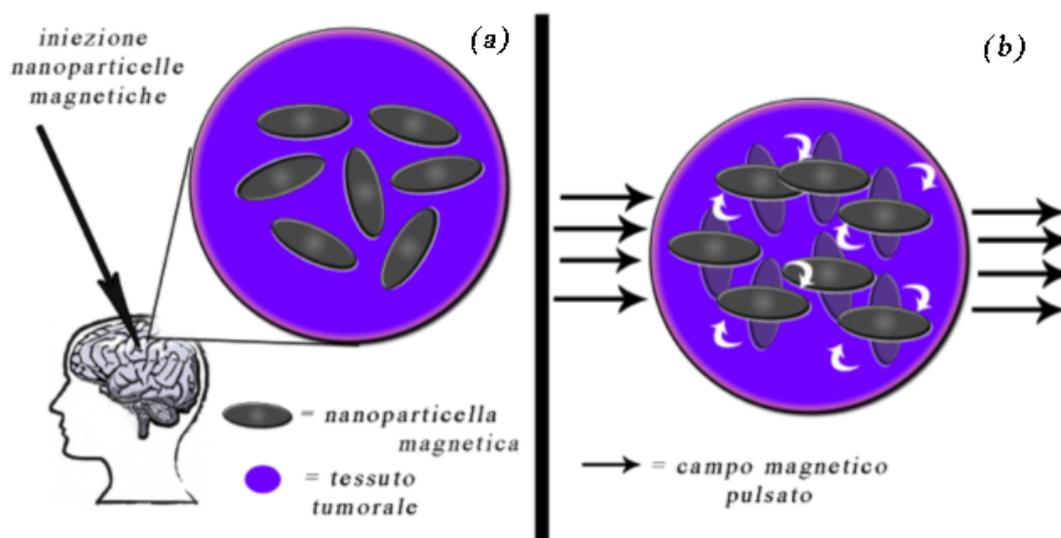
<sup>32</sup> J. Kreuter, S. Gelperina; Use of nanoparticles for cerebral cancer. *Tumori*, **2008**, 94, 271-277.

<sup>33</sup> T.Hekmatara, C. Bernreuther, A.S. Khalansky, T. Hekmatara, R. Muller; Chemotherapy of brain tumour using doxorubicin bound to surfactant-coated poly(butyl chanoacrylate) nanoparticles: revisiting the role of surfactants. *J. Control Release*, **2009**, 28, 153-164.

<sup>34</sup> S. Wohlfart, A.S. Khalansky, S. Gelperina, O. Maksimenjo, C. Bernreuther, M. Glatzel, J. Kreuter. Efficient Chemotherapy of Rat Glioblastoma Using Doxorubicin-Loaded PLGA Nanoparticles with Different stabilizers. *PLoS ONE*, **2011**, 6(5)

<sup>35</sup> W.I. Choi, J.T. Kim, C. Kang, C.C. Byeon, Y.H. Kim, G. Tae; Tumor Regression *In Vivo* by Photothermal Therapy Based on Gold-Nanorod-Loaded, Functional Nanocarriers. *ACS Nano*, **2011**, 5(3), 1995-2003.

cellule malate, come nel caso dell'oro, avviene per ipertermia; il riscaldamento in questo caso è dovuto ad un campo magnetico esterno pulsante che porta le nanoparticelle a vibrare ad altissima velocità, riscaldando il tessuto circostante per frizionamento meccanico (**figura 1.10(b)**).



**figura 1.10:** somministrazione (a) e meccanismo di azione (b) di nanoparticelle magnetiche come agente terapeutico per glioblastoma

Tramite sperimentazione sull'uomo si è ottenuto che 12 pazienti su 59 sono sopravvissuti per oltre 3 anni;<sup>36</sup> tali risultati hanno portato all'accettazione di questa tecnica da parte della Comunità Europea per il trattamento del glioblastoma umano.

Le nanoparticelle metalliche impiegate come farmaci sono una valida alternativa alle molecole organiche; i risultati ottenuti con gli ossidi di ferro sono promettenti, ma è importante scoprire altri materiali inorganici che possono rivelarsi ugualmente efficaci, se non migliori. Le nanoparticelle di argento sono state già largamente studiate per le loro proprietà antibatteriche<sup>37</sup> e come catalizzatori, ma a differenza dell'oro e degli ossidi di ferro non è stata investigata la possibilità di utilizzarle come farmaco antitumorale. Recenti scoperte effettuate dal gruppo di ricerca presso il

<sup>36</sup> K. Maier-Hauff, F- Ulrich, D. Nestler, H. Niehoff, P. Wust, B. Thiesen, H. Orawa, V. Budach, A. Jordan; Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme. *J. Neurocol.*, **2010**, 103(2), 317-324.

<sup>37</sup> Q. Wu, H. Cao, W. Luan, J. Zhang, Z. Wang, J.H. Warner, A.R.A. Watt; Biomolecule-assisted synthesis of water-soluble silver nanoparticles and their biomedical applications. *Inorg. Chem.*, **2008**, 47, 5882-5888

quale è stata svolta questa tesi hanno rivelato che queste nanosfere di argento possono essere internalizzate dentro a cellule tumorali per poi distruggere queste ultime dall'interno: le nanoparticelle d'argento sono state incapsulate in nanoparticelle polimeriche di PLGA-b-PEG e testate *in vitro* su linee cellulari di glioblastoma; i risultati hanno rivelato una notevole citotossicità per le cellule tumorali, facendo di queste nanoparticelle un potenziale farmaco antitumorale.<sup>38</sup> Questo nanosistema ha utilizzato come vettore la Clorotossina, un polipeptide derivato dal veleno di uno scorpione che aveva già manifestato un'elevata selettività per cellule di glioblastoma ed di altri tumori maligni cerebrali.<sup>39</sup> Dai risultati si è concluso che le nanoparticelle polimeriche, le nanoparticelle d'argento e la Clorotossina stessa non presentano citotossicità per le cellule malate. Il nanosistema di *drug delivery* passivo formato da nanoparticelle d'argento incapsulate nel *carrier* non presenta una soddisfacente efficacia, ma aggiungendo al sistema il vettore Clorotossina, trasformando il sistema da *drug delivery* passivo ad attivo, si è rivelata una concreta citotossicità, confermando l'efficacia di questo nanosistema.

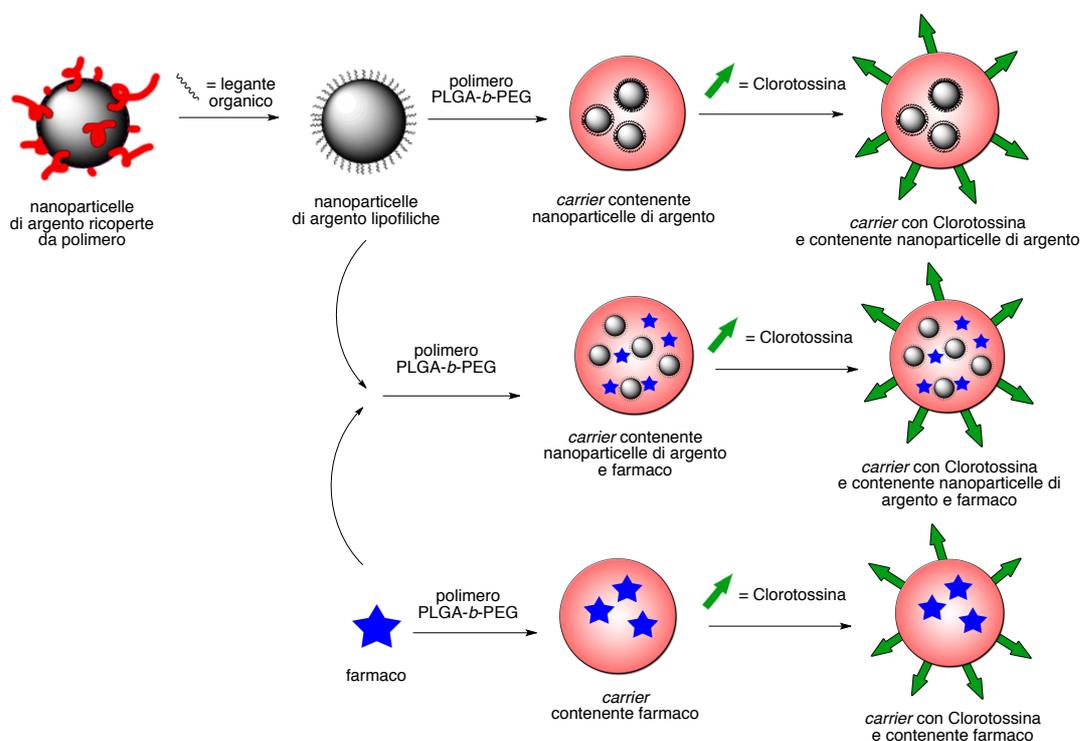
---

<sup>38</sup> E. Locatelli, F. Broggi, J. Ponti, P. Marmorato, F. Franchini, S. Lena, M. Comes Franchini; Lipophilic Silver Nanoparticles and Their Polymeric Entrapment Into Targeted-PEG-Based Micelles for the Treatment of Glioblastoma. *Adv. Healthcare Mater.*, **2012**, 1, 342–347.

<sup>39</sup> S.A. Lyons, J. O'Neal, H. Sontheimer; Chlorotoxin, a Scorpion-Derived Peptide, Specifically Binds to Gliomas and Tumors of Neuroectodermal Origin. *Glia*, **2002**, 39, 162-163.

## 2: OBIETTIVI DELLA RICERCA

Il lavoro di ricerca di questa tesi è volto alla progettazione e preparazione di nanosistemi attivi contro cellule tumorali di glioblastoma. A questo proposito si è studiata inizialmente la sintesi di nanoparticelle d'argento (AgNPs) come possibile farmaco e agente di *imaging* per queste cellule tumorali, ricoprendole con opportuni leganti organici per renderle stabili in ambiente organico o acquoso. Il passaggio successivo per completare il nanosistema è stato quello di preparare nanoparticelle polimeriche di PLGA-b-PEG come *carrier* adatto a contenere le nanoparticelle di argento. Si è scelto poi di coniugare sulla superficie di tale veicolo la Clorotossina, vettore specifico per le cellule tumorali di glioblastoma. Sono stati quindi preparati altri nanosistemi analoghi a quelli appena citati, sostituendo le nanoparticelle di argento con farmaci anti tumorali già testati (Temsirrolimus e Alisertib) e nanosistemi contenenti sia farmaco che nanoparticelle di argento (**schema 2.1**). I campioni preparati sono stati testati *in vitro* su cellule tumorali di glioblastoma riprodotte in laboratorio dal Centro Comune di Ricerca (CCR) di Ispra (VA), permettendo così di confrontare l'attività tra nanoparticelle di argento e farmaci già testati in sistemi di *drug delivery* attivo.

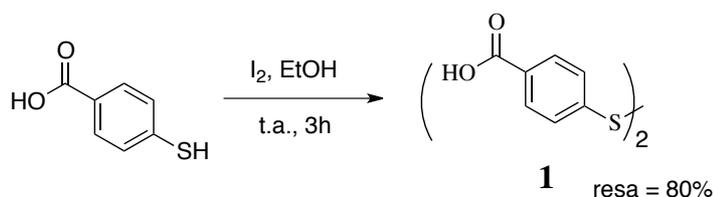


**schema 2.1:** nanosistemi sintetizzati

### 3: DISCUSSIONE DEI RISULTATI

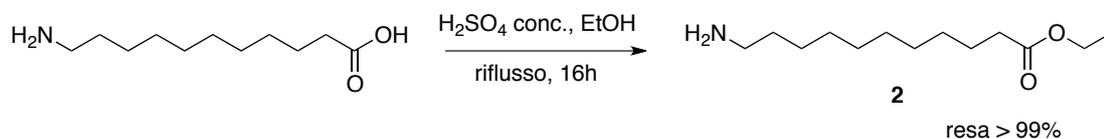
#### 3.1 Sintesi del legante 11-(4-mercaptobenzammide)undecanoato di etile

Come primo obiettivo si è effettuata la sintesi del legante **4** (11-(4-mercaptobenzammide)undecanoato di etile) che è stato usato per rendere lipofile le nanoparticelle di argento (AgNPs). I mercaptani sono particolarmente affini per i metalli nobili come oro e argento, rendendo possibile la coniugazione della molecola organica sulla superficie. Tramite la catena alifatica terminale questo legante è in grado di conferire proprietà lipofila al sistema inorganico AgNPs-4.



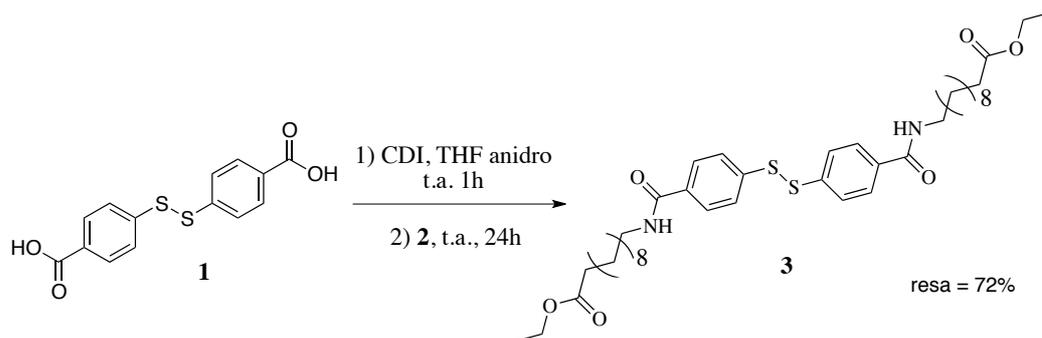
**schema 1:** sintesi acido 4,4'-disulfanidilbenzoico

Per prima cosa si è proceduto a dimerizzare l'acido 4-mercaptobenzoico (reagente commerciale) utilizzando una soluzione satura di iodio ( $I_2$ ) in etanolo (EtOH) (**schema 1**) per proteggere il tiolo convertendolo in disolfuro; ricristallizzando da etanolo si è ottenuto il prodotto **1** con resa pari all'80%.



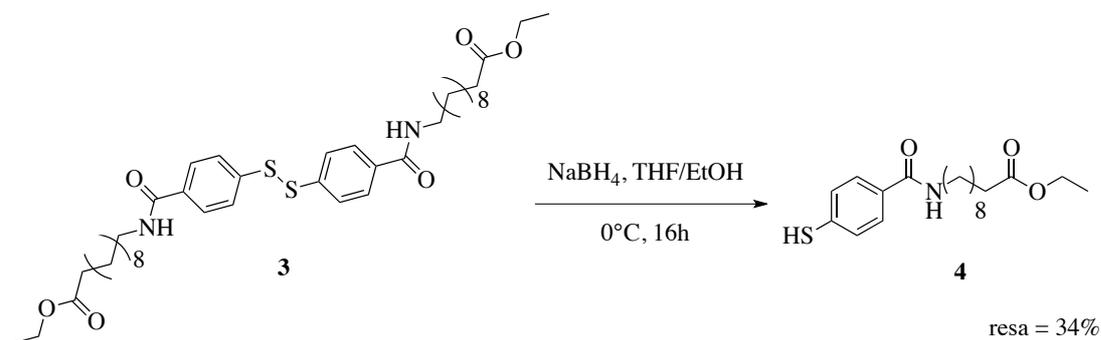
**schema 2:** sintesi 11-amminoundecanoato di etile

Parallelamente si è sintetizzato l'11-amminoundecanoato di etile tramite esterificazione, catalizzata da acido solforico, dell'acido 11-amminoundecanoico (reagente commerciale) con etanolo (**schema 2**). Dopo l'allontanamento del solvente si ottiene il prodotto esterificato **2** con resa quantitativa.



**schema 3:** sintesi bis-etil 12-(4-benzammide)undecanoato disolfossido

Si è quindi eseguito l'aggancio della catena alifatica ai gruppi carbossilici del disolfuro. Per fare questo si aggiunge 1,1'-carbonildiimidazolo (CDI) a una soluzione contenente il prodotto **1** in tetraidrofurano (THF) anidro, attivando così il gruppo carbossilico e favorendo l'addizione nucleofila da parte del gruppo amminico del prodotto **2** (**schema 3**). Ricristallizzando da etanolo si ottiene il prodotto **3** con resa pari al 72%.

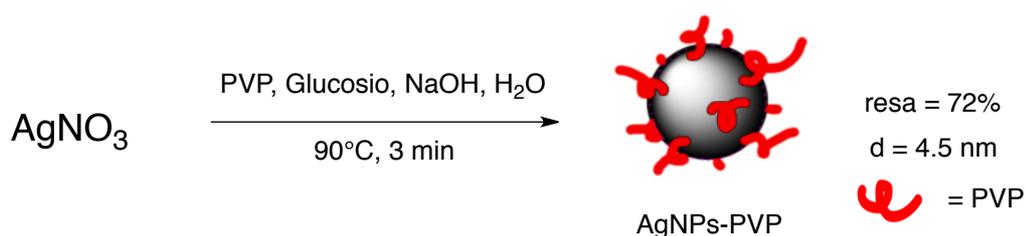


**schema 4:** sintesi 11-4(4-mercaptobenzammide)undecanoato di etile

Terminate le reazioni di modificazione delle catene laterali è ora possibile rompere il legame disolfuro tramite una riduzione con sodio boro idruro (NaBH<sub>4</sub>) per ripristinare il gruppo tiolo (**schema 4**), ottenendo il legante **4** con resa del 34%.

### 3.2 : Sintesi delle nanoparticelle d'argento

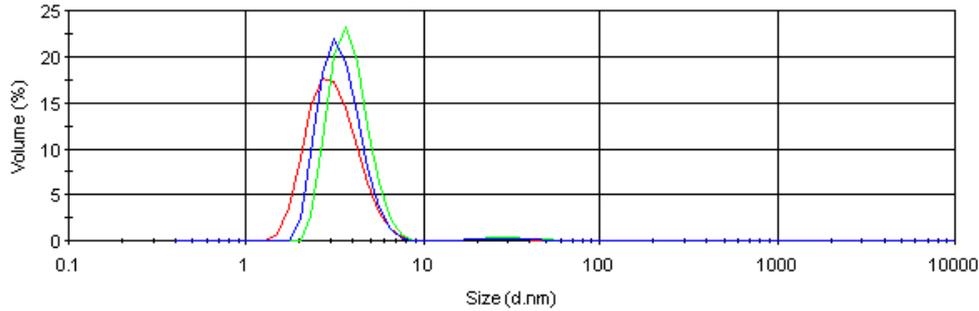
Si è proceduto quindi nel preparare le nanoparticelle d'argento, modificando un metodo di sintesi già conosciuto dal nostro gruppo di ricerca e ideato da alcuni ricercatori della facoltà di Chimica Industriale di Bologna.<sup>40</sup> È stata preparata una soluzione contenente polivinilpirrolidone (PVP) in acqua ultrapura in un pallone sotto flusso di azoto. Questa miscela viene tenuta sotto vigorosa agitazione e riscaldata a 90°C.



**schema 5:** sintesi delle nanoparticelle d'argento ricoperte da polivinilpirrolidone

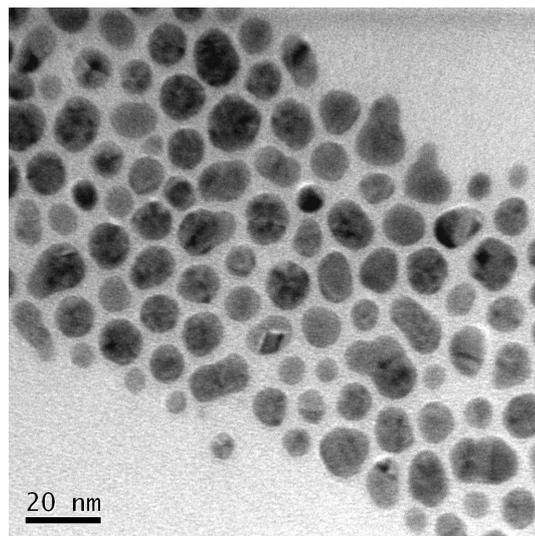
Raggiunta tale temperatura si è aggiunto glucosio come agente riducente e idrossido di sodio (NaOH). A parte è stata preparata una soluzione di argento nitrato ( $\text{AgNO}_3$ ) in acqua ultrapura, che viene iniettata rapidamente all'interno della miscela contenente PVP, glucosio e NaOH (**schema 5**). Si può osservare un rapido cambiamento di colore, dovuto alla riduzione dell'argento allo stato metallico. La reazione è tenuta in agitazione per circa 3 minuti, quindi viene fermata e lasciata raffreddare lentamente a temperatura ambiente. Tali nanoparticelle sono caratterizzate tramite *dynamic light scattering* (DLS) e spettroscopia UV-VIS: Il processo porta alla formazione di nanosfere di argento ricoperte da polivinilpirrolidone (AgNPs-PVP), del diametro di circa 4.5 nm (**figura 3.1**).

<sup>40</sup> M. Blosi, S. Albonetti, M. Dondi, G. Baldi, A. Barzanti, M. Bitossi; Process for preparing stable colloidal suspension of metal nanoparticles using microwave. *PCT Int. Appl.*, **2010**, WO2010100107 A2 20100910



**figura 3.1:** dimensioni delle AgNPs-PVP misurate attraverso DLS

Tramite immagini effettuate al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) è possibile che, nonostante la loro elevata concentrazione, le nanoparticelle non si trovano in forma aggregata, bensì ben disperse sulla superficie del vetrino; da queste immagini si può anche osservare la sfericità delle AgNPs-PVP (**figura 3.2**).



**figura 3.2:** AgNPs-PVP in un'immagine effettuata al TEM

La dispersione nanoparticellare in acqua si presenta nera a causa della grande concentrazione in argento (**figura 3.3(b)**), ma diluendo molto con altra acqua si può notare che il vero colore della dispersione tende al giallo (**figura 3.3(c)**), con un picco di assorbimento a  $\lambda = 394 \text{ nm}$  (**figura 3.3(a)**).

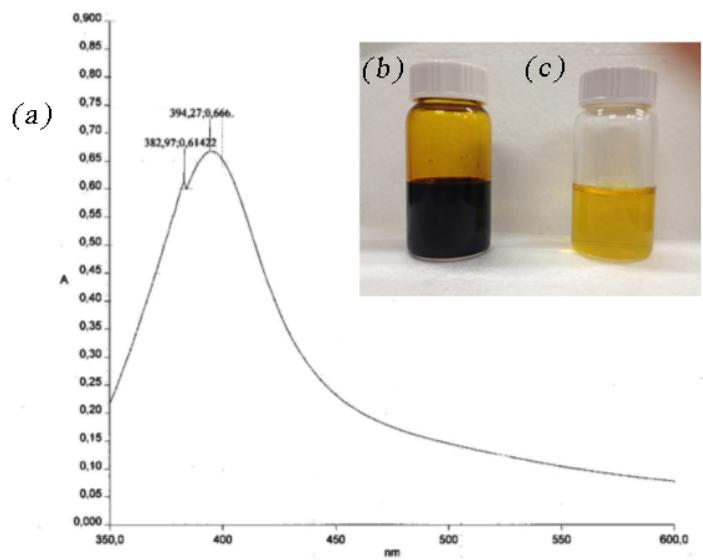


fig 3.3: proprietà ottiche delle AgNPs-PVP

La concentrazione in argento della dispersione nanoparticellare è stata calcolata da misure di spettroscopia di assorbimento atomico: è stata dapprima registrata una retta di calibrazione preparando quattro standard a concentrazione nota nell'intervallo compreso tra 1 e 10 ppm; successivamente è stata registrata l'assorbanza del campione ignoto, precedentemente diluito di un fattore 1/10000. Tale dispersione presenta una assorbanza di 0.27 (figura 3.4), corrispondente ad una concentrazione in argento nel campione reale di 316.6 mM, ovvero ad una resa di questo passaggio pari al 72%.

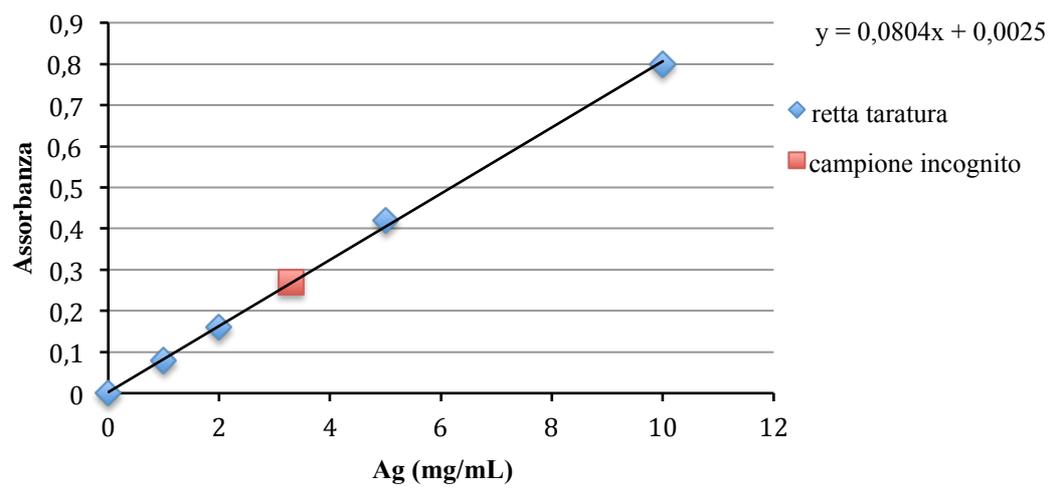
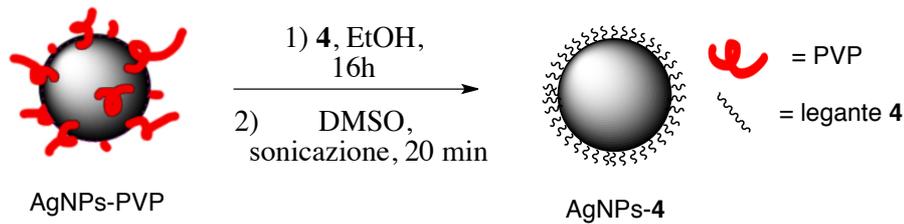


figura 3.4: retta di calibrazione e misura della concentrazione delle AgNPs-PVP tramite spettroscopia ad assorbimento atomico

### 3.3 Ricopertura delle nanoparticelle di argento



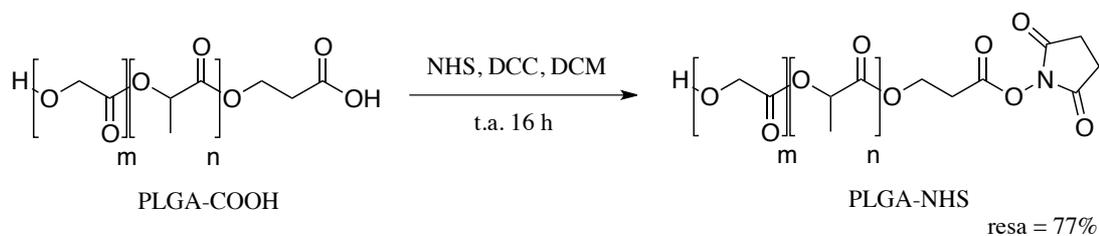
**schema 6:** ricopertura nanoparticelle d'argento con legante 4

Si è quindi effettuata la ricopertura delle nanoparticelle di argento con il legante 4 sintetizzato. Ad una soluzione di etanolo contenente il legante si aggiungono le nanoparticelle di argento in soluzione acquosa (**schema 6**): subito il tiolo si coordina sulla superficie delle AgNPs, spostando il PVP e rendendole disperdibili in fase organica. Tramite centrifugazione è possibile precipitare le nanoparticelle e rimuovere l'etanolo, aggiungendo poi il solvente organico desiderato. Rendere le AgNPs lipofile è importante per riuscire a incapsularle efficacemente dentro le nanoparticelle polimeriche. A causa della loro instabilità queste nanoparticelle ricoperte di legante 4 devono essere utilizzate subito per il passaggio successivo.

### 3.4 Sintesi polimero

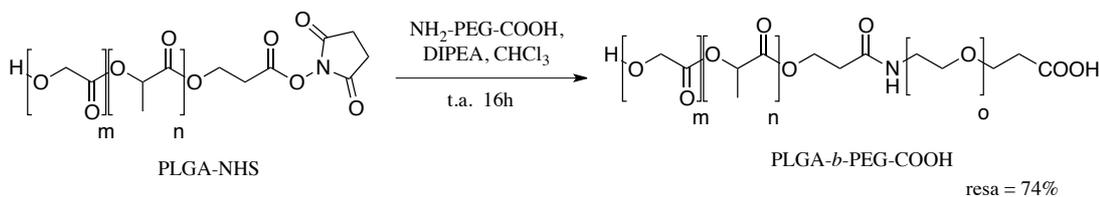
Per il *carrier* si è scelto come polimero il PLGA-*b*-PEG-COOH, già utilizzato in precedenza dal gruppo di ricerca presso il quale è stata svolta la tesi. Il copolimero viene ottenuto in due passaggi di reazione legando tra loro due polimeri commerciali, l'acido poli(lattico co-glicolico) (PLGA-COOH) e l'acido amminopoli(etilenglicolico) (NH<sub>2</sub>-PEG-COOH).

Come prima cosa si è attivata la funzione carbossilica del PLGA-COOH con N-idrossisuccinimide (NHS) e dicicloesilcarbodiimmide (DCC) in diclorometano (DCM), ottenendo il polimero attivato PLGA-NHS con resa del 77% (**schema 7**).



**schema 7:** attivazione PLGA-COOH

Nel secondo passaggio si è effettuata la sostituzione sul gruppo elettrofilo del PLGA-NHS con  $\text{NH}_2\text{-PEG-COOH}$  in presenza di N,N-diisopropiletilammina (DIPEA), ottenendo il copolimero a blocchi PLGA-*b*-PEG-COOH con resa del 74% (**schema 8**).



**schema 8:** sintesi PLGA-*b*-PEG-COOH

### 3.5 Incapsulamento di AgNPs-4 e molecole organiche in nanoparticelle polimeriche (PNPs) e coniugazione del vettore Clorotossina su di esse

Per l'incapsulamento di nanoparticelle e molecole lipofile all'interno di *carrier* polimerici si è sfruttata la tecnica della nanoprecipitazione in continuo. Questa tecnica prevede la miscelazione di due correnti, una acquosa ed una organica, all'interno di un piccolo vial agitato; la risultante corrente miscelata viene raccolta in continuo all'interno di un pallone. Nella fase organica è solubilizzato sia il polimero sia il principio attivo o l'agente da incapsulare; quando il polimero incontra la fase acquosa, che in proporzione volumetrica è dieci volte maggiore rispetto all'organica, si autoassembla in nanoparticelle rivolgendo la parte idrofila all'esterno, e la lipofila all'interno. Durante l'autoassemblaggio del *carrier* viene intrappolato al suo interno ciò che è scarsamente idrofilo, ovvero l'agente disciolto nella fase

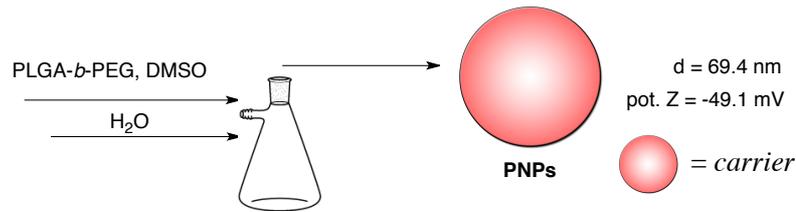
organica (AgNPs-4 o molecole organiche). Per la fase organica si sono testati con successo solventi come dimetilformammide (DMF) e dimetilsolfossido (DMSO), preferendo quest'ultimo perché in grado di solubilizzare meglio le molecole organiche e perché meno tossico.

Il successo dell'incapsulamento si può notare dall'aumento del diametro di questi nanosistemi rispetto alle nanoparticelle polimeriche vuote: queste misure sono state effettuate tramite la tecnica di *dynamic light scattering* (DLS), una tecnica che sfrutta la diffusione dinamica della luce. Sono state inoltre fatte ulteriori analisi (spettroscopia di assorbimento atomico e spettroscopia UV-VIS) a seconda della natura dell'agente intrappolato nel *carrier*.

Per legare la Clorotossina (Cltx) sulla superficie delle nanoparticelle si sfruttano i gruppi carbossilici terminali del blocco PEG esterno al *carrier*. La funzione carbossilica viene attivata dalla coppia N-idrossisulfosuccinimide (sulfo-NHS) e 1-etil-3-(3-dimetilamminopropil)carbodiimmide (EDAC), spesso usati insieme per accoppiamenti di peptidi e proteine ad acidi. Dopo aver preparato una miscela di questi due reagenti in una soluzione acquosa di tampone fosfato salino (PBS), una miscela spesso usata per test biologici, è necessario acidificare tale soluzione a pH 7.4, in quanto l'EDAC porta la soluzione a pH alcalini che potrebbero abbassare la stabilità delle nanoparticelle polimeriche. Una volta aggiustato il pH si aggiungono le nanoparticelle polimeriche e quindi la Clorotossina, che si legherà tramite i suoi gruppi amminici terminali al carbossile attivato del *carrier*.

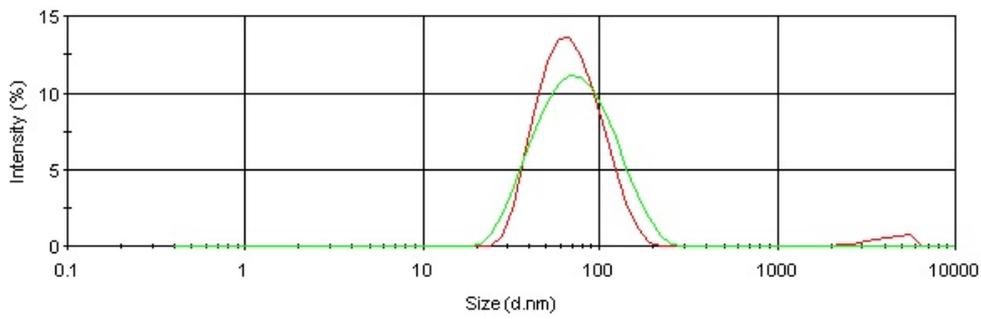
### **3.5.1 : Preparazione delle nanoparticelle polimeriche (PNPs)**

Tramite la tecnica della nanoprecipitazione appena descritta è stato possibile innanzitutto preparare nanoparticelle polimeriche vuote dette PNPs (**schema 9**), utili sia per confrontarne le dimensioni con le nanoparticelle piene sia per essere usate come test di controllo biologici. Tramite misure al DLS si sono osservate dimensioni di 69.4 nm (**figura 3.5**).



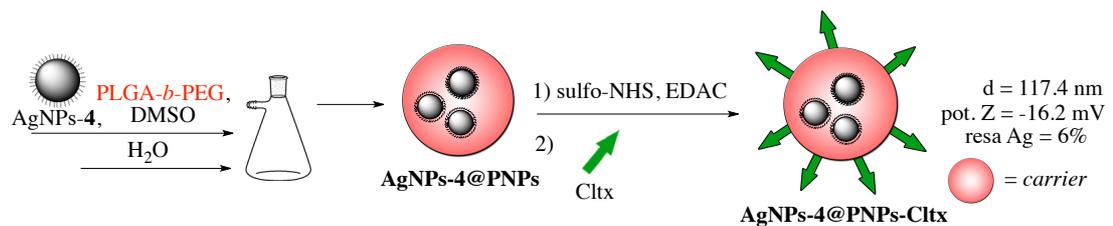
**schema 9:** preparazione nanoparticelle polimeriche vuote

Sempre tramite misure al DLS si è rilevato un potenziale zeta di circa -49.1 mV, il valore molto negativo del potenziale superficiale sta a indicare che i gruppi carbossilici del polimero sono rivolti all'esterno, confermando il successo dell'autoassemblamento.



**figura 3.5:** dimensioni PNPs

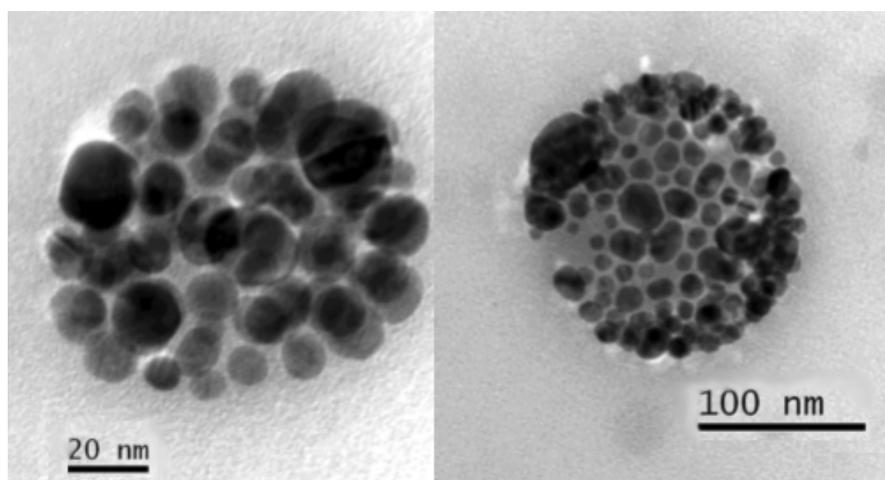
### 3.5.2: preparazione AgNPs-4@PNPs-Cltx



**schema 10:** preparazione AgNPs-4@PNPs-Cltx

Tramite la tecnica di nanoprecipitazione è stato possibile incapsulare le nanoparticelle di argento lipofile (AgNPs-4) all'interno delle nanoparticelle polimeriche di PLGA-*b*-PEG (**schema 10**). La dispersione nanoparticellare risultante analizzata al DLS presenta dimensioni di circa 112.6 nm, la differenza di dimensioni rispetto alle nanoparticelle vuote suggerisce la buona riuscita dell'incapsulamento, confermata da immagini effettuate al microscopio elettronico a trasmissione che

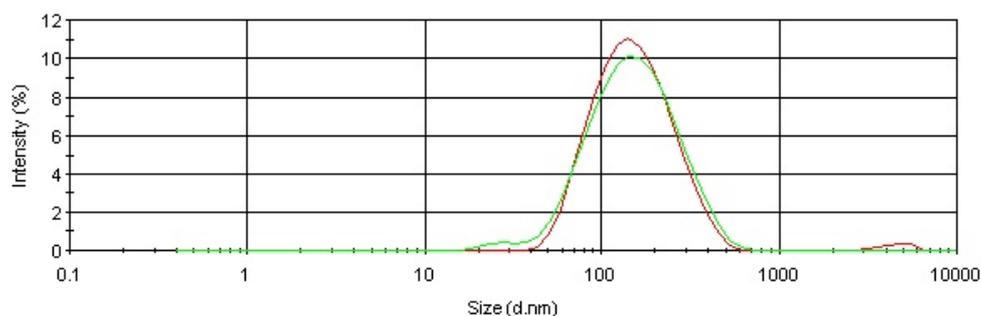
mostra un'elevata concentrazione di nanoparticelle di argento confinata dentro al *carrier* (**figura 3.6**).



**figura 3.6:** AgNPs-4 incapsulate in nanoparticelle polimeriche

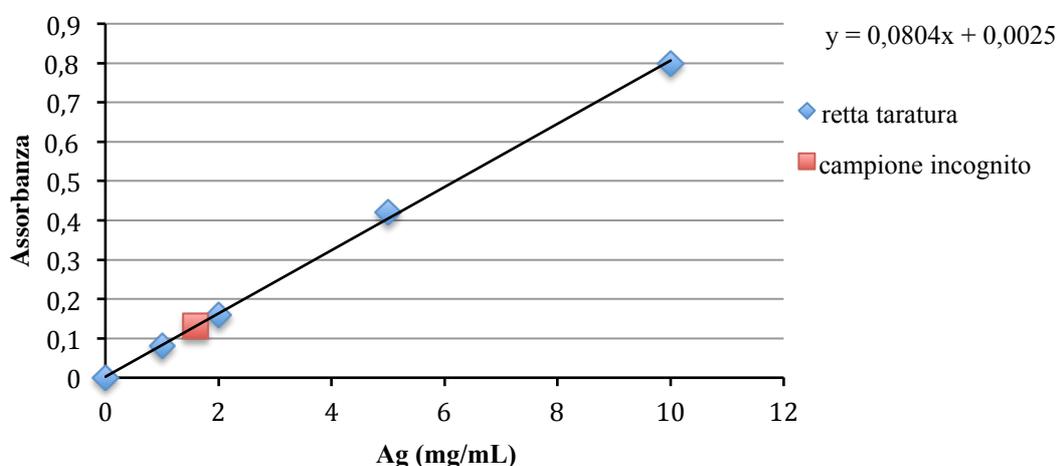
Il potenziale zeta misurato è di circa -35.3 mV, indice di numerose funzioni carbossiliche sulla superficie della nanoparticelle polimerica. Da misure di spettroscopia di assorbimento atomico è stata calcolata la concentrazione di argento dopo l'incapsulamento, che risulta essere di 211.3 mM, corrispondente ad una resa del 67%.

Tramite la metodologia già descritta è stato possibile coniugare alla superficie del *carrier* la Clorotossina, ottenendo così il nanosistema AgNPs-4@PNPs-Cltx (**schema 10**). In questo passaggio il solvente della dispersione è stato cambiato da acqua a una soluzione di tampone fosfato salino (PBS), una miscela di sali usata spesso per test biologici. La dimensione di queste nanoparticelle è di circa 117.4 nm (**figura 3.7**), leggermente maggiore rispetto a quelle senza vettore.



**figura 3.7:** dimensioni AgNps-4@PNPs-Cltx

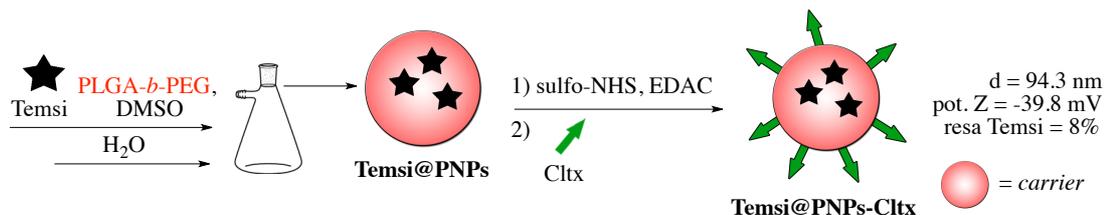
A causa della coniugazione della Clorotossina il numero dei gruppi carbossilici liberi diminuisce, dunque il potenziale zeta della nanoparticelle aumenta a circa -16.2 mV. La concentrazione in argento nella dispersione di AgNPs-4@PNPs-Cltx in PBS, è stata calcolata da misure di spettroscopia di assorbimento atomico: è stata dapprima registrata una retta di calibrazione preparando quattro standard a concentrazione nota nell'intervallo compreso tra 1 e 10 ppm; successivamente è stata registrata l'assorbanza del campione ignoto, precedentemente diluito di un fattore 1/200. Tale dispersione presenta una assorbanza di 0.13 (**figura 3.8**), corrispondente ad una concentrazione in argento nel campione reale di 13.2 mM, ovvero ad una resa di questo passaggio pari al 6 %.



**figura 3.8:** retta di calibrazione e misura della concentrazione di AgNPs-4@PNPs-Cltx tramite spettroscopia ad assorbimento atomico

### 3.5.3: preparazione Tamsi@PNPs-Cltx

Con la stessa tecnica è stato possibile incapsulare molecole organiche come il Tamsirolimus (Tamsi) (**schema 11**), un farmaco commerciale già approvato ed utilizzato nel trattamento di tumori renali.

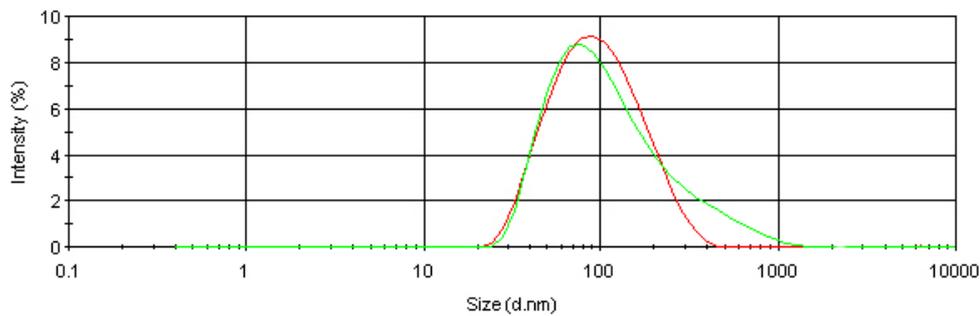


**schema 11:** preparazione Tamsi@PNPs-Cltx

La dimensione del sistema risultante dopo la nanoprecipitazione (Temsì@PNPs) è di circa 92.5 nm, un po' minore del nanosistema ottenuto con l'argento, ma comunque maggiore rispetto alla nanoparticella polimerica vuota. Questo può essere dovuto alla differenza di dimensioni tra AgNPs e molecole organiche come il Temsirolimus.

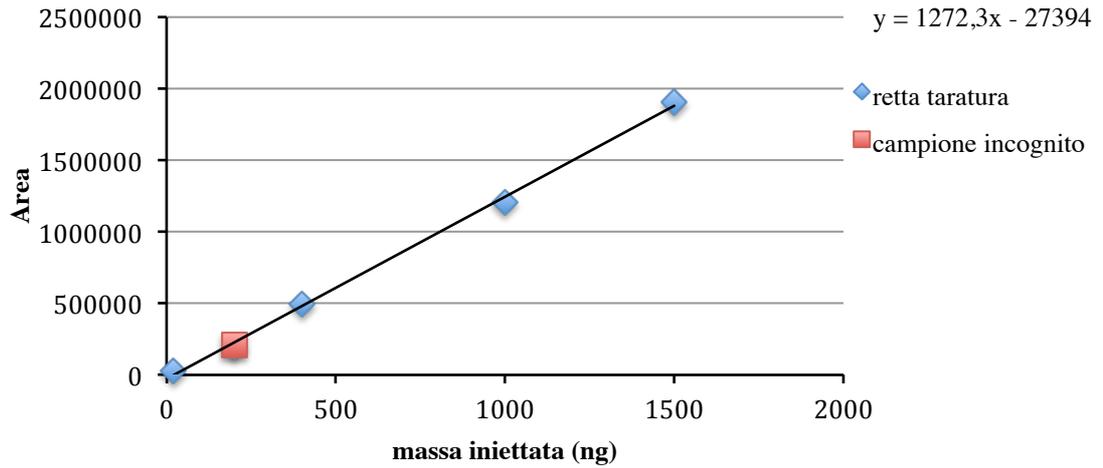
Il potenziale zeta misurato con DLS è di -52.6 mV.

Dopo l'aggancio della Clorotossina il nanosistema presenta un leggero aumento delle dimensioni a 94.3 nm (**figura 3.9**), mentre il potenziale zeta aumenta a -39.8 mV a causa della perdita di gruppi carbossilici liberi.



**figura 3.9:** dimensione Temsi@PNPs-Cltx

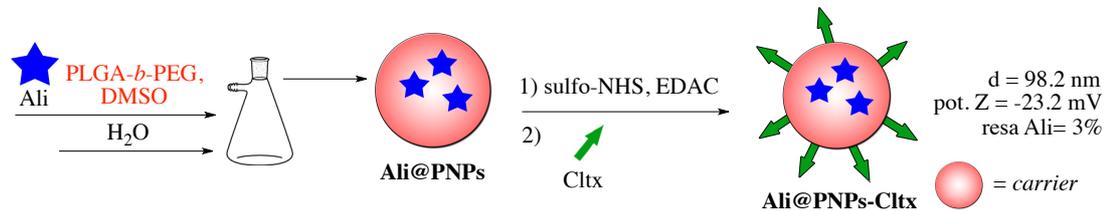
La concentrazione di Temsirolimus è stata determinata tramite spettroscopia UV-VIS dopo separazione in colonna per cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC): grazie ad una retta di calibrazione precedentemente registrata con apposite soluzioni standard a concentrazione nota è stato possibile interpolare la misura del campione incognito (**figura 3.10**) ed ottenere il valore di concentrazione di farmaco nel campione reale, tale valore risulta essere pari a 52.4  $\mu\text{M}$ , corrispondente ad una resa di 8.3%.



**figura 3.10:** retta di calibrazione e misura della concentrazione di Temsi@PNPs-Cltx tramite spettroscopia UV-VIS

### 3.5.3: preparazione Ali@PNPs-Cltx

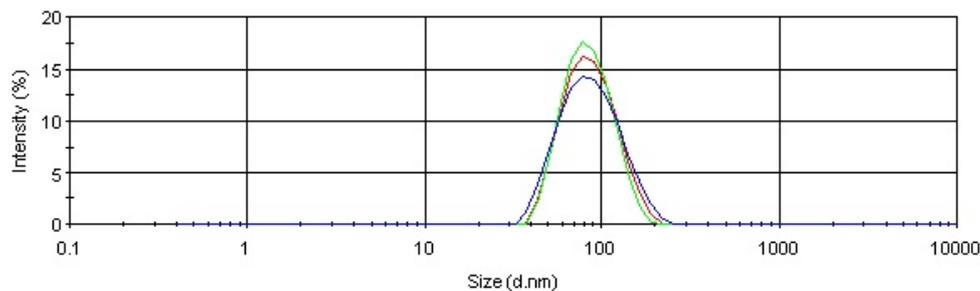
Con la stessa tecnica è stato possibile incapsulare l'Alisertib (Ali) (**schema 12**), un farmaco ancora in fase sperimentale.



**schema 12:** preparazione Ali@PNPs-Cltx

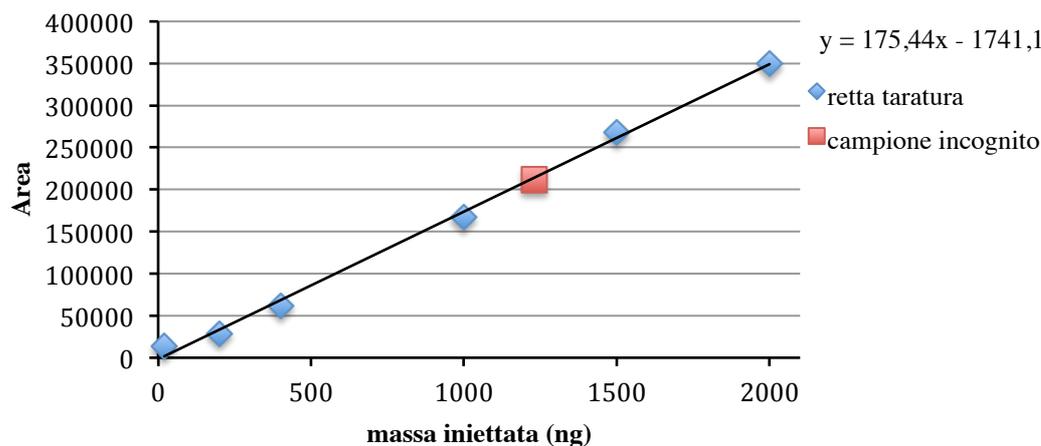
La dimensione del sistema risultante dopo la nanoprecipitazione (Ali@PNPs) è di circa 95.3 nm, dimensioni confrontabili con quelle del nanosistema contenente Temsirolimus, mentre il potenziale zeta è di circa -51.6 mV.

Dopo l'aggancio della Clorotossina il nanosistema presenta un leggero aumento delle dimensioni a 98.2 nm (**figura 3.11**), mentre il potenziale zeta aumenta a -23.2 mV a causa della perdita di gruppi carbossilici liberi.



**figura 3.11:** dimensione Ali@PNPs-Cltx

La concentrazione di Alisertib è stata determinata tramite spettroscopia UV-VIS dopo separazione in colonna per cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC): grazie ad una retta di calibrazione precedentemente registrata con apposite soluzioni standard a concentrazione nota è stato possibile interpolare la misura del campione incognito (**figura 3.12**) ed ottenere il valore di concentrazione di farmaco nel campione reale, tale valore risulta essere pari a 120.8  $\mu\text{M}$ , corrispondente ad una resa di 3%.

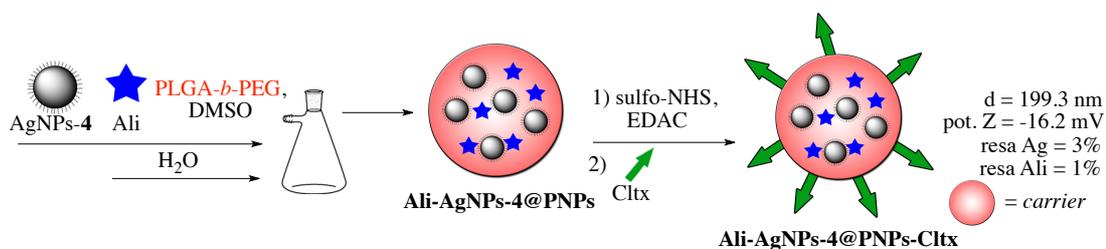


**figura 3.12:** retta di calibrazione e misura della concentrazione di Ali@PNPs-Cltx tramite spettroscopia UV-VIS

### 3.5.4: preparazione Ali-AgNPs-4@PNPs-Cltx

I tre nanosistemi appena descritti sono stati inviati al CCR di Ispra e sono stati esaminati *in vitro* su cellule di glioblastoma, i risultati sono mostrati e discussi più avanti. Il sistema AgNPs-4@PNPs-Cltx era già stato investigato dal gruppo di ricerca<sup>38</sup> e si era già rivelato efficace. Dei nanosistemi contenenti i farmaci

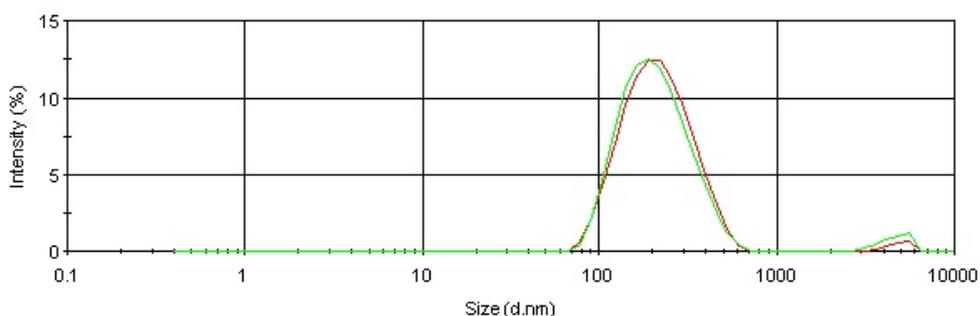
Temsirolimus ed Alisertib solo il secondo ha rivelato considerevoli proprietà citotossiche. Alla luce di questi risultati si è deciso di investigare un possibile effetto sinergico da parte di nanoparticelle d'argento ed Alisertib. Si è preparato quindi un nanosistema contenente sia Alisertib che AgNPs (Ali-AgNPs-4@PNPs-Cltx) utilizzando la stessa tecnica utilizzata precedentemente (**schema 13**).



**schema 13:** preparazione Ali-AgNPs-4@PNPs-Cltx

La dimensione del sistema risultante dopo la nanoprecipitazione (Ali-AgNPs-4@PNPs) è di circa 136.8 nm, dimensioni confrontabili con quelle del nanosistema contenente l'argento. Il potenziale zeta è come per gli altri sistemi, molto negativo, con un valore di -87.8 mV.

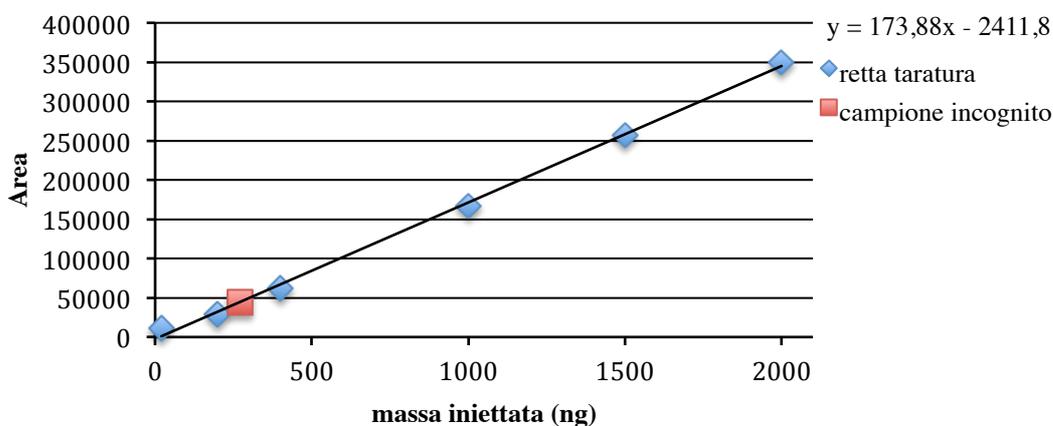
Dopo l'aggancio della Clorotossina il nanosistema presenta un considerevole aumento delle dimensioni a 199.3 nm (**figura 3.7**), mentre il potenziale zeta aumenta a -16.2 mV a causa della perdita di gruppi carbossilici liberi.



**figura 3.13:** dimensione Ali-AgNPs-4@PNPs-Cltx

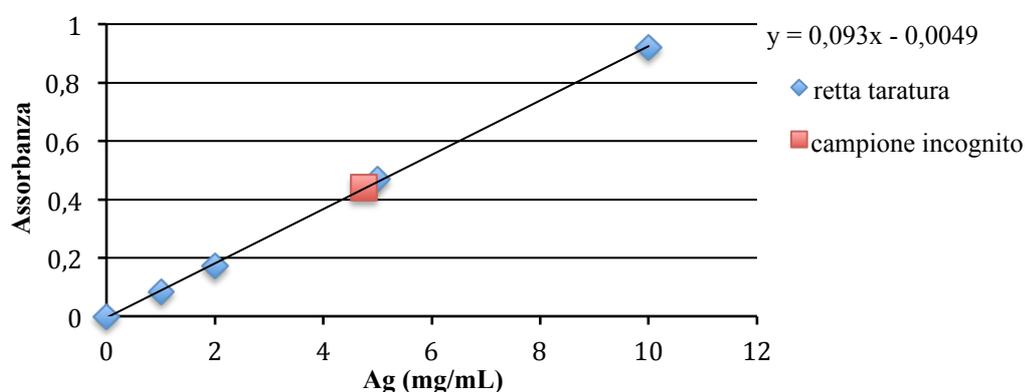
La concentrazione di Alisertib è stata determinata tramite spettroscopia UV-VIS dopo separazione in colonna per cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC): grazie ad una retta di calibrazione precedentemente registrata con apposite soluzioni standard a concentrazione nota è stato possibile interpolare la misura del campione incognito (**figura 3.14**) ed ottenere il valore di concentrazione di farmaco nel

campione reale, tale valore risulta essere pari a 42.4  $\mu\text{M}$ , corrispondente ad una resa di 1%.



**figura 3.14:** retta di calibrazione e misura della concentrazione di Ali-AgNPs-4@PNPs-Cltx tramite spettroscopia UV-VIS

La concentrazione in argento nella dispersione di AgNPs-4@PNPs-Cltx in PBS, è stata calcolata da misure di spettroscopia di assorbimento atomico: è stata dapprima registrata una retta di calibrazione preparando quattro standard a concentrazione nota nell'intervallo compreso tra 1 e 10 ppm; successivamente è stata registrata l'assorbanza del campione ignoto, precedentemente diluito di un fattore 1/50. Tale dispersione presenta una assorbanza di 0.44 (**figura 3.15**), corrispondente ad una concentrazione in argento nel campione reale di 2.2 mM, ovvero ad una resa di questo passaggio pari al 3%.



**figura 3.15:** retta di calibrazione e misura della concentrazione di Ali-AgNPs-4@PNPs-Cltx tramite spettroscopia ad assorbimento atomico

Il nanosistema appena descritto è stato preparato nell'ultimo periodo di tesi e come gli altri nanosistemi è stato spedito al CCR di Ispra per effettuare test *in vitro*: questi test sono tuttora in corso ed i risultati saranno disponibili a breve.

### 3.7 test *in vitro* dei nanosistemi sintetizzati su linee cellulari di glioblastoma

I campioni preparati nei passaggi appena descritti sono stati spediti al Centro Comune di Ricerca (CCR) di Ispra (VA). I biologi di questo centro di ricerca hanno investigato la citotossicità dei nanosistemi su linee cellulari di glioblastoma chiamate U87MG. La citotossicità è stata studiata in funzione della concentrazione di principio attivo e del tempo trascorso dalla loro aggiunta nei pozzetti contenenti le cellule (tempo di esposizione).

Un dato molto significativo per questi test è l'IC<sub>50</sub> (concentrazione inibente), ovvero la concentrazione minima di farmaco per il quale si ha una inibizione delle funzioni biologiche per il 50% della popolazione cellulare presa in esame per un determinato tempo di esposizione.

Si è inizialmente confrontata la citotossicità dei due sistemi contenenti Temsirolimus ed Alisertib per un tempo di esposizione di 24h (**tabella 3.1**).

campione	IC <sub>50</sub> <sub>24h</sub>
Temsi@PNPs-Cltx	nessun effetto
Ali@PNPs-Cltx	300 nM

**tabella 3.1:** concentrazioni inibenti (IC<sub>50</sub>) di Temsi@PNPs-Cltx e Ali@PNPs-Cltx

Come si può notare il nanosistema Temsi@PNPs-Cltx non si è rivelato efficace, a differenza di Ali@PNPs-Cltx che ha mostrato una concentrazione inibente inferiore al micromolare. Da questi risultati si è deciso di proseguire gli studi sull'Alisertib, scartando invece il Temsirolimus.

Si è perciò proseguito confrontando le concentrazioni inibenti a 48h e 72h di Ali@PNPs-Cltx con quelle del nanosistema contenente l'argento, delle quali eravamo già in possesso<sup>38</sup> (**tabella 3.2**).

<b>campione</b>	<b>IC50<sub>24h</sub></b>	<b>IC50<sub>72h</sub></b>
<b>Ali@PNPs-Cltx</b>	300 nM	20 nM
<b>AgNPs-4@PNPs-Cltx</b>	80*10 <sup>3</sup> nM	45*10 <sup>3</sup> nM

**tabella 3.2:** concentrazioni inibenti (IC50) di Ali@PNPs-Cltx e AgNPs-4@PNPs-Cltx

I risultati di IC50 (**tabella 3.1** e **tabella 3.2**) mostrano che il nanosistema Ali@PNPs-Cltx risulta molto efficace *in vitro* anche se somministrato in concentrazioni molto basse (20 nM); questo risultato di elevata citotossicità di un sistema di *drug delivery* attivo è molto promettente per future applicazioni *in vivo*.

#### 4: CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Il glioblastoma è un tumore cerebrale che ancora oggi non presenta efficaci metodi di cura. Lo sviluppo della nanomedicina sembra poter offrire nuove possibilità per sconfiggere questa malattia, annullando contemporaneamente gli effetti collaterali dei trattamenti tradizionali.

Durante questo lavoro di tesi sono stati inizialmente progettati e preparati tre differenti nanosistemi per *drug delivery* attivo: AgNPs-4@PNPs-Cltx, Tamsi@PNPs-Cltx ed Ali@PNPs-Cltx. A questo scopo sono state sintetizzate e caratterizzate le nanoparticelle d'argento, potenziali farmaci per il trattamento di glioblastoma. Per rendere lipofile queste nanoparticelle è stato preparato il legante **4**. È stato poi sintetizzato il copolimero a blocchi PLGA-*b*-PEG che, grazie alle sue proprietà di autoassemblarsi in nanoparticelle polimeriche, è stato utilizzato come *carrier* per gli agenti terapeutici. Sono stati poi scelti due farmaci commerciali, il Tamsirolimus e l'Alisertib, che sono stati incapsulati all'interno delle nanoparticelle polimeriche.

I tre nanosistemi sono stati poi testati al CCR di Ispra *in vitro* su cellule di glioblastoma. Il sistema AgNPs-4@PNPs-Cltx era già stato investigato dal nostro gruppo di ricerca e si era già rivelato efficace *in vitro* per cellule di glioblastoma.<sup>38</sup> Dei due nanosistemi contenenti i farmaci commerciali, solo Ali@PNPs-Cltx ha dimostrato una buona citotossicità, con valori di IC50 inferiori al micromolare. Alla luce di questi risultati si è deciso di sintetizzare e testare il nanosistema Ali-AgNPs-4@PNPs-Cltx per testare *in vitro* l'effetto sinergico delle nanoparticelle d'argento e di Alisertib, risultati di cui il nostro gruppo di ricerca è in attesa.

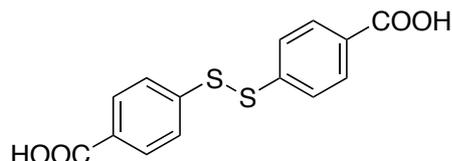
In questo lavoro si è quindi dimostrata la possibilità di utilizzare nanoparticelle d'argento come farmaco antitumorale ed in generale si è ribadita l'efficacia della nanomedicina per queste particolari malattie. I buoni risultati *in vitro* ottenuti permettono di continuare gli studi su questi nanosistemi; per questo AgNPs-4@PNPs-Cltx, Ali@PNPs-Cltx ed Ali-AgNPs-4@PNPs saranno prossimamente esaminati anche *in vivo*. In particolare si studierà la tossicità dei nanosistemi e la loro biodistribuzione all'interno dell'organismo, per confermare l'efficacia del *targeting* da parte della Clorotossina.

## 5: PARTE SPERIMENTALE

### 5.1 SINTESI DI

#### 11-(4-MERCAPTOBENZAMMIDE)UNDECANOATO DI ETILE

##### 5.1.1 Sintesi acido 4,4'-disulfanidilbenzoico



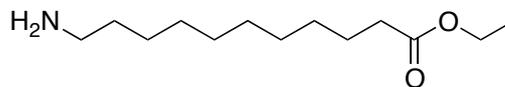
In un pallone da 100 mL, dotato di agitatore magnetico, viene inserito acido 4-mercaptobenzoico (1.00 g, 6.80 mmol) e 15 mL di una soluzione di iodio (0.45 M, 6.8 mmol) in etanolo (15 mL); la miscela viene lasciata in agitazione per 3 ore a temperatura ambiente. Trascorso tale tempo si neutralizza l'eventuale eccesso di iodio aggiungendo una soluzione di sodio tiosolfato (10% m/m). Si raccoglie il prodotto tramite filtrazione su filtro Buchner e dopo aver allontanato il solvente tramite pompa ad alto vuoto si cristallizza il prodotto da etanolo, ottenendo un solido bianco (1.65 g, 5.40 mmol) con resa pari a 80%.

*Dati:*

$^1\text{H NMR}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$ = 13.0 (bs, 2H), 8.0 (d, 2H), 7.7 (d, 2H) ppm;

$^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$ = 166.6, 140.8, 130.3, 129.7, 126.1 ppm;

### 5.1.2 Sintesi 11-amminoundecanoato di etile



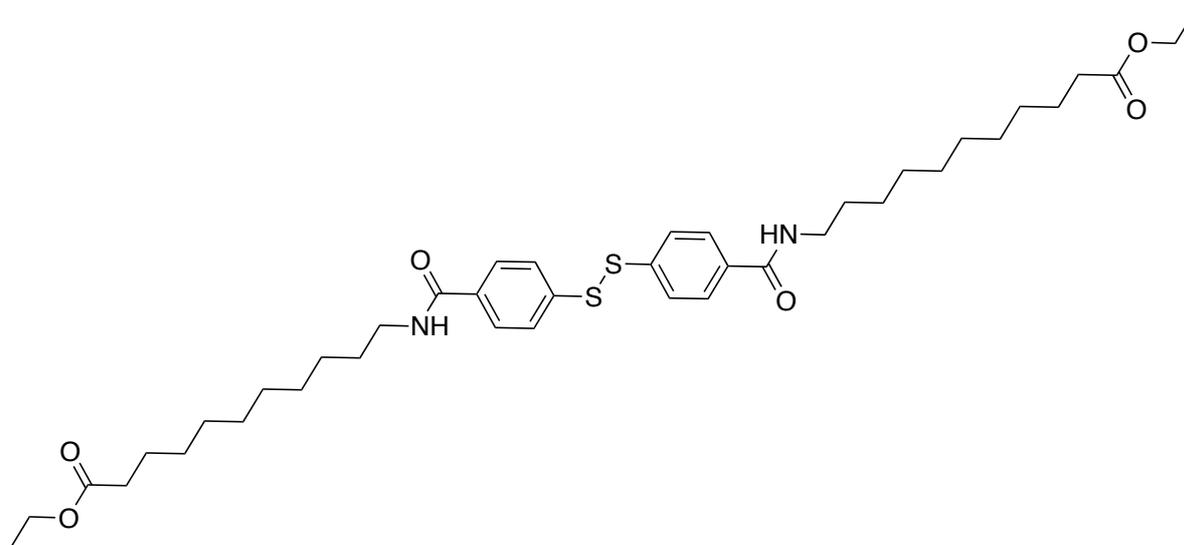
In un pallone da 250 mL, dotato di agitatore magnetico e colonna refrigerante, viene introdotto acido 11-amminoundecanoico (3.50 g, 17.00 mmol) e etanolo (60 mL). Avvenuta la solubilizzazione si sgocciola acido solforico concentrato (1.50 mL, 20.00 mmol). La soluzione viene quindi riscaldata lentamente e lasciata in agitazione a riflusso per 16 ore. Trascorso tale tempo si raffredda lentamente la miscela a 0°C e la si basifica a pH 8-9 con una soluzione di bicarbonato di sodio satura. Il solido precipitato viene filtrato su Buchner e quindi lavato con acqua; per recuperare tutto il prodotto rimasto nelle acque madri si rimuove l'etanolo tramite rotavapor e si procede ad estrarre il prodotto dalla fase acquosa con etile acetato. La fase organica è poi anidrificata con solfato di magnesio anidro che viene poi rimosso per filtrazione. Il prodotto viene recuperato tramite allontanamento del solvente con rotavapor, ottenendo un solido bianco (3.89 g, 17.00 mmol) con resa quantitativa.

*Dati:*

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ= 1.15 (t, 3H), 1.22 (s, 12H), 1.31 (bs, 2H), 1.48 (bs, 2H), 2.24 (bs, 2H), 2.86 (d, 2H), 4.02 (q, 2H) ppm;

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ= 173.8, 60.0, 41.3, 34.3, 29.4, 29.3, 29.2, 29.1, 26.8, 24.9, 14.2 ppm;

### 5.1.3 Sintesi bis-etil 12-(4-benzamide)undecanoato disolfossido



Ad un pallone da 50 mL, dotato di agitatore magnetico e sotto flusso di azoto, viene aggiunto acido 4,4'-disulfanidilbenzoico (1.10 g, 3.62 mmol) e tetraidrofurano anidro (10 mL). Avvenuta la solubilizzazione si aggiunge 1,1'-carbonildiimidazolo (1.30 g, 7.96 mmol) e si lascia in agitazione a temperatura ambiente per 1 ora. Trascorso tale tempo si aggiunge 11-amminoundecanoato di etile (1.66 g, 7.96 mmol) e si lascia in agitazione per circa 16 ore. La miscela risultante viene quindi filtrata su Buchner e lavata con THF anidro freddo. Si ricristallizza il prodotto da etanolo, ottenendo così un solido bianco (1.92 g, 2.62 mmol) con resa pari al 72%.

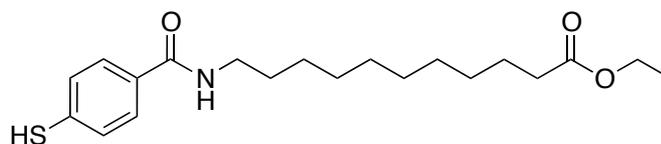
*Dati:*

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ= 7.65 (d, 4H), 7.42 (d, 4H), 6.57 (bs, 2H), 4.09 (q, 4H), 3.35 (m, 4H), 2.24 (t, 4H), 1.56 (m, 8H), 1.37-1.19 (m, 30H) ppm;

**<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ= 173.9, 166.6, 140.0, 133.6, 127.7, 126.6, 60.1, 40.1, 34.3, 29.6, 29.4, 29.3, 29.2, 29.2, 29.0, 26.9, 24.9, 14.2 ppm;

**MS:** 751 [M+Na]<sup>+</sup>

#### 5.1.4 Preparazione 11-(4-mercaptobenzammide)undecanoato di etile (4)



In un pallone da 50 mL, dotato di agitatore magnetico e sotto flusso di azoto, è inserito il bis-etil 12-(4-benzammide)undecanoato disolfossido (1.90 g, 2.60 mmol) ed una miscela di tetraidrofurano:etanolo in rapporto 1:1 (25 mL). La sospensione viene raffreddata a 0°C e si aggiunge sodio boro idruro (NaBH<sub>4</sub>) (300 mg, 9.4 mmol). La reazione è lasciata in agitazione per circa 16 ore. La miscela di reazione viene concentrata allontanando il solvente tramite rotavapor: si riprende poi con etile acetato e si lava la miscela con una soluzione di HCl (0.1 M) (3 x 15 mL) e successivamente con acqua (3 x 15 mL). Si recupera la fase organica, la si anidrifca con solfato di magnesio anidro, si filtra la soluzione e si allontana il solvente organico tramite rotavapor e pompa ad alto vuoto. Si ricristallizza il prodotto da etanolo ottenendo un solido bianco (650 mg, 1.78 mmol) con resa del 34%.

*Dati:*

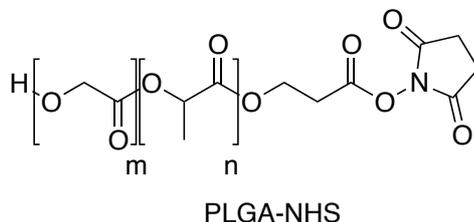
<sup>1</sup>HNMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ= 7.61 (d, 2H), 7.26 (d, 2H), 6.25 (bs, 1H), 4.10 (q, 2H), 3.56 (s, 1H), 3.40 (m, 2H), 2.27 (t, 2H), 1.58 (m, 4H), 1.36-1.21 (m, 15H) ppm;

<sup>13</sup>CNMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ= 173.8, 166.7, 135.7, 131.7, 128.4, 127.6, 60.1, 40.0, 34.3, 29.5, 29.3, 29.2, 29.2, 29.1, 29.0, 26.9, 24.9, 14.2 ppm;

MS: 388 [M+Na]<sup>+</sup>

## Cap 5.2 PREPARAZIONE PLGA-b-PEG-COOH

### 5.2.1 Preparazione PLGA-NHS



In un pallone da 50 mL, dotato di agitatore magnetico e sotto flusso di azoto, si aggiunge acido poli(lattidico-co-glicolico) (PLGA-COOH) (1.00 g, 0.14 mmol) e diclorometano (DCM) (8 mL) precedentemente filtrato su allumina basica. Alla miscela viene addizionata N-idrossisuccinimide (66 mg, 0.56 mmol), la miscela è portata a 0°C e quindi è inserita dicicloesilcarbodiimmide (DCC) (127 mg, 0.66 mmol). La reazione viene fatta proseguire per 16 ore a temperatura ambiente; trascorso tale tempo si filtra su celite e si effettuano lavaggi con diclorometano. Viene effettuata la precipitazione del prodotto aggiungendo etere etilico freddo e il prodotto è recuperato tramite decantazione scartando il surnatante. Dopo l'allontanamento del solvente si ottiene un solido bianco spugnoso (0.77 g, 0.11 mmol) con resa pari al 77%.

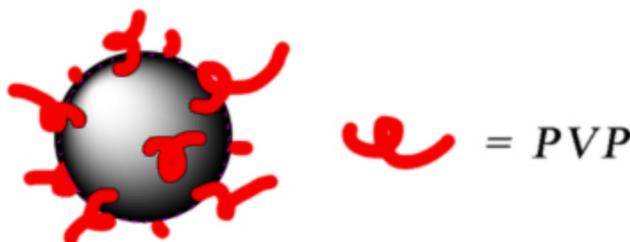
*Dati:*

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ= 5.29-5.12 (m, (OCH(CH<sub>3</sub>)C(O))<sub>m</sub>), 4.92-4.62 (m, (OCH<sub>2</sub>C(O))<sub>n</sub>), 2.85 (s, (ON(C(O)CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>), 1.61-1.52 (m, (OCH(CH<sub>3</sub>)C(O))<sub>m</sub>).



## 5.3 PREPARAZIONE NANOPARTICELLE DI ARGENTO

### 5.3.1 Sintesi di nanoparticelle di argento ricoperte di polimero (AgNPs-PVP)

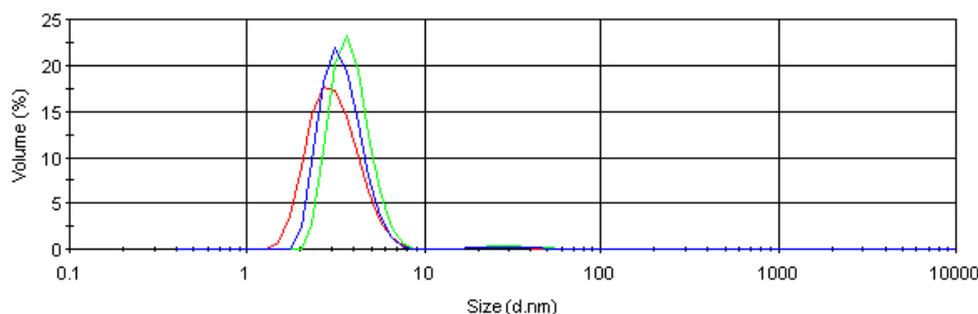


AgNPs-PVP

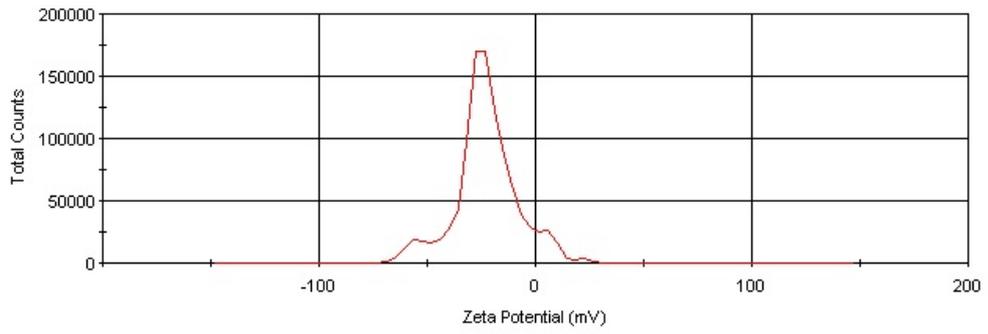
In un pallone a due colli si aggiunge, sotto flusso di azoto, una soluzione 1.31 mM di polivinilpirrolidone (PVP) (1.38 g, 0.046 mmol) in 35 mL di H<sub>2</sub>O ultrapura e la si riscalda fino a 90°C. Raggiunta tale temperatura viene introdotto glucosio (0.40 g, 2.22 mmol) e NaOH (125 mg, 3.13 mmol). Si lascia omogeneizzare la soluzione per qualche minuto e si aggiunge rapidamente una soluzione di argento nitrato (AgNO<sub>3</sub>) 0.22 M (375 mg, 2.22 mmol) in 10 mL di acqua ultrapura. Si lascia reagire per 3 minuti poi si interrompe l'agitazione e si lascia raffreddare a temperatura ambiente. Si concentra e si purifica la soluzione tramite filtri per centrifuga Amicon Ultra, Ultracel membrane con taglio di 100.000 NMWL (limite di massa molecolare nominale), Millipore, USA. Terminata la concentrazione si trasferiscono le AgNPs-PVP in un matraccio da 5 mL, portando a volume utilizzando H<sub>2</sub>O ultrapura. La resa pari a circa 72% è stata calcolata attraverso misure di spettroscopia di assorbimento atomico.

*Dati:*

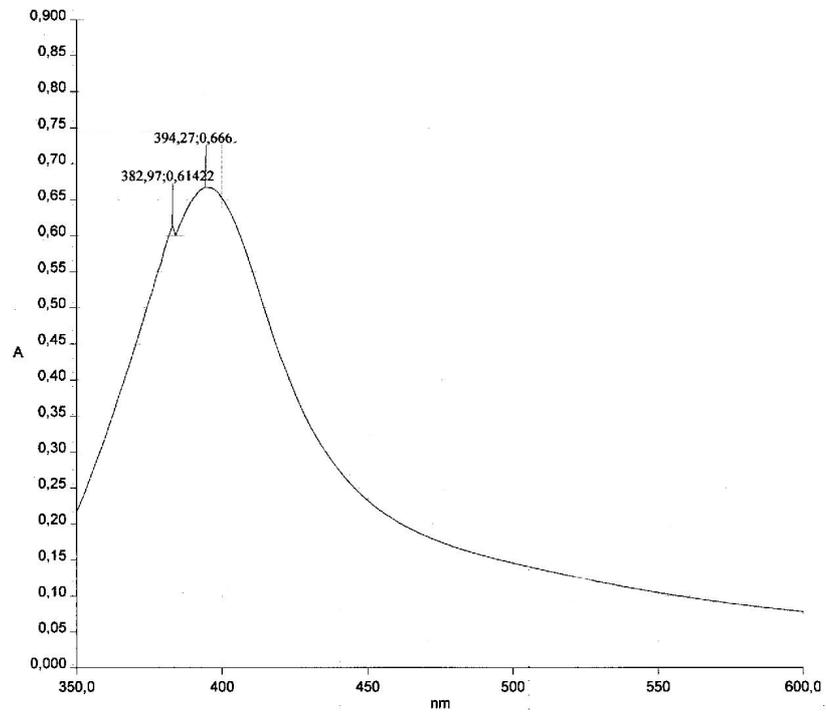
*diametro* :  $4.5 \pm 0.6$  nm, PDI =  $0.205 \pm 0.011$



potenziale Z :  $-29.5 \pm 0.3$  mV



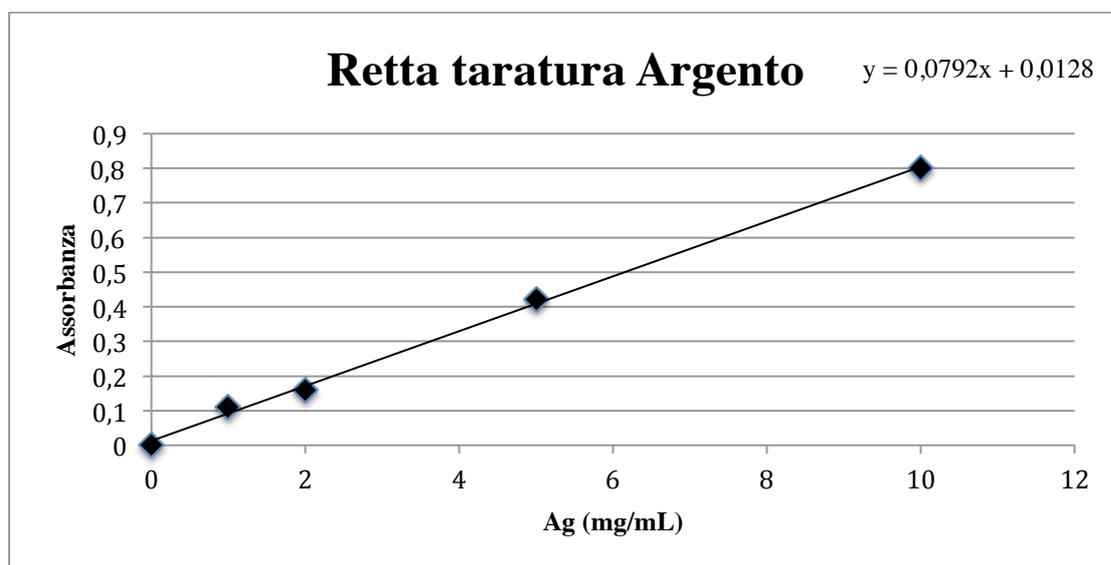
UV-VIS : 394.27 nm



Assorbimento atomico:

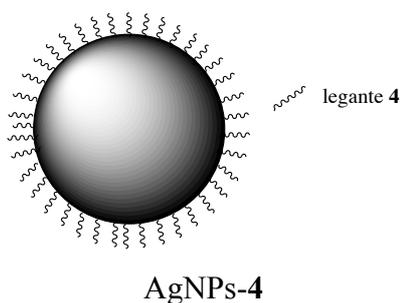
Retta di taratura

Concentrazione (mg/L)	Assorbanza (media di 3 misure)
0.00	0.00
1.00	0.12
2.00	0.16
5.00	0.42
10.00	0.80



Assorbanza campione media	Conc. Ag in camp. diluito (ppm)	fattore di diluizione	Conc. Ag in camp. originale (mg/L)	Conc. Ag (mM)	moli finali Ag (mmol)	resa % in Ag
0.27	3.40	1/10000	34064.04	315.79	1.68	72

### 5.3.2 Sintesi nanoparticelle di argento ricoperte di legante 4 (AgNPs-4)



In una provetta da 30 mL si aggiunge il legante **4** (75 mg, 0.21 mmol) ed etanolo (17 mL). Alla soluzione si aggiunge una dispersione di AgNPs-PVP (5 mL) in acqua ultrapura ( $H_2O_{UP}$ ); la dispersione così ottenuta viene messa in sonicazione per circa 1 ora, quindi si lascia in agitazione tramite vortex per circa 16 ore. La dispersione è quindi centrifugata (6000 giri/min, 60 minuti), e il surnatante rimosso; si lava con etanolo fresco, ripetendo tutta l'operazione due volte per purificare le AgNPs-4. Dopo tre lavaggi le nanoparticelle vengono disperse in cloroformio precedentemente filtrato su allumina basica. Si tiene questa dispersione in sonicazione per circa 20 minuti, quindi si allontana il solvente con flusso di azoto. Si aggiunge il solvente desiderato e si lascia la dispersione in sonicazione per altri 30 minuti. Trascorso tale tempo le nanoparticelle di argento legate con il legante **4** (AgNPs-4) sono utilizzate immediatamente per i passaggi successivi.

## 5.4 PREPARAZIONE DELLE NANOPARTICELLE POLIMERICHE

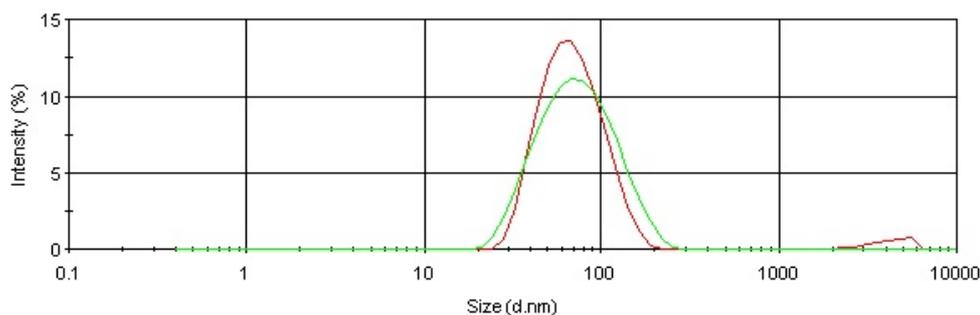
Per la preparazione di nanoparticelle di polimero si è utilizzata la tecnica della nanoprecipitazione in continuo.

### 5.4.1 Preparazione di nanoparticelle di polimero vuote (PNPs)

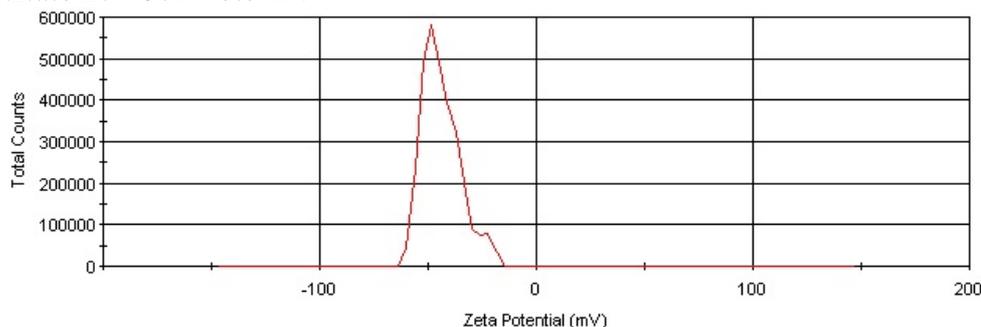
In un pallone da 50 mL si introduce il polimero PLGA-b-PEG-COOH (100 mg, 0.01 mmol) e DMSO (5 mL) sonicando fino a completa dissoluzione del polimero. Si preleva la soluzione ottenuta con una siringa da 10 mL e la si miscela in continuo con una corrente di acqua (50 mL) all'interno di un vial sotto vigorosa agitazione. La dispersione risultante è raccolta in continuo in un pallone da 100 mL e lasciata in agitazione per circa 30 minuti, quindi concentrata e purificata tramite filtri per centrifuga Amicon Ultra, Ultracel membrane con taglio di 100.000 NMWL (limite di massa molecolare nominale), Millipore, USA. La dispersione contenente le nanoparticelle di polimero (PNPs) in acqua viene portata a volume in un matraccio da 5 mL con acqua.

*Dati:*

*diametro* :  $d = 69.4 \pm 1.1$  nm,  $PDI = 0.199 \pm 0.013$



*potenziale Z*:  $-49.1 \pm 7.7$  mV

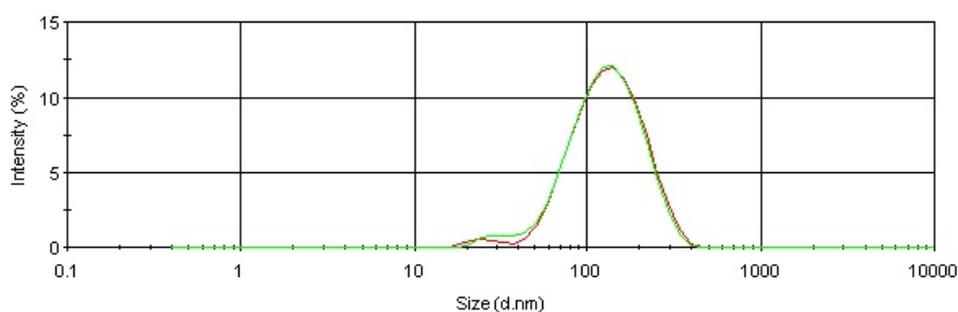


#### 5.4.2 Preparazione nanoparticelle di argento incapsulate in nanoparticelle di polimero (AgNPs-4@PNPs)

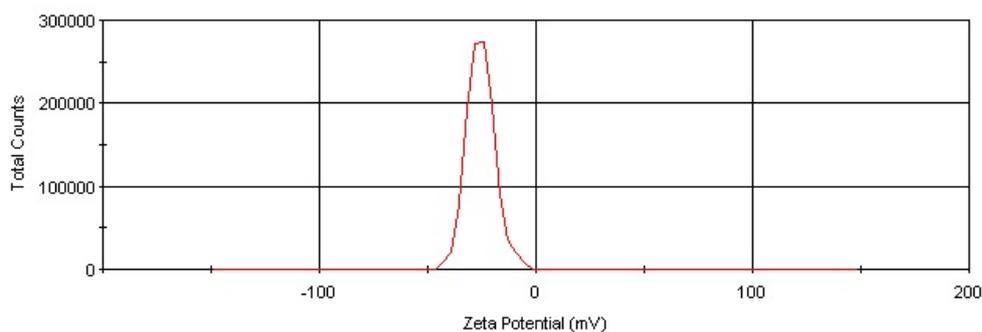
In un pallone da 50 mL si introduce il polimero PLGA-b-PEG-COOH (100 mg, 0.01 mmol) ed una dispersione di AgNPs-4 (5 mL) in DMSO sonicando fino a completa dissoluzione del polimero. Si preleva la dispersione di nanoparticelle di argento e polimero in DMSO con una siringa da 10 mL e la si miscela in continuo con una corrente di acqua (50 mL) all'interno di un vial sotto vigorosa agitazione. La dispersione risultante è raccolta in continuo in un pallone da 100 mL e lasciata in agitazione per circa 30 minuti, quindi concentrata e purificata tramite filtri per centrifuga Amicon Ultra, Ultracel membrane con taglio di 100.000 NMWL (limite di massa molecolare nominale), Millipore, USA. La dispersione contenente le nanoparticelle di argento incapsulate in nanoparticelle di polimero (AgNPs-T11@PNPs) viene portata a volume in un matraccio da 5 mL con acqua, ottenendo una concentrazione di argento di circa 211.3 mM corrispondente ad una resa di incapsulamento di circa 67%.

*Dati:*

*diametro:*  $112.6 \pm 2.9$  nm, PDI =  $0.190 \pm 0.011$



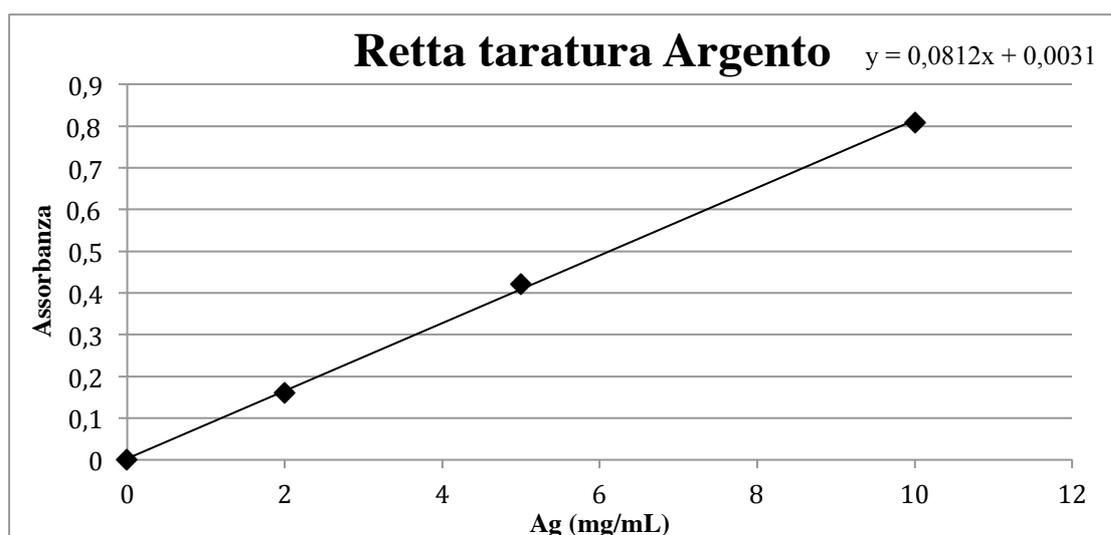
*potenziale Z:*  $-35.3 \pm 3.9$  mV



Assorbimento atomico:

Retta di taratura

Conc (mg/L)	Assorbanza (media di 3 misure)
0.00	0.000
1.00	0.120
2.00	0.160
5.00	0.420
10.00	0.800



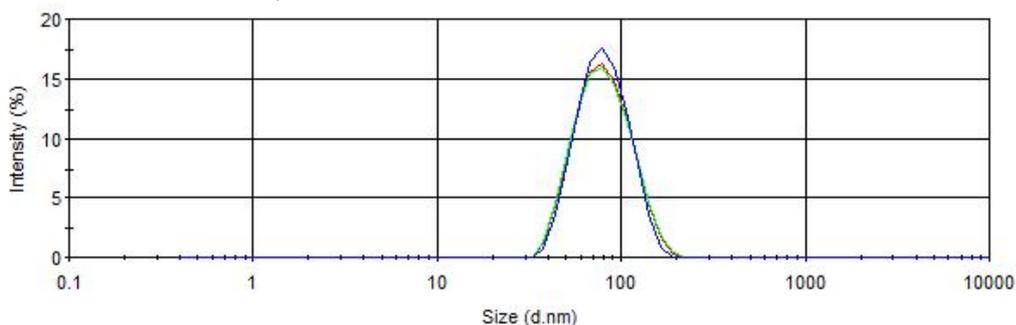
Assorbanza campione media	Conc. Ag in camp. diluito (ppm)	Fattore di diluizione	Conc. Ag in camp. originale (ppm)	Conc. Ag (mM)	moli finali Ag (mmol)	resa % in Ag
0.3732	4.56	1/5000	22795.57	211.33	1.06	67

### 5.4.3 : preparazione di farmaco (Alisertib) incapsulato in nanoparticelle di polimero (Ali@PNPs)

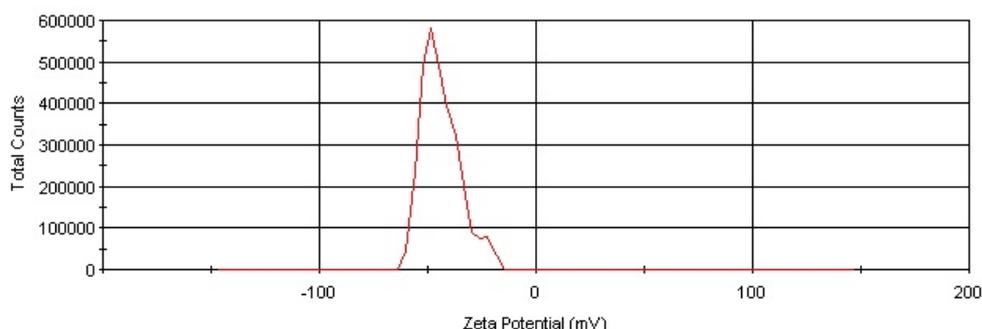
In un pallone da 50 mL si introduce il polimero PLGA-b-PEG-COOH (100 mg, 0.01 mmol), Alisertib (9 mg, 0.017 mmol) e DMSO (5 mL) sonicando fino a completa dissoluzione del polimero. Si preleva la soluzione di farmaco e polimero in DMSO con una siringa da 10 mL e la si miscela in continuo con una corrente di acqua (50 mL) all'interno di un vial sotto vigorosa agitazione. La dispersione risultante è raccolta in continuo in un pallone da 100 mL e lasciata in agitazione per circa 30 minuti, quindi concentrata e purificata tramite filtri per centrifuga Amicon Ultra, Ultracel membrane con taglio di 100.000 NMWL (limite di massa molecolare nominale), Millipore, USA. La dispersione contenente il farmaco incapsulato in nanoparticelle di polimero (Ali@PNPs) viene portata a volume in un matraccio da 10 mL e utilizzata per i passaggi seguenti.

*Dati:*

*diametro:*  $95.3 \pm 3.1$  nm, PDI =  $0.194 \pm 0.014$



*potenziale Z:*  $-51.6 \pm 13.5$  mV

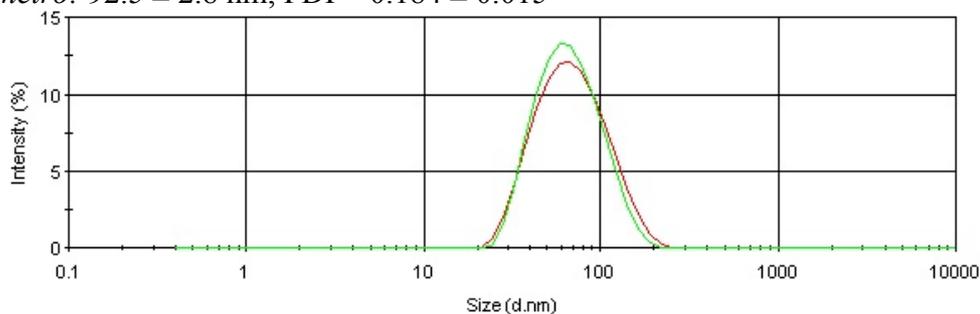


#### 5.4.4 Preparazione di farmaco (Temsirolimus) incapsulato in nanoparticelle di polimero (Tems@PNPs)

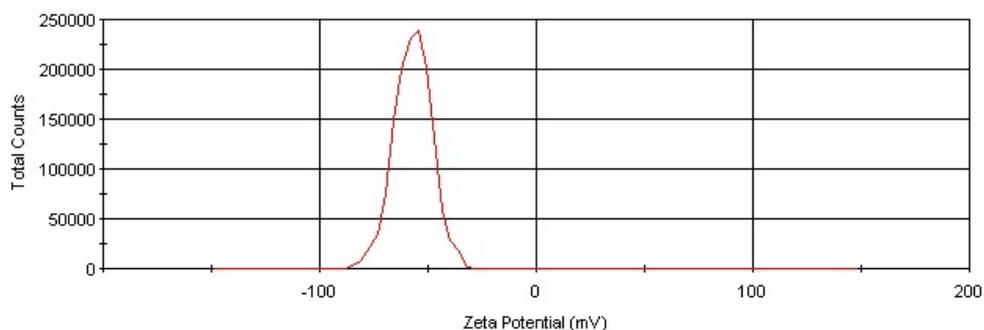
In un pallone da 50 mL si introduce il polimero PLGA-b-PEG-COOH (100 mg, 0.01 mmol), Temsirolimus (6 mg, 0.006 mmol) e DMSO (5 mL) sonicando fino a completa dissoluzione del polimero. Si preleva la soluzione di farmaco e polimero in DMSO con una siringa da 10 mL e la si miscela in continuo con una corrente di acqua (50 mL) all'interno di un vial sotto vigorosa agitazione. La dispersione risultante è raccolta in continuo in un pallone da 100 mL e lasciata in agitazione per circa 30 minuti; quindi concentrata e purificata tramite filtri per centrifuga Amicon Ultra, Ultracel membrane con taglio di 100.000 NMWL (limite di massa molecolare nominale), Millipore, USA. La dispersione contenente il farmaco incapsulato in nanoparticelle di polimero (Tems@PNPs) viene portata a volume in un matraccio da 10 mL con acqua. Tramite spettroscopia HPLC si rileva una concentrazione in farmaco di 90  $\mu$ M con resa del 15%.

*Dati:*

*Diametro:*  $92.5 \pm 2.8$  nm, PDI =  $0.184 \pm 0.015$



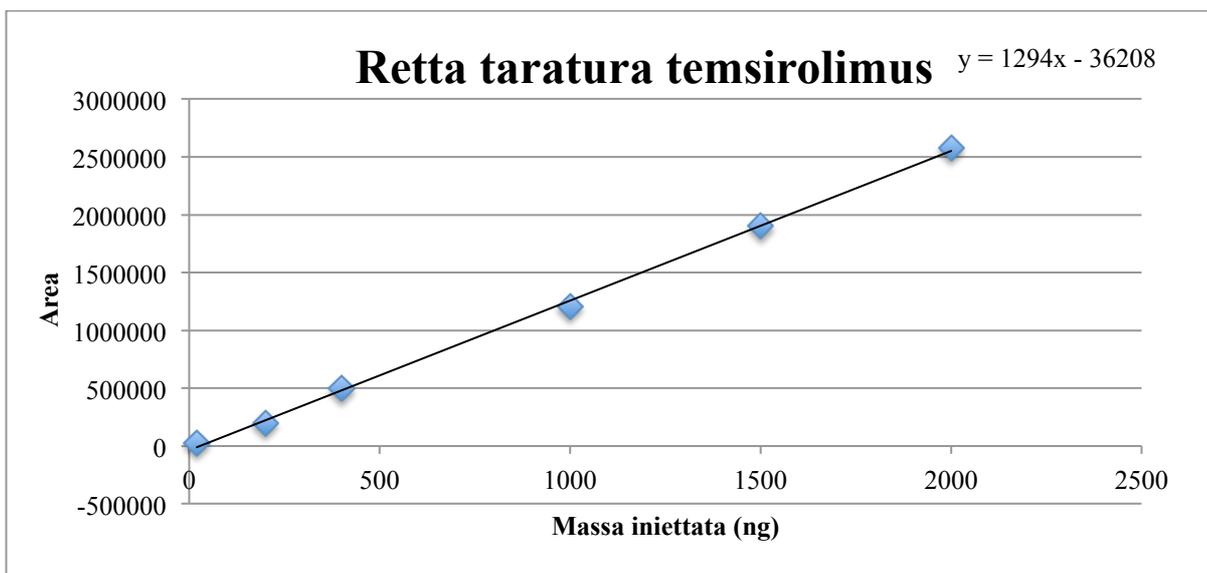
*potenziale Z:*  $-52.6 \pm 17.2$  mV



HPLC:

*Retta taratura*

massa farmaco iniettato (ng)	Area segnale
20	26906
200	196906
400	495450
1000	1207224
1500	1906050
2000	2575573



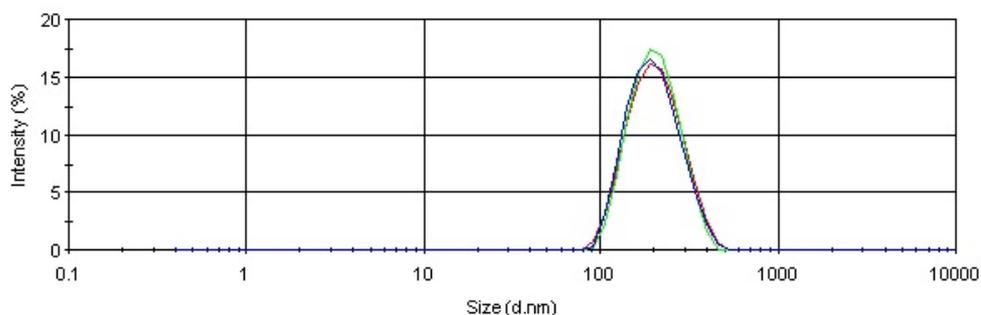
Area segnale	massa di Temsi nel camp. originale (mg)	moli in 10 mL ( $\mu\text{mol}$ )	Conc. di Temsi in 10 mL ( $\mu\text{M}$ )	massa iniziale (mg)	resa
42584.47	0.90	0.9	90.40	6.00	15%

### 5.4.5 Preparazione di farmaco (Alisertib) e nanoparticelle di argento incapsulati in nanoparticelle di polimero (Ali-AgNPs-4@PNPs)

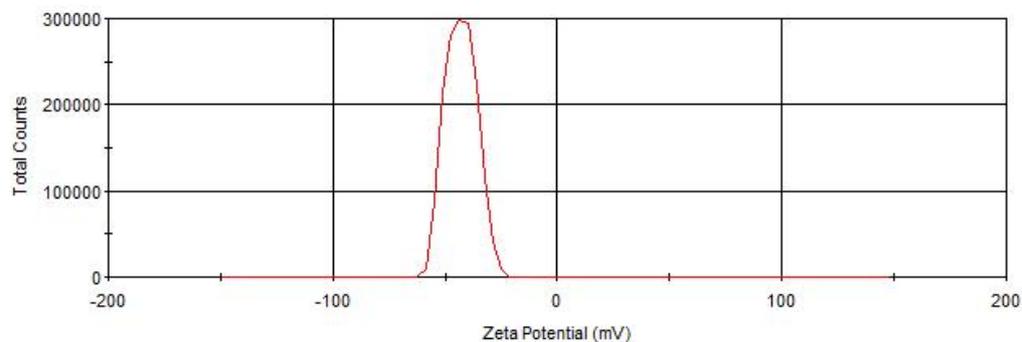
In un pallone da 50 mL si introduce PLGA-b-PEG-COOH (100 mg, 0.01 mmol), Alisertib (9 mg, 0.017 mmol) ed una dispersione di AgNPs-4 (1 mL) in DMSO. Si preleva la dispersione in DMSO con una siringa da 10 mL e la si miscela in continuo con una corrente di acqua (50 mL) all'interno di un vial sotto vigorosa agitazione. La dispersione risultante è raccolta in un pallone da 100 mL e lasciata in agitazione per circa 30 minuti; quindi concentrata tramite filtri per centrifuga Amicon Ultra, Ultracel membrane con taglio di 100.000 NMWL (limite di massa molecolare nominale), Millipore, USA. La dispersione contenente il farmaco e le nanoparticelle di argento incapsulati da nanoparticelle di polimero (Ali-AgNPs-4@PNPs) viene utilizzata totalmente per il passaggio successivo.

*Dati spettroscopici:*

*diametro:*  $136.8 \pm 1.2$  nm, PDI =  $0.072 \pm 0.067$



*potenziale Z:*  $-87.8 \pm 13.4$  mV



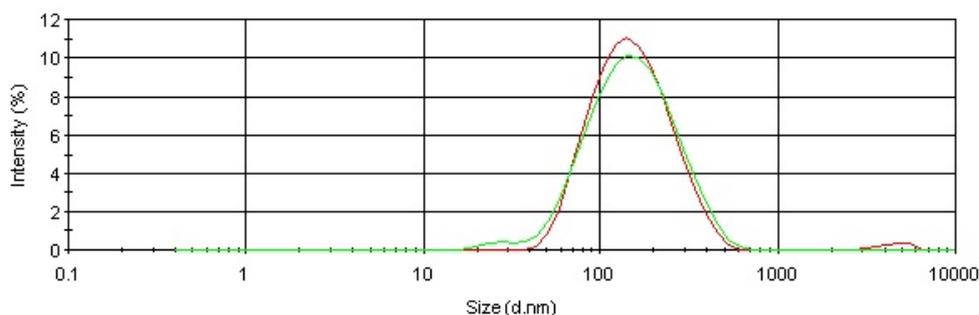
## 5.5 : CONIUGAZIONE CLOROTOSSINA SULLA SUPERFICIE DELLE NANOPARTICELLE POLIMERICHE

### 5.5.1 Coniugazione Clorotossina sulla superficie delle nanoparticelle contenenti nanoparticelle di argento. AgNPs-4@PNPs-Cltx

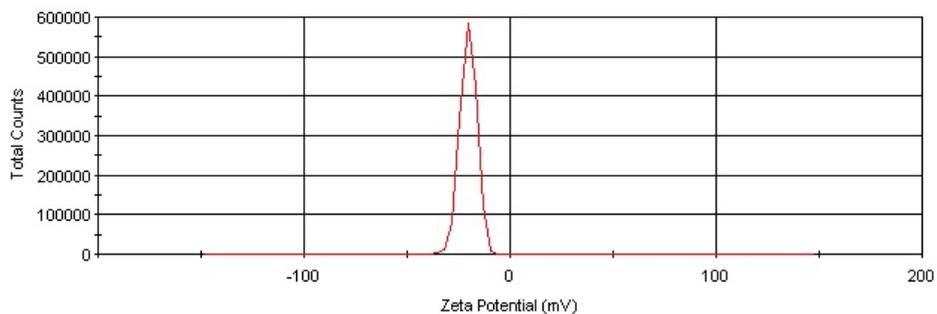
In un pallone da 50 mL, dotato di agitatore magnetico, si aggiunge una soluzione di tampone fosfato salino (PBS) (20 mL), N-idrossisulfosuccinimide (sulfo-NHS) (1.30 mg, 11.00  $\mu\text{mol}$ ) e 1-etil-3-(3-dimetilamminopropil)carbodiimmide (14.5  $\mu\text{L}$ , 0.55 mmol). Si acidifica a pH 7.4 la miscela con una soluzione di acido cloridrico (0.1 M), quindi si aggiungono le nanoparticelle precedentemente preparate (AgNPs-4@PNPs) e si lascia in agitazione per circa 30 minuti. Trascorso tale tempo si aggiunge Clorotossina (Cltx) (0.150 mg, 0.038  $\mu\text{mol}$ ) e si lascia il pallone in agitazione per circa 8 ore. La miscela di reazione viene poi concentrata e purificata tramite filtri per centrifuga Amicon Ultra, Ultracel membrane con taglio di 100.000 NMWL (limite di massa molecolare nominale), Millipore, USA. La dispersione contenente le nanoparticelle di argento incapsulate in nanoparticelle di polimero coniugate con Clorotossina (AgNPs-4@PNPs-Cltx) (2 mL) viene portata a volume in un matraccio da 5 mL con acqua, ottenendo una concentrazione di argento di 13.03 mM, corrispondente ad una resa del 6%.

*Dati:*

*diametro:*  $117.4 \pm 14.4$  nm, PDI =  $0.220 \pm 0.013$



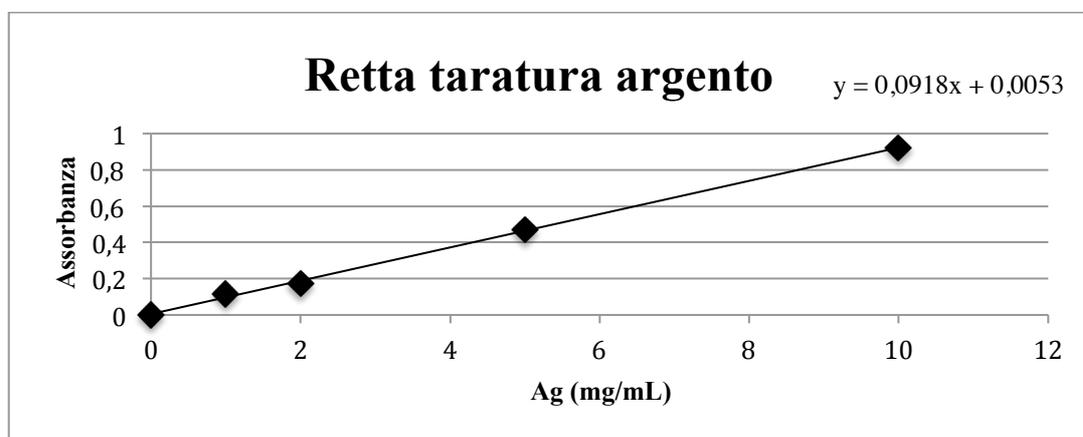
potenziale Z:  $-16.2 \pm 1.5$  mV



Assorbimento atomico:

Retta di taratura

Conc (mg/L)	Assorbanza (media di 3 misure)
0.00	0.000
1.00	0.115
2.00	0.172
5.00	0.470
10.00	0.922



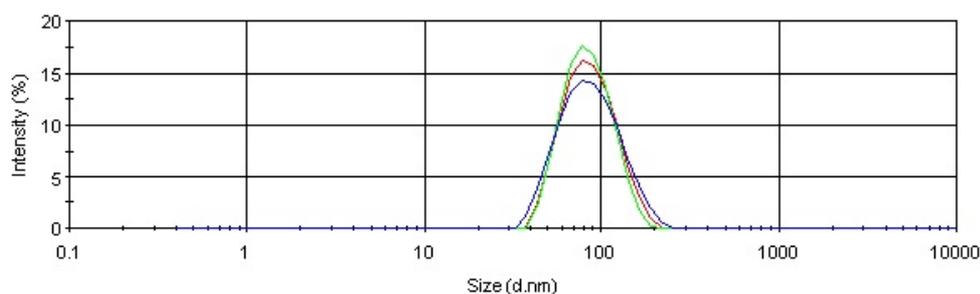
Assorbanza campione media	Conc. Ag in camp. diluito (ppm)	fattore di diluizione	Conc. Ag in camp. originale (mg/L)	Conc. Ag (mM)	moli finali Ag (mmol)	resa % in Ag
0.13	1.41	1/200	1405.23	13.03	65.30	6

### 5.5.2 : coniugazione Clorotossina sulla superficie delle nanoparticelle contenenti Alisertib. Ali@PNPs-Cltx

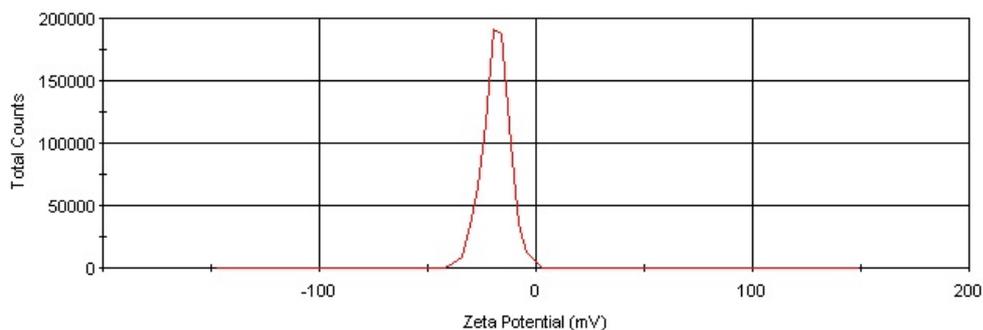
In un pallone da 50 mL, dotato di agitatore magnetico, si aggiunge una soluzione di tampone fosfato salino (PBS) (20 mL), N-idrossisulfosuccinimide (sulfo-NHS) (1.30 mg, 11.00  $\mu\text{mol}$ ) e 1-etil-3-(3-dimetilamminopropil)carbodiimmide (14.5  $\mu\text{L}$ , 0.55 mmol). Si acidifica a pH 7.4 la miscela con una soluzione di acido cloridrico (0.1 M), quindi si aggiungono le nanoparticelle precedentemente preparate (Ali@PNPs) e si lascia in agitazione per circa 30 minuti. Trascorso tale tempo si aggiunge Clorotossina (Cltx) (0.150 mg, 0.038  $\mu\text{mol}$ ) e si lascia il pallone in agitazione per circa 8 ore. La miscela di reazione viene poi concentrata e purificata tramite filtri per centrifuga Amicon Ultra, Ultracel membrane con taglio di 100.000 NMWL (limite di massa molecolare nominale), Millipore, USA. La dispersione contenente l'Alisertib incapsulato in nanoparticelle di polimero coniugate con Clorotossina (Ali@PNPs-Cltx) viene portata a volume in un matraccio da 5 mL con acqua, ottenendo una concentrazione di farmaco di circa 120.8  $\mu\text{M}$ .

*Dati:*

*diametro:*  $98.2 \pm 3.8 \text{ nm}$ ,  $\text{PDI} = 0.145 \pm 0.009$

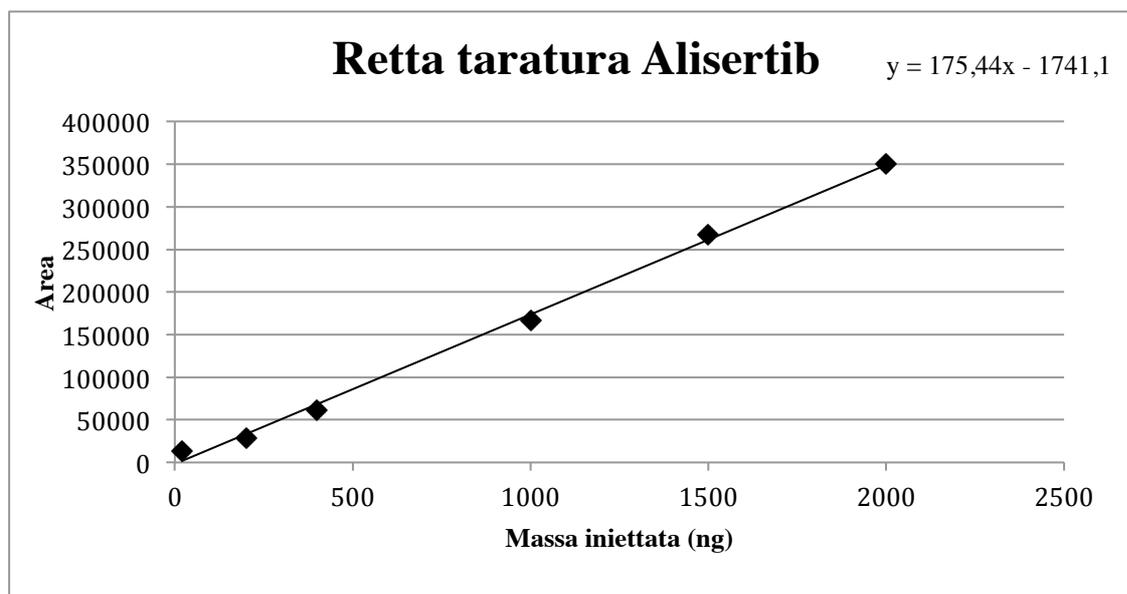


*potenziale Z:*  $-23.2 \pm 13.5 \text{ mV}$



## Retta taratura

massa farmaco iniettato (ng)	Area segnale
20	13557
200	28504
400	61781
1000	166659
1500	267543
2000	349765



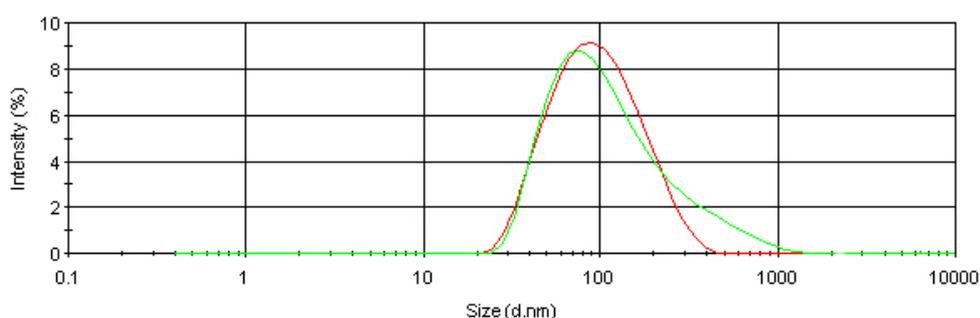
Area segnale	massa di Ali nel camp. originale (mg)	moli in 10 mL ( $\mu\text{mol}$ )	Conc. di Ali in 5 mL ( $\mu\text{M}$ )	massa iniziale (mg)	resa
31836.21	0.30	0.60	120.82	9.00	3%

### 5.5.3 Coniugazione Clorotossina sulla superficie delle nanoparticelle contenenti Temsirolimus. Temsi@PNPs-Cltx

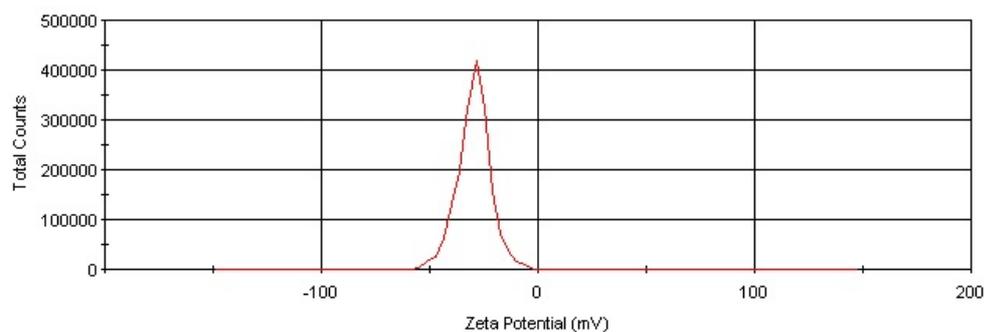
In un pallone da 50 mL, dotato di agitatore magnetico, si aggiunge una soluzione di tampone fosfato salino (PBS) (20 mL), N-idrossisulfosuccinimide (sulfo-NHS) (1.30 mg, 11.00  $\mu\text{mol}$ ) e 1-etil-3-(3-dimetilamminopropil)carbodiimmide (14.5  $\mu\text{L}$ , 0.55 mmol). Si acidifica a pH 7.4 la miscela con una soluzione di acido cloridrico (0.1 M) in acqua, quindi si aggiungono le nanoparticelle precedentemente preparate (Temsi@PNPs) e si lascia in agitazione per circa 30 minuti. Trascorso tale tempo si aggiunge Clorotossina (Cltx) (0.150 mg, 0.038  $\mu\text{mol}$ ) e si lascia il pallone in agitazione per circa 8 ore. La miscela di reazione viene poi concentrata e purificata tramite filtri per centrifuga Amicon Ultra, Ultracel membrane con taglio di 100.000 NMWL (limite di massa molecolare nominale), Millipore, USA. La dispersione contenente il Temsirolimus incapsulato in nanoparticelle di polimero coniugate con Clorotossina (Temsi@PNPs-Cltx) viene portata a volume in un matraccio da 10 mL con acqua, ottenendo una concentrazione di farmaco di circa 52.4  $\mu\text{M}$ .

*Dati:*

*diametro:*  $94.3 \pm 2.3$  nm, PDI =  $0.203 \pm 0.012$



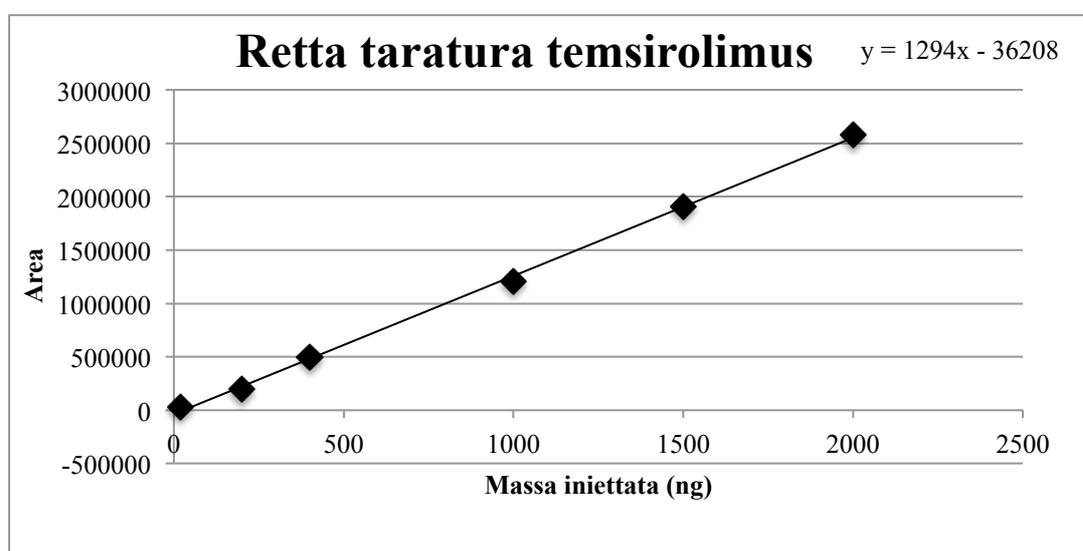
*potenziale Z:*  $-39.8 \pm 9.4$  mV



HPLC:

*Retta taratura*

massa farmaco iniettato (ng)	Area segnale
20	26906
200	196906
400	495450
1000	1207224
1500	1906050
2000	2575573



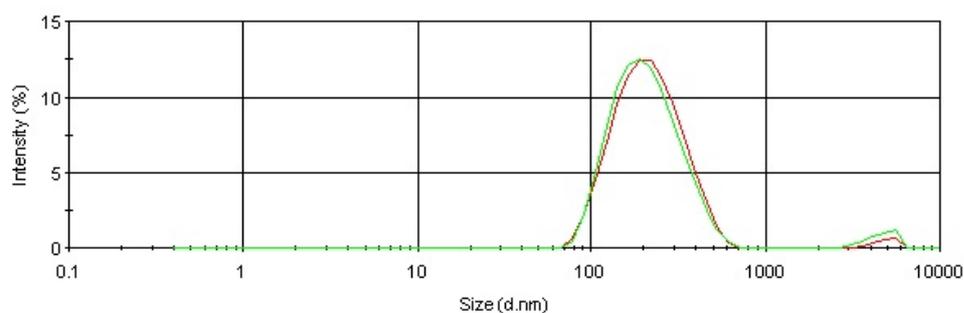
Area segnale	massa di Temsi nel camp. originale (mg)	moli in 10 mL ( $\mu\text{mol}$ )	Conc. di Temsi in 10 mL ( $\mu\text{M}$ )	massa iniziale (mg)	resa
211871	0.50	0.53	52.32	6.00	8%

#### 5.5.4 Coniugazione Clorotossina sulla superficie delle nanoparticelle contenenti Alisertib e nanoparticelle di argento. Ali-AgNPs-4@PNPs-Cltx

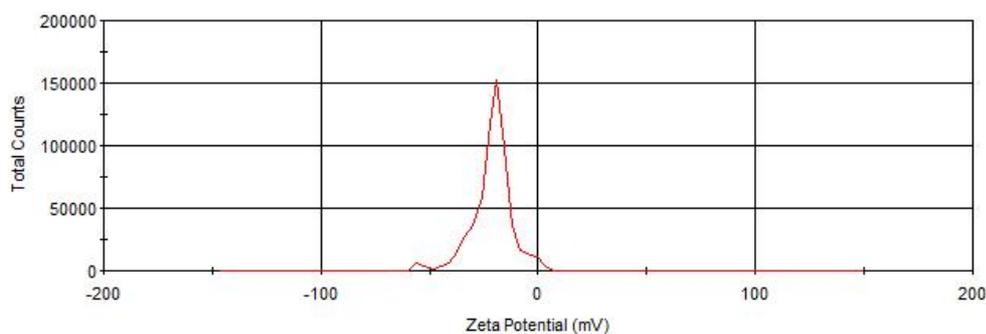
In un pallone da 50 mL, dotato di agitatore magnetico, si aggiunge una soluzione di tampone fosfato salino (PBS) (20 mL), N-idrossisulfosuccinimide (sulfo-NHS) (1.30 mg, 11.00  $\mu\text{mol}$ ) e 1-etil-3-(3-dimetilamminopropil)carbodiimmide (14.5  $\mu\text{L}$ , 0.55 mmol). Si acidifica a pH 7.4 la miscela con una soluzione di acido cloridrico (0.1 M), quindi si aggiungono le nanoparticelle precedentemente preparate (Ali-AgNPs-4@PNPs) e si lascia in agitazione per circa 30 minuti. Trascorso tale tempo si aggiunge Clorotossina (0.150 mg, 0.038  $\mu\text{mol}$ ) e si lascia il pallone in agitazione per circa 8 ore. La miscela di reazione viene poi concentrata e purificata tramite filtri per centrifuga Amicon Ultra, Ultracel membrane con taglio di 100.000 NMWL (limite di massa molecolare nominale), Millipore, USA. La dispersione contenente le nanoparticelle di argento ed il farmaco incapsulati in nanoparticelle di polimero coniugate con Clorotossina (Ali-AgNPs-4@PNPs-Cltx) viene portata a volume in un matraccio da 5 mL con acqua, ottenendo una concentrazione di argento di circa 2.17 mM ed una concentrazione di Alisertib di 42.4  $\mu\text{M}$ .

*Dati:*

*diametro:*  $199.3 \pm 0.6 \text{ nm}$ ,  $\text{PDI} = 0.205 \pm 0.018$

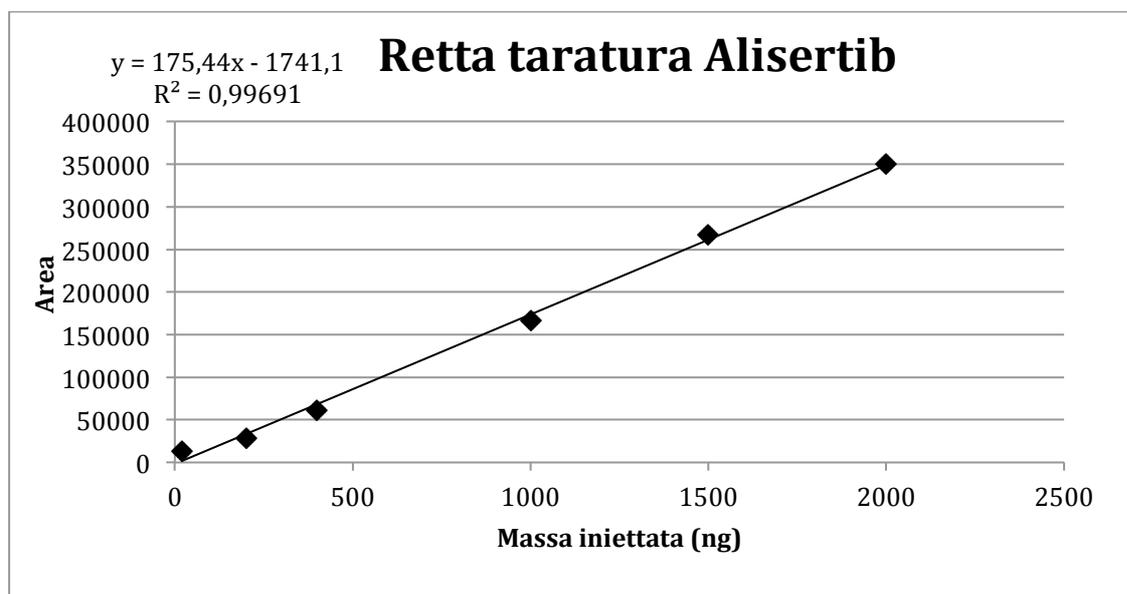


*potenziale Z:*  $-16.2 \pm 4.5 \text{ mV}$



## Retta taratura

massa farmaco iniettato (ng)	Area segnale
20	13557
200	28504
400	61781
1000	166659
1500	267543
2000	349765

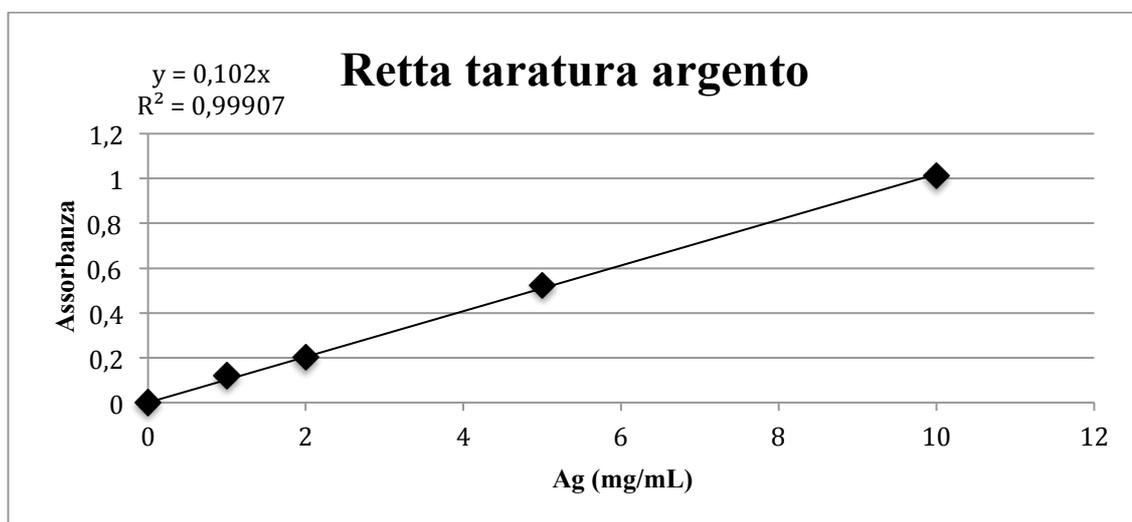


Area segnale	massa di Ali nel camp. originale (mg)	moli in 10 mL ( $\mu\text{mol}$ )	Conc. di Ali in 5 mL ( $\mu\text{M}$ )	massa iniziale (mg)	resa %
44327.21	0.10	0.21	41.76	9.00	1%

Assorbimento atomico:

Retta di taratura

Conc (mg/L)	Assorbanza (media di 3 misure)
0.00	0.000
1.00	0.115
2.00	0.172
5.00	0.470
10.00	0.922



Assorbanza campione media	Conc. Ag in camp. diluito (ppm)	fattore di diluizione	Conc. Ag in camp. originale (mg/L)	Conc. Ag (mM)	moli finali Ag (mmol)	resa % in Ag
0.44	4.69	1/50	234.26	2.17	11.19	3