

SCUOLA DI SCIENZE
Dipartimento di Chimica Industriale “Toso Montanari”

Corso di Laurea Magistrale in
Chimica Industriale
Classe LM-71 - Scienze e Tecnologie della Chimica Industriale

Acido (*R*)-9-idrossiottadecanoico veicolato
da nanoparticelle proteiche: sintesi,
caratterizzazione e valutazione
dell'attività biologica

Tesi di laurea sperimentale

CANDIDATO

Alberto Busi

RELATORE

Prof.ssa Carla Boga

CORRELATORE

Dott.ssa Claudia Ferroni

Dott.ssa Greta Varchi

ABSTRACT

This work describes the preparation and characterization of protein nanoparticles loaded with (*R*)-9-hydroxystearic acid, (*R*)-9-HSA. This fatty acid is an endogenous product of lipid metabolism that acts as histone deacetylase 1 inhibitor and exerts anti-proliferative activity by arresting colon cancer cells (HT29) growth in G₀/G₁ phase.

The formation of nanoparticles was induced by hydrophobic interactions between (*R*)-9-HSA and the hydrophobic protein domains, affording water-stable nanoparticles with no need of toxic cross-linking agents. Nanoparticles were characterized in terms of hydrodynamic diameter, surface charge, morphology and thermogravimetric behavior.

The controlled release of (*R*)-9-HSA from nanoparticles was determined at 37°C and at different pH values by internal standard method with quantitative ¹H-NMR spectroscopy (qNMR).

The *in vitro* evaluation of nanoparticles uptake and cytotoxicity was performed on human colorectal adenocarcinoma cells (HT29). Collected data show that the activity of (*R*)-9-HSA as free or loaded onto nanoparticles is similar in terms of anti-proliferative effect; however, some significant differences were observed in the cell cycle analysis, showing that while free (*R*)-9-HSA causes a growth arrest in the G₀/G phase, it induces a S phase arrest when loaded on nanoparticles.

In summary, protein nanoparticles loaded with (*R*)-9-HSA, described here for the first time, represent an effective tool against colon cancer cells proliferation. Additional studies are ongoing to better elucidate the underpinning biochemical mechanism of action of our newly developed delivery system.

ABSTRACT

Questo lavoro descrive la preparazione e la caratterizzazione di nanoparticelle proteiche caricate con acido (*R*)-9-idrossistearico, (*R*)-9-HSA. Questo acido grasso è un prodotto endogeno del metabolismo lipidico e un inibitore delle istone deacetilasi 1 esercitando un'attività antiproliferativa nei confronti delle cellule di adenocarcinoma del colon (HT29) grazie all'arresto in fase G₀/G₁.

La formazione delle nanoparticelle è indotta dalle interazioni idrofobiche tra (*R*)-9-HSA e i domini idrofobici della proteina; rendendo possibile la formazione di nanoparticelle stabili in ambiente acquoso, senza l'utilizzo di agenti reticolanti tossici. Le nanoparticelle sono state caratterizzate in termini di diametro idrodinamico, carica superficiale, morfologia e comportamento termico.

Il rilascio controllato di (*R*)-9-HSA dalle nanoparticelle è stato determinato a 37°C e a diversi valori di pH, tramite spettroscopia ¹H-NMR quantitativa (qNMR), utilizzando il metodo dello standard interno.

L'internalizzazione e la citotossicità delle nanoparticelle sono state valutate *in vitro* su cellule di adenocarcinoma umano del colon (HT29). I dati raccolti mostrano che (*R*)-9-HSA libero e caricato su nanoparticelle esercitano una simile attività antiproliferativa, tuttavia alcune differenze significative si riscontrano nell'analisi del ciclo cellulare, in particolare (*R*)-9-HSA libero provoca un arresto in fase G₀/G₁, mentre quando è caricato su nanoparticelle induce un arresto in fase S.

In conclusione, le nanoparticelle proteiche caricate con (*R*)-9-HSA, descritte per la prima volta in questo lavoro, rappresentano uno strumento efficace contro la proliferazione delle cellule di adenocarcinoma del colon. Ulteriori studi sono in corso per comprendere meglio i meccanismi biochimici alla base dell'azione di questo nuovo sistema di veicolazione.

INDICE

1. Introduzione.....	5
1.1. Nanomedicina e <i>drug delivery</i>.....	5
1.1.1. Nanoparticelle.....	10
1.1.1.1. Nanoparticelle metalliche.....	10
1.1.1.2. Nanoparticelle di polimeri sintetici.....	11
1.1.1.3. Nanoparticelle polisaccaridiche.....	12
1.1.1.4. Liposomi.....	12
1.1.1.5. Nanoparticelle proteiche.....	13
1.1.2. Metodi di preparazione di nanoparticelle proteiche.....	14
1.1.2.1. Desolvatazione.....	15
1.1.2.2. Emulsione.....	15
1.1.2.3. Elettrospray drying.....	16
1.1.2.4. Self-assembly.....	17
1.2. Cheratina.....	18
1.2.1. Struttura e ruolo fisiologico.....	18
1.2.2. Classificazione, composizione amminoacidica e caratteristiche.....	20
1.2.3. Proprietà.....	21
1.2.4. Metodi di estrazione.....	22
1.2.5. Applicazioni.....	23
1.3. Istoni e deacetilasi istoniche (HDACs).....	25
1.4. Inibitori delle deacetilasi istoniche (HDACi).....	27
1.5. Acido 9-idrossistearico (9-HSA).....	29
2. Scopo della tesi.....	32
3. Risultati e discussione.....	33
3.1. Sintesi di (R)-9HSA.....	33
3.2. Estrazione della cheratina.....	36
3.3. Metodi di preparazione delle nanoparticelle.....	36
3.4. Nanoparticelle di cheratina.....	38
3.5. Nanoparticelle di cheratina e (R)-9-HSA, (R)-9-HSA@Ker.....	39
3.5.1. Studio di ottimizzazione delle condizioni operative.....	39
3.5.2. Stabilità nel tempo delle NPs (R)-9-HSA@Ker.....	42

3.5.3. Prove di rilascio.....	43
3.5.4. Caratterizzazione delle NPs (R)-9-HSA@Ker.....	47
3.6. Nanoparticelle di cheratina funzionalizzata con FITC.....	50
3.7. Nanoparticelle di (R)-9-HSA e cheratina funzionalizzata con FITC, (R)-9-HSA@Ker-FITC.....	51
3.8. Nanoparticelle di cheratina e acido 12-idrossistearico (12-HSA), 12-HSA@Ker.....	52
3.9. Nanoparticelle di albumina.....	52
3.10. Nanoparticelle di albumina e (R)-9-HSA, (R)-9-HSA@HSAr.....	53
3.11. Analisi biologiche <i>in vitro</i>	53
3.11.1. Analisi dell'internalizzazione delle nanoparticelle.....	53
3.11.2. Analisi delle interazioni con la membrana cellulare.....	55
3.11.3. Effetti sulla proliferazione cellulare.....	58
3.11.4. Analisi del ciclo cellulare.....	59
4. Conclusioni.....	61
5. Parte sperimentale.....	63
5.1. Sintesi di acido (R)-9-idrossistearico, (R)-9-HSA.....	65
5.1.1. Valutazione dell'eccesso enantiomerico.....	67
5.2. Metodo di estrazione della cheratina.....	68
5.3. Nanoparticelle di cheratina.....	69
5.3.1. Nanoparticelle bianche.....	69
5.3.1.1. <i>Self-assembly</i>	69
5.3.1.2. <i>Desolvatazione</i>	69
5.3.2. Funzionalizzazione della cheratina con FITC, Ker-FITC.....	70
5.3.3. Nanoparticelle fluorescenti, KNPs-FITC.....	70
5.3.4. Nanoparticelle cariche.....	70
5.3.4.1. <i>Nanoparticelle caricate con (R)-9-HSA, (R)-9-HSA@Ker</i>	70
5.3.4.2. <i>Nanoparticelle fluorescenti caricate con (R)-9-HSA, (R)-9-HSA@Ker-FITC</i>	71
5.3.5. Prove di rilascio.....	71
5.4. Nanoparticelle di albumina.....	72
5.4.1. Nanoparticelle bianche.....	72

5.4.2. Nanoparticelle caricate con (R)-9-HSA, (R)-9-HSA@HSAr.....	73
5.5. Analisi biologiche <i>in vitro</i>	73
5.5.1. Colture cellulari.....	73
5.5.2. Internalizzazione nanoparticelle.....	73
5.5.3. Analisi delle interazioni con la membrana cellulare.....	74
5.5.4. Conte cellulari.....	74
5.5.5. Analisi del ciclo cellulare.....	74
Bibliografia.....	75

CAPITOLO 1

Introduzione

1.1. Nanomedicina e *drug delivery*

Durante la storia dell'uomo sono avvenute tre grandi rivoluzioni scientifiche:

- La rivoluzione industriale nel XIX secolo;
- La rivoluzione nucleare nel XX secolo;
- La rivoluzione nanotecnologica nel XXI secolo e attualmente in corso.

La nanoscienza si occupa dei fenomeni e delle manipolazioni della materia su scala nanometrica. Il termine fu coniato da Richard Feynman nel 1959 durante il suo celebre discorso “*There's Plenty of Room at the Bottom*” (“C'è tanto spazio giù in fondo”)¹ nel quale argomentò la possibilità di manipolare la materia a livello atomico e di costruire macchine di dimensioni molecolari.

Nel 1974, Norio Taniguchi definì per la prima volta la nanotecnologia come un processo di separazione, consolidamento e deformazione di materiali a livello atomico o molecolare (“Nano-technology mainly consists of the processing of separation, consolidation, and deformation of materials by one atom or one molecule”).²

Il termine “nanomedicina” ad oggi non ha una definizione universalmente accettata: per l'European Science Foundation si tratta della “scienza e tecnologia di diagnosi, trattamento e prevenzione di malattie e lesioni traumatiche, di attenuazione del dolore, di preservazione e miglioramento della salute umana grazie all'utilizzo di strumenti molecolari e la conoscenza molecolare del corpo umano”.³ Mentre per il National Institute of Health degli USA si tratta di una “branca della nanotecnologia che si riferisce a interventi medici altamente specifici su scala molecolare rivolti alla cura di malattie o riparazione di tessuti danneggiati, come ossa, muscoli o nervi”.⁴

La nanomedicina trova ampia applicazione per la veicolazione di farmaci (*drug delivery*), la diagnostica, la medicina rigenerativa e i dispositivi medici impiantabili.

Il *drug delivery* ha come obiettivo lo sviluppo di sistemi di trasporto di dimensioni nanometriche (*nanocarriers*) in grado di veicolare principi attivi in maniera mirata. Fra i vari tipi di farmaci possibilmente veicolabili con *nanocarriers*, i farmaci antitumorali

Capitolo 1 - Introduzione

sono certamente quelli sui quali si sono maggiormente concentrati gli studi degli scienziati. Infatti, i trattamenti chemioterapici prevedono l'uso di molecole molto tossiche, scarsamente o per nulla solubili in acqua che richiedono pertanto l'uso di solventi organici altamente tossici che concorrono ad aumentare il numero e l'intensità degli effetti collaterali sul paziente. In particolare, i taxani (paclitaxel e il docetaxel) sono tra i farmaci antitumorali più utilizzati ed efficaci nel trattamento del tumore al seno⁵, tuttavia la loro efficacia è limitata dalla formulazione a base solvente, alla quale è associata una severa tossicità. Il solvente migliore per aumentare la solubilità in ambiente acquoso del paclitaxel è una miscela di olio di ricino etossilato (Cremophor® EL) ed etanolo. L'insieme di paclitaxel e questa miscela solvente fu chiamato Taxol®. I problemi associati all'utilizzo di Cremophor® EL sono la necessità di utilizzare speciali set di infusione per minimizzare la contaminazione da parte degli ftalati presenti nella plastica, tempi di infusione lunghi (3h) e procedure di medicazione preventive per evitare reazioni di ipersensibilità.^{6,7,8} Da queste premesse è emersa la necessità di sviluppare nuovi sistemi di veicolazione per i taxani e i farmaci idrofobici in generale. Esistono diverse tipologie di *nanocarriers*: nanoparticelle (polimeriche e metalliche), liposomi, micelle, nanotubi, dendrimeri, ecc.

Il *drug delivery* presenta numerosi vantaggi rispetto all'utilizzo del farmaco libero:

- a) Proteggere il principio attivo dalla degradazione *in vivo* e aumentarne il tempo di emivita;
- b) Migliorare l'efficacia e la specificità del farmaco e contemporaneamente ridurre gli effetti collaterali;
- c) Diminuire la dose somministrata di principio attivo;
- d) Aumentare il controllo sulla biodistribuzione grazie al *targeting* passivo ed attivo;
- e) Rendere solubili in ambiente acquoso principi attivi altamente lipofili.

Nonostante i potenziali vantaggi nell'utilizzo di *nanocarriers*, numerose barriere biologiche ne limitano l'efficacia reale (Fig. 1). Infatti, una volta in circolo i nanosistemi sono rivestiti, attraverso il processo di opsonizzazione, dalle proteine

Capitolo 1 - Introduzione

plasmatiche, formando le proteine corona che sono riconosciute e fagocitate dal sistema reticoloendoteliale o dei fagociti mononucleati (*Mononuclear Phagocyte System*, MPS). Inoltre i meccanismi di accumulo ed eliminazione del *nanocarrier*, dopo aver esplicitato la sua funzione, sono complessi e dipendono da diversi fattori come, ad esempio, la via di somministrazione.

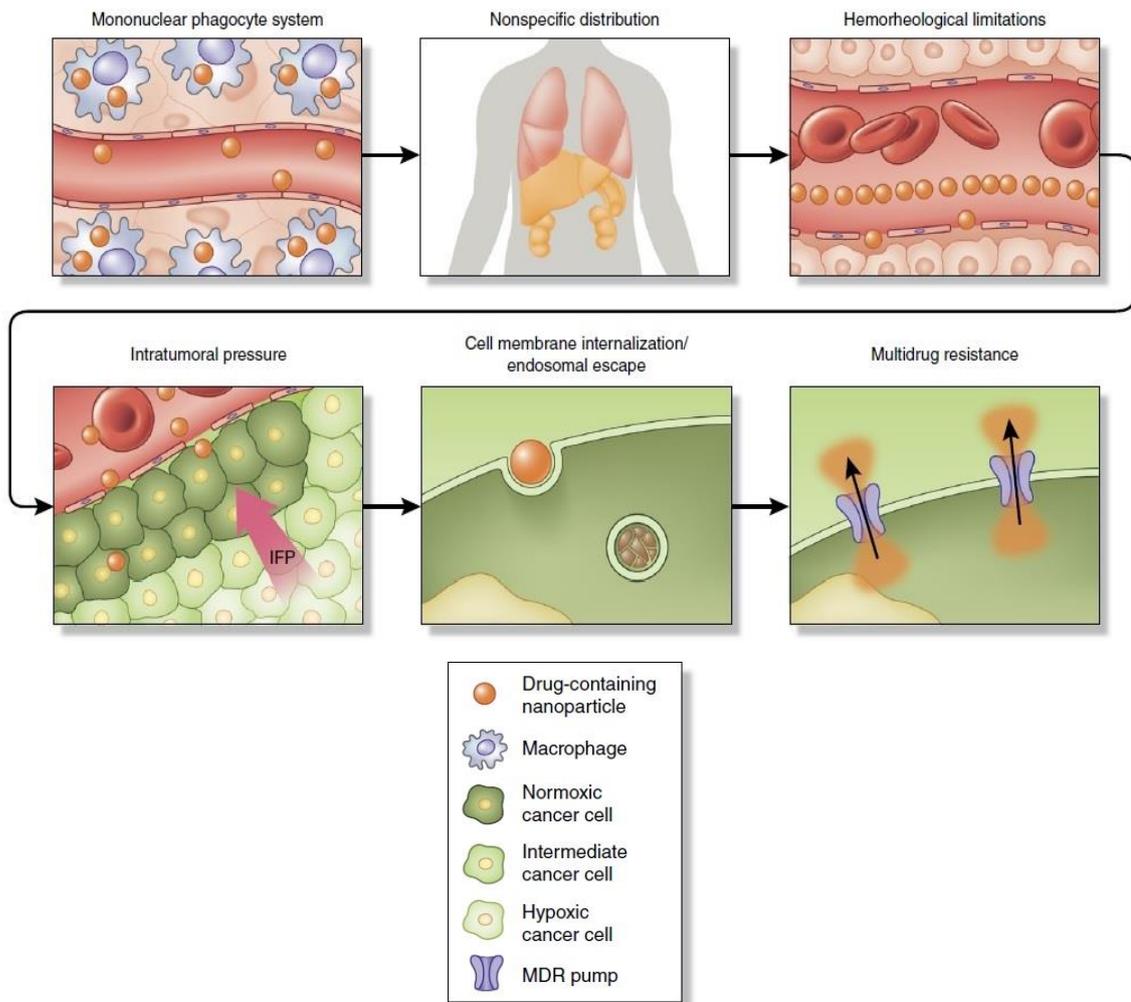


Figura 1: Rappresentazione delle principali barriere biologiche che riducono l'efficacia della terapia con nanoparticelle.⁹

La percentuale di nanoggetti che effettivamente raggiunge il tumore è definita come “efficienza di veicolazione”. Nel 2016 Wilhelm *et al.*¹⁰ hanno condotto uno studio statistico sulla letteratura degli ultimi dieci anni riguardante la nanomedicina e hanno concluso che in media solamente lo 0.7% dei nanoggetti iniettati raggiunge il tumore. Tale valore indica che per raggiungere un'efficacia soddisfacente sono necessarie

elevate quantità di nanoggetti, con conseguenti problemi di *scale-up* delle sintesi e aumento dei costi.

Una strategia per aggirare il MPS è detta “*stealth*” e consiste nel rivestire i nanoggetti con materiali, come il glicole polietilenico (PEG), in grado di non essere riconosciuti come estranei dai macrofagi.¹¹

- ***Targeting passivo***

La distribuzione preferenziale nei tessuti tumorali rispetto a quelli sani venne attribuita alla presenza di ampie fenestrazioni e scarso drenaggio linfatico dei vasi sanguigni nei tessuti malati rispetto a quelli sani. Tale effetto venne definito come EPR: *Enhanced Permeability and Retention effect*. Infatti, i tessuti tumorali necessitano di elevate quantità di nutrienti e ossigeno per sostenere la loro crescita incontrollata, per questo le cellule sintetizzano quantità molto elevate di fattore di crescita dell’endotelio vascolare di tipo A (VEGF-A), il quale promuove l’angiogenesi, cioè la formazione di nuovi vasi sanguigni da altri preesistenti. I nuovi vasi generati presentano delle fenestrazioni di dimensioni variabili tra i 200 e i 1200 nm, strettamente legate al tipo di tumore, alla sua localizzazione e al micro-ambiente tumorale.¹²

In condizioni fisiologiche, in quasi tutti i tessuti sani, i fluidi extracellulari sono drenati costantemente dal sistema linfatico, mentre nei tumori solidi il drenaggio è assente, in questo modo le macromolecole o nanoparticelle con volume idrodinamico elevato sono trattenute all’interno delle cellule tumorali (Fig. 2).¹³

Grazie all’effetto EPR è possibile ottenere concentrazioni di principio attivo molto elevate nella zona tumorale, anche 10-50 volte maggiori rispetto ai tessuti sani.¹⁴

Negli ultimi vent’anni questa caratteristica dei tumori solidi è stata la forza trainante per il *design* e lo sviluppo di nanomedicine nel trattamento antitumorale.

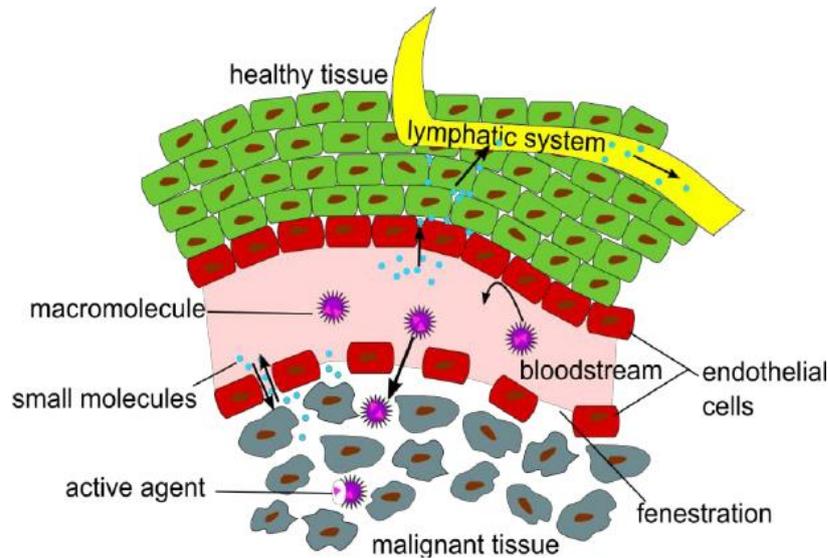


Figura 2: Schema dei meccanismi che prendono parte all'effetto EPR. Tra le cellule endoteliali dei vasi sanguigni tumorali sono presenti delle fenestrazioni che consentono l'ingresso delle nanoparticelle nei tessuti tumorali. Inoltre, l'assenza di drenaggio linfatico permette la ritenzione delle nanoparticelle e il conseguente accumulo di principio attivo. https://www.researchgate.net/profile/Hanno_Schieferstein/publication/261372022/figure/fig1/AS:296891494486016@1447795856067/Figure-1-Illustration-of-the-Enhanced-Permeation-and-Retention-EPR-effect-of.png (ultimo accesso 06/01/2017)

- **Targeting attivo**

Il *targeting* attivo si basa sull'interazione specifica delle cellule tumorali con il *nanocarrier*. In linea di principio, questo può essere ottenuto attraverso diversi approcci come ad esempio il riconoscimento selettivo di recettori localizzati sulla membrana cellulare da parte di ligandi specifici presenti sulla superficie dei *nanocarriers* che contengono il principio attivo. I ligandi possono essere proteine, anticorpi, acidi nucleici, carboidrati o piccole molecole come le vitamine.¹⁵ Le molecole bersaglio "*target*" possono essere proteine, zuccheri o lipidi presenti sulle cellule tumorali o nei tessuti malati.¹⁶ La progettazione di nanosistemi destinati al *targeting* attivo è più complicata rispetto al *targeting* passivo perché l'efficacia del nanosistema dipende dalla sua struttura, dalla tipologia di ligando e da come questo è legato al *carrier*. Inoltre si può avere legame non specifico con proteine presenti nel flusso sanguigno con conseguente perdita di efficacia della terapia.¹⁷ L'efficacia del *targeting* attivo aumenta

all'aumentare della densità dei ligandi, della concentrazione dei nanoggetti e dell'espressione dei recettori da parte delle cellule bersaglio.¹⁸

I due aspetti fondamentali che determinano l'efficienza di un sistema basato sul *targeting* attivo sono la specificità nel raggiungimento dell'obiettivo e la capacità di trasporto. Il primo dipende dalla biodistribuzione dei nanosistemi e dalla loro interazione con le cellule sane ed è definito dai leganti e dalle proprietà del nanoggetto. Il secondo è direttamente correlato al materiale di cui è fatto il *nanocarrier* e alla sua struttura.¹⁹ La difficoltà più grande di questo approccio è la necessità, per il nanosistema funzionalizzato, di trovarsi in prossimità dei recettori per consentire il riconoscimento e l'interazione.²⁰

1.1.1. Nanoparticelle

Per nanoparticella si intende una particella solida con un diametro tra i 10 e i 1000 nm.²¹ A seconda della struttura le nanoparticelle possono essere suddivise in nanocapsule, se il farmaco è confinato al centro della particella e ricoperto da una membrana polimerica, e nanosfere se il farmaco è omogeneamente disperso nella matrice polimerica.

I materiali con cui si possono ottenere nanoparticelle sono molti e di diversa natura, infatti, esistono nanoparticelle formate da metalli (Au, Ag, Cu, ecc.), da semiconduttori (Si) e da polimeri sia sintetici che naturali. La scelta del materiale più adatto dipende da molti fattori come le dimensioni, la solubilità e stabilità del farmaco in ambiente acquoso, il profilo di rilascio controllato che si intende ottenere, le cariche superficiali e l'idrofobicità delle nanoparticelle, la biocompatibilità e biodegradabilità della matrice, la non tossicità e immunogenicità del prodotto.²²

1.1.1.1. Nanoparticelle metalliche

Le nanoparticelle metalliche, in particolare di metalli nobili come oro e argento, hanno molte applicazioni nel settore biomedicale, ad esempio nell'ipertermia, nel *drug delivery*, nell'*imaging* e nella radioterapia.²³ Quando le particelle metalliche hanno dimensioni nanometriche mostrano proprietà molto diverse da quelle dei metalli *bulk*. La conseguenza più evidente delle dimensioni nanometriche dei metalli è la risonanza plasmonica di superficie localizzata (*Localized Surface Plasmon Resonance, LSPR*),

questa consiste in una oscillazione coerente degli elettroni di superficie della nanoparticella metallica indotta da una radiazione elettromagnetica. La frequenza di risonanza plasmonica è un parametro molto sensibile alle variazioni delle dimensioni, della forma, e della funzionalizzazione delle nanoparticelle come anche delle condizioni ambientali. L'elevata sensibilità nei confronti di questi parametri rende le nanoparticelle metalliche adatte all'impiego nella rilevazione di molecole e nella diagnostica.²⁴

Attualmente le nanoparticelle di oro (AuNPs) vengono impiegate nella terapia fototermica del cancro (*Photothermal Therapy*, PTT) grazie alla loro capacità di assorbire la radiazione elettromagnetica trasformandola in calore. Tra queste le AuNPs di forma cilindrica (*nanorods*) risultano essere quelle più efficaci.²⁵

Un altro metallo utilizzato per sintetizzare nanoparticelle è l'argento. Le nanoparticelle di argento (AgNPs) possiedono particolari caratteristiche chimico-fisiche come elevata conducibilità elettrica e termica, stabilità meccanica, attività catalitica, proprietà ottiche non lineari e proprietà antibatteriche.²⁶ Grazie a queste ultime le AgNPs sono diventate popolari in molti settori come quello delle plastiche, quello alimentare e tessile.

Alcuni metalli esibiscono proprietà paramagnetiche, ovvero la capacità di sviluppare un momento magnetico non nullo solamente quando vengono immerse in un campo magnetico esterno. Se le dimensioni delle particelle di tali materiali sono abbastanza piccole da contenere un singolo dominio magnetico si ha il fenomeno di superparamagnetismo. Le nanoparticelle superparamagnetiche più conosciute sono quelle a base di $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ o Fe_3O_4 , SPION (*Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles*), le quali trovano applicazione nell'*imaging* a risonanza magnetica (Magnetic Resonance Imaging, MRI), nell'ipertermia oncologica e nella radioterapia.²⁷

1.1.1.2. Nanoparticelle di polimeri sintetici

Nanoparticelle a base di polimeri sintetici sono utilizzate per il trasporto di farmaci, per la terapia fotodinamica e nella teranostica.^{28,29} L'utilizzo di polimeri sintetici è vantaggioso perché consente di aggiungere il principio attivo lipofilico direttamente durante la polimerizzazione, evitando quindi modifiche post-sintetiche.³⁰

I polimeri sintetici maggiormente utilizzati per la preparazione di nanoparticelle sono il polietilenglicole (PEG), la poli(N-(2-idrossipropil)metacrilammide) (HPMA) e il polimetilmetacrilato (PMMA).

Ad esempio, PK1 è un coniugato tra doxorubicina e HPMA che ha superato la fase I degli studi clinici nel trattamento di tumori resistenti alla chemioterapia e/o radioterapia.³¹

1.1.1.3. Nanoparticelle polisaccaridiche

I polisaccaridi sono polimeri costituiti da unità monomeriche monosaccaridiche, le cui fonti naturali possono essere vegetali (alginati, pectina) o animali (chitosano, condroitina, acido ialuronico). Le loro strutture e proprietà sono strettamente influenzate dalla composizione chimica, dai gruppi funzionali presenti e dai pesi molecolari.³² I polisaccaridi sono stabili, non tossici, biodegradabili, ottenibili da fonti rinnovabili e con processi economicamente sostenibili, inoltre i gruppi idrofilici (idrossilici, carbossilici e amminici) sono in grado di interagire non covalentemente con i tessuti biologici³³, prolungandone i tempi di permanenza all'interno dell'organismo.

Le nanoparticelle polisaccaridiche possono essere preparate mediante reticolazione covalente, reticolazione ionica, complessazione polielettrolitica (PEC) o *self-assembly*.^{34,35,36}

1.1.1.4. Liposomi

I liposomi sono delle vescicole sferiche costituite da molecole anfifiliche che, in ambiente acquoso, appaiano le loro code idrofobiche e si dispongono spontaneamente in modo da formare uno o più strati concentrici (Fig 3). Le molecole che possono formare liposomi sono il colesterolo, i fosfolipidi, i glicolipidi, i surfattanti, gli acidi grassi a lunga catena e le proteine di membrana.³⁷

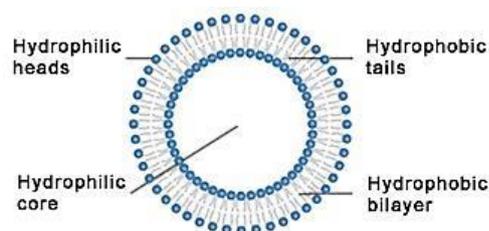


Figura 3: Struttura generica di un liposoma.

http://www.andros.com.tw/en/img_en/liposome3.jpg (16/02/2017)

I liposomi sono ampiamente utilizzati nel *drug delivery* grazie alla loro capacità di internalizzare e rendere solubili farmaci lipofili, di proteggerli dalla degradazione *in vivo*, di aumentarne la permanenza nel flusso sanguigno e di consentirne un rilascio controllato.

Ad oggi esistono molti farmaci commercializzati in formulazione con liposomi, i più noti nella terapia antitumorale sono Doxil®, contenente doxorubicina e approvato nel 1995 dall'FDA³⁸, il suo derivato non pegylato, Myocet®³⁹, e DaunoXome®, a base di daunorubicina.⁴⁰

1.1.1.5. Nanoparticelle proteiche

Le proteine sono candidati ideali per la sintesi di nanoparticelle in quanto biodegradabili, biocompatibili e facilmente funzionalizzabili⁴¹, inoltre la loro anfifilicità permette di interagire sia con l'ambiente acquoso che con farmaci lipofili.⁴² L'utilizzo di nanoparticelle proteiche nel *drug delivery* è favorito anche dall'eliminazione di solventi necessari per solubilizzare i principi attivi e dal potenziale aumento della concentrazione intratumorale del farmaco.⁴³ Sono state utilizzate con successo varie proteine, idrosolubili come albumina sierica umana (HSA) e bovina (BSA), e insolubili come zeina e gliadina.^{44,45}

L'albumina è la principale proteina presente nel plasma ed è coinvolta nel mantenimento della pressione osmotica e nel trasporto dei nutrienti alle cellule. Ha un peso molecolare di 66.5 kDa e presenta un'elevata solubilità in acqua e in soluzione saline diluite, a pH 7.4 la solubilità è pari al 40% w/v. È stabile tra pH 4 e 9 e può essere scaldata a 60°C per 10 ore senza che si degradi.⁴⁶ Le nanoparticelle a base di albumina sono biodegradabili, facili da sintetizzare, hanno dimensioni ben definite e presentano numerosi gruppi funzionali (tiolici, amminici, carbossilici).²²

Il primo prodotto commerciale a scopo chemioterapico a base di nanoparticelle di albumina umana (HSA) caricate con paclitaxel fu l'Abraxane® (nabTM-paclitaxel), (Fig. 4).

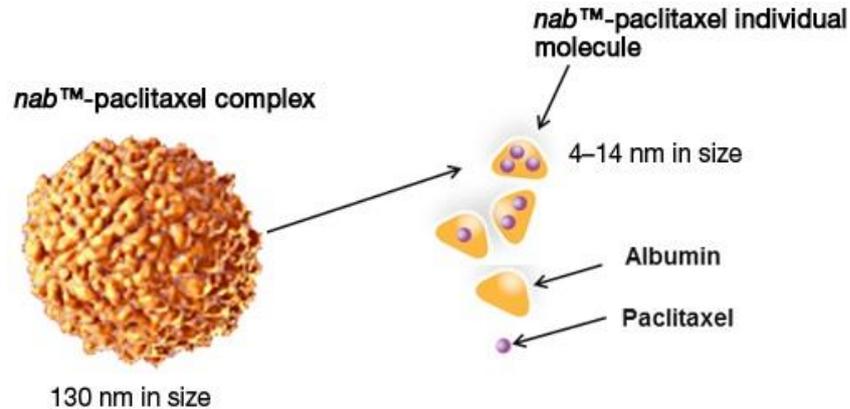


Figura 4: Rappresentazione schematica dell'Abraxane. http://www.abraxane.eu/wp-content/uploads/2013/05/nano_2.jpg (ultimo accesso 26/02/2017).

L'Abraxane è stato approvato nel 2005 dall'FDA per il trattamento del cancro al seno. L'impiego di tali nanoparticelle ha consentito l'eliminazione della miscela solvente (Cremophor EL) diminuendo l'insorgenza di reazioni di ipersensibilità e riducendo notevolmente i tempi di infusione rispetto alla terapia con Cremophor EL (30 minuti vs 3 ore).

1.1.2. Metodi di preparazione di nanoparticelle proteiche

La formazione di nanoparticelle proteiche è basata sull'equilibrio tra forze attrattive e repulsive presenti nella proteina. L'aumento della denaturazione e la diminuzione delle interazioni idrofobiche intramolecolari sono fondamentali per la formazione delle nanoparticelle.⁴⁷ Durante la formazione di nanoparticelle, le proteine subiscono dei cambiamenti conformazionali che dipendono dalla concentrazione, dal pH, dalla forza ionica e dal tipo di solvente. La denaturazione delle proteine espone all'ambiente esterno i gruppi funzionali reattivi, come quelli tiolici e amminici, che possono successivamente essere reticolati chimicamente o termicamente portando alla formazione di nanoparticelle stabili.²²

1.1.2.1. Desolvatazione

La desolvatazione (Fig. 5) è un metodo basato sulla variazione di solubilità di una proteina in solventi diversi. Infatti, l'aggiunta di un non-solvente ad una soluzione di proteina, provoca cambiamenti conformazionali, con conseguente riduzione della solubilità e precipitazione. Quando le nanoparticelle si sono formate viene aggiunto un agente reticolante, ad esempio glutaraldeide, che mediante la formazione di legami covalenti, stabilizza la struttura nanoparticellare. La desolvatazione per produrre nanoparticelle di albumina venne utilizzata per la prima volta nel 1993.⁴⁸ Gli agenti desolvatanti più comunemente utilizzati sono l'etanolo e l'acetone. Le dimensioni delle nanoparticelle sono modulabili in base alle condizioni operative, all'agitazione, alla specie desolvatante, al rapporto solvente/antisolvente, al pH della soluzione e alla concentrazione salina.^{48,49}

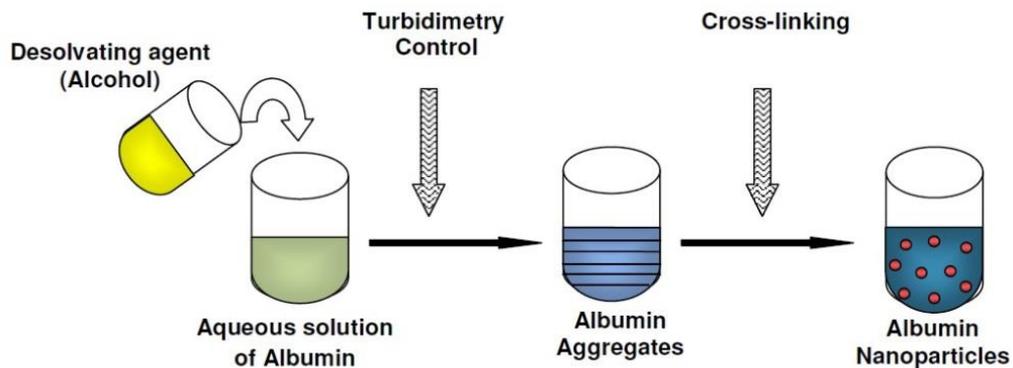


Figura 5: Metodo di preparazione per desolvatazione di nanoparticelle di albumina.⁴¹

1.1.2.2. Emulsione

Questo metodo prevede la formazione di un'emulsione tra una soluzione acquosa di proteina e una fase oleosa, in presenza di un tensioattivo (fosfatidilcolina, Span 80 ecc.) (Fig. 6).⁵⁰ Le nanoparticelle, che si formano all'interfaccia tra le due fasi, vengono stabilizzate da un agente reticolante ed infine la fase oleosa viene allontanata utilizzando solventi organici. Le dimensioni delle nanoparticelle aumentano all'aumentare della concentrazione iniziale e del rapporto volumetrico tra fase acquosa e oleosa. Questa metodica presenta il grande svantaggio di utilizzare solventi organici e surfattanti che successivamente devono essere rimossi. Inoltre le nanoparticelle ottenute per emulsione

hanno dimensioni generalmente più elevate rispetto a quelle ottenute per desolvatazione.⁵¹

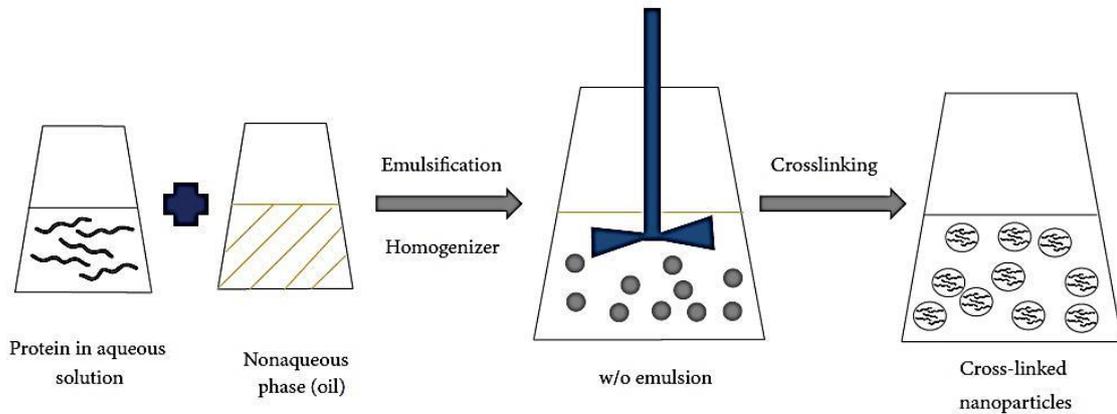


Figura 6: Metodo di preparazione in emulsione di nanoparticelle proteiche.²²

1.1.2.3. *Elettrospray Drying*

L'*elettrospray drying* è una tecnica usata per disperdere i liquidi in goccioline di dimensioni micro- o nano-metriche. Una soluzione liquida o un fuso polimerico, con conducibilità elettrica sufficiente, viene estruso attraverso un ago e sottoposto all'azione di un campo elettrico.⁵² La differenza di potenziale impartita da due elettrodi genera una forza che si oppone alla tensione superficiale che tende a trattenere il fluido all'interno del capillare. All'aumentare dell'intensità del campo, il menisco del liquido assume una caratteristica forma a cono, chiamato "cono di Taylor" (Fig. 7). Quando le forze elettrostatiche superano la tensione superficiale dalla sommità di questo cono esce un sottilissimo getto di liquido che successivamente viene disgregato in un aerosol di goccioline cariche elettrostaticamente.⁵³ La capacità di produrre particelle nanometriche monodisperse con relativa facilità rende l'*elettrospray drying* la migliore tra le tecniche basate su aerosol. Il vantaggio più importante di questa tecnica è l'ottenimento di una polvere nanometrica istantaneamente asciutta, eliminando pertanto la necessità di successivi procedimenti di rimozione del solvente.

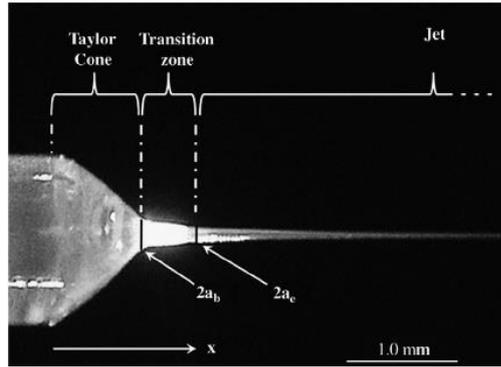


Figura 7: Formazione del cono di Taylor.⁵⁴

1.1.2.4. Self-assembly

Self-assembly è il processo per cui i componenti di un sistema, siano essi molecole, polimeri, colloidali o particelle macroscopiche, si organizzano spontaneamente in strutture ordinate e/o funzionali.⁵⁵

Il processo di *self-assembly* di nanoparticelle proteiche sfrutta la presenza concomitante di residui idrofilici e idrofobici sulla stessa proteina. In ambiente acquoso le proteine formano strutture micellari nelle quali i domini idrofobici sono rivolti verso il nucleo mentre in superficie si orientano i domini idrofilici (Fig. 8).

Sfruttando l'instaurarsi di interazioni tra i residui idrofobici della proteina (leucina, fenilalanina) con molecole lipofili è possibile caricare il *core* idrofobico della nanoparticella con principi attivi lipofili, che nella loro forma libera sono insolubili in ambiente acquoso.

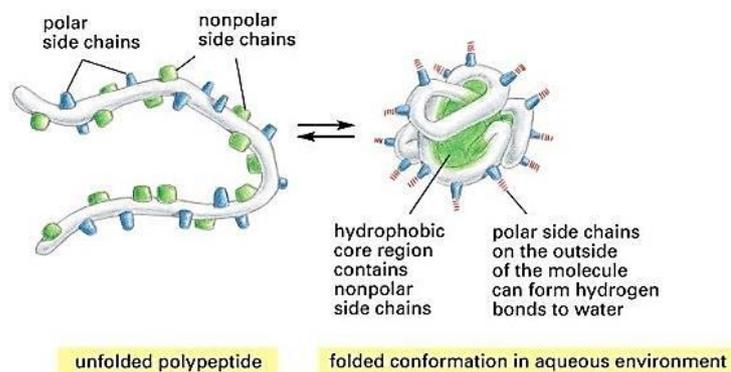


Figura 8: Ripiegamento delle proteine in ambiente acquoso.

<http://images.iop.org/objects/bio/news/1/5/20/BM4SL3.jpg> (ultimo accesso 07/01/2017)

1.2. Cheratina

1.2.1. Struttura e ruolo fisiologico

Le cheratine sono un'ampia famiglia di proteine fibrose, insolubili e ad alto contenuto di zolfo che vengono sintetizzate nelle cellule di molte specie animali principalmente con funzione strutturale. La cheratina è sintetizzata e accumulata all'interno dei cheratinociti, le principali cellule dell'epidermide, e rappresenta una tra le proteine più abbondanti nei filamenti intermedi che, insieme a microtubuli e microfilamenti di actina compongono il citoscheletro (Fig. 9). Il citoscheletro svolge una funzione strutturale organizzando gli organelli nel citoplasma, permette alla cellula di muoversi e prende parte alla divisione cellulare, inoltre mediante i desmosomi permette l'ancoraggio tra le diverse cellule.

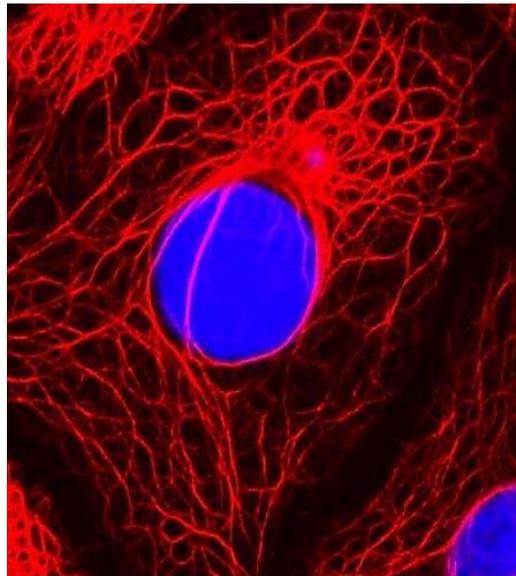


Figura 9: Immagine al microscopio del citoscheletro di cellule epiteliali. Filamenti di cheratina (rosso) e nucleo cellulare (blu).⁵⁶

I filamenti intermedi sono delle superstrutture fibrose composte da unità polipeptidiche diverse tra loro che però presentano una struttura simile composta da una testa N-terminale, un dominio centrale lineare ad α -elica ed una coda C-terminale. Due catene polipeptidiche si superavvolgono con orientazione parallela in una spirale, definita *coiled-coil*, in modo che i residui idrofobici delle due α -eliche si trovino appaiati mentre

i residui idrofili siano rivolti verso l'esterno.⁵⁷ I dimeri a loro volta si affiancano in modo sfalsato e con orientamento antiparallelo per formare dei tetrameri, che si allineano in protofilamenti. Il filamento intermedio è l'unione di più protofilamenti (Fig. 10).

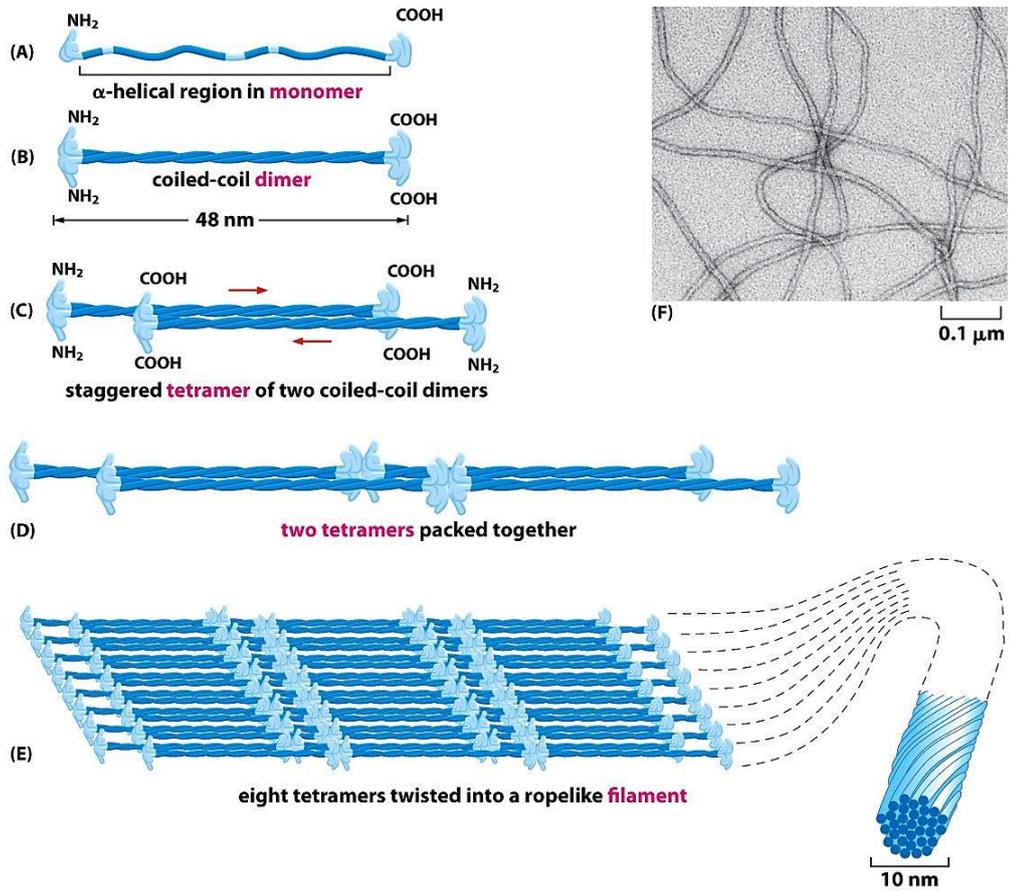


Figure 17-3 Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)

Figura 10: Schema di assemblaggio di un filamento a partire dai polipeptidi.⁵⁸

La cheratina gioca un ruolo fondamentale anche nella barriera placentare⁵⁹, nella prevenzione dell'apoptosi⁶⁰, nella regolazione della sintesi di proteine e nella crescita cellulare.⁶¹

1.2.2. Classificazione, composizione amminoacidica e caratteristiche

L'ampia famiglia delle cheratine si può suddividere in cheratina “*hard*” e “*soft*”. La cheratina *hard* contiene molto zolfo e costituisce i capelli, la lana, le unghie, gli zoccoli e le corna degli animali. La cheratina *soft* contiene meno zolfo e costituisce parte dei filamenti intermedi riscontrabili nelle cellule epiteliali.

La cheratina contenuta nei capelli e nella lana è composta da tre tipologie di cheratina:

- a) α -cheratine: hanno un peso molecolare che tra i 60 e gli 80 kDa, la loro struttura è un'alfa-elica, contengono relativamente poco zolfo, si organizzano in microfibrille andando a comporre la corteccia (parte interna del capello) e rappresentano il 50-60% del capello;⁶²
- b) β -cheratine: svolgono una funzione protettiva infatti sono la componente principale della cuticola (rivestimento protettivo del capello), la loro estrazione è difficoltosa e i prodotti estratti non hanno impieghi interessanti;
- c) γ -cheratine: sono proteine globulari, hanno un peso molecolare di circa 15 kDa. Compongono la matrice che circonda le microfibrille, grazie al loro elevato contenuto di zolfo possono formare legami disolfuro, conferendo compattezza alla struttura globale.

Gli amminoacidi più presenti nella cheratina sono serina, acido glutammico e cisteina.⁶³ La concentrazione elevata di residui cisteinici (dal 7 al 20%, rispetto agli amminoacidi totali)⁶⁴ distingue la cheratina dalle altre proteine e consente la formazione di molti legami a ponte disolfuro. L'inerzia chimica e l'insolubilità in comuni solventi della lana è riconducibile alla struttura delle sue fibre che viene mantenuta compatta grazie ai numerosi ponti disolfuro, oltre a legami a idrogeno, alle interazioni elettrostatiche e interazioni idrofobiche (Fig. 11).

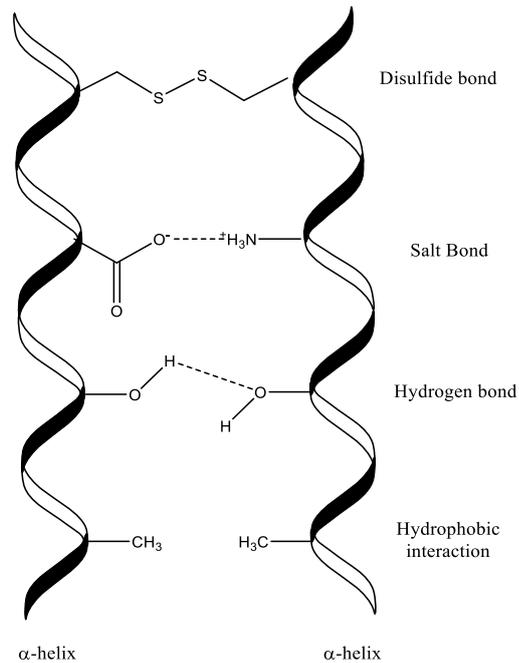


Figura 11: Interazioni tra due α -eliche di cheratina

La cheratina presenta sequenze amminoacidiche, leucina-acido aspartico-valina (LDV) e arginina-glicina-aspartato (RGD), tipiche delle proteine della matrice extracellulare, che promuovono l'adesione, la diffusione e la crescita cellulare.⁶⁵

1.2.3. Proprietà

La cheratina ha caratteristiche tali che ne consentono la facile manipolazione e trasformazione in oggetti tridimensionali, inoltre la sua biocompatibilità e biodegradabilità garantiscono un utilizzo sicuro in molti ambiti.⁶⁶

La cheratina possiede una buona resistenza termica, anche senza reticolazione, che le consente di essere sottoposta a trattamenti chimici e a successivi lavaggi senza essere degradata. Ad esempio la cheratina non viene degradata durante l'estrazione a 100°C né durante *spray drying* a 60°C.⁶⁷ Le proprietà termiche della cheratina estratta da lana dipendono dal livello di umidità presente al suo interno⁶⁸, in particolare all'aumentare del contenuto di umidità si nota una diminuzione della temperatura di transizione vetrosa e quindi un aumento della mobilità della struttura proteica.⁶⁷

La cheratina ha un'elevata biocompatibilità, infatti non provoca reazioni da parte del sistema immunitario, non è citotossica, promuove l'adesione e la proliferazione cellulare.

Inoltre, la cheratina è biodegradabile⁶⁹, pur essendo la sua velocità di degradazione *in vivo* da parte delle proteasi inferiore rispetto a quella di altre proteine.

La cheratina possiede il vantaggio, rispetto ad altre proteine, di poter essere ricavata da materie prime rinnovabili e di scarto, come lana⁷⁰, piume⁷¹ o capelli⁶³, ed essere poi trasformata in prodotti ad alto valore aggiunto. Gli attuali metodi di smaltimento degli scarti a base di cheratina, incenerimento o trasformazione in mangimi, non sono efficienti rispettivamente a causa dell'autoestinguenza (Limiting Oxygen Index > 21)⁷² e dei trattamenti ad alta pressione e temperatura necessari che però riducono i valori nutritivi.⁷³

La cheratina è altamente funzionalizzabile, grazie alla presenza nella sua struttura di gruppi carbossilici (COOH), amminici (NH₂), ammidici (CONH₂), alcolici (OH), tiolici (SH) o solfonici (SO₃H).

1.2.4. Metodi di estrazione

La struttura compatta delle sue fibre e l'abbondanza di interazioni determinano l'inerzia chimica della lana e la sua insolubilità in solventi comuni.

L'estrazione di proteine dalla lana implica l'uso di agenti ossidanti o riducenti per la scissione dei ponti disolfuro presenti nella cistina e l'aggiunta di urea per la rottura dei legami a idrogeno.

L'utilizzo di ossidanti come cloro, acido ipocloroso e acido peracetico permette un'ossidazione completa della cistina, mentre l'azione di acido permanganico o ipoclorito non porta oltre al 25% di ossidazione.⁷⁴ Si ottengono delle proteine ricche in acido cistinico dette cheratina ossidata o "cheratosi". Grazie alla presenza di gruppi solfonici acidi (SO₃H), la cheratina ossidata è solubile in acqua, igroscopica, sensibile all'idrolisi a pH estremi, non può riformare i ponti disolfuro e per questo è degradabile velocemente *in vivo*.⁷⁵

La reazione con riducenti come acido tioglicolico, ditiotreitolo o 2-mercaptoetanololo, invece genera la cheratina ridotta, ricca in cisteina, meno idrofilica di quella ossidata,

più resistente a pH estremi, stabile per periodi più lunghi e che può essere ossidata per rigenerare i legami disolfuro.

Dal momento che la maggior parte degli agenti riducenti e ossidanti risulta nociva, in alternativa l'estrazione della cheratina può essere ottenuta tramite il processo di solfitolisi. I legami S-S vengono scissi in residui di cisteina e residui cistein-S-solfonati (sali di Bunte), solubili in acqua, tramite ioni solfito, bisolfito o metabisolfito anche se con questo metodo le rese di estrazione risultano inferiori.⁷⁶

L'analisi elettroforetica assicura che il trattamento di solfitolisi condotto a 65°C, a pH 7 per 5 ore non porta alla degradazione della cheratina ridotta.

L'aggiunta di sodio dodecilsolfato (SDS), un surfattante, è necessaria per aumentare la stabilità della soluzione grazie alla solvatazione delle proteine, che ne evita l'aggregazione pur non influenzando la resa di estrazione.

1.2.5. Applicazioni

Le molteplici proprietà della cheratina ne hanno promosso lo studio per svariate applicazioni, non solo in campo medicale. La cheratina può essere utilizzata in ambito cosmetico⁷⁷, in formulazione nelle schiume per estintori⁷⁸, nel packaging⁷⁹, in sistemi di filtrazione attiva delle acque e di purificazione dell'aria⁸⁰, nell'industria tessile⁸¹ e nel *wound-healing*⁸².

L'ingegneria tissutale ha lo scopo di rigenerare tessuti ed organi grazie alla crescita cellulare su supporti polimerici chiamati *scaffolds*. Per *scaffold* si intende un supporto poroso tridimensionale realizzato in un materiale biocompatibile e bioerodibile sul quale far avvenire l'adesione delle cellule e la successiva ricrescita fino alla formazione del tessuto e in maniera tale che esso si biodegradi a velocità controllata simile a quella di ricrescita. Risale al 2001 in Giappone, la prima applicazione di uno *scaffold* cheratinico per la proliferazione cellulare.⁸³

Le caratteristiche che uno *scaffold* deve avere sono:

- porosità elevata ed interconnessione tra i pori in modo da favorire la crescita cellulare, il trasporto delle sostanze nutritive e l'eliminazione delle sostanze di rifiuto;
- biocompatibilità elevata;

- biodegradabilità controllata;
- superficie chimicamente adatta all'adesione, alla proliferazione e alla differenziazione delle cellule;
- proprietà meccaniche simili a quelle dei tessuti che si devono riprodurre sullo *scaffold*;
- riproducibilità, in modo semplice, in diverse forme e dimensioni.

Gli *scaffold* possono presentarsi in diverse forme:

- **Spugne:** le spugne sono strutture tridimensionali rigide ad elevata porosità e con pori omogeneamente distribuiti e interconnessi (Fig. 12). Le spugne di cheratina possono essere ottenute tramite liofilizzazione di una soluzione acquosa e utilizzate nella medicina rigenerativa.^{84,85}

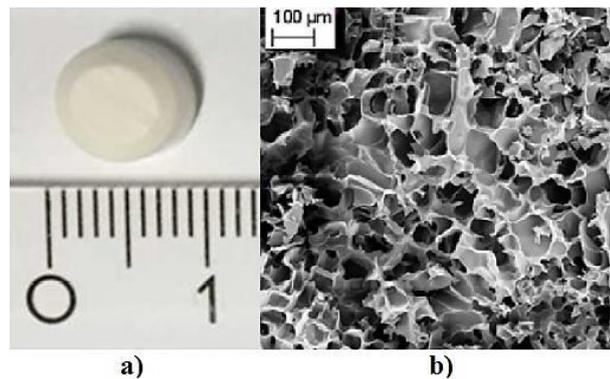


Figura 12: Aspetto macroscopico di una spugna di cheratina (a) e visualizzazione al microscopio elettronico a scansione (b).⁸⁴

- **Film:** i film sono delle sottili pellicole ottenute tramite deposizione uniforme (*casting*) ed essiccamento di una soluzione di proteina, sia pura⁶⁹ sia in formulazione con altri polimeri naturali⁸⁶ o sintetici.⁷⁶
- **Fibre:** la cheratina può essere processata, mediante elettrofilatura, in fibre micrometriche o nanometriche dall'elevata area superficiale ed elevata porosità.^{87,88}
- **Idrogel:** un idrogel è un reticolo polimerico tridimensionale e idrofilo capace di assorbire grandi quantità di acqua o fluidi biologici.⁸⁹ Idrogel a base di cheratina

sono stati studiati per la medicina rigenerativa, in particolare per la rigenerazione di nervi periferici⁹⁰, di vasi sanguigni e nell'emostasi (HemCom® e Quickclot®).⁹¹

1.3. Istoni e deacetilasi istoniche (HDACs)

Il DNA nel genoma non è presente in forma libera ma è associato a istoni, cioè delle proteine basiche attorno alle quali il DNA si avvolge in maniera sinistrorsa. L'associazione tra DNA e istoni prende il nome di cromatina. Gli istoni sono carichi positivamente a causa della presenza di gruppi funzionali amminici protonati, appartenenti a residui lisinici. Gli istoni si organizzano in ottameri detti nucleosomi, ognuno dei quali è costituito da quattro coppie di istoni (H2A, H2B, H3, H4) attorno ai quali si avvolgono circa 146 coppie di basi azotate del DNA.⁹² È poi presente un ulteriore istone (H1) che svolge una funzione aggregativa tra i nucleosomi e consente la formazione di una fibra cromatinica di circa 30 nm di diametro (Fig. 13).

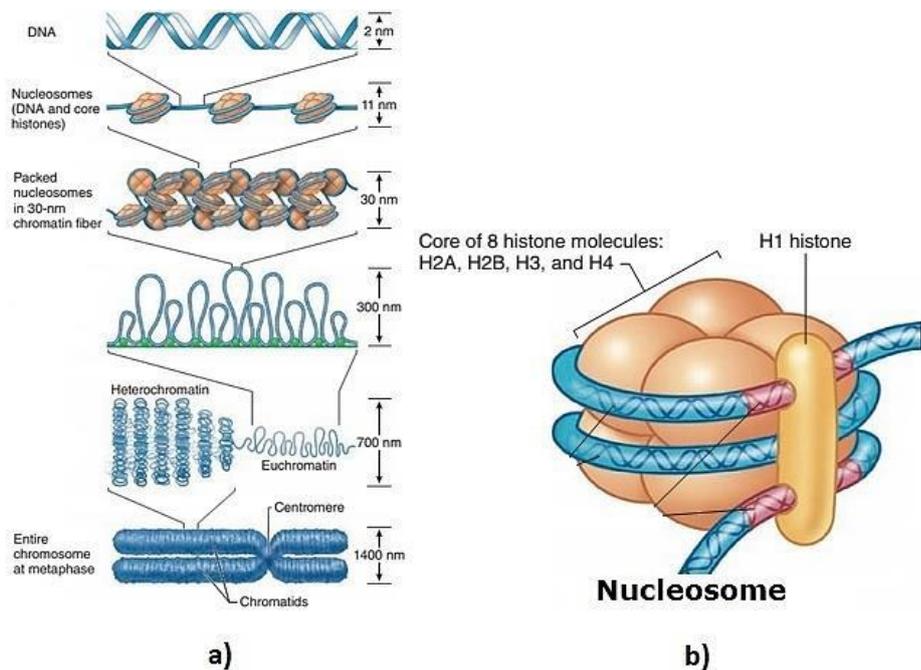


Figura 13: a) Schema di assemblaggio di un cromosoma partendo dal DNA. b) Struttura di un nucleosoma. <http://www.getmededu.com/chromatin.html> (ultimo accesso 25/01/2017)

La struttura della cromatina è dinamica e regola l'attività trascrizionale. Nel 1964 Allfrey *et al.*⁹³ ipotizzarono che la regolazione della struttura della cromatina e delle sue

Capitolo 1 - Introduzione

funzioni dipendesse dall'acetilazione degli istoni. La cromatina può presentarsi in due conformazioni, una aperta e una chiusa, ed il passaggio da una all'altra è dovuto al grado di acetilazione dei residui lisinici degli istoni. Infatti, l'iperacetilazione comporta una maggiore neutralizzazione della carica positiva istonica e quindi un rilassamento della conformazione. Quando la cromatina assume questa conformazione più aperta, è chiamata eucromatina e grazie a questa forma è promossa la trascrizione.⁹⁴ Viceversa l'ipoacetilazione porta a un impaccamento della cromatina in una struttura chiamata eterocromatina. La cromatina, quindi, può presentare due regioni, l'eucromatina contenente la maggior parte dei geni attivi e l'eterocromatina contenente in preponderanza geni inattivi. Il passaggio da una forma all'altra è un processo enzimatico reversibile che vede come protagonisti due classi di enzimi, le istone acetiltransferasi (HATs) e le istone deacetilasi (HDACs). Il nome di questi enzimi deriva dal fatto che inizialmente furono identificati per la loro funzione di rimozione di gruppi acetilici dai residui lisinici sulle code N-terminali degli istoni.⁹⁵

Uno squilibrio tra l'attività di HDAC e HAT, con conseguente ipoacetilazione istonica, può essere un passaggio fondamentale durante la carcinogenesi.^{96,97,98} Nello specifico: una sovraespressione di HDACs è stata rilevata in molti tumori solidi.^{96,99}

La famiglia delle HDACs è vasta e comprende almeno 18 elementi, suddivisi in 4 classi secondo il criterio di omologia con le relative HDACs dei lieviti e in base ad analisi filogenetiche:^{100,101}

- **Classe 1.** Comprende le HDACs 1,2,3 e 8. Sono formate dai 350 ai 500 amminoacidi. Si trovano principalmente nel nucleo e sono conosciuti come co-repressori trascrizionali;
- **Classe 2.** Comprende le HDACs 5, 6, 7, 9 e 10. Sono formate da circa 1000 amminoacidi. HDAC6 e HDAC10 contengono due domini catalitici;
- **Classe 3.** Chiamate anche sirtuine (SIRT1-7), comprende 7 proteine NAD⁺-dipendenti e strutturalmente non correlate a quelle delle altre classi;¹⁰²
- **Classe 4.** Comprende solamente la HDAC11.

1.4. Inibitori delle deacetilasi istoniche (HDACi)

Gli inibitori delle deacetilasi istoniche (HDACi) sono un'ampia classe di molecole che mostrano attività antitumorale, riconducibile alla capacità di influenzare diversi processi cellulari che, nelle cellule neoplastiche, sono fuori controllo. Anche se i meccanismi specifici di azione non sono ancora chiari, è evidente che l'inibizione delle HDACs ha diverse conseguenze sulle cellule tumorali tra le quali l'arresto del ciclo cellulare, la differenziazione, l'induzione dell'apoptosi e la riduzione dell'angiogenesi.¹⁰³

Il trattamento con HDACi, sia di cellule sane sia tumorali, genera un accumulo confrontabile di istoni H2A, H2B, H3 e H4^{104,105,106}, nonostante ciò, gli HDACi hanno un effetto più marcato sulle cellule tumorali rispetto a quelle normali, in termini di apoptosi e inibizione della crescita cellulare.^{107,108}

Un elevato numero di HDACi è stato ottenuto da fonti naturali o per via sintetica. La grande varietà strutturale fra le molecole che appartengono a questa classe può far pensare che esse agiscano secondo diversi meccanismi. Gli inibitori delle HDACs possono essere classificati in quattro grandi classi in base alla loro struttura.

Acidi idrossamici: sono una classe di molecole che presentano un gruppo idrossilico legato all'azoto di un gruppo ammidico.

A questa categoria appartengono la tricostatina A (TSA) e l'acido idrossamico suberoilamido (SAHA)(Fig. 14).

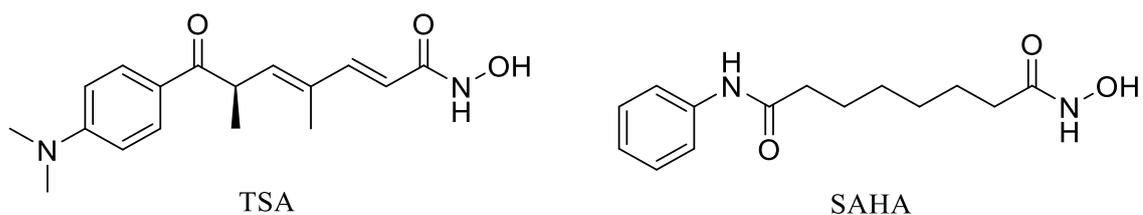


Figura 14: Strutture di TSA e SAHA.

TSA è stato il primo acido idrossamico naturale del quale si hanno evidenze d'inibizione delle HDACs già a basse concentrazioni (nM)¹⁰⁹, induce differenziazione e inibisce la crescita tumorale, pur avendo effetti trascurabili sulle cellule normali.¹¹⁰

Un altro acido idrossamico è il SAHA (Vorinostat), strutturalmente simile al precedente, che rappresenta il primo inibitore delle HDACs approvato dall'FDA per il trattamento del linfoma cutaneo a cellule T.¹¹¹

Acidi grassi a corta catena: a questa categoria appartengono butirrato, fenilbutirrato, acido valproico (Fig. 15) e i loro derivati. La loro attività inibitoria nei confronti delle HDACs è relativamente debole, sono richieste concentrazioni mM per ottenere un effetto significativo.¹¹² Per questo motivo l'interesse nei loro confronti non è molto elevato.

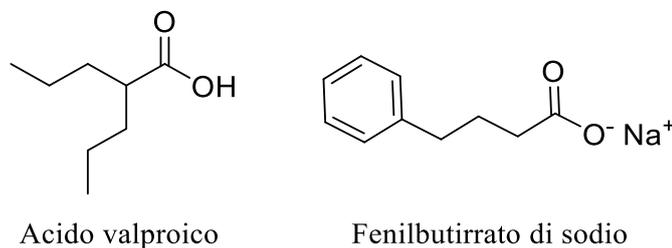
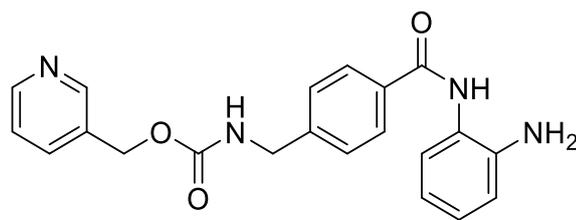


Figura 15: Strutture di acido valproico e fenilbutirrato di sodio.

Benzammidi: MS-275 (Fig. 16) è una benzammide sintetica che ha raggiunto la fase II dei test clinici e presenta attività inibitoria verso HDAC1, HDAC2 e HDAC3 in concentrazioni μM . È usata nel trattamento di leucemie, linfomi e tumori solidi.^{113,114}



MS-275

Figura 16: Struttura di MS-275.

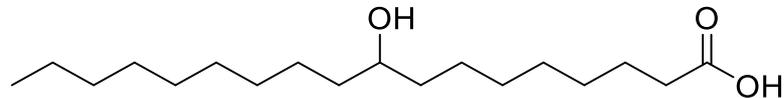
Peptidi ciclici: sono gli HDACi strutturalmente più complessi. In questa categoria rientrano depsipeptide, apicidina e acidi idrossamici ciclici contenenti gruppi peptidici. Il primo è anche conosciuto come romidespin (FK228), una molecola naturale estratta da *Chromobacterium violaceum*¹¹⁵ e che nel 2009 è stata approvata dall'FDA per il trattamento del linfoma cutaneo a cellule T.

1.5. Acido 9-idrossistearico (9-HSA)

I derivati idrossilici degli acidi grassi a lunga catena, prodotti per via enzimatica o meno, hanno ricevuto sempre più attenzione nel corso degli anni grazie ai loro effetti, *in vitro* e *in vivo*, sulla sintesi del DNA e sulla proliferazione cellulare.^{116,117}

Alcuni di questi acidi grassi sono prodotti endogeni cellulari e la loro quantità nelle cellule tumorali è diversa rispetto alle cellule sane. Studi *in vitro* hanno evidenziato che nelle cellule tumorali la loro quantità diminuisce all'aumentare della densità cellulare mentre in quelle sane la quantità aumenta proporzionalmente alla proliferazione cellulare.¹¹⁸

Due acidi grassi in particolare, 9-idrossistearico (9-HSA) (Fig. 17) e 10-idrossistearico (10-HSA), sono stati individuati come prodotti endogeni della perossidazione lipidica nelle cellule del carcinoma polmonare di Lewis (C108) *in vitro* e la loro concentrazione è risultata diminuire proporzionalmente all'aumentare della confluenza cellulare.¹¹⁸ Sulla base di queste evidenze sperimentali è stato ipotizzato che 9-HSA e 10-HSA avessero un ruolo preciso nel controllo delle funzioni cellulari.



Acido 9-idrossiottadecanoico
(Acido 9-idrossistearico)

Figura 17: Struttura dell'acido-9-idrossistearico (9-HSA).

Successivamente Masotti *et al.*¹¹⁹ hanno esteso i loro studi a cellule tumorali umane HT29 (adenocarcinoma del colon) e a cellule embrionali intestinali (I-407), utilizzate come controllo. In entrambe le linee cellulari sono stati nuovamente riscontrati 9-HSA e 10-HSA, la loro concentrazione endogena nelle I-407 aumenta proporzionalmente alla proliferazione cellulare, mentre nelle HT29 diminuisce all'aumentare della densità cellulare. Questa è un'ulteriore conferma della relazione tra questi acidi grassi e la proliferazione delle cellule neoplastiche.

Nello stesso studio, la somministrazione esogena di una miscela di 9-HSA e 10-HSA, sulla linea C108, ha mostrato che l'azione antiproliferativa è funzione della concentrazione somministrata e del tempo di coltura. Nello specifico, fino a una

Capitolo 1 - Introduzione

concentrazione di 50 μM si osserva solamente un effetto citostatico, mentre per concentrazioni pari a 100 μM si osserva un effetto citotossico dopo 2-3 giorni. Nel caso in cui sia ripristinato il mezzo di coltura originale, senza acido idrossistearico, le cellule tumorali riprendono a proliferare.

L'effetto di HSA sul ciclo cellulare è diverso tra HT29, C108 e I-407, infatti, nelle prime avviene un blocco in G_0/G_1 mentre nelle seconde si ha accumulo cellulare in G_2/M , infine nelle ultime si ha un effetto citotossico solo per concentrazioni superiori a 150 μM . L'evidenza che HSA agisce secondo un meccanismo biochimico comune alle fasi G_0/G_1 e G_2/M è alla base dell'ipotesi che esso influenzi l'attività di una chinasi ciclina dipendente (CDK1), in particolare HSA ne inibisce l'attività. CDK1 è un enzima necessario per la cellula nell'ingresso nella fase mitotica, nella progressione in G_1 e nella transizione G_1/S .¹¹⁹

La miscela di 9-HSA e 10-HSA può avere un effetto citostatico o citotossico a seconda delle linee cellulari tumorali alle quali è somministrata.¹¹⁹

Inoltre, la somministrazione separata di 9-HSA e 10-HSA in cellule HT29 ha mostrato che i due isomeri hanno effetti diversi. Entrambi provocano un blocco in fase G_0/G_1 , il 9-HSA genera un blocco più importante rispetto al 10-HSA, inoltre l'isomero 9 porta ad apoptosi mentre il 10-HSA a necrosi. Il forte blocco in G_0/G_1 è riconducibile all'espressione, indotta da 9-HSA, della proteina $p21^{\text{WAF1}}$, una proteina che regola in modo negativo il ciclo cellulare. L'espressione di $p21^{\text{WAF1}}$ è generalmente indotta da p53, una proteina in grado di arrestare temporaneamente il ciclo cellulare o indurre apoptosi. L'espressione di $p21^{\text{WAF1}}$ indotta da 9-HSA è indipendente da p53.¹²⁰ Inoltre è stato dimostrato che 9-HSA necessita di $p21^{\text{WAF1}}$ per esercitare la sua funzione di controllo della crescita cellulare.¹²⁰ L'espressione della proteina $p21^{\text{WAF1}}$ è parzialmente regolata dall'acetilazione istonica della zona di cromatina associata al gene $p21^{\text{WAF1}}$. Calonghi *et al.*¹²¹ hanno ipotizzato che il bersaglio di 9-HSA sia l'enzima istone deacetilasi 1 (HDAC1), il quale viene inibito con conseguente iperacetilazione degli istoni, e che il meccanismo di azione sia simile a quello di classici inibitori delle istone deacetilasi (HDACi), come alcuni acidi idrossamici. Da studi *in vitro*¹²² è emerso che la somministrazione di una miscela racemica di (R)-9-HSA e (S)-9-HSA ha un effetto antiproliferativo sulle cellule HT29 grazie all'interazione di 9-HSA con il sito catalitico di HDAC1 (Fig. 18) e conseguente mancata formazione del complesso HDAC1/ciclina

D1. L'interazione con HDAC1 è energeticamente differente per i due enantiomeri di 9-HSA, in particolare l'energia libera di legame stimata per l'enantiomero *R* è pari a -6.31 kcal/mol mentre quella della forma *S* è +4.98 kcal/mol. Questa evidenza suggerisce l'importanza della configurazione assoluta nell'interazione tra HDAC1 e substrato.

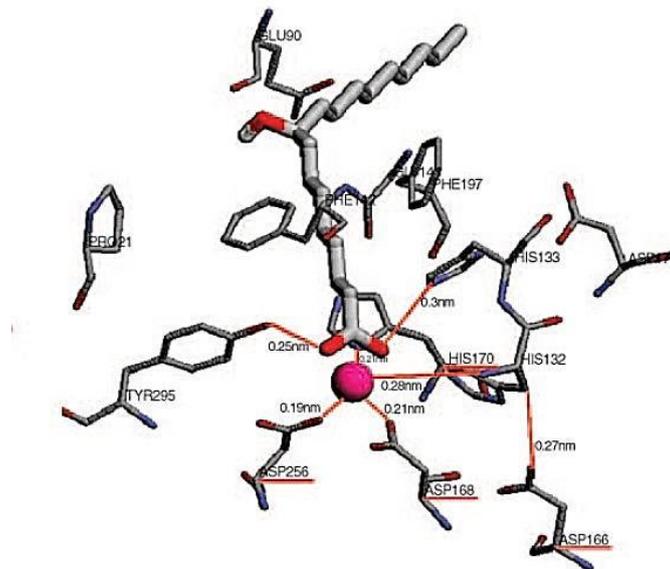


Figura 18: Elaborazione computazionale dell'interazione tra (*R*)-9-HSA e il sito attivo catalitico di HDAC1. In rosso sono mostrati il sito attivo e i residui che si legano allo zinco.¹²¹

Le predizioni emerse dagli studi computazionali spinsero i ricercatori a sintetizzare e somministrare separatamente i due enantiomeri di 9-HSA. Parolin *et al.*¹²³ hanno studiato gli effetti della configurazione del centro stereogenico di 9-HSA sull'attività inibitoria delle HDACs ed hanno riscontrato che quella dell'enantiomero *R* è maggiore rispetto all'*S*. Gli stessi studi hanno dimostrato che entrambi gli enantiomeri causano una simile acetilazione dell'istone H4 e provocano un blocco nella fase G₀/G₁, inoltre la forma *R* ha mostrato un effetto del 25% maggiore rispetto alle cellule di controllo mentre la forma *S* solo del 16%.

CAPITOLO 2

Scopo della tesi

Lo scopo del presente lavoro di tesi è la sintesi di (*R*)-9-HSA in forma otticamente pura, la sua veicolazione grazie a nanoparticelle proteiche di cheratina e la valutazione dell'attività antiproliferativa nei confronti delle cellule di adenocarcinoma umano del colon (HT29). La sintesi di (*R*)-9-HSA otticamente puro è stata effettuata attingendo al *pool* chirale naturale presente nell'olio dei semi di *Dimorphotheca sinuata* L.. L'acido grasso ottenuto è stato caricato su nanoparticelle di cheratina e albumina, tramite interazioni idrofobiche, allo scopo di renderlo veicolabile in ambiente acquoso, proteggerlo dai processi di degradazione e consentirne l'accumulo nelle cellule tumorali grazie all'effetto *Enhanced Permeability and Retention* (EPR). Le nanoparticelle ottenute sono state caratterizzate dal punto di vista morfologico (forma e dimensioni), della polidispersità, della stabilità termica e del loading di principio attivo.

Inoltre il rilascio di (*R*)-9-HSA nel tempo, e a diversi pH, è stato analizzato mediante risonanza magnetica nucleare al protone, in presenza di uno standard interno.

L'attività antiproliferativa delle nanoparticelle caricate con (*R*)-9-HSA è stata valutata sulla linea cellulare HT29, siccome è su questa linea cellulare che in passato sono stati studiati il target molecolare e il meccanismo di azione di (*R*)-9-HSA.

La sintesi e la caratterizzazione delle nanoparticelle è stata svolta presso l'Istituto per la sintesi organica e la fotoreattività (ISOF) del Consiglio Nazionale delle Ricerche, sede di Bologna, sotto la guida della Dott.sse Claudia Ferroni e della Dott.ssa Greta Varchi. Le indagini biologiche sono state condotte dal gruppo di ricerca della Prof.ssa Natalia Calonghi del Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie dell'Università di Bologna.

CAPITOLO 3

Risultati e discussione

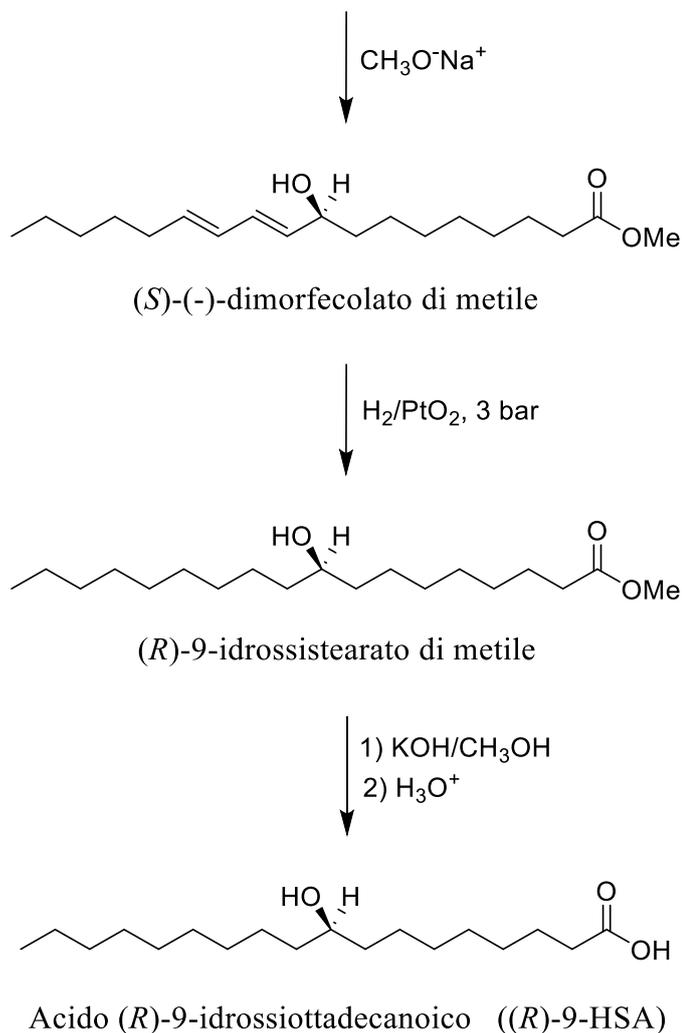
3.1. Sintesi di (*R*)-9-HSA

Per ottenere l'enantiomero (*R*)-9-HSA, più attivo sulle linee cellulari HT29, in forma otticamente pura si è attinto al *pool* chirale naturale, in questo caso rappresentato dai semi della *Dimorphotheca sinuata* L., una pianta perenne originaria del Sudafrica. Si è scelta questa strategia poiché la riduzione enantioselectiva del precursore chetonico o la risoluzione enzimatica della miscela racemica non sono efficaci a causa della quasi-simmetria della molecola attorno al centro chirale.¹²⁴

I trigliceridi costituenti l'olio dei semi di *Dimorphotheca sinuata* L. contengono fino al 70% di acido (*S*)-(-)-dimorfecolico (acido 9-(*S*)-idrossi-10(*E*),12(*E*)-ottadecanoico)¹²⁵ che ha due caratteristiche vantaggiose: la presenza di un gruppo ossidrilico con configurazione *S* in posizione 9 e la sua abbondanza nei semi di questa pianta, reperibili facilmente in commercio.

Per estrarre l'acido dimorfecolico contenuto nell'olio dei semi di *Dimorphotheca sinuata*, questi ultimi sono stati sminuzzati in un macinaspezie per aumentare l'area interfacciale e successivamente è stata condotta un'estrazione con una miscela cloroformio/metanolo. L'estratto oleoso è stato sottoposto a transesterificazione utilizzando metilato sodico in metanolo per ottenere il metilestere dell'acido dimorfecolico [(*S*)-dimorfecolato di metile]. Sulla catena alifatica di questo estere sono presenti due doppi legami, in posizione 10 e 12. Questi doppi legami possono essere ridotti per idrogenazione alla pressione di circa 3 bar in presenza di ossido di platino come catalizzatore (catalizzatore di Adams) per ottenere il derivato saturo (*R*)-9-idrossistearato di metile. Infine l'idrolisi base-catalizzata del metilestere porta all'ottenimento di (*R*)-9-HSA (acido (*R*)-9-idrossiottadecanoico) con una purezza enantiomerica superiore al 95%. Nello schema 1 è riportato lo schema di reazione.

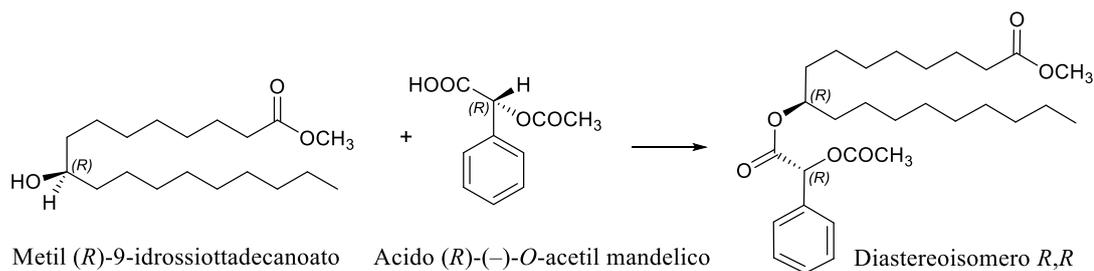
Estratto lipidico da semi di *Dimorphoteca sinuata*



Schema 1

Tutti gli intermedi e il prodotto finale sono stati purificati e completamente caratterizzati.

La determinazione della purezza enantiomerica è stata effettuata grazie alla derivatizzazione del gruppo ossidrilico del metilestere del 9-HSA con acido (R)-(-)-O-acetilmandelico secondo lo schema 2, che mostra il diastereoisomero ottenuto per derivatizzazione dell'enantiomero con configurazione *R*.



Schema 2

Il triestere ottenuto è stato isolato mediante cromatografia su lastra preparativa, quindi analizzato allo spettrometro NMR Varian Inova 600. Lo spettro ^1H NMR risultante, riportato in Fig. 19, presenta due segnali relativi al gruppo metossilico estereo in rapporto circa 95/5, corrispondenti rispettivamente ai diastereoisomeri (*R,R*) e (*R,S*). Lo stesso rapporto è stato ottenuto analizzando la miscela grezza di reazione prima della purificazione cromatografica, per verificare l'assenza di arricchimento in uno dei due diastereoisomeri durante la procedura di isolamento della frazione contenente gli stessi.

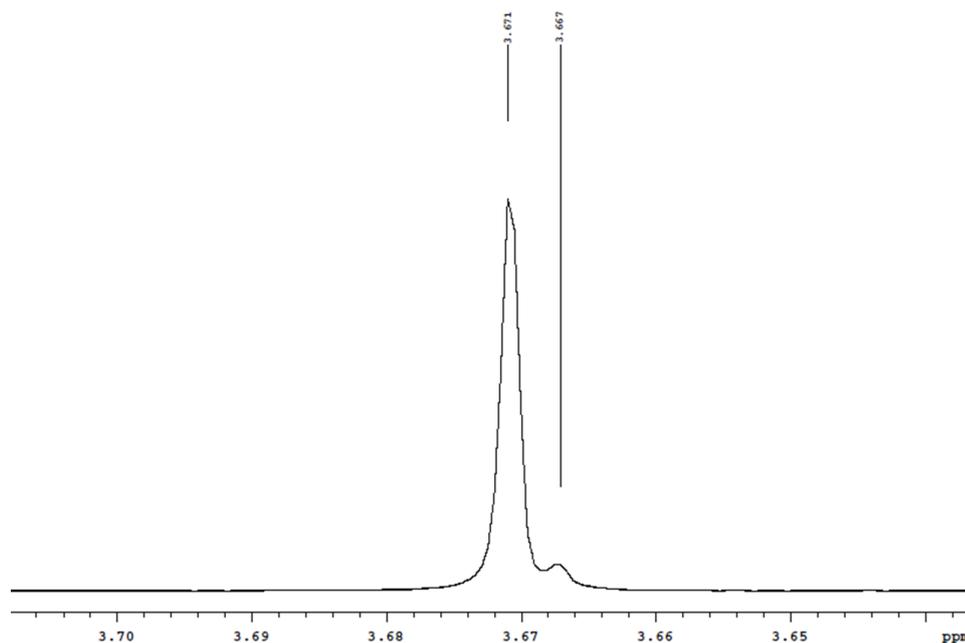
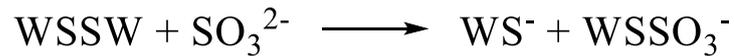


Figura 19: Espansione dello spettro ^1H NMR, nella zona relativa ai segnali del gruppo metossilico estereo, dei diastereoisomeri ottenuti dalla reazione tra metil 9-idrossistearato preparato da semi di *Dimorphotheca sinuata* L. e acido (*R*)-(-)-*O*-acetilmandelico. I due diastereoisomeri (*R,R*)/(*R,S*) sono in rapporto relativo di circa 95/5.

3.2. Estrazione della cheratina

L'estrazione della cheratina dalla lana Merino è stata effettuata mediante reazione di solfitolisi, grazie all'aggiunta di ioni metabisolfito ($S_2O_5^{2-}$) e urea. Durante la reazione i legami disolfuro (WSSW) vengono scissi e si formano due prodotti principali, cheratina ridotta (WS^-) e cheratina solfonata ($WSSO_3^-$).



La soluzione ottenuta dal processo di solfitolisi, è filtrata sotto vuoto, sottoposta a dialisi per 3 giorni contro acqua distillata ed infine liofilizzata per ottenere una polvere di cheratina solfonata pura (Fig. 20), che risulta solubile in ambiente acquoso a $pH \geq 7$.



Figura 20: Cheratina solfonata liofilizzata.

3.3. Metodi di preparazione delle nanoparticelle

Le diverse tipologie di nanoparticelle (NPs) sintetizzate sono state ottenute sfruttando diverse metodiche.

- Il processo di *self-assembly* (Fig. 21) si basa sull'anfifilicità della proteina, ovvero la presenza di amminoacidi idrofilici e idrofobici sulla stessa catena polipeptidica. Quando una proteina, come la cheratina, si trova in ambiente acquoso tende a formare delle micelle nelle quali i gruppi idrofilici si dispongono sulla superficie a contatto con l'acqua, mentre i gruppi idrofobici rimangono confinati nel nucleo, dove possono interagire tra loro.

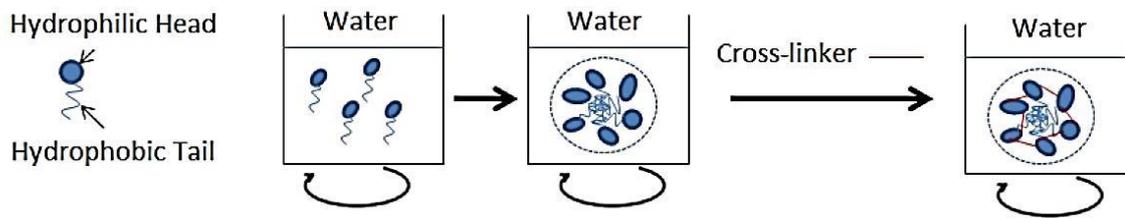


Figura 21: Rappresentazione schematica del processo di sintesi di nanoparticelle tramite *self-assembly*.

- Il processo di desolvatazione (Fig. 22) sfrutta la variazione di solubilità di una proteina, inizialmente disciolta in ambiente acquoso, quando viene effettuata un'aggiunta di un antisolvente, come etanolo o acetone. L'aggiunta dell'agente desolvatante induce dei cambiamenti conformazionali nella proteina e di conseguenza ne provoca l'aggregazione in forma di NPs.

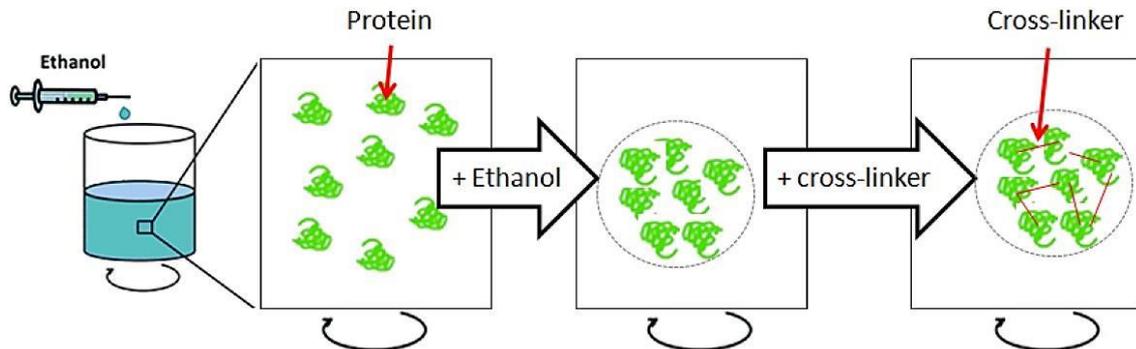


Figura 22: Schema del processo di sintesi di nanoparticelle tramite desolvatazione.

- Infine la formazione di NPs proteiche caricate con acido idrossistearico è stata ottenuta mediante un processo di aggregazione, indotta dalle caratteristiche fortemente idrofobiche dell'acido grasso e dalla capacità della proteina di ripiegarsi in strutture micellari, confinando nel nucleo i residui idrofobici.

3.4. Nanoparticelle di cheratina

Le NPs di cheratina sono state ottenute per *self-assembly* e per desolvatazione.

Le NPs per *self-assembly* sono state sintetizzate partendo da una soluzione di cheratina in tampone carbonato (15 mg/mL) e stabilizzate mediante aggiunta di glutaraldeide (all'8%), un agente reticolante che si lega ai residui ϵ -amminici delle lisine della proteina.

Le NPs ottenute per desolvatazione sono state sintetizzate partendo da una soluzione di cheratina in tampone carbonato (15 mg/mL) e stabilizzate mediante aggiunta di glutaraldeide (all'8%), liofilizzate previa aggiunta di saccarosio, che agisce da crioprotettore favorendo la risospensione delle NPs.

La resa è stata calcolata secondo l'equazione (1):

$$Resa (\%) = \frac{Massa\ nanoparticelle}{Massa\ cheratina\ iniziale} \cdot 100 \quad (1)$$

Le NPs ottenute per desolvatazione hanno un diametro idrodinamico minore rispetto a quelle per *self-assembly* (126 ± 4 nm vs 153 ± 7 nm) e un indice di polidispersità (PDI) migliore (0.115 ± 0.005 vs 0.31 ± 0.01), mentre le rese dei due metodi sono paragonabili, 89.3% vs 91.7%, (Tab. 1).

Metodo	Diametro (nm)	PDI	Resa% (w/w)
Desolvatazione	126 ± 4	0.115 ± 0.005	89.3
Self-assembly	153 ± 7	0.31 ± 0.01	91.7

Tabella 1. Confronto tra i due metodi di sintesi di NPs in termini di dimensioni, PDI e resa.

3.5. Nanoparticelle di cheratina (R)-9-HSA, (R)-9-HSA@Ker

Le NPs di cheratina caricate con (R)-9-HSA, (R)-9-HSA@Ker, sono state ottenute per aggregazione.

La cheratina solfonata è solubilizzata in acqua sotto vigorosa agitazione fino all'ottenimento di una soluzione limpida incolore. Successivamente viene effettuata l'aggiunta di una soluzione di (R)-9-HSA sciolto in etanolo. L'analisi al DLS (*Dynamic Light Scattering*) mostra che dopo circa 15 minuti la formazione e stabilizzazione delle nanoparticelle è completa e si procede pertanto alla loro liofilizzazione (Fig. 23).

Le NPs si ottengono mediante un processo puramente fisico, che non implica la formazione di alcun legame covalente con (R)-9-HSA, e sono sufficientemente stabili da non richiedere ulteriori *crosslinking* con glutaraldeide.

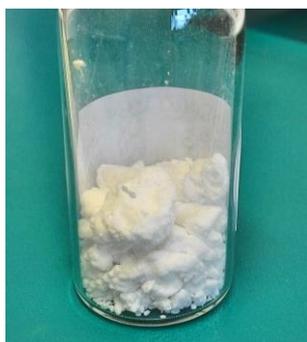


Figura 23: (R)-9-HSA@Ker liofilizzate.

3.5.1. Studio di ottimizzazione delle condizioni operative

Effetto del pH della soluzione acquosa

Il pH della soluzione acquosa di cheratina influenza significativamente il *folding* della proteina e di conseguenza le dimensioni delle NPs. La proteina è ricca di gruppi amminici e carbossilici che, a seconda del pH, possono conferire una carica netta positiva, neutra o negativa. Inoltre, la cheratina utilizzata presenta dei gruppi solfonici che a $\text{pH} \geq 7$ sono dissociati e la rendono solubile, oltre che contribuire alla repulsione elettrostatica tra le NPs.

La sintesi di NPs è stata condotta in H_2O ($\text{pH} = 7.0$), in tampone fosfato salino (PBS, $\text{pH} = 7.4$) e in tampone carbonato 0.1 M ($\text{pH} = 9.2$). In H_2O sono state ottenute NPs con diametro idrodinamico di 210 nm, in tampone carbonato di 240 nm, mentre in PBS si

sono osservati fenomeni di aggregazione. Sulla base di queste evidenze sperimentali la scelta del mezzo è ricaduta sull'H₂O.

Concentrazione della soluzione di cheratina

Mantenendo costanti la percentuale di (*R*)-9-HSA caricato (8% w/w) e la concentrazione della soluzione dell'acido grasso in etanolo (20 mg/mL), le dimensioni delle NPs sono state studiate in funzione della concentrazione della soluzione acquosa di cheratina.

Alla concentrazione di 2 mg/mL di cheratina sono state ottenute NPs di 169 ± 3 nm, PDI 0.19 ± 0.01 , mentre con una soluzione 1 mg/mL le NPs risultavano più piccole 75 ± 1 nm, PDI 0.30 ± 0.02 . Sulla base di questi dati, la concentrazione utilizzata per la sintesi di NPs è stata mantenuta pari a 1 mg/mL.

Effetto di (*R*)-9-HSA

Partendo da una soluzione acquosa di cheratina (1 mg/mL), gli esperimenti sono stati condotti prima variando la concentrazione della soluzione etanolica di (*R*)-9-HSA e mantenendo costante la percentuale totale di (*R*)-9-HSA caricato (10% w/w), in seguito fissando la concentrazione della soluzione di acido (10 mg/mL) e modificando la quantità totale di (*R*)-9-HSA caricata sulle NPs.

Il risultato è che le dimensioni delle NPs sono strettamente correlate alla concentrazione della soluzione alcolica di (*R*)-9-HSA, in particolare aumentano proporzionalmente e gradualmente all'aumentare della concentrazione. Utilizzando una concentrazione di 5 mg/mL si sono ottenute NPs con dimensioni 180 ± 2 nm (Tab. 2)

(<i>R</i>)-9-HSA (mg/mL in EtOH)	Diametro (nm)	PDI
20	198 ± 4	$0,21 \pm 0,02$
10	185 ± 2	$0,19 \pm 0,01$
5	180 ± 2	$0,13 \pm 0,01$

Tabella 2. Effetto della concentrazione della soluzione di (*R*)-9-HSA sulle dimensioni delle NPs in soluzione acquosa di cheratina (1 mg/mL) e (*R*)-9-HSA pari al 10% w/w.

Fissando la concentrazione della soluzione di (R)-9-HSA in etanolo a 10 mg/mL, è stata studiata la variazione delle dimensioni delle NPs al variare della percentuale totale di (R)-9-HSA caricata. All'aumentare della percentuale di acido, anche le dimensioni delle NPs aumentano (Tab. 3).

% (R)-9-HSA (w/w)	Diametro (nm)	PDI
15	208 ± 1	0,104 ± 0,009
27,5	234 ± 4	0,08 ± 0,04
36	309 ± 9	0,33 ± 0,01
40	273 ± 5	0,22 ± 0,01

Tabella 3. Effetto del *loading* di (R)-9-HSA sulle dimensioni delle NPs in soluzione acquosa di cheratina (1mg/mL) e (R)-9-HSA (10 mg/mL in etanolo).

Questi risultati confermano l'effetto altamente aggregante esercitato dall'acido (R)-9-HSA sulla cheratina e variando la sua quantità siamo stati in grado di modulare le dimensioni delle NPs.

Condizioni operative ottimali

Sulla base dei dati ottenuti le condizioni operative ottimali per la sintesi di (R)-9-HSA@Ker sono di seguito riportate (Tab. 4):

Solvente	Ker (mg/mL)	% (R)-9-HSA (w/w)	(R)-9-HSA (mg/mL in EtOH)
H ₂ O	1	10	5

Tabella 4. Condizioni operative ottimali per la sintesi di (R)-9-HSA@Ker.

Tali condizioni ci hanno permesso di ottenere NPs con un diametro idrodinamico di 208 ± 2 nm, con un PDI pari a 0.21 ± 0.02 (Fig. 24) e con una resa pari al 90.9% (w/w). Il potenziale ζ, cioè il potenziale generato dal doppio strato elettrico superficiale delle NPs, è pari a -51.3 ± 0.4 mV, per via della presenza dei gruppi solfonati.

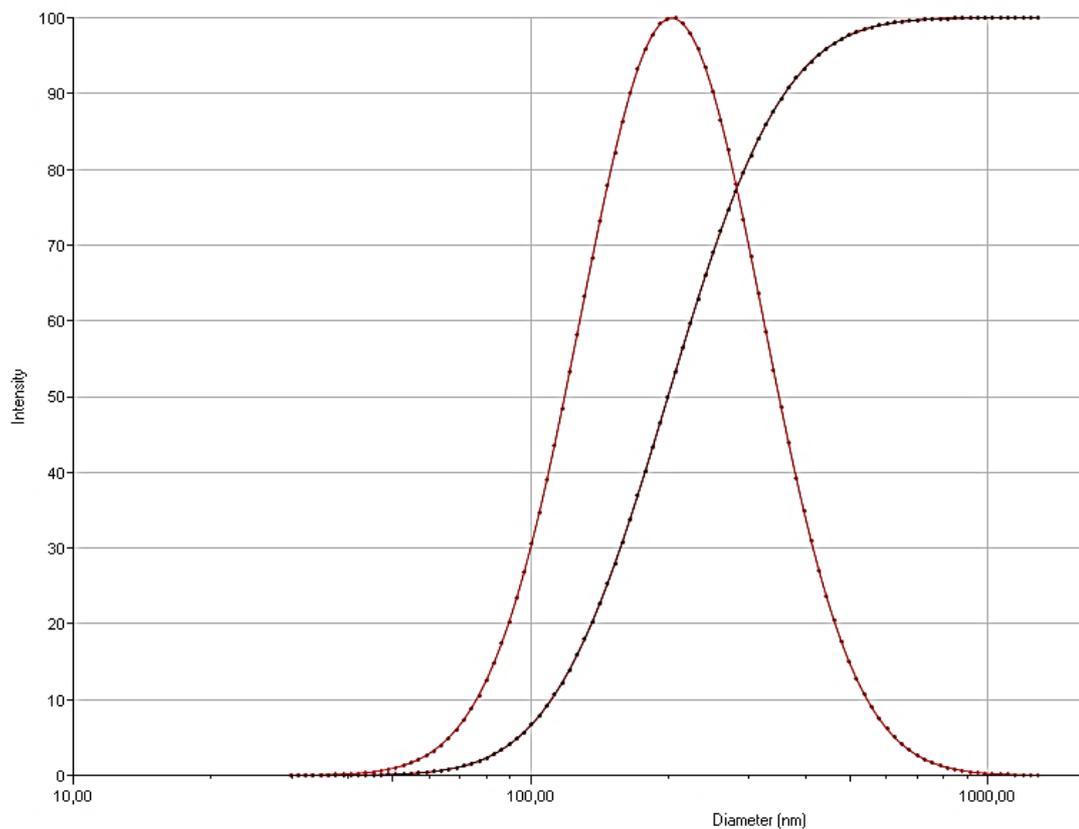


Figura 24: Grafico DLS intensità vs diametro (nm) di (R)-9-HSA@Ker

3.5.2 Stabilità nel tempo delle NPs (R)-9-HSA@Ker

Per valutare la stabilità nel tempo delle NPs sono state effettuate 3 misure al DLS successive all'aggiunta di (R)-9-HSA alla soluzione di cheratina, a $t_0 = 0$, $t_1 = 90$ minuti e $t_2 = 25$ ore. Fino a t_1 le NPs tendono ad aumentare le loro dimensioni fino a stabilizzarsi intorno ai 240 nm (Grafico 1). Questi risultati confermano la stabilità delle NPs ottenute che anche dopo 25 ore non mostrano tendenza a disgregarsi.

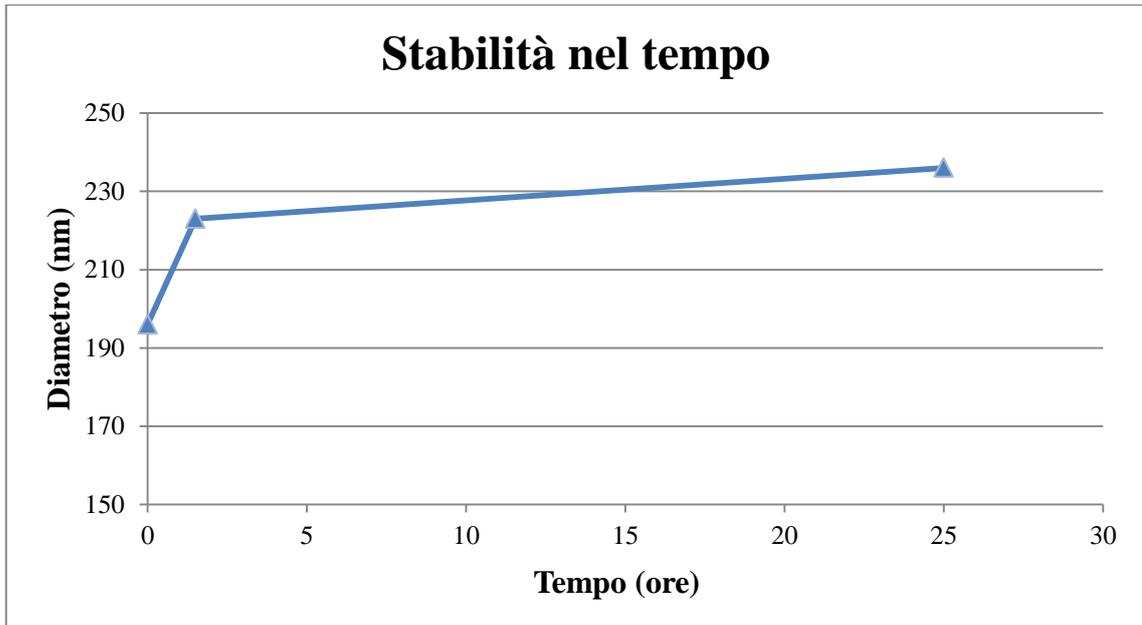


Grafico 1. Studio della stabilità nel tempo delle dimensioni delle NPs.

3.5.3 Prove di rilascio

Il rilascio è stato valutato a 37°C a due differenti pH, 7.4 e 5.5, per ciascun valore di pH si sono analizzati tre campioni in parallelo. Questi valori di pH sono stati scelti per mimare rispettivamente il pH fisiologico del sangue (pH 7.4) e quello dell'ambiente tumorale (pH 5.8-7.6).¹²⁶

Sono state preparate delle nanoparticelle (R)-9-HSA@Ker e sono state suddivise in sei campioni pesandone una quantità nota. A tre campioni è stato aggiunto PBS a pH 7.4 e ai restanti PBS a pH 5.5. La sospensione colloidale è stata trasferita in un tubicino per dialisi (MWCO = 14-12 kDa) e immerso in una soluzione tampone uguale a quella utilizzata per disperdere le nanoparticelle. I contenitori sono stati posizionati in ambiente termostato a 37°C e lasciati sotto blanda agitazione magnetica (Fig. 25).

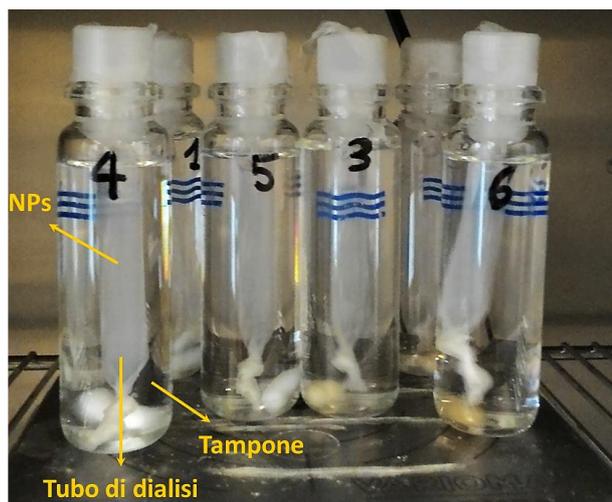


Figura 25: Allestimento dei vials per la conduzione delle prove di rilascio.

Ad intervalli regolari di tempo il tampone esterno è stato prelevato e sostituito con tampone fresco. Il tampone prelevato viene estratto con diclorometano (3 volte) e le frazioni organiche estratte e concentrate, sono state analizzate all' ^1H NMR. In ogni tubino NMR è stata aggiunta una aliquota nota di una soluzione in cloroformio deuterato di uno standard interno, il 2,4-dinitrotoluene (2,4-DNT).

Il rilascio di (*R*)-9-HSA da parte delle nanoparticelle di cheratina è stato analizzato tramite spettroscopia ^1H NMR quantitativa (qNMR), sfruttando la proporzionalità diretta esistente tra l'area di un picco e il numero di protoni che lo genera. La scelta è ricaduta sulla spettroscopia ^1H NMR perché (*R*)-9-HSA, nella spettroscopia UV-VIS, presenta un unico debole assorbimento con massimo a 208 nm, difficile da rilevare e che comunque sarebbe coperto dal segnale della cheratina.

Lo spettro ^1H NMR del (*R*)-9-HSA presenta un tripletto a 2.37 ppm relativo ai protoni metilenici in α al carbonile (CH_2COO). Questo segnale risulta essere adatto all'analisi quantitativa perché si trova in una regione pulita dello spettro e non interferisce con i segnali dello standard interno utilizzato, cioè il (2,4-DNT). Il 2,4-DNT presenta un protone, evidenziato in Fig. 26, che genera un doppietto di doppietti a δ 8.37 ppm, utilizzato come riferimento per la quantificazione di 9-HSA.

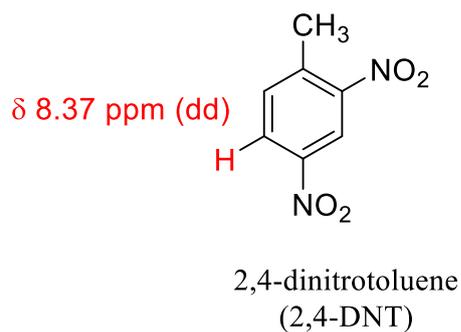


Figura 26: Struttura di 2,4-dinitrotoluene (2,4-DNT), in rosso è evidenziato il protone utilizzato come riferimento per la quantificazione.

Come si può notare dalla Fig. 27, i picchi relativi al 2,4-DNT e ai protoni in α al carbonile del 9-HSA si trovano in regioni pulite dello spettro, dove non esiste sovrapposizione con altri segnali.

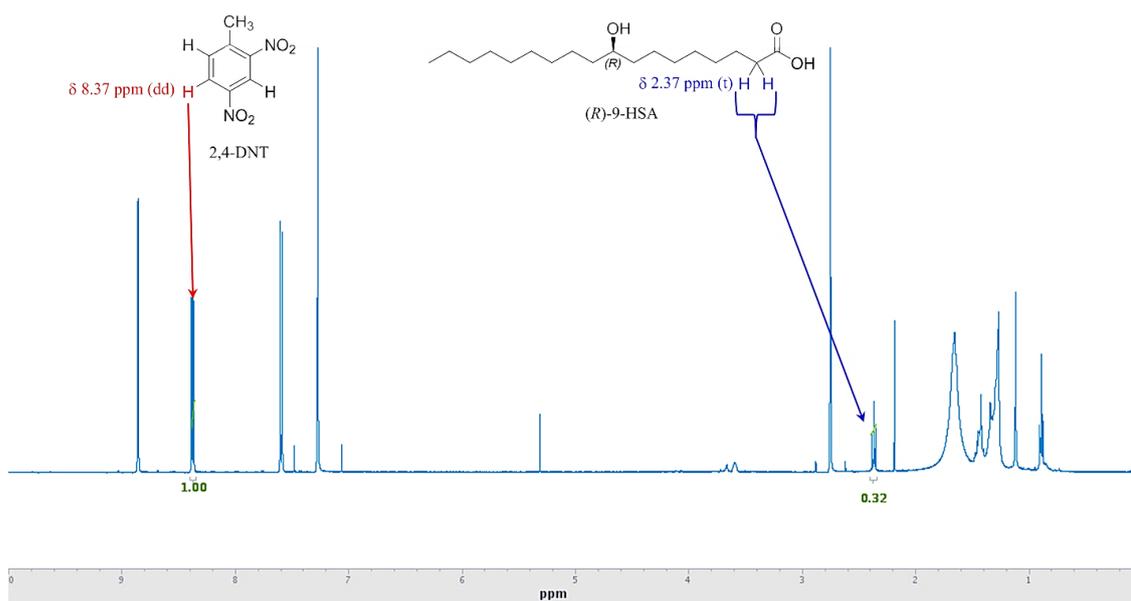


Figura 27: Spettro ^1H NMR (500 MHz) in CDCl_3 della fase organica estratta a 48h dal campione a pH 7.4. Al tubo NMR è stata aggiunta di una quantità nota di 2,4-DNT. All'area del segnale del 2,4-DNT (δ 8.37 ppm) è assegnato valore unitario e di conseguenza è stato ottenuto il valore dell'area del segnale del 9-HSA (δ 2.37 ppm).

Sfruttando la proporzionalità esistente tra valore dell'area del picco e numero di protoni, è possibile risalire alle moli di 9-HSA presenti nel campione.

L'equazione (2) permette di calcolare la quantità di (R)-9-HSA (m_x) presente nel campione analizzato:

$$m_x = \frac{n_{std} \cdot A_x \cdot N_{std} \cdot M_x}{A_{std} \cdot N_x} \quad (2)$$

Dove n_{std} sono le moli di standard interno aggiunte, A_x è il valore dell'integrale dell'analita (R)-9-HSA, A_{std} è il valore dell'integrale dello standard, N_{std} è il numero di atomi di idrogeno per molecola di standard generanti il segnale considerato (per il 2,4-DNT N=1), N_x è il numero di atomi di idrogeno per molecola di analita generanti il segnale considerato (per (R)-9-HSA N=2) e M_x è il peso molecolare dell'analita (per (R)-9-HSA M=300.48 g/mol).

Le masse ottenute dall'analisi qNMR sono state rielaborate in maniera tale da ottenere una curva di rilascio mostrata nel grafico 2.

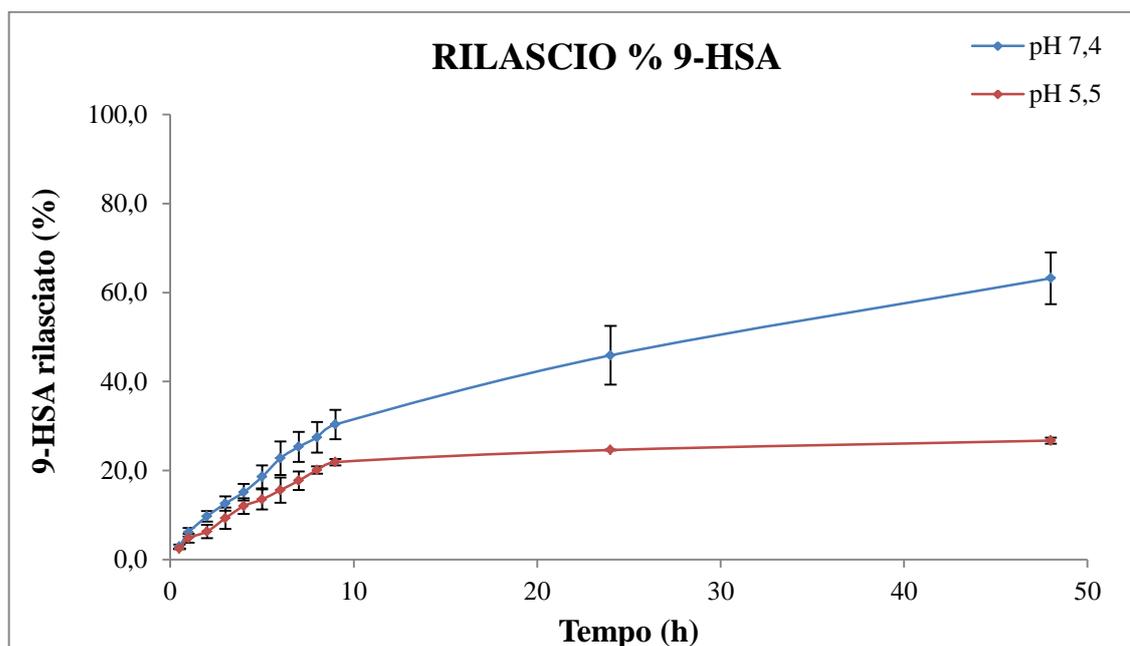


Grafico 2. Rilascio di 9-HSA in tampone PBS pH 7.4 e PBS pH 5.5. Ogni punto delle curve deriva dalla media di tre valori.

A pH 5.5 probabilmente le nanoparticelle si trovano in una conformazione più chiusa, grazie alla vicinanza al punto isoelettrico della cheratina (p.i. = 4.17) e alla protonazione dei gruppi solfonici. Infatti, a pH acido, sulla superficie della nanoparticella le cariche

negative si riducono e conseguentemente anche la loro repulsione, compattandone la struttura. Questo potrebbe risultare vantaggioso in quanto le nanoparticelle potrebbero rimanere accumulate all'interno del tumore per più tempo prima di disgregarsi ed essere in grado di raggiungere diversi compartimenti cellulari.

3.5.4. Caratterizzazione NPs (R)-9-HSA@Ker

Le NPs (R)-9-HSA@Ker sono state caratterizzate tramite analisi termogravimetrica (TGA) in atmosfera ossidante (aria), con una rampa di riscaldamento 10°C/min fino a 600°C ed infine in isoterma per 15 min.

In Fig. 28 è riportato il termogramma: la curva verde corrisponde alla perdita di peso in funzione della temperatura mentre la curva blu è rispettiva derivata prima.

La prima perdita di peso, tra i 50°C e i 100°C, è riconducibile alla disidratazione del campione, il contenuto di acqua risulta essere pari al 6.4%. La temperatura di inizio decomposizione (IDT), che è un indice della stabilità termica del materiale, è circa 225°C. La temperatura di massima velocità di decomposizione (MRDT) è di circa 280°C. Tra i 225°C e i 480°C si osserva una seconda perdita di peso, pari al 71.1%, attribuibile alla degradazione di (R)-9-HSA e della cheratina. Tra i 480°C e i 530°C si osserva un'ulteriore perdita di peso, pari al 12.5%. Il residuo finale a 600°C è pari al 10.0%.

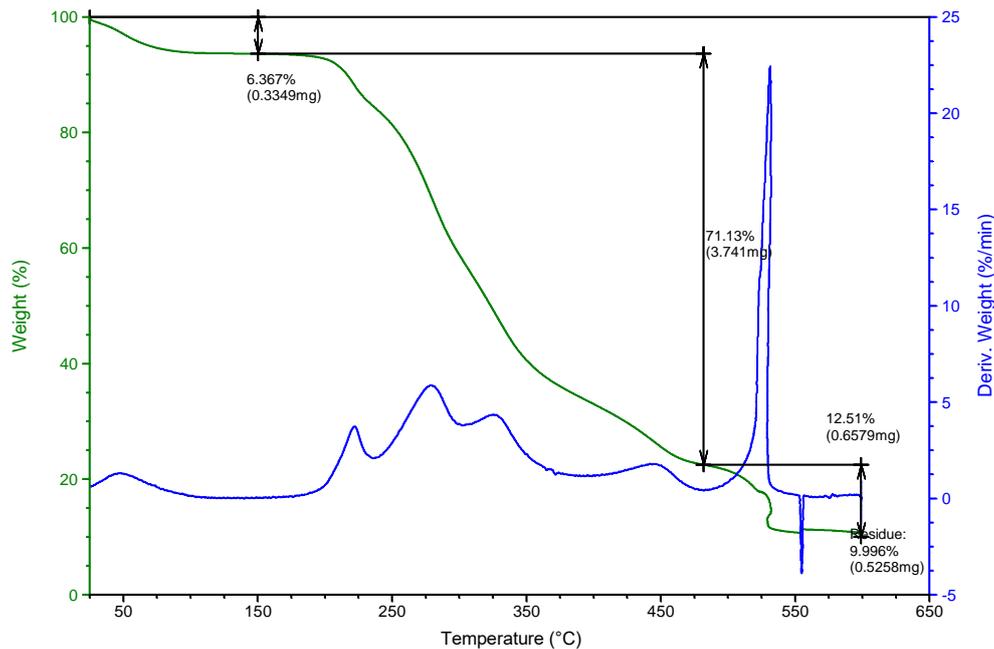


Figura 28: Termogramma di nanoparticelle (R)-9-HSA@Ker, con (R)-9-HSA pari al 10% w/w). Peso % del campione (curva verde) e derivata prima (curva blu).

È stata effettuata anche l'analisi termogravimetrica di cristalli di cheratina pura e di cristalli di (R)-9-HSA, per consentire un confronto fra i tre termogrammi (Fig. 29). Il termogramma di (R)-9-HSA, curva rossa, mostra una IDT di circa 225°C, mentre a 268°C si ha la MRDT. (R)-9-HSA si degrada completamente senza lasciare residui, già a 550°C il termogramma raggiunge lo 0%.

La curva verde rappresenta il termogramma relativo alla polvere di cheratina, inizialmente, tra 50 e 100°C, si ha una disidratazione simile a quella osservata per le nanoparticelle. La cheratina è stabile fino a circa 210°C (IDT). Tra i 210 e i 525°C si osserva la degradazione della cheratina con una perdita in peso pari al 78.1%, tra i 525 e i 600°C si osserva una seconda degradazione con una perdita di peso del 12.9%. Quest'ultima degradazione avviene ad una temperatura più elevata, di circa 40°C, rispetto a quella osservata per le nanoparticelle. Infine, a 600°C rimane un residuo pari all'1.9%.

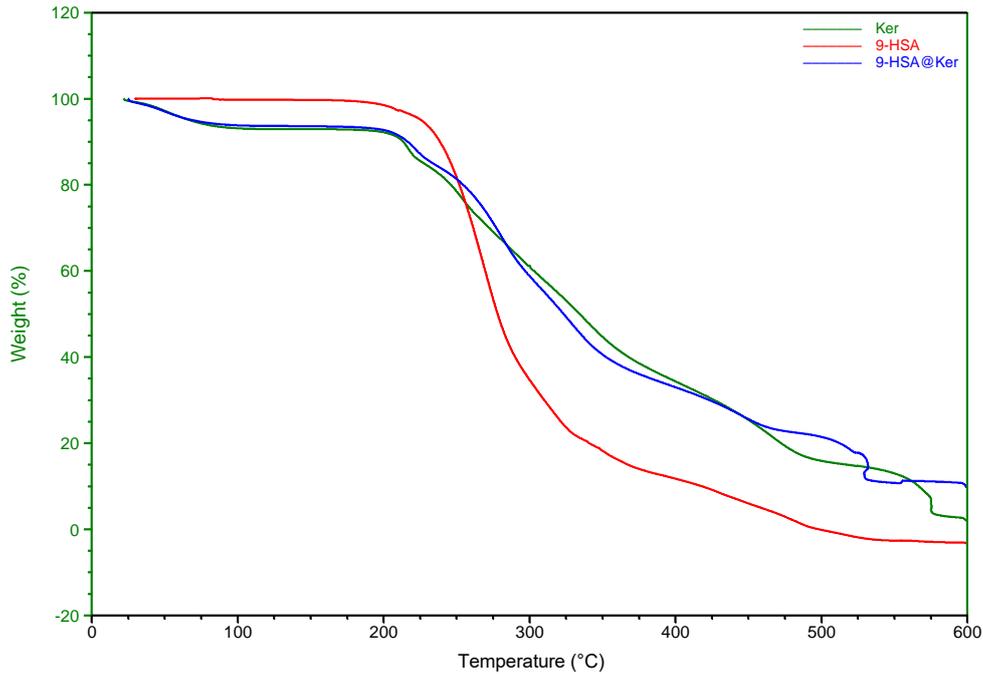


Figura 29: Confronto tra i termogrammi di cheratina (linea verde), (R)-9-HSA (linea rossa) e nanoparticelle (R)-9-HSA@Ker, con (R)-9-HSA pari al 10% w/w (linea blu).

Inoltre le NPs sono state caratterizzate mediante microscopio a forza atomica (AFM). In Fig. 30 si può notare che la maggior parte delle nanoparticelle ha un diametro di circa 250 nm, inoltre si notano degli aggregati con diametro di circa 1 μm probabilmente generati durante il processo di liofilizzazione e non completamente disgregati durante la risospensione.

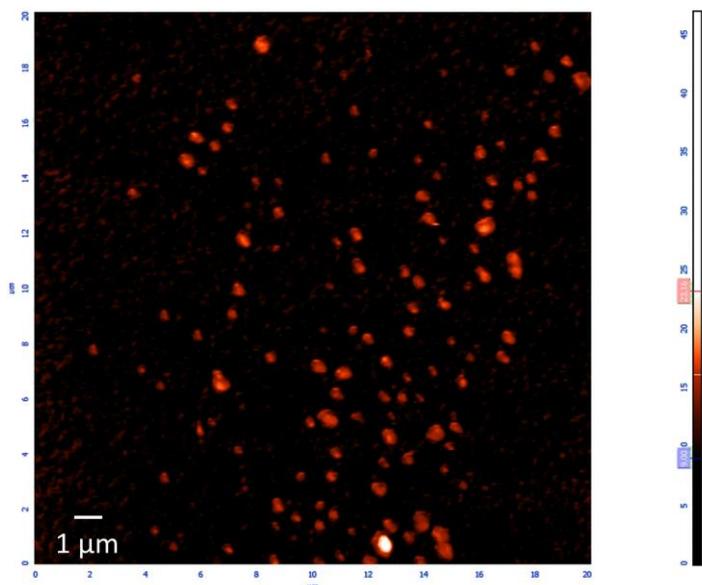
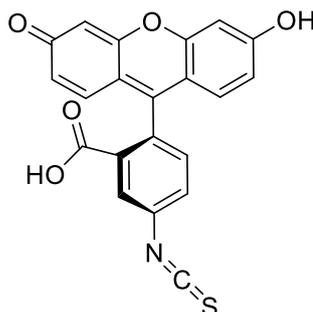


Figura 30: Immagine AFM di nanoparticelle (R)-9-HSA@Ker, liofilizzate e risospese.

3.6 Nanoparticelle di cheratina funzionalizzata con FITC

La fluoresceina-5-isotiocianato (FITC isomero I) (Fig. 31) è un fluoroforo che presenta un massimo di assorbimento attorno a 495 nm e un massimo di emissione a 520 nm. Grazie al gruppo isotiocianato è in grado di reagire con nucleofili, ad esempio con i residui amminici delle proteine.



Fluoresceina-5-isotiocianato (FITC Isomero I)

Figura 31: Struttura della fluoresceina-5-isotiocianato (FITC isomero I)

La funzionalizzazione della cheratina con FITC (Fig. 32) è stata effettuata allo scopo di preparare NPs fluorescenti in modo da studiare la loro internalizzazione nelle cellule.

Si prepara una soluzione di cheratina in tampone carbonato 0.1 M in modo da ottenere una concentrazione di 20 mg/mL. Separatamente si prepara una soluzione 1 mg/mL di FITC isomero I in DMSO anidro. Per garantire una resa ottimale è necessario preparare queste due soluzioni poco prima della reazione. Alla soluzione di cheratina si aggiunge quella di FITC in eccesso. Tramite analisi spettrofotometrica UV-VIS, previa costruzione di una curva di taratura, si determina il rapporto FITC/cheratina ($17 \mu\text{g}/\text{mg}_{\text{ker}}$).

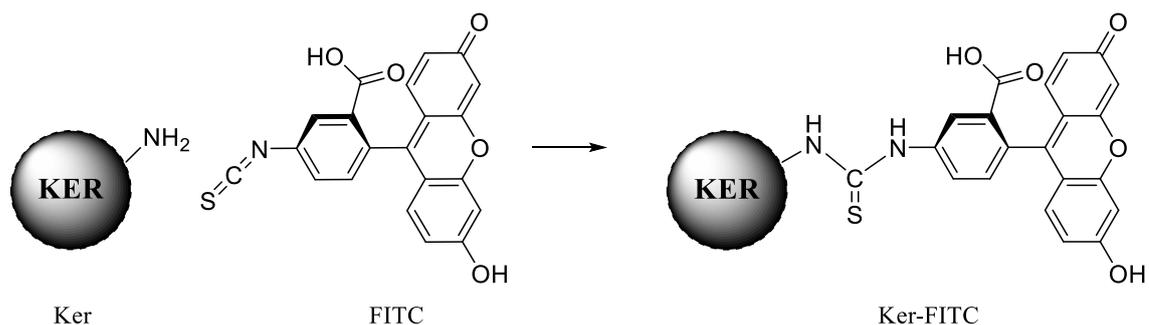


Figura 32: Schema di reazione della funzionalizzazione della cheratina con FITC.

La cheratina funzionalizzata con FITC (Ker-FITC) è stata utilizzata per sintetizzare delle NPs (KNPs-FITC) per verificare l'internalizzazione *in vitro* nelle cellule. Le NPs (Fig. 33) sono state ottenute tramite *self-assembly* sciogliendo la Ker-FITC in H₂O e stabilizzate poi con glutaraldeide. L'analisi al DLS ha mostrato un diametro idrodinamico pari a 120 ± 9 nm e una PDI di 0.20 ± 0.05 .



Figura 33: KNPs-FITC liofilizzate.

3.7 Nanoparticelle di cheratina contenente (R)-9-HSA funzionalizzata con FITC, (R)-9-HSA@Ker-FITC

La Ker-FITC è solubilizzata in H₂O mQ in modo da ottenere una concentrazione pari a 1 mg/mL, successivamente si aggiunge la soluzione di (R)-9-HSA (5 mg/mL in etanolo) per ottenere una concentrazione finale di acido pari al 6% (w/w). In questo caso la percentuale totale di (R)-9-HSA caricato non è stata del 10% poichè si temeva l'aggregazione della cheratina funzionalizzata. Dopo liofilizzazione e risospensione, l'analisi DLS ha rilevato un diametro idrodinamico pari a 131 ± 1 nm e un PDI pari a 0.12 ± 0.01 .

Le nanoparticelle di Ker-FITC caricate con (R)-9-HSA sono identificate dalla sigla (R)-9-HSA@Ker-FITC.

La resa ottenuta è pari all'89.6% (w/w).

3.8. Nanoparticelle di cheratina e acido 12-idrossistearico (12-HSA), 12-HSA@Ker

L'acido 12-idrossistearico (12-HSA) ha una struttura simile a quella di 9-HSA ma non possiede attività biologica sulla linea cellulare HT29, per questo motivo è stato scelto per sintetizzare nanoparticelle da utilizzare come controllo negativo nelle analisi *in vitro*.

Il procedimento di sintesi delle NPs caricate con 12-HSA è identico a quello utilizzato con il (R)-9-HSA. Sono state mantenute le stesse condizioni operative.

Le NPs, caratterizzate al DLS, presentano un diametro idrodinamico pari a 235 ± 1 nm e una PDI di 0.19 ± 0.01 .

3.9. Nanoparticelle di albumina

Come descritto in precedenza (si veda introduzione pag. 9), l'albumina è l'unica proteina ad oggi utilizzata in clinica per il trasporto di farmaci in forma nanoparticellare. Pertanto, risulta particolarmente significativo confrontare il comportamento della cheratina e dell'albumina quali *nanocarriers* di (R)-9-HSA.

A tale proposito, in questo lavoro di tesi abbiamo utilizzato albumina serica umana ricombinante (Human Serum Albumin, HSAr) per preparare nanoparticelle caricate con (R)-9-HSA.

Le NPs di sola HSAr (bianco) sono state ottenute tramite desolvatazione: HSAr è stata sciolta in H₂O, successivamente è stato aggiunto etanolo ed infine è stata utilizzata glutaraldeide e le NPs sono state liofilizzate previa aggiunta di saccarosio, dopo lavaggi in centrifuga.

Le NPs sono state caratterizzate al DLS e mostrano un diametro idrodinamico pari a 208 ± 2 nm e un PDI pari a 0.137 ± 0.004 .

3.10 Nanoparticelle di albumina con (R)-9-HSA, (R)-9-HSA@HSAr

L'HSAr è stata sciolta in H₂O, successivamente è stata aggiunta la soluzione etanolica di (R)-9-HSA (concentrazione totale 6.0%). Dopo liofilizzazione e ri-sospensione, le nanoparticelle sono state caratterizzate al DLS mostrando un diametro idrodinamico medio pari a 201 ± 7 nm e un PDI pari a 0.24 ± 0.03 .

3.11. Analisi biologiche *in vitro*

I test biologici sono stati svolti presso il Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie dell'Università di Bologna.

Dapprima si è verificato se le nanoparticelle riuscivano ad entrare nella cellula e per questo sono state impiegate nanoparticelle di cheratina funzionalizzate con FITC sia scariche che caricate con (R)-9-HSA. Una volta verificato che tali sistemi entravano nelle cellule, si è proceduto con l'analisi delle interazioni con la membrana cellulare. Gli effetti sulla proliferazione cellulare di HT29 sono stati valutati considerando il numero di cellule sopravvissute dopo 24h dal trattamento con i diversi sistemi: (R)-9-HSA libero (50 μ M), nanoparticelle di cheratina caricate con il 10% di (R)-9-HSA ((R)-9-HSA@Ker, 50 μ M), nanoparticelle di albumina umana caricate con il 6% di (R)-9-HSA ((R)-9-HSA@HSAr, 50 μ M) e infine nanoparticelle di cheratina caricate con il 10% w/w di 12-HSA (12-HSA@Ker, 10 μ M). Infine l'analisi citofluorimetrica ha permesso di analizzare la percentuale di cellule nelle diverse fasi del ciclo cellulare e di ottenere indicazioni per capire se la diminuzione del numero di cellule fosse riconducibile ad uno stesso meccanismo d'azione. Di seguito sono riportati i risultati ottenuti.

3.11.1. Analisi dell'internalizzazione delle nanoparticelle

La cheratina è stata funzionalizzata con FITC e successivamente utilizzata per la sintesi di nanoparticelle fluorescenti sia scariche sia caricate con (R)-9-HSA, come descritto nelle sezioni 3.6 e 3.7. Le nanoparticelle sono state somministrate alle cellule e dopo 15

e 30 minuti sono stati preparati i vetrini per la loro osservazione al microscopio confocale.

In Fig. 34 si evidenzia che sia le nanoparticelle (R)-9-HSA@Ker-FITC sia la KNP-FITC vengono internalizzate dalle cellule già dopo 15 minuti dalla somministrazione. Un'ulteriore conferma dell'internalizzazione è stata ottenuta acquisendo l'immagine sull'asse z.

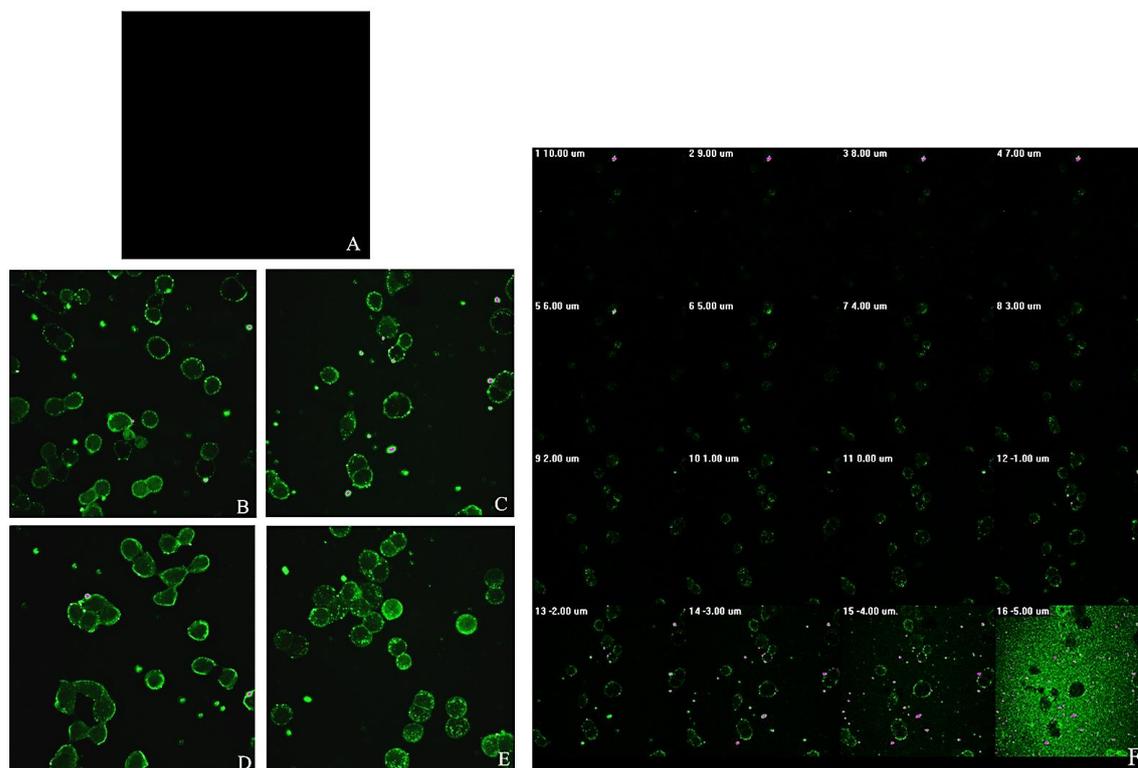


Figura 34: Internalizzazione di nanoparticelle KNP-FITC e (R)-9-HSA@Ker-FITC in HT29 dopo 15 e 60 minuti di interazione. A) controllo negativo; B-C) (R)-9-HSA@Ker-FITC dopo 15 e 60 minuti rispettivamente; D-E) KNP-FITC dopo 15 e 60 minuti rispettivamente; F) analisi sull'asse z.

3.11.2. Analisi delle interazioni con la membrana cellulare

La valutazione di eventuali alterazioni della membrana cellulare, dovuta all'ingresso delle nanoparticelle, è stata verificata mediante l'utilizzo della colorazione Rosso Nilo (Sigma-Aldrich®).

Il Rosso Nilo è una sonda fluorescente utilizzata per ottenere misure qualitative del contenuto lipidico di membrana grazie alla sua capacità di intercalarsi nella membrana cambiando il suo spettro di assorbimento e di emissione in funzione della natura dei lipidi. Infatti, quando questo si trova in presenza di lipidi neutri ha un assorbimento ad una lunghezza d'onda di 488 nm ed un'emissione a 530 nm restituendo, quindi una colorazione verde; mentre in presenza di lipidi polari assorbe ad una lunghezza d'onda di 540 nm ed emette a 620 nm restituendo, in questo caso, una fluorescenza nel rosso. La co-localizzazione di lipidi neutri e polari genera un colore giallo/oro.

La Fig. 35 evidenzia come (R)-9-HSA libero e (R)-9HSA@Ker internalizzino in maniera molto simile modificando l'organizzazione lipidica della membrana, la quale si presenta con aggregati, evidenziati dalla co-localizzazione delle due componenti lipidiche (colore giallo). Al contrario l'interazione delle nanoparticelle di (R)-9-HSA@HSAr e 12-HSA@Ker con la membrana plasmatica non modificano in modo significativo la morfologia delle due componenti lipidiche, come ben evidenziato in Fig. 36.

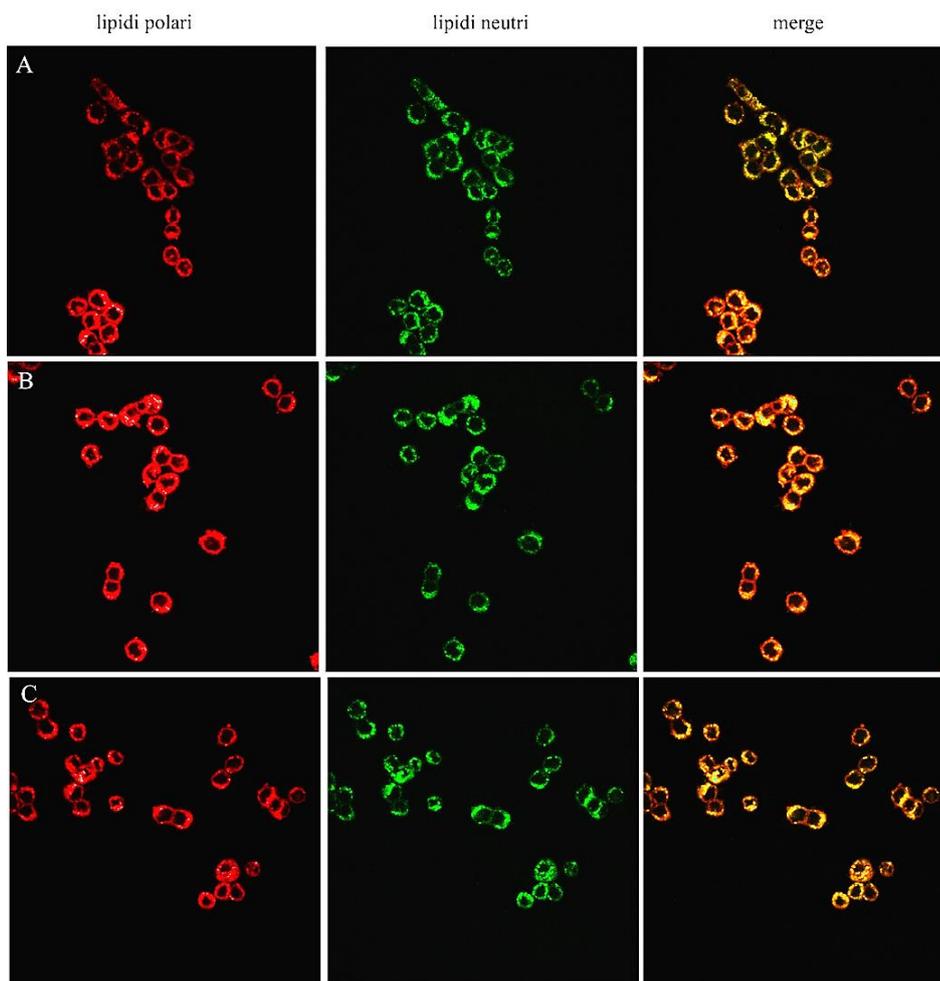


Figura 35: Analisi della interazione tra membrana plasmatica e (R)-9-HSA libero, (R)-9-HSA@Ker, effettuata in microscopia confocale di fluorescenza dopo colorazione con Rosso Nilo. La componente lipidica polare è mostrata con falso colore rosso, quella neutra con falso colore verde, la co-localizzazione delle due componenti lipidiche è mostrata con falso colore giallo. A) HT29 di controllo; B) HT29 trattate con (R)-9-HSA; C) HT29 trattate con (R)-9-HSA@Ker.

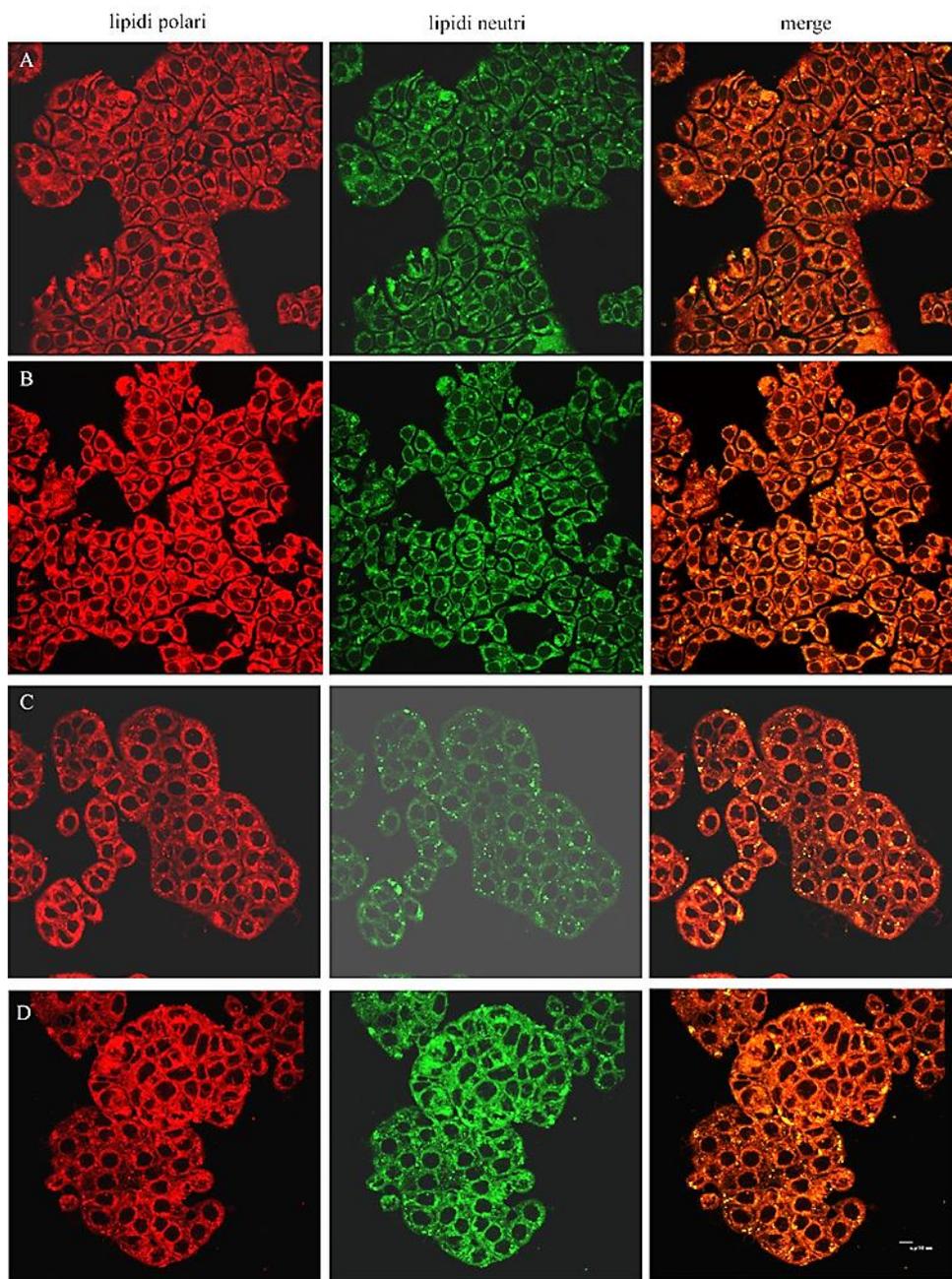


Figura 36: Analisi della interazione tra membrana plasmatica e 12-HSA@Ker, (*R*)-9-HSA@HSAr, effettuata in microscopia confocale di fluorescenza dopo colorazione con Rosso Nilo. La componente lipidica polare è mostrata con falso colore rosso, quella neutra con falso colore verde, la co-localizzazione delle due componenti lipidiche è mostrata con falso colore giallo. A) HT29 di controllo; B) HT29 trattate con 12-HSA@Ker; C) HT29 di controllo; D) HT29 trattate con (*R*)-9-HSA@HSAr.

3.11.3. Effetti sulla proliferazione cellulare

Gli effetti sulla proliferazione cellulare sono stati valutati somministrando alle HT29 concentrazioni note di (*R*)-9-HSA libero (50 μ M), nanoparticelle di cheratina caricate con il 10% di (*R*)-9-HSA ((*R*)-9-HSA@Ker, 50 μ M), nanoparticelle di albumina umana caricate con il 5.7% di (*R*)-9-HSA ((*R*)-9-HSA@HSAr, 50 μ M) e infine nanoparticelle di cheratina caricate con il 10% w/w di 12-HSA (12-HSA@Ker, 10 μ M).

La quantità di nanoparticelle è stata pesata in modo tale da raggiungere una concentrazione finale di (*R*)-9-HSA pari a 50 μ M. Per il 12-HSA si è usato un valore inferiore (10 μ M) perché per concentrazioni superiori a 20 μ M si osserva un effetto citotossico legato alla formazione di micelle e al distacco meccanico delle cellule e non riconducibile ad una citotossicità intrinseca di 12-HSA. Dopo 24 ore di trattamento, cellule di controllo e trattate vengono staccate e contate nella camera di Burkert.

Il grafico 3 evidenzia come i trattamenti con (*R*)-9-HSA libero, (*R*)-9-HSA@Ker, (*R*)-9-HSA@HSAr inducano una diminuzione del numero di cellule, mentre non si evidenzia alcun effetto sulla proliferazione da parte di 12-HSA libero e delle nanoparticelle 12-HSA@Ker.

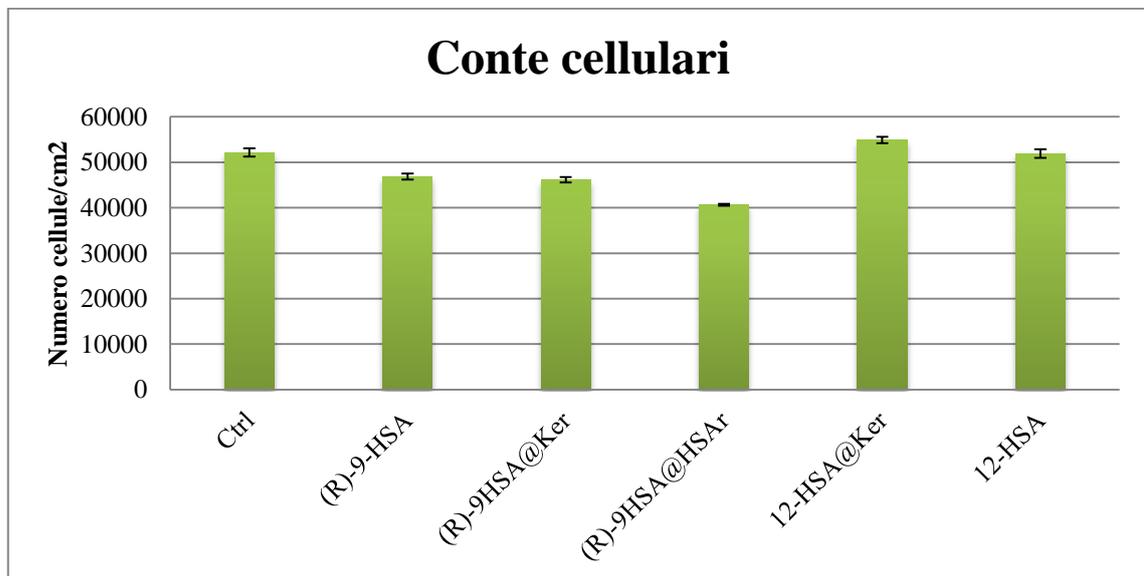


Grafico 3: Numero di cellule HT-29 sopravvissute dopo 24h dal trattamento con (*R*)-9-HSA libero, (*R*)-9-HSA@Ker, (*R*)-9-HSA@Ker, 12-HSA@Ker e 12HSA libero.

3.11.4. Analisi del ciclo cellulare

Per verificare se la diminuzione del numero di cellule fosse riconducibile ad uno stesso meccanismo d'azione si è proceduto con l'analisi del ciclo cellulare, utilizzando come tecnica la citometria a flusso.

L'analisi citofluorimetrica permette di analizzare la percentuale di cellule nelle diverse fasi del ciclo cellulare (Fig. 37), grazie alla funzionalizzazione stechiometrica tra DNA e una molecola "sonda", per cui l'intensità della fluorescenza emessa è proporzionale alla quantità di DNA per cellula. La sonda utilizzata è il Propidio Ioduro (PI), che si intercala tra le basi del DNA, che emette a $\lambda_{em} = 639$ nm quando è eccitata da una radiazione con $\lambda_{ex} = 465$ nm.

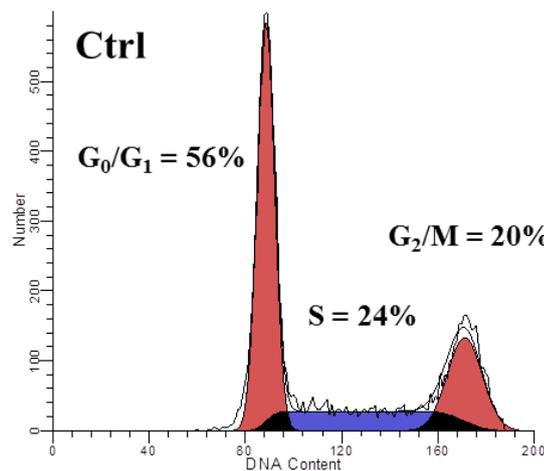


Figura 37: Citogramma di distribuzione di HT29 nella fase G₀/G₁, S, G₂/M del ciclo cellulare, le percentuali rappresentano la quantità relativa di cellule presenti nella fase del ciclo.

Il grafico 4 evidenzia come la somministrazione di (R)-9-HSA@HSAr induca un accumulo delle cellule nella fase G₀/G₁, esattamente come atteso dalla somministrazione di (R)-9-HSA libero, mentre la somministrazione di (R)-9-HSA@Ker causa un accumulo delle cellule nella fase S del ciclo. Poiché questa differenza poteva essere ascritta sia ad un effetto delle sole nanoparticelle di cheratina che ad una interazione specifica del sistema di (R)-9-HSA@Ker, si è pensato di somministrare 12-HSA@Ker in modo da avere un sistema molto simile a quello in esame. Dato che la somministrazione di 12-HSA@Ker non ha variato la distribuzione delle cellule nelle

diverse fasi del ciclo, è possibile affermare che l'accumulo delle cellule nella fase S del ciclo è da attribuire al sistema (R)-9-HSA@Ker.

Ulteriori indagini sono in corso per individuare il *target* molecolare del sistema (R)-9-HSA@Ker.

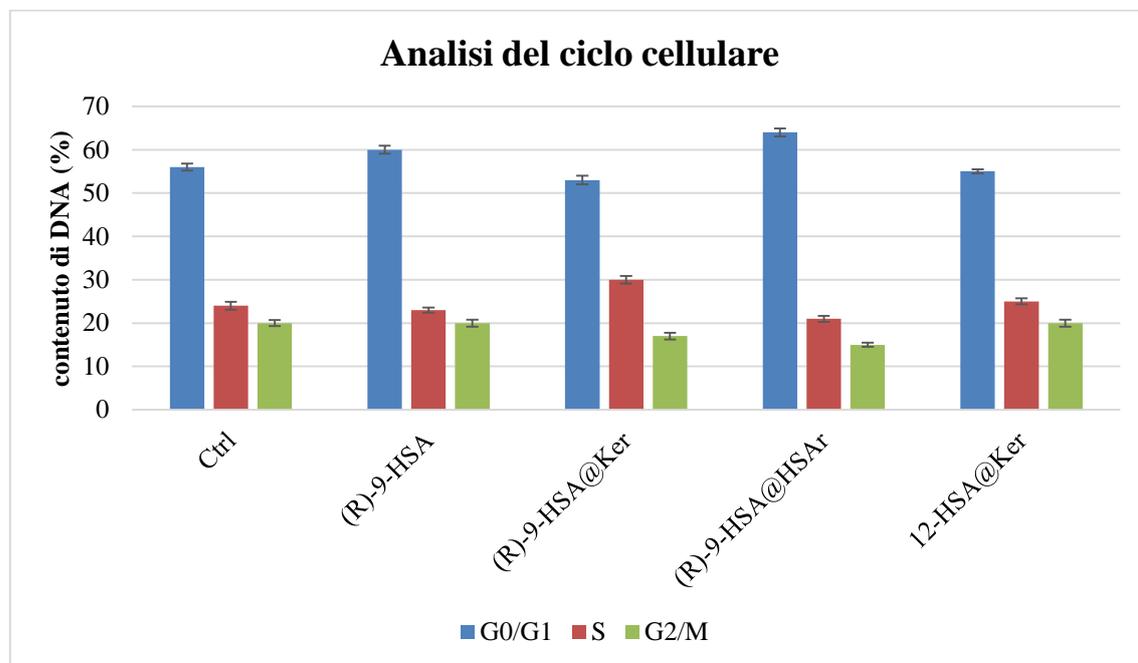


Grafico 4: Analisi del ciclo cellulare di cellule HT29 di controllo (Ctrl), di cellule trattate con: (R)-9-HSA libero, con (R)-9-HSA caricato su nanoparticelle di cheratina ((R)-9-HSA@Ker), con (R)-9-HSA caricato su nanoparticelle di albumina umana ((R)-9-HSA@HSAr) e con 12-HSA caricato su nanoparticelle di cheratina (12-HSA@Ker). I valori nell'istogramma corrispondono alle percentuali misurate in citofluorimetria.

CAPITOLO 4

Conclusioni

Nel presente lavoro di tesi è descritta per la prima volta la sintesi, la caratterizzazione e la valutazione dell'attività antitumorale *in vitro* di nanoparticelle proteiche di cheratina caricate con acido 9-(*R*)-9-idrossistearico, (*R*)-9-HSA.

L'acido (*R*)-9-HSA è stato sintetizzato a partire dal *pool* chirale che si estrae dai semi di *Dimorphotheca sinuata* L.. L'acido grasso ottenuto è stato poi caricato all'interno di nanoparticelle proteiche, di cheratina o albumina, al fine di consentirne la solubilizzazione e la veicolazione in ambiente acquoso. La formazione delle nanoparticelle avviene grazie all'interazione idrofobica tra l'acido grasso e la proteina. Il diametro idrodinamico medio delle nanoparticelle ottenute, sia con cheratina sia con albumina è circa 200 nm, mentre il *loading* di (*R*)-9-HSA risulta pari al 10% (w/w) per la cheratina, e al 6% (w/w) per l'albumina. Questo risultato conferma la superiore capacità della cheratina di incorporare stabilmente molecole idrofobiche, rendendola pertanto molto interessante come *carrier* di farmaci insolubili in acqua.

Le nanoparticelle caricate con (*R*)-9-HSA, (*R*)-9-HSA@Ker, mostrano un rilascio di principio attivo controllato nel tempo in tampone fosfato salino (PBS), sia a pH 7.4 sia a pH 5.5. Dopo 48 ore a pH 7.4 le nanoparticelle rilasciano circa il 60% di acido, mentre dopo lo stesso tempo a pH 5.5, solo il 25% di (*R*)-9-HSA viene stato rilasciato.

L'attività biologica delle nanoparticelle caricate con (*R*)-9-HSA è stata valutata sulla linea cellulare di adenocarcinoma umano del colon (HT29) e confrontata con quella dell'acido libero. Al fine di valutare la capacità di internalizzazione cellulare, la proteina è stata dapprima legata covalentemente alla fluoresceina e quindi utilizzata per la preparazione di nanoparticelle di cheratina fluorescenti. Le analisi effettuate al microscopio confocale dimostrano che le nanoparticelle di cheratina sono efficacemente internalizzate già dopo 15' dalla somministrazione. La fluorescenza ha inoltre permesso di evidenziare che le (*R*)-9-HSA@Ker modificano la membrana plasmatica, formando delle vescicole. La somministrazione di (*R*)-9-HSA@Ker provoca una diminuzione della proliferazione cellulare, in accordo con l'azione di (*R*)-9-HSA libero, tuttavia, contrariamente a quanto accade con l'acido libero che agisce bloccando il ciclo cellulare

Capitolo 4 – Conclusioni

nella fase G₀/G₁, nel caso del trattamento con (R)-9-HSA@Ker si riscontra un accumulo di cellule in fase S con conseguente morte cellulare.

Al fine di escludere che l'effetto osservato sia legato alla sola cheratina, bensì all'azione dell'acido una volta caricato sulle nanoparticelle, abbiamo caricato sulla cheratina un isomero strutturale di (R)-9-HSA, l'acido 12-idrossistearico, noto per essere biologicamente inattivo su HT29. I risultati ottenuti mostrano che le nanoparticelle 12-HSA@Ker non hanno alcun effetto sulla proliferazione cellulare, escludendo pertanto la possibilità che l'effetto antiproliferativo osservato per (R)-9-HSA@Ker sia attribuibile alla sola proteina ed evidenziando un'azione sinergica dovuta alla combinazione tra cheratina e (R)-9-HSA. Tale evidenza sperimentale è di notevole interesse e sono in corso ulteriori studi per determinare il meccanismo d'azione dell'acido una volta caricato sulle nanoparticelle.

CAPITOLO 5

Parte sperimentale

Note generali

I semi della pianta *Dimorphotheca sinuata* L. sono stati acquistati da Galassi sementi SNC (Gambettola, FC). I reagenti utilizzati, se non diversamente specificato, provengono dalla Sigma-Aldrich (Milano). La cromatografia su colonna (*Flash Chromatography*, FC) è stata effettuata utilizzando come fase stazionaria gel di silice (0.037-0.063 mm, Merck), mentre la cromatografia su strato sottile (TLC) è stata effettuata usando gel di silice 60 (FlukaAnalytical). Le macchie relative ai reagenti e ai prodotti sono state rilevate utilizzando una soluzione acquosa di $(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_{24}$ (2.5%), $(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_4$ (1%) in 10% H_2SO_4 .

La lana Merino è stata gentilmente fornita da Cariaggi Fine Yards S.p.a., mentre tutti i reagenti utilizzati per la sintesi di nanoparticelle sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (Milano).

La caratterizzazione delle nanoparticelle, *Dynamic Light Scattering* e potenziale ζ , è stata effettuata con uno strumento NanoBrook Omni.

Lo spettrofotometro UV-VIS utilizzato è un Cary 100 UV-VIS della Agilent Technologies.

La centrifuga utilizzata è il modello Hettich EBA 12.

Per la liofilizzazione si è utilizzato uno strumento Edwards Modulyo.

L'analisi TGA è stata eseguita utilizzando uno strumento TA Instruments SDT Q600 con scansioni a $10^\circ\text{C}/\text{min}$ da temperatura ambiente a 600°C , in aria.

Gli spettri di risonanza magnetica nucleare (^1H NMR) sono stati acquisiti con spettrometri Varian Gemini 300, Mercury 400, Agilent 500 e Inova 600 (Varian, Palo Alto USA); le frequenze sono riportate in Hz e lo spostamento chimico δ è riportato in ppm, prendendo come riferimento il solvente CDCl_3 ($\delta = 7.27$ ppm per ^1H NMR).

Per l'idrogenazione è stato utilizzato un idrogenatore Parr modello 3911EKX.

Il punto di fusione del prodotto è stato determinato tramite apparecchio Buchi 535 e non è stato corretto.

Capitolo 5 – Parte sperimentale

Lo spettro di massa (EI) è stato registrato con uno spettrometro VG-7070E ad un potenziale di ionizzazione di 70 eV.

I solventi anidri sono stati preparati seguendo procedure standard.

5.1. Sintesi di acido (*R*)-9-idrossistearico, (*R*)-9-HSA

13 g di semi di *Dimorphotheca sinuata* L., sono stati sminuzzati in un macinaspezie elettrico e trasferiti in un pallone a tre colli precedentemente anidrificato mediante riscaldamento con pistola essiccatrice ad aria e mantenuto sotto flusso di azoto. Si aggiungono 210 mL di una miscela CHCl₃/CH₃OH 2:1 (v/v). Il pallone è mantenuto al riparo dalla luce per evitare la formazione di radicali in posizione alfa ai doppi legami presenti negli acidi grassi dei trigliceridi. Dopo 24 ore la miscela è filtrata su setto poroso sottovuoto e i semi rimasti sul filtro sono lavati con CHCl₃. L'estratto lipidico è acidificato con circa 20 mL di soluzione 0.1 M in HCl e 0.1 M in NaCl, quindi la fase organica è separata, anidrificata su MgSO₄ anidro, filtrata e concentrata, ottenendo un olio viscoso di colore giallo. All'olio grezzo, posto in un pallone raffreddato in bagno di ghiaccio e mantenuto in atmosfera inerte (azoto) vengono aggiunti 40 mL di CH₃OH e CH₃CONa (2.350 g; 43.52 mmol) aggiunto a piccole aliquote. Si lascia sotto agitazione magnetica per due ore, si acidifica con una soluzione di HCl 1M fino a pH~4 e si estrae con esano tramite imbuto separatore; le fasi organiche sono anidificate con MgSO₄ anidro, filtrate e concentrate. L'olio ottenuto è disciolto in 30 mL di AcOEt e trasferito in una bottiglia per idrogenatore Parr. Dopo l'aggiunta di una punta di spatola di PtO₂ (catalizzatore di Adams) il sistema è sottoposto ad idrogenazione. La miscela è lasciata reagire per 30 minuti sotto pressione di idrogeno (3 bar), a fine reazione il liquido si presenta incolore. Si rimuove il catalizzatore dalla soluzione tramite filtrazione su setto poroso sul quale è stata posta della celite [(CaO)₃·Al₂O₃]. Dopo concentrazione della fase liquida al rotavapor si ottiene un solido bianco di consistenza cerosa. Questo solido contiene una miscela di esteri metilici di acidi grassi. Il prodotto d'interesse è stato purificato via FC eluendo con una soluzione di etere di petrolio/etere etilico (7:3).

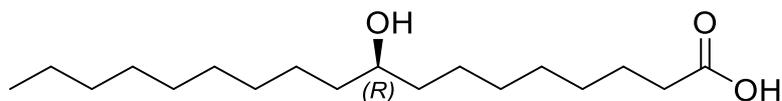
(*R*)-9-idrossiottadecanoato di metile 0.477 g (1.52 mmol) è stato ottenuto come solido bianco ceroso; p.f.: 49-51°C [lett.¹²⁷: 50-51.5 °C].

¹H NMR (399.9 MHz, CDCl₃): 3.65 (s, 3 H, OCH₃), 3.60-3.55 (m, 1 H, CHOH), 2.29 (t, 2 H, *J* = 7.6 Hz, CH₂COO), 1.61 (quint, 2 H, *J* = 7.4 Hz, CH₂CH₂COO), 1.50–1.20 (m, 27 H, incl. OH), 0.87 (t, 3 H, *J* = 7.0 Hz, CH₃). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃): 174.1, 71.7, 51.3, 37.4, 37.3, 33.9, 31.8, 29.6, 29.56, 29.5, 29.4, 29.2, 29.1, 28.9, 25.5, 25.4, 24.8, 22.6, 14.05. IR (CHCl₃): 3427, 1728 cm⁻¹. MS (EI) *m/z* (%): 283 (M⁺ -

Capitolo 5 – Parte sperimentale

OCH₃, 2), 264 (4), 187(45), 159 (11), 158 (53), 155 (100), 129 (6), 115 (18), 109 (14), 87 (50), 74 (33), 69 (18), 55 (31).

L'ultimo passaggio della sintesi è stato l'idrolisi dell'estere ad acido carbossilico: (*R*)-9-idrossiottadecanoato di metile è stato sciolto in circa 40 mL di KOH metanolica al 10% (w/v) e il sistema mantenuto a temperatura ambiente e sotto agitazione magnetica per circa quattro ore, successivamente si è acidificato con HCl 4M fino alla formazione di un precipitato bianco, che è stato disciolto in AcOEt ed estratto (3 x 20 mL). La fase organica raccolta è stata anidrificata su MgSO₄ anidro, filtrata e infine concentrata. Il solido bianco ottenuto è stato ricristallizzato sciogliendolo nella minima quantità di CH₃OH, dopo lento raffreddamento cristalli bianchi sono precipitati dalla soluzione e la soluzione rimasta, in cui sono presenti eventuali impurezze, è stata rimossa. Si ottengono 0.291 g (0.97 mmol) di acido (*R*)-9-idrossistearico (resa 64%). P.f.: 82-83 °C [lett.: ¹²⁸ 81-82 °C].



Acido (*R*)-9-idrossistearico

Aspetto: Solido bianco ceroso

P.f. = 82-83 °C

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 4.73 (br.s, 1H, OH), 3.66-3.54 (m, 1H, CHOH), 2.37 (t, *J*=7.8 Hz, 2H, CH₂CO), 1.63 (quint, 2H, *J*=7.1 Hz, CH₂CH₂COO), 1.60-1.23 (m, 27H, CH₂ alifatici e OH), 0.89 (t, *J*=7.0 Hz, 3H, CH₃).

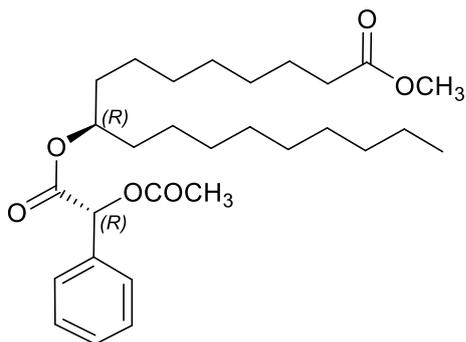
¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃): 178.7, 72.0, 37.5, 37.4 33.5, 31.9, 29.7, 29.6 (2 segnali sovrapposti), 29.4, 29.3, 29.2, 29.0, 25.7, 25.5, 24.7, 22.7, 14.1. IR (CHCl₃): 3427, 1707 cm⁻¹. MS (m/e): 283, 282 (M⁺ - H₂O), 264, 155.

5.1.1. Valutazione dell'eccesso enantiomerico

Per valutare l'eccesso enantiomerico si è derivatizzata un'aliquota di metil (*R*)-9-idrossistearato.

In un pallone da 25 mL sono stati posti 10 mg di acido (*R*)-(-)- α -acetossifenilacetico e 2 mg di catalizzatore DMAP (4-(*N,N*)-dimetilammino piridina), il tutto è stato sciolto in 200 μ L di CH₂Cl₂ anidro, mantenendo il sistema sotto flusso di azoto, sotto agitazione in bagno di ghiaccio (0°C). Nel pallone è stata aggiunta una soluzione preparata solubilizzando 5 mg di metil (*R*)-9-idrossistearato e 10 mg di DCC (dicicloesilcarbodiimmide) in 350 μ L di CH₂Cl₂ anidro, si lascia reagire per una notte. La completezza della reazione viene verificata tramite TLC (eluente n-esano/AcOEt 3:1).

Il prodotto puro (0.0947 g) è stato ottenuto mediante TLC preparativa, utilizzando una lastra di vetro (20x20 cm) sulla quale era depositato uno strato di silice. Da questa, la macchia con R_f circa 0.6 è stata rimossa grattando. Il prodotto è stato separato dalla silice grazie all'estrazione con CH₃OH e successiva filtrazione. Dopo eliminazione del solvente all'evaporatore rotante, il prodotto è stato sciolto in CDCl₃ e analizzato allo spettrometro Varian Inova 600 al fine di valutare il rapporto diastereomerico del composto ottenuto metil (9*R*)-9-{[(2*R*)-2-(acetilossi)-2-fenilacetil]ossi}ottadecanoato che è risultato essere 95/5 (*R,R*:*S,R*), che corrisponde ad un e.e. del 90% di metil (*R*)-9-idrossistearato. Lo stesso rapporto è stato determinato anche dallo spettro ¹H NMR della miscela grezza di reazione prima della purificazione mediante TLC su lastra per preparativa (dopo evaporazione del solvente il grezzo è stata disciolto in CDCl₃ e analizzato). Analisi preliminari sulla miscela racemica avevano mostrato che il segnale H-2 del residuo proveniente dall'acido mandelico e quello del gruppo metossilico estereo erano sufficientemente separati e quindi integrabili: la determinazione del d.r. è stata perciò effettuata su questi segnali.



metil (9R)-9-([(2R)-2-(acetilossi)-2-fenilacetil]ossi)ottadecanoato

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): δ 7.51-7.44 (m, 2H, fenilici), 7.40-7.34 (m, 3H, fenilici), 5.874 (s, 1H, H-2), 4.88 (quint., 1H, $J=6.36$ Hz, H-9), 3.671 (s, 3H, OCH_3), 2.30 (t, 2H, $J=7.55$ Hz, CH_2CO), 2.19 (s, 3H, OCOCH_3), 1.68-1.00 (m.s, 28 H, alifatici), 0.89 (t, 3H, $J=6.8$ Hz, CH_3).

5.2. Metodo di estrazione della cheratina

La lana Merino è lavata dalle impurezze lipidiche con etere di petrolio in un estrattore di Soxhlet. Si pesano 5 g di lana pulita, si sminuzzano finemente ed infine si trasferiscono in un pallone a tre colli contenente 100 mL di una soluzione composta da urea (8 M), sodio dodecilsolfato (SDS, 0.11 M) e metabisolfito di sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, 0.5 M). Il pallone è riempito con atmosfera di azoto, posto in un bagno d'olio a 65°C e lasciato in agitazione magnetica per una notte sotto battente di azoto. Il giorno seguente si filtra la soluzione tramite filtrazione a vuoto (cut-off 10-16 μm). La soluzione filtrata è posta in un tubo di cellulosa per dialisi (*molecular weight cut-off*, MWCO 12-14 kDa) e dializzata contro acqua mQ per tre giorni a 25°C , cambiando l'acqua esterna ogni due ore. La soluzione acquosa risultante è liofilizzata in modo da ottenere una polvere di cheratina pura.

5.3. Nanoparticelle di cheratina

5.3.1. Nanoparticelle bianche

5.3.1.1. Self-assembly

Si sciolgono 15 mg di cheratina in 1 mL di tampone carbonato 0.1 M (pH 9.2) e si lascia in agitazione magnetica fino all'ottenimento di una soluzione limpida incolore. Se rimangono dei corpuscoli non disciolti si procede con filtrazione a 0.45 μm con filtri a trottola. Successivamente si esegue l'aggiunta una soluzione all'8% di glutaraldeide (0.4 μL per ogni mg di cheratina), dopodiché si lascia reagire in agitazione per 24 h. A fine reazione si prelevano 20 μL di nanoparticelle e si portano a 2000 μL in una cuvetta di plastica, poi si caratterizza al DLS. La glutaraldeide non reagita è rimossa tramite 3 lavaggi con acqua mQ alla centrifuga (12000 rpm, 5 minuti), con filtri MWCO 100 kDa. Ad ogni ciclo le nanoparticelle sono risospese in 400 μL di H₂O mQ. La sospensione di nanoparticelle è raccolta e liofilizzata.

5.3.1.2. Desolvatazione

Si sciolgono 15 mg di cheratina in 1 mL di tampone carbonato 0.1 M (pH 9.2) e si lascia in agitazione magnetica fino all'ottenimento di una soluzione limpida incolore. Se rimangono dei corpuscoli non disciolti si filtra con filtro a membrana per siringhe (cut-off 0.45 μm). Si aggiunge etanolo goccia a goccia in rapporto 1:4 (V/V, soluzione di cheratina : etanolo). Successivamente si esegue l'aggiunta una soluzione all'8% di glutaraldeide (0.4 μL per ogni mg di cheratina), dopodiché si lascia reagire in agitazione per 24 h. A fine reazione si prelevano 20 μL di nanoparticelle e si portano a 2000 μL in una cuvetta di plastica, poi si caratterizza al DLS. L'etanolo e la glutaraldeide non reagita sono rimossi tramite 3 lavaggi con acqua mQ alla centrifuga (12000 rpm, 5 minuti), con filtri MWCO 100 kDa. Ad ogni ciclo le nanoparticelle sono risospese in 400 μL di H₂O mQ. La sospensione di nanoparticelle è raccolta e liofilizzata.

5.3.2. Funzionalizzazione della cheratina con FITC, Ker-FITC

Si prepara una soluzione 20 mg/mL di cheratina in tampone carbonato 0.1 M (pH 9.2). Successivamente si prepara una soluzione 1 mg/mL di fluoresceina-5-isotiocianato (FITC isomero I) in DMSO anidro. Per consentire una funzionalizzazione efficace è necessario che le soluzioni siano preparate al momento. La soluzione di FITC in DMSO è aggiunta alla soluzione di cheratina in modo gli equivalenti di FITC siano 10 volte quelli di cheratina. Si fa reagire per 48 h, sotto agitazione magnetica e al buio. A fine reazione si eliminano i reagenti non convertiti tramite otto lavaggi con PBS (pH 7.4) alla centrifuga, con filtri con MWCO 10 kDa, impostando cicli da 5 minuti a 10000 rpm. Si recupera il liquido arancio fluorescente e si liofilizza.

Il grado di funzionalizzazione ottenuto è 2.2/1 ($\text{mol}_{\text{FITC}}/\text{mol}_{\text{KER}}$) ed è stato valutato tramite spettrofotometria UV-VIS, previa costruzione di una curva di calibrazione utilizzando soluzioni a titolo noto di FITC in tampone carbonato 0.1 M. La curva di calibrazione è stata ricavata misurando l'assorbanza a $\lambda_{\text{max}} = 510 \text{ nm}$.

5.3.3. Nanoparticelle fluorescenti, KNP-FITC

La cheratina fluorescente (Ker-FITC) è stata utilizzata per preparare nanoparticelle scariche fluorescenti per verificare la loro internalizzazione in cellule tumorali HT29. La procedura utilizzata (*self-assembly*) è identica a quella riportata nella sezione 5.3.1.1., tranne per l'utilizzo di H₂O mQ come solvente per la proteina al posto di tampone carbonato.

5.3.4. Nanoparticelle cariche

5.3.4.1. Nanoparticelle caricate con (R)-9-HSA, (R)-9-HSA@Ker

Si prepara una soluzione di (R)-9-HSA in etanolo (5 mg/mL). In un *vial* si sciolgono 10 mg di cheratina in H₂O mQ sotto agitazione magnetica, in modo da ottenere una soluzione limpida incolore con concentrazione pari a 1 mg/mL. Successivamente si aggiunge goccia a goccia un volume di soluzione di (R)-9-HSA in EtOH, in modo da ottenere un *loading* di (R)-9-HSA pari al 10% w/w rispetto al peso totale finale. Si

attendono 20 minuti per consentire la formazione delle nanoparticelle, si caratterizzano al DLS e infine si liofilizzano.

La resa in nanoparticelle è stata pari al 78.0%, calcolata tramite la seguente equazione:

$$Resa (\%) = \frac{\text{massa nanoparticelle ottenute}}{\text{massa cheratina iniziale}} \cdot 100$$

5.3.4.2. Nanoparticelle fluorescenti caricate con (R)-9-HSA, (R)-9-HSA@Ker-FITC

Si prepara una soluzione di Ker-FITC 1 mg/mL in H₂O mQ. In parallelo si prepara una soluzione di (R)-9-HSA 5 mg/mL in EtOH. Quando la cheratina è perfettamente solubilizzata si aggiunge, goccia a goccia e sotto vigorosa agitazione magnetica, la soluzione alcolica di (R)-9-HSA in modo tale che la quantità di acido sia il 6% (w/w) rispetto al totale finale. Si lascia in agitazione per 20 minuti e poi si prelevano 200 µL di liquido, si portano a 2000 µL con H₂O mQ in una cuvetta di plastica e si caratterizza al DLS.

La resa in nanoparticelle è stata dell'89.6% (w/w).

5.3.5. Prove di rilascio

Si preparano e liofilizzano circa 45 mg di nanoparticelle caricate con (R)-9-HSA, seguendo la procedura descritta nel paragrafo 4.3.2.1.. Le nanoparticelle sono poi divise equamente in sei *vials* numerati. Successivamente si aggiunge 1 mL di PBS (pH 7.4) nei *vials* 1,2,3 e 1 mL di PBS (pH 5.5) nei *vials* 4,5,6. Le sospensioni ottenute si trasferiscono in sei tubicini di cellulosa per dialisi (MWCO 12-14 kDa), questi vengono chiusi e posti contro 17 mL di PBS a pH 7.4 (*vials* 1-3) e PBS a pH 5.5 (*vials* 4-6). La soluzione tampone esterna al tubo di dialisi è mantenuta sotto blanda agitazione magnetica e mantenuta a 37°C. Ad intervalli regolari si preleva totalmente la soluzione tampone esterna e si rinnova con soluzione fresca. Sulla soluzione prelevata vengono eseguite 3 estrazioni con CH₂Cl₂ (2 mL ciascuna), le fasi organiche sono riunite in un *vial* da 10 mL e seccate all'evaporatore rotante. Si lava il *vial* con 0.8 mL di CDCl₃ (4 x 0.2 mL) e i lavaggi sono trasferiti in un tubo NMR.

Si prepara una soluzione a titolo noto di 2,4-dinitrotoluene in CDCl_3 che poi viene aggiunta, prelevando un volume noto con siringa per HPLC, direttamente nel tubo NMR. Si acquisisce lo spettro ^1H NMR tramite spettrometro Agilent 500 MHz.

Per l'analisi quantitativa è stato scelto il picco del 2,4-DNT con δ 8.37 (dd) e alla sua area è stato assegnato valore unitario. L'area del picco con δ 2.37 (t), relativa ai protoni CH_2COO di (*R*)-9-HSA, è stata calcolata in funzione del picco di riferimento del 2,4-DNT. Grazie al rapporto tra le aree dei picchi scelti e conoscendo la quantità esatta di standard aggiunto nel tubo NMR si può risalire alla quantità di (*R*)-9-HSA rilasciata. Siccome la quantità di (*R*)-9-HSA presente in ogni volume di soluzione tampone prelevato non rappresenta la quantità totale rilasciata dall'inizio dell'esperimento, ma solamente quella rilasciata nell'intervallo tra un prelievo e l'altro, per costruire il grafico % rilasciata vs tempo è stato necessario calcolare la sommatoria dei singoli punti.

5.4. Nanoparticelle di albumina

5.4.1. Nanoparticelle bianche

Le nanoparticelle bianche di albumina sono state preparate secondo il metodo di desolvatazione.

Si prepara una soluzione 10 mg/mL di albumina umana ricombinante (HSA_r) in H_2O mQ. Si lascia in agitazione magnetica fino all'ottenimento di una soluzione limpida incolore. Si aggiunge il 10% (v/v) di soluzione tampone carbonato 0.1 M. Se sono presenti dei corpuscoli o della polvere, si filtra con filtro a membrana per siringhe (cut-off 0.45 μm). Si aggiunge etanolo goccia a goccia in rapporto 1:4 (V/V, soluzione di albumina : etanolo). Terminata l'aggiunta di etanolo, si lascia in agitazione per 10 minuti e poi si sonica per 2 minuti. Successivamente si esegue l'aggiunta una soluzione all'8% di glutaraldeide (0.4 μL per ogni mg di albumina), dopodiché si lascia reagire in agitazione per 24 h. A fine reazione si prelevano 20 μL di nanoparticelle e si portano a 2000 μL in una cuvetta di plastica, poi si caratterizza al DLS. L'etanolo e la glutaraldeide non reagita sono rimossi tramite 3 lavaggi con acqua mQ alla centrifuga (12000 rpm, 5 minuti), con filtri MWCO 100 kDa. Ad ogni ciclo le nanoparticelle sono risospese in 400 μL di H_2O mQ. La sospensione di nanoparticelle è raccolta e liofilizzata, previa aggiunta di saccarosio (5 mg/mL).

5.4.2. Nanoparticelle caricate con (R)-9-HSA, (R)-9-HSA@HSAr

Si prepara una soluzione 1 mg/mL di HSAr in H₂O mQ. Si mantiene in agitazione magnetica fino all'ottenimento di una soluzione limpida incolore. Successivamente si aggiunge, goccia a goccia e sotto vigorosa agitazione magnetica, una soluzione di (R)-9-HSA in EtOH (5 mg/mL) in modo tale che la concentrazione di acido finale sia il 6.0% (w/w) rispetto al totale. Terminata l'aggiunta, si lascia in agitazione magnetica per 20 minuti, al termine dei quali si prelevano 200 µL di nanoparticelle e si portano a 2000 µL in una cuvetta di plastica. Si caratterizza al DLS e infine si liofilizza senza aggiungere saccarosio.

5.5. Analisi biologiche *in vitro*

5.5.1. Colture cellulari

Il modello cellulare utilizzato è una linea umana di adenocarcinoma del colon (HT29). Le cellule vengono coltivate in medium RPMI 1640 (Eurobio), arricchito con il 10% di FBS-Siero Fetale Bovino (Euroclone), e con l'1% di L-glutamina (Sigma-Aldrich) 2 mM. Le HT29 vengono inoculate alla densità di 1×10^4 cellule/cm² in piastre di Petri (Orange) dove crescono in monostrato e mantenute in incubatore a 37°C, con il 5% di CO₂, a pressione atmosferica. Una volta che la coltura si è ampliata, si esegue lo *split* mediante tripsinizzazione che prevede: due lavaggi con tampone fosfato PBS [NaCl (Sigma) 8 g/L, Na₂HPO₄ (Sigma) 1,15 g/L, KCl (Sigma) 0,2 g/L, KH₂PO₄ (Sigma) 0,2 g/L], aggiunta di tripsina (Seromed) allo 0,125% in EDTA (Sigma) allo 0,02% a 37 °C. Al termine del distacco, si neutralizza la tripsina con terreno completo e si procede alla conta delle cellule per mezzo della camera di Burker.

5.5.2. Internalizzazione NPs

Le cellule sono state inoculate su vetrino e dopo 24 ore di adesione alcune sono state trattate con nanoparticelle (R)-9HSA@Ker-FITC (50 µM rispetto a (R)-9-HSA) e altre con KNP-FITC per 15 e 60 minuti, successivamente preparate per l'analisi in microscopia confocale. Le immagini sono state acquisite con un microscopio confocale Nikon utilizzando un obiettivo ad immersione in olio 60x.

5.5.3. Analisi delle interazioni con la membrana cellulare

Le cellule vengono inoculate su un vetrino coprioggetto sterile ad una densità di 2×10^5 cellule in 2 mL di terreno RPMI 160 con FBS 10%. Queste sono state lasciate proliferare in incubazione per 24-72 ore a 37°C e 5% di CO₂ e poi trattate per 60 minuti con (R)-9-HSA (50 μM), (R)-9-HSA@Ker (50 μM rispetto a (R)-9-HSA). La colorazione con la sonda è stata effettuata mediante aggiunta di una soluzione di Rosso Nilo 5 μM per 5 min a 37°C. Il fissaggio delle cellule, quindi, è stato fatto eliminando il terreno di coltura, lavando le cellule due volte con PBS ed aggiungendo 0.5 mL di paraformaldeide 3% per 5min. Sono seguiti due lavaggi con PBS-glicina 0,1 M ed altri due con PBS-BSA 1%. I vetrini coprioggetto sono stati montati su vetrini portaoggetto utilizzando una goccia di Mowiol, e successivamente analizzati con il microscopio confocale (Nikon C1s), equipaggiato con un obiettivo ad immersione ad olio 60x .

5.5.4. Conta cellulare

Le HT29 sono inoculate ad una densità di 100-150.000 in *multiwell* in 2 mL di terreno completo. Dopo 24 h dall'inoculo vengono trattate con (R)-9-HSA libero (50 μM), (R)-9-HSA@Ker (50 μM), con (R)-9-HSA@HSAr 50 μM, o con 12-HSA@Ker (10 μM). Dopo 24 ore di trattamento, le cellule di controllo e quelle trattate vengono staccate e contate.

5.5.5. Analisi ciclo cellulare

Le cellule HT29 sono inoculate in piastre, e dopo 24 ore sono trattate con (R)-9-HSA libero, (R)-9-HSA@Ker (50 μM rispetto a (R)-9-HSA), con (R)-9-HSA@HSAr (50 μM rispetto a (R)-9-HSA) e 12-HSA@Ker (10 μM rispetto a 12-HSA). A 24 ore dal trattamento, cellule di controllo e trattate sono state tripsinizzate, lavate due volte in PBS (soluzione di tampone fosfato) e centrifugate. Il *pellet* è stato risospeso in 0.01% di Nonidet-P40 (Sigma-Aldrich), 10 μg/mL di RNasi (Sigma-Aldrich), 0,1% di sodio-citrato (Sigma-Aldrich), 50 μg/mL di propidio ioduro (PI) (Sigma-Aldrich), per 30 minuti al buio a temperatura ambiente. La fluorescenza del PI è stata analizzata usando un citofluorimetro a flusso Beckman Coulter Epics XL-MCL a flusso e l'analisi delle cellule è stata eseguita usando il programma Cell Cycle e analizzate utilizzando il software MODEFIT 5.0.

Bibliografia

Bibliografia

- (1) Feynman, R. P. (1960). There's plenty of room at the bottom. *Engineering and Science*, 23(5), 22-36.
- (2) Taniguchi, N. (1974). On the basic concept of nanotechnology. In *Proc. Intl. Conf. Prod. Eng. Tokyo, Part II, Japan Society of Precision Engineering*, 18-23.
- (3) ESF, E. (2005). Nanomedicine: An ESF–European Medical Research Councils (EMRC) Forward Look Report. *Strasbourg cedex, France*.
- (4) Webster, T. J. (2006). Nanomedicine: What's in a Definition?. *International Journal of Nanomedicine*, 1(2), 115–116.
- (5) Hawkins, M. J., Soon-Shiong, P., & Desai, N. (2008). Protein nanoparticles as drug carriers in clinical medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(8), 876-885.
- (6) Ten Tije, A. J., Verweij, J., Loos, W. J., & Sparreboom, A. (2003). Pharmacological effects of formulation vehicles: implications for cancer chemotherapy. *Clinical Pharmacokinetics*, 42(7), 665-685.
- (7) Gelderblom, H., Verweij, J., Nooter, K., & Sparreboom, A. (2001). Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. *European Journal of Cancer*, 37(13), 1590-1598.
- (8) Kloover, J. S., Den Bakker, M. A., Gelderblom, H., & Van Meerbeeck, J. P. (2004). Fatal outcome of a hypersensitivity reaction to paclitaxel: a critical review of premedication regimens. *British Journal of Cancer*, 90(2), 304-305.
- (9) Blanco, E., Shen, H., & Ferrari, M. (2015). Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nature Biotechnology*, 33(9), 941-951.
- (10) Wilhelm, S., Tavares, A. J., Dai, Q., Ohta, S., Audet, J., Dvorak, H. F., & Chan, W. C. (2016). Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nature Reviews Materials*, 1, 16014. doi: 10.1038/natrevmats.2016.14
- (11) Gref, R., Lück, M., Quellec, P., Marchand, M., Dellacherie, E., Harnisch, S., ... & Müller, R. H. (2000). 'Stealth'corona-core nanoparticles surface modified by

Bibliografia

polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 18(3), 301-313.

(12) Hobbs, S. K., Monsky, W. L., Yuan, F., Roberts, W. G., Griffith, L., Torchilin, V. P., & Jain, R. K. (1998). Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(8), 4607-4612.

(13) Noguchi, Y., Wu, J., Duncan, R., Strohalm, J., Ulbrich, K., Akaike, T., & Maeda, H. (1998). Early phase tumor accumulation of macromolecules: a great difference in clearance rate between tumor and normal tissues. *Cancer Science*, 89(3), 307-314.

(14) Iyer, A. K., Khaled, G., Fang, J., & Maeda, H. (2006). Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug Discovery Today*, 11(17), 812-818.

(15) Saha, R. N., Vasanthakumar, S., Bende, G., & Snehalatha, M. (2010). Nanoparticulate drug delivery systems for cancer chemotherapy. *Molecular Membrane Biology*, 27(7), 215-231.

(16) Yu, B. O., Tai, H. C., Xue, W., Lee, L. J., & Lee, R. J. (2010). Receptor-targeted nanocarriers for therapeutic delivery to cancer. *Molecular Membrane Biology*, 27(7), 286-298.

(17) Bertrand, N., & Leroux, J. C. (2012). The journey of a drug-carrier in the body: an anatomo-physiological perspective. *Journal of Controlled Release*, 161(2), 152-163.

(18) Wang, J., Tian, S., Petros, R. A., Napier, M. E., & DeSimone, J. M. (2010). The complex role of multivalency in nanoparticles targeting the transferrin receptor for cancer therapies. *Journal of the American Chemical Society*, 132(32), 11306-11313.

(19) Kamaly, N., Xiao, Z., Valencia, P. M., Radovic-Moreno, A. F., & Farokhzad, O. C. (2012). Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. *Chemical Society Reviews*, 41(7), 2971-3010.

Bibliografia

- (20) Lammers, T., Kiessling, F., Hennink, W. E., & Storm, G. (2012). Drug targeting to tumors: principles, pitfalls and (pre-) clinical progress. *Journal of Controlled Release*, 161(2), 175-187.
- (21) Mohanraj, V. J., & Chen, Y. (2006). Nanoparticles-a review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5(1), 561-573.
- (22) Lohcharoenkal, W., Wang, L., Chen, Y. C., & Rojanasakul, Y. (2014). Protein nanoparticles as drug delivery carriers for cancer therapy. *BioMed Research International*, 2014. doi:10.1155/2014/180549
- (23) Conde, J., Doria, G., & Baptista, P. (2011). Noble metal nanoparticles applications in cancer. *Journal of Drug Delivery*, 2012. doi:10.1155/2012/751075
- (24) Boisselier, E., & Astruc, D. (2009). Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chemical society reviews*, 38(6), 1759-1782.
- (25) Marsh, M., Schelew, E., Wolf, S., & Skippon, T. (2009). Gold nanoparticles for cancer treatment. *Queen's University, Kingston*, 29.
- (26) Tran, Q. H., & Le, A. T. (2013). Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 4(3), 033001. doi:10.1088/2043-6262/4/3/033001
- (27) Neuberger, T., Schöpf, B., Hofmann, H., Hofmann, M., & Von Rechenberg, B. (2005). Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: possibilities and limitations of a new drug delivery system. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 293(1), 483-496.
- (28) Kurupparachchi, M., Savoie, H., Lowry, A., Alonso, C., & Boyle, R. W. (2011). Polyacrylamide nanoparticles as a delivery system in photodynamic therapy. *Molecular Pharmaceutics*, 8(3), 920-931.
- (29) Monasterolo, C., Ballestri, M., Sotgiu, G., Guerrini, A., Dambruoso, P., Sparnacci, K., ... & Zunino, F. (2012). Sulfonates-PMMA nanoparticles conjugates: A versatile

Bibliografia

system for multimodal application. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20(22), 6640-6647.

(30) Turos, E., Shim, J. Y., Wang, Y., Greenhalgh, K., Reddy, G. S. K., Dickey, S., & Lim, D. V. (2007). Antibiotic-conjugated polyacrylate nanoparticles: new opportunities for development of anti-MRSA agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17(1), 53-56.

(31) Vasey, P. A., Kaye, S. B., Morrison, R., Twelves, C., Wilson, P., Duncan, R., ... & Burtles, S. (1999). Phase I clinical and pharmacokinetic study of PK1 [N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymer doxorubicin]: first member of a new class of chemotherapeutic agents—drug-polymer conjugates. *Clinical Cancer Research*, 5(1), 83-94.

(32) Liu, Z., Jiao, Y., Wang, Y., Zhou, C., & Zhang, Z. (2008). Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(15), 1650-1662.

(33) Lee, J. W., Park, J. H., & Robinson, J. R. (2000). Bioadhesive-based dosage forms: The next generation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 89(7), 850-866.

(34) Bodnar, M., Hartmann, J. F., & Borbely, J. (2005). Preparation and characterization of chitosan-based nanoparticles. *Biomacromolecules*, 6(5), 2521-2527.

(35) Calvo, P., Remunan-Lopez, C., Vila-Jato, J. L., & Alonso, M. J. (1997). Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *Journal of Applied Polymer Science*, 63(1), 125-132.

(36) Letchford, K., & Burt, H. (2007). A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 65(3), 259-269.

(37) Samad, A., Sultana, Y., & Aqil, M. (2007). Liposomal drug delivery systems: an update review. *Current Drug Delivery*, 4(4), 297-305.

Bibliografia

- (38) Barenholz, Y. C. (2012). Doxil®—the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. *Journal of Controlled Release*, 160(2), 117-134.
- (39) Swenson, C. E., Perkins, W. R., Roberts, P., & Janoff, A. S. (2001). Liposome technology and the development of Myocet™(liposomal doxorubicin citrate). *The Breast*, 10, 1-7.
- (40) Forssen, E. A., & Ross, M. E. (1994). Daunoxome® treatment of solid tumors: preclinical and clinical investigations. *Journal of Liposome Research*, 4(1), 481-512.
- (41) Jahanshahi, M., & Babaei, Z. (2008). Protein nanoparticle: a unique system as drug delivery vehicles. *African Journal of Biotechnology*, 7(25), 4926-4934.
- (42) Marty, J. J., Oppenheim, R. C., & Speiser, P. (1977). Nanoparticles—a new colloidal drug delivery system. *Pharmaceutica Acta Helveticae*, 53(1), 17-23.
- (43) Hawkins, M. J., Soon-Shiong, P., & Desai, N. (2008). Protein nanoparticles as drug carriers in clinical medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(8), 876-885.
- (44) Weber, C., Coester, C., Kreuter, J., & Langer, K. (2000). Desolvation process and surface characterisation of protein nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 194(1), 91-102.
- (45) Ezpeleta, I., Irache, J. M., Stainmesse, S., Chabenat, C., Gueguen, J., Popineau, Y., & Orecchioni, A. M. (1996). Gliadin nanoparticles for the controlled release of all-trans-retinoic acid. *International Journal of Pharmaceutics*, 131(2), 191-200.
- (46) Kratz, F. (2008). Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 132(3), 171-183.
- (47) Ko, S., & Gunasekaran, S. (2006). Preparation of sub-100-nm β -lactoglobulin (BLG) nanoparticles. *Journal of Microencapsulation*, 23(8), 887-898.
- (48) Lin, W., Coombes, A., Davies, M., Davis, S., & Illum, L. (1993). Preparation of sub-100 nm human serum albumin nanospheres using a pH-coacervation method. *Journal of Drug Targeting*, 1(3), 237-243.

Bibliografia

- (49) Langer, K., Balthasar, S., Vogel, V., Dinauer, N., Von Briesen, H., & Schubert, D. (2003). Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 257(1), 169-180.
- (50) Yang, L., Cui, F., Cun, D., Tao, A., Shi, K., & Lin, W. (2007). Preparation, characterization and biodistribution of the lactone form of 10-hydroxycamptothecin (HCPT)-loaded bovine serum albumin (BSA) nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 340(1), 163-172.
- (51) Müller, B. G., Leuenberger, H., & Kissel, T. (1996). Albumin nanospheres as carriers for passive drug targeting: an optimized manufacturing technique. *Pharmaceutical Research*, 13(1), 32-37.
- (52) Gomez, A., Bingham, D., De Juan, L., & Tang, K. (1998). Production of protein nanoparticles by electrospray drying. *Journal of Aerosol Science*, 29(5), 561-574.
- (53) Cloupeau, M., & Prunet-Foch, B. (1989). Electrostatic spraying of liquids in cone-jet mode. *Journal of Electrostatics*, 22(2), 135-159.
- (54) Han, T., Yarin, A. L., & Reneker, D. H. (2008). Viscoelastic electrospun jets: Initial stresses and elongational rheometry. *Polymer*, 49(6), 1651-1658.
- (55) Grzybowski, B. A., Wilmer, C. E., Kim, J., Browne, K. P., & Bishop, K. J. (2009). Self-assembly: from crystals to cells. *Soft Matter*, 5(6), 1110-1128.
- (56) Moll, R., Divo, M., & Langbein, L. (2008). The human keratins: biology and pathology. *Histochemistry and cell biology*, 129(6), 705–733.
- (57) Hanukoglu, I., & Ezra, L. (2014). Proteopedia entry: Coiled-coil structure of keratins. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 42(1), 93-94.
- (58) Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., & Walter, P. (2010). *Essential Cell Biology*. Garland Science. New York.
- (59) Jaquemar, D., Kupriyanov, S., Wankell, M., Avis, J., Benirschke, K., Baribault, H., & Oshima, R. G. (2003). Keratin 8 protection of placental barrier function. *The Journal of Cell Biology*, 161(4), 749-756.

Bibliografia

- (60) Caulin, C., Ware, C. F., Magin, T. M., & Oshima, R. G. (2000). Keratin-dependent, epithelial resistance to tumor necrosis factor-induced apoptosis. *The Journal of Cell Biology*, *149*(1), 17-22.
- (61) Kim, S., Wong, P., & Coulombe, P. A. (2006). A keratin cytoskeletal protein regulates protein synthesis and epithelial cell growth. *Nature*, *441*(7091), 362-365.
- (62) Crewther, W. G., Fraser, R. D. B., Lennox, F. G., & Lindley, H. (1965). The chemistry of keratins. *Advances in Protein Chemistry*, *20*, 191-346.
- (63) Hill, P., Brantley, H., & Van Dyke, M. (2010). Some properties of keratin biomaterials: keratines. *Biomaterials*, *31*(4), 585-593.
- (64) Dowling, L. M., Crewther, W. G., & Parry, D. A. (1986). Secondary structure of component 8c-1 of α -keratin. An analysis of the amino acid sequence. *Biochemical Journal*, *236*(3), 705-712.
- (65) Tachibana, A., Furuta, Y., Takeshima, H., Tanabe, T., & Yamauchi, K. (2002). Fabrication of wool keratin sponge scaffolds for long-term cell cultivation. *Journal of Biotechnology*, *93*(2), 165-170.
- (66) Wang, K., Li, R., Ma, J. H., Jian, Y. K., & Che, J. N. (2016). Extracting keratin from wool by using L-cysteine. *Green Chemistry*, *18*(2), 476-481.
- (67) Phillips, D. G. (1985). Detecting a glass transition in wool by differential scanning calorimetry. *Textile Research Journal*, *55*(3), 171-174.
- (68) Katoh, K., Shibayama, M., Tanabe, T., & Yamauchi, K. (2004). Preparation and physicochemical properties of compression-molded keratin films. *Biomaterials*, *25*(12), 2265-2272.
- (69) Yamauchi, K., Yamauchi, A., Kusunoki, T., Kohda, A., & Konishi, Y. (1996). Preparation of stable aqueous solution of keratins, and physicochemical and biodegradational properties of films. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, *31*(4), 439-444.

Bibliografia

- (70) Zhang, J., Li, Y., Li, J., Zhao, Z., Liu, X., Li, Z., ... & Chen, A. (2013). Isolation and characterization of biofunctional keratin particles extracted from wool wastes. *Powder technology*, 246, 356-362.
- (71) Eslahi, N., Hemmatinejad, N., & Dadashian, F. (2014). From feather waste to valuable nanoparticles. *Particulate Science and Technology*, 32(3), 242-250.
- (72) Zoccola, M., Montarsolo, A., Mossotti, R., Patrucco, A., & Tonin, C. (2014). Green hydrolysis conversion of wool wastes into organic nitrogen fertilisers. In *2nd International Conference on Sustainable Solid Waste Management* (pp. 1-11).
- (73) Khardenavis, A. A., Kapley, A., & Purohit, H. J. (2009). Processing of poultry feathers by alkaline keratin hydrolyzing enzyme from *Serratia* sp. HPC 1383. *Waste Management*, 29(4), 1409-1415.
- (74) Alexander, P., Hudson, R. F., & Fox, M. (1950). The reaction of oxidizing agents with wool. 1. The division of cystine into two fractions of widely differing reactivities. *Biochemical Journal*, 46(1), 27.
- (75) De Guzman, R. C., Merrill, M. R., Richter, J. R., Hamzi, R. I., Greengauz-Roberts, O. K., & Van Dyke, M. E. (2011). Mechanical and biological properties of keratose biomaterials. *Biomaterials*, 32(32), 8205-8217.
- (76) Tonin, C., Aluigi, A., Vineis, C., Varesano, A., Montarsolo, A., & Ferrero, F. (2006). Thermal and structural characterization of poly (ethylene-oxide)/keratin blend films. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 89(2), 601-608.
- (77) Matsunaga, K., Okumura, T., & Tsushima, R. (1983). *U.S. Patent No. 4,369,037*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- (78) Zoccola, M., Aluigi, A., & Tonin, C. (2009). Characterisation of keratin biomass from butchery and wool industry wastes. *Journal of Molecular Structure*, 938(1), 35-40.
- (79) Pardo-Ibáñez, P., Lopez-Rubio, A., Martínez-Sanz, M., Cabedo, L., & Lagaron, J. M. (2014). Keratin–polyhydroxyalkanoate melt-compounded composites with improved barrier properties of interest in food packaging applications. *Journal of Applied Polymer Science*, 131(4). doi: 10.1002/app.39947.

Bibliografia

- (80) Aluigi, A., Vineis, C., Tonin, C., Tonetti, C., Varesano, A., & Mazzuchetti, G. (2009). Wool keratin-based nanofibres for active filtration of air and water. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, 3(3), 311-319.
- (81) Reddy, N., Chen, L., Zhang, Y., & Yang, Y. (2014). Reducing environmental pollution of the textile industry using keratin as alternative sizing agent to poly (vinyl alcohol). *Journal of Cleaner Production*, 65, 561-567.
- (82) Rothman, J., & Band, P. A. (1991). *U.S. Patent No. 5,047,249*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- (83) Rouse, J. G., & Van Dyke, M. E. (2010). A review of keratin-based biomaterials for biomedical applications. *Materials*, 3(2), 999-1014.
- (84) Ferroni, C., Sotgiu, G., Sagnella, A., Varchi, G., Guerrini, A., Giuri, D., ... & Monti, E. (2016). Wool keratin 3D scaffolds with light-triggered antimicrobial activity. *Biomacromolecules*, 17(9), 2882-2890.
- (85) Tachibana, A., Kaneko, S., Tanabe, T., & Yamauchi, K. (2005). Rapid fabrication of keratin–hydroxyapatite hybrid sponges toward osteoblast cultivation and differentiation. *Biomaterials*, 26(3), 297-302.
- (86) Tanabe, T., Okitsu, N., Tachibana, A., & Yamauchi, K. (2002). Preparation and characterization of keratin–chitosan composite film. *Biomaterials*, 23(3), 817-825.
- (87) Aluigi, A., Varesano, A., Montarsolo, A., Vineis, C., Ferrero, F., Mazzuchetti, G., & Tonin, C. (2007). Electrospinning of keratin/poly (ethylene oxide) blend nanofibers. *Journal of Applied Polymer Science*, 104(2), 863-870.
- (88) Zoccola, M., Aluigi, A., Vineis, C., Tonin, C., Ferrero, F., & Piacentino, M. G. (2008). Study on cast membranes and electrospun nanofibers made from keratin/fibroin blends. *Biomacromolecules*, 9(10), 2819-2825.
- (89) Caló, E., & Khutoryanskiy, V. V. (2015). Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *European Polymer Journal*, 65, 252-267.

Bibliografia

- (90) Sierpinski, P., Garrett, J., Ma, J., Apel, P., Klorig, D., Smith, T., ... & Van Dyke, M. (2008). The use of keratin biomaterials derived from human hair for the promotion of rapid regeneration of peripheral nerves. *Biomaterials*, 29(1), 118-128.
- (91) Aboushwareb, T., Eberli, D., Ward, C., Broda, C., Holcomb, J., Atala, A., & Van Dyke, M. (2009). A keratin biomaterial gel hemostat derived from human hair: evaluation in a rabbit model of lethal liver injury. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 90(1), 45-54.
- (92) Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., & Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389(6648), 251-260.
- (93) Allfrey, V. G., Faulkner, R., & Mirsky, A. E. (1964). Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 51(5), 786-794.
- (94) Grunstein, M. (1997). Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*, 389(6649), 349-352.
- (95) Taunton, J., Hassig, C. A., & Schreiber, S. L. (1996). A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science*, 272(5260), 408-411.
- (96) Song, J., Noh, J. H., Lee, J. H., Eun, J. W., Ahn, Y. M., Kim, S. Y., ... & Nam, S. W. (2005). Increased expression of histone deacetylase 2 is found in human gastric cancer. *Apmis*, 113(4), 264-268.
- (97) Fraga, M. F., Ballestar, E., Villar-Garea, A., Boix-Chornet, M., Espada, J., Schotta, G., ... & Iyer, N. G. (2005). Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nature genetics*, 37(4), 391-400.
- (98) Toh, Y., Ohga, T., Endo, K., Adachi, E., Kusumoto, H., Haraguchi, M., ... & Nicolson, G. L. (2004). Expression of the metastasis-associated MTA1 protein and its relationship to deacetylation of the histone H4 in esophageal squamous cell carcinomas. *International Journal of Cancer*, 110(3), 362-367.

Bibliografia

- (99) Müller, B. M., Jana, L., Kasajima, A., Lehmann, A., Prinzler, J., Budczies, J., ... & Denkert, C. (2013). Differential expression of histone deacetylases HDAC1, 2 and 3 in human breast cancer-overexpression of HDAC2 and HDAC3 is associated with clinicopathological indicators of disease progression. *BMC Cancer*, *13*(1), 215. doi: 10.1186/1471-2407-13-215.
- (100) De Ruijter, A. J., Van Gennip, A. H., Caron, H. N., Stephan, K. E. M. P., & Van Kuilenburg, A. B. (2003). Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochemical Journal*, *370*(3), 737-749.
- (101) Gregoretta, I., Lee, Y. M., & Goodson, H. V. (2004). Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *Journal of Molecular Biology*, *338*(1), 17-31.
- (102) Grozinger, C. M., & Schreiber, S. L. (2002). Deacetylase enzymes: biological functions and the use of small-molecule inhibitors. *Chemistry & Biology*, *9*(1), 3-16.
- (103) Liu, T., Kuljaca, S., Tee, A., & Marshall, G. M. (2006). Histone deacetylase inhibitors: multifunctional anticancer agents. *Cancer Treatment Reviews*, *32*(3), 157-165.
- (104) Marks, P. A., Richon, V. M., & Rifkind, R. A. (2000). Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. *Journal of the National Cancer Institute*, *92*(15), 1210-1216.
- (105) Marks, P. A., Richon, V. M., Breslow, R., & Rifkind, R. A. (2001). Histone deacetylase inhibitors as new cancer drugs. *Current Opinion in Oncology*, *13*(6), 477-483.
- (106) Vigushin, D. M., & Coombes, R. C. (2002). Histone deacetylase inhibitors in cancer treatment. *Anti-cancer Drugs*, *13*(1), 1-13.
- (107) Butler, L. M., Agus, D. B., Scher, H. I., Higgins, B., Rose, A., Cordon-Cardo, C., ... & Richon, V. M. (2000). Suberoylanilide hydroxamic acid, an inhibitor of histone deacetylase, suppresses the growth of prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Research*, *60*(18), 5165-5170.

Bibliografia

- (108) Qiu, L., Kelso, M. J., Hansen, C., West, M. L., Fairlie, D. P., & Parsons, P. G. (1999). Anti-tumour activity in vitro and in vivo of selective differentiating agents containing hydroxamate. *British Journal of Cancer*, 80(8), 1252–1258.
- (109) Yoshida, M., Kijima, M., Akita, M., & Beppu, T. (1990). Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *Journal of Biological Chemistry*, 265(28), 17174-17179.
- (110) Marks, P. A., & Dokmanovic, M. (2005). Histone deacetylase inhibitors: discovery and development as anticancer agents. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 14(12), 1497-1511.
- (111) Duvic, M., Talpur, R., Ni, X., Zhang, C., Hazarika, P., Kelly, C., ... & Frankel, S. R. (2007). Phase 2 trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) for refractory cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). *Blood*, 109(1), 31-39.
- (112) Xu, W. S., Parmigiani, R. B., & Marks, P. A. (2007). Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene*, 26(37), 5541-5552.
- (113) Gojo, I., Jiemjit, A., Trepel, J. B., Sparreboom, A., Figg, W. D., Rollins, S., ... & Gore, S. D. (2007). Phase 1 and pharmacologic study of MS-275, a histone deacetylase inhibitor, in adults with refractory and relapsed acute leukemias. *Blood*, 109(7), 2781-2790.
- (114) Ryan, Q. C., Headlee, D., Acharya, M., Sparreboom, A., Trepel, J. B., Ye, J., ... & Melillo, G. (2005). Phase I and pharmacokinetic study of MS-275, a histone deacetylase inhibitor, in patients with advanced and refractory solid tumors or lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, 23(17), 3912-3922.
- (115) Nakajima, H., Kim, Y. B., Terano, H., Yoshida, M., & Horinouchi, S. (1998). FR901228, a potent antitumor antibiotic, is a novel histone deacetylase inhibitor. *Experimental Cell Research*, 241(1), 126-133.
- (116) Miller, C. C., & Ziboh, V. A. (1990). Induction of epidermal hyperproliferation by topical n-3 polyunsaturated fatty acids on guinea pig skin linked to decreased levels

Bibliografia

of 13-hydroxyoctadecadienoic acid (13-HODE). *Journal of Investigative Dermatology*, 94(3), 353-358.

(117) Bégin, M. E. (1987). Effects of polyunsaturated fatty acids and of their oxidation products on cell survival. *Chemistry and Physics of Lipids*, 45(2-4), 269-313.

(118) Cavalli, G., Casali, E., Spisni, A., & Masotti, L. (1991). Identification of the peroxidation product hydroxystearic acid in Lewis lung carcinoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 178(3), 1260-1265.

(119) Masotti, L., Casali, E., & Gesmundo, N. (1993). Influence of hydroxystearic acid on in vitro cell proliferation. *Molecular Aspects of Medicine*, 14(3), 209-215.

(120) Calonghi, N., Cappadone, C., Pagnotta, E., Farruggia, G., Buontempo, F., Boga, C.,... & Masotti, L. (2004). 9-Hydroxystearic acid upregulates p21 WAF1 in HT29 cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 314(1), 138-142.

(121) Calonghi, N., Cappadone, C., Pagnotta, E., Boga, C., Bertucci, C., Fiori, J., & Masotti, L. (2005). Histone deacetylase 1: a target of 9-hydroxystearic acid in the inhibition of cell growth in human colon cancer. *Journal of Lipid Research*, 46(8), 1596-1603.

(122) Calonghi, N., Pagnotta, E., Parolin, C., Tognoli, C., Boga, C., & Masotti, L. (2006). 9-Hydroxystearic acid interferes with EGF signalling in a human colon adenocarcinoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 342(2), 585-588.

(123) Parolin, C., Calonghi, N., Presta, E., Boga, C., Caruana, P., Naldi, M., ... & Sartor, G. (2012). Mechanism and stereoselectivity of HDAC I inhibition by (R)-9-hydroxystearic acid in colon cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1821(10), 1334-1340.

(124) Ebert, C., Felluga, F., Forzato, C., Foscatto, M., Gardossi, L., Nitti, P., ... & Calonghi, N. (2012). Enzymatic kinetic resolution of hydroxystearic acids: A combined experimental and molecular modelling investigation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 83, 38-45.

Bibliografia

- (125) Binder, R. G., Applewhite, T. H., Diamond, M. J., & Goldblatt, L. A. (1964). Chromatographic analysis of seed oils. II. Fatty acid composition of dimorphothecca oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 41(2), 108–111.
- (126) Amreddy, N., Muralidharan, R., Babu, A., Mehta, M., Johnson, E. V., Zhao, Y. D., ... & Ramesh, R. (2015). Tumor-targeted and pH-controlled delivery of doxorubicin using gold nanorods for lung cancer therapy. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 6773–6788.
- (127) Cochrane, C. C., Harwood, H. J. (1961). Phase Properties of Mixtures of 9- and 10-Oxo-octadecanoic Acids and of 9- and 10-Hydroxyoctadecanoic Acids. *The Journal of Organic Chemistry*, 26, 1278-1282.
- (128) Baker, C. D., Gunstone, F. D. (1963). Fatty Acids. Part XI. The Synthesis of 9D-Hydroxyoctadecanoic Acid. *Journal of Chemical Society*. 759-760.