

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

Preparazione e caratterizzazione di  
micelle costituite da un pro-farmaco di  
Paclitaxel e caricate con un agente  
fotosensibile per il trattamento chemio- e  
foto-terapico dei tumori

Tesi di laurea sperimentale

**CANDIDATO**

Manuele Battan

**RELATORE**

**Prof.ssa** Carla Boga

**CORRELATORI**

**Dott.ssa** Claudia Ferroni

**Dott.ssa** Greta Varchi



## ABSTRACT

Il Paclitaxel (PTX) è un potente agente chemioterapico approvato per il trattamento di numerosi tumori solidi. Tuttavia, la scarsa solubilità in acqua e l'elevata tossicità causano gravi effetti collaterali che pregiudicano severamente la qualità di vita dei pazienti, già compromessa dalla patologia.

Il presente lavoro di tesi ha riguardato la preparazione mediante nano-precipitazione di micelle di un pro-farmaco del PTX (PTX<sub>2</sub>S), caricate con feoforbide a (PheoA), una molecola fotosensibile che illuminata ad una specifica lunghezza d'onda genera specie reattive all'ossigeno (ROS) e ossigeno di singoletto (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) capaci di uccidere le cellule tumorali. Le nanomicelle sono state caratterizzate in termini di stabilità in condizioni fisiologiche, capacità di loading e di rilascio del farmaco e sviluppo di ROS a seguito di irraggiamento con luce bianca. Inoltre, test preliminari *in vitro* eseguiti su cellule staminali mesenchimali umane (MSC) hanno dimostrato che le nanomicelle sono efficacemente internalizzate dalle cellule senza comprometterne la vitalità e la morfologia. Tali dati preliminari dimostrano che le MSC possono essere quindi utilizzate come vettori selettivi delle nanomicelle qui descritte.

Poor water solubility and adverse side effects pose a challenge for clinical application of Paclitaxel (PTX), a widely used anticancer drug for a number of solid tumors.

In the present study, PTX dimeric prodrug nanomicelles (PTX<sub>2</sub>S) were prepared using the nanoprecipitation method and loaded with pheophorbide a (PheoA), a photosensitizer agent that, upon irradiation with specific wavelengths, generates singlet oxygen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) and reactive oxygen species (ROS), inducing cell death. The loading content, stability, drug release under physiological conditions and ROS production of the PheoA-loaded nanomicelles were investigated in detail. Moreover, *in vitro* preliminary studies on mesenchymal stem cells (MSC) have shown that cells are capable to internalize the nanomicelles, while sparing their vitality and morphology, thus indicating their potential application as drug carriers of our nanomicelles.



# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	<b>4</b>
1.1. IL PACLITAXEL .....	4
1.2. MECCANISMO DI AZIONE .....	6
1.3. MECCANISMI DI RESISTENZA E METABOLISMO .....	9
1.4. SISTEMI PER IL <i>DRUG DELIVERY</i> .....	11
1.5. CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI PER IL <i>DRUG DELIVERY</i> .....	14
1.6. PROFARMACI .....	16
1.7. TERAPIA FOTODINAMICA .....	17
<b>2. SCOPO DEL LAVORO</b> .....	<b>22</b>
<b>3. RISULTATI E DISCUSSIONE</b> .....	<b>23</b>
3.1. SINTESI DI PTX <sub>2</sub> S.....	23
3.2. NANOMICELLE DI PTX <sub>2</sub> S (PTX <sub>2</sub> S_NMs).....	24
3.3. NANOMICELLE DI PTX <sub>2</sub> S CARICATE CON PHEOA (PHEO@PTX <sub>2</sub> S).....	25
3.4. STABILITÀ NEL TEMPO DELLE NANOMICELLE PHEO@PTX <sub>2</sub> S.....	27
3.5. STABILITÀ DELLE NANOMICELLE PHEO@PTX <sub>2</sub> S IN CONDIZIONI FISILOGICHE.....	28
3.6. STABILITÀ DELLE NANOMICELLE IN AMBIENTE RIDUCENTE .....	31
3.7. STABILITÀ DELLE NANOMICELLE IN AMBIENTE OSSIDANTE .....	33
3.8. SVILUPPO DI SPECIE REATTIVE ALL'OSSIGENO (ROS) .....	35
3.9. TEST BIOLOGICI <i>IN VITRO</i> .....	39
3.9.1. <i>Analisi dell'internalizzazione delle cellule</i> .....	39
3.9.2. <i>Valutazione dell'effetto citotossico del pro-farmaco sulle MSC</i> .....	42
<b>4. CONCLUSIONI</b> .....	<b>44</b>
<b>5. PARTE SPERIMENTALE</b> .....	<b>45</b>
5.1. NOTE GENERALI.....	45
5.2. SINTESI DI PTX <sub>2</sub> S.....	46
5.3. PREPARAZIONE DI NANOMICELLE DI PTX <sub>2</sub> S (PTX <sub>2</sub> S_NMs) .....	46
5.4. PREPARAZIONE DI NANOMICELLE DI PTX <sub>2</sub> S E PHEOA (PHEO@PTX <sub>2</sub> S).....	47
5.5. STUDI DI STABILITÀ DI PHEO@PTX <sub>2</sub> S .....	47
5.5.1. <i>Stabilità di Pheo@PTX<sub>2</sub>S in H<sub>2</sub>O</i> .....	47
5.5.2. <i>Stabilità di Pheo@PTX<sub>2</sub>S in condizioni fisiologiche</i> .....	47

5.5.3. Stabilità dopo ultrafiltrazione .....	48
5.5.4. Stabilità dopo rimozione di DMSO tramite dialisi.....	48
5.5.5. Stabilità in ambiente riducente .....	48
5.5.6. Stabilità in ambiente ossidante.....	49
5.6. DETERMINAZIONE DELLA PRODUZIONE DI ROS.....	49
5.7. SAGGI IN VITRO.....	50
5.7.1. Internalizzazione cellulare delle nanomicelle .....	50
5.7.2. Valutazione dell'effetto citotossico sulle MSC .....	51
<b>RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI.....</b>	<b>52</b>

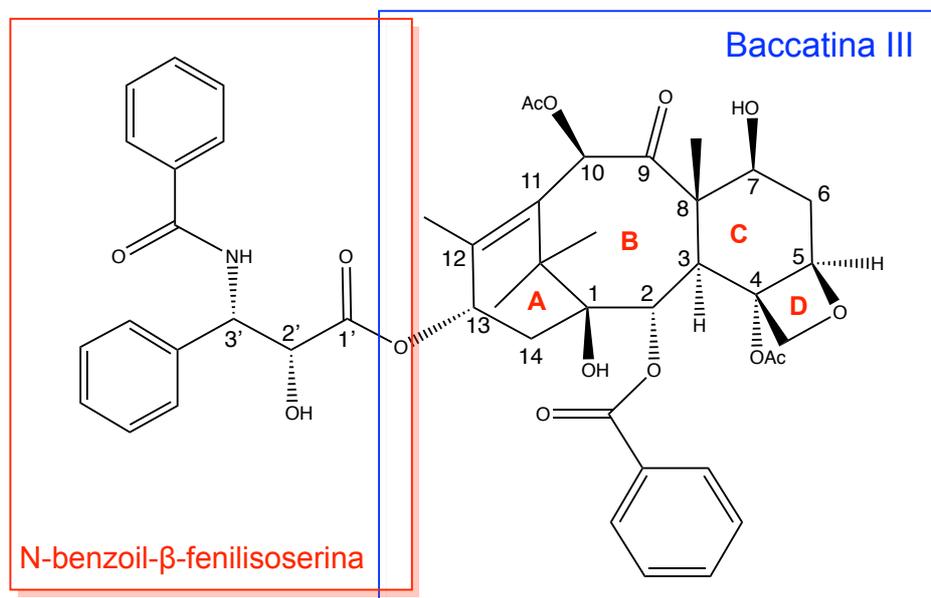


# 1. Introduzione

## 1.1. Il Paclitaxel

Una neoplasia è un processo patologico eterogeneo caratterizzato dalla proliferazione abnorme e incontrollata delle cellule, che provoca la perdita progressiva delle funzionalità dell'organo coinvolto [1].

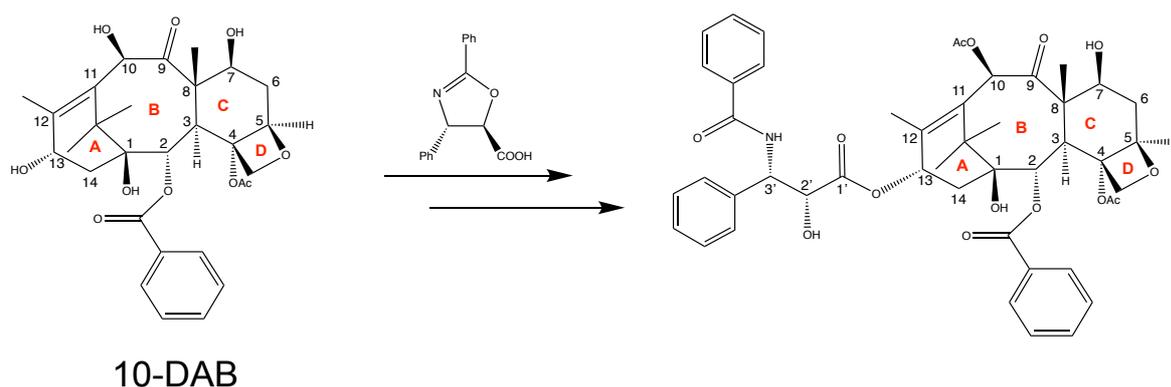
Gli approcci terapeutici per il trattamento delle neoplasie sono diversi e strettamente dipendenti dalla tipologia di tumore da trattare: radioterapia, chirurgia, chemioterapia, terapia ormonale e più recentemente immunoterapia. La chemioterapia rappresenta il trattamento di scelta nei tumori in stadio avanzato ed utilizza sostanze citotossiche in grado di indurre la morte delle cellule tramite l'arresto della divisione cellulare. I farmaci impiegati vengono comunemente classificati in base al loro meccanismo di azione, fra cui agenti alchilanti, antimetaboliti, antimitotici ecc. In particolare, il Paclitaxel (PTX) o tassolo (**Figura 1**), rappresenta il farmaco ad azione antimitotica di elezione per il trattamento del tumore alle ovaie, del cancro metastatico al seno, del sarcoma di Kaposi e del carcinoma polmonare [2]. Il tassolo venne isolato per la prima volta nel 1963 dalla corteccia del *Taxus brevifolia*.



**Figura 1.** Struttura del Paclitaxel.

Dal punto di vista strutturale il PTX è un diterpenoide costituito da un core tetraciclico chiamato *baccatina III* e da una catena lineare, *N*-benzoil- $\beta$ -fenilisoserina. I cicli vengono convenzionalmente nominati come *anello A* (cicloesene), *anello B* (cicloottano), *anello C* (cicloesano) e *anello D* (ossetano) [3].

Inizialmente l'impiego del PTX fu fortemente limitato dalla scarsa resa di estrazione dalla corteccia dell'albero (0.04% w/w) e dalla complessità della sintesi totale della molecola. Inoltre, la rimozione della corteccia comporta il sacrificio dell'albero, che è una specie rara ed a crescita molto lenta. Tuttavia, nel 1998 la Bristol Myers Squibb mise a punto un processo semi-sintetico che prevedeva la sintesi di PTX a partire dalla 10-deacetilbaccatina III (10-DAB), estratta dalle foglie del tasso europeo, tramite reazione con un derivato ossazolinico sul carbonio 13 e conseguente apertura dell'anello (**Figura 2**) [4].



**Figura 2.** Semisintesi di PTX dalla 10-deacetilbaccatina III (10-DAB).

Le prime sintesi totali del PTX furono pubblicate nel 1994 da due gruppi di ricerca, Holton *et al.* [5] e Nicolaou *et al.* [6], ma entrambe non erano applicabili su scala industriale, a causa delle basse rese associate ad elevati costi di produzione. Attualmente, accanto al processo semi-sintetico discusso precedentemente, il PTX viene ottenuto dalla coltura di linee cellulari della pianta e dalla fermentazione di alcuni funghi endofitici del tasso.

Il tassolo è scarsamente solubile in acqua (0.3  $\mu\text{g/mL}$ ), mentre si scioglie in altri solventi quali diclorometano (25 mg/mL), dimetilsolfossido (50 mg/mL) e metanolo

(45 mg/mL). In soluzione metanolica non è stabile e dopo due settimane a temperatura ambiente subisce idrolisi e transesterificazione (~35%) [7].

## 1.2. Meccanismo di azione

Il PTX agisce interferendo sul ciclo cellulare bloccando il processo di divisione. Il ciclo cellulare prevede che una cellula, dividendosi, generi due cellule figlie ed è composto da cinque fasi:

- i. fase *G1*, segue immediatamente la mitosi e consiste nella fase di crescita della cellula, con la sintesi delle proteine e dell'RNA;
- ii. fase *S*, viene duplicato il DNA;
- iii. fase *G2*, fase preparatoria in cui avviene la sintesi delle proteine coinvolte nella divisione cellulare e l'avvolgimento del DNA a costituire i cromosomi;
- iv. mitosi *M*, processo di divisione cellulare;
- v. citodieresi, processo di divisione del citoplasma.

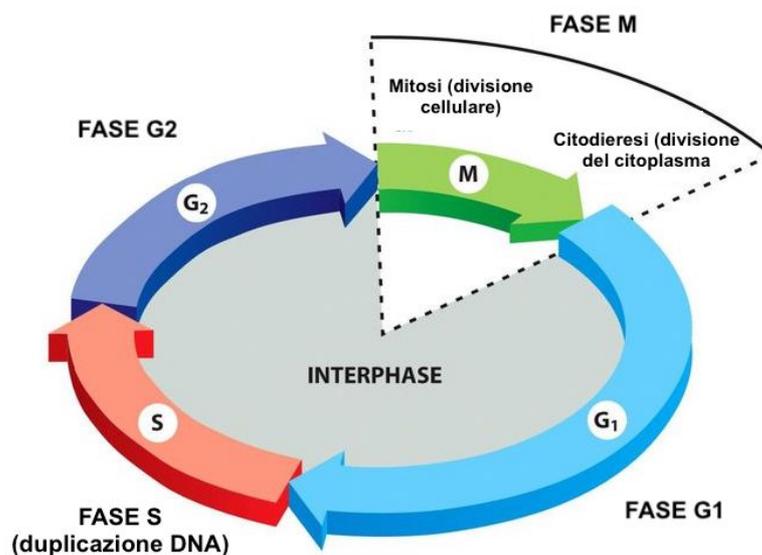


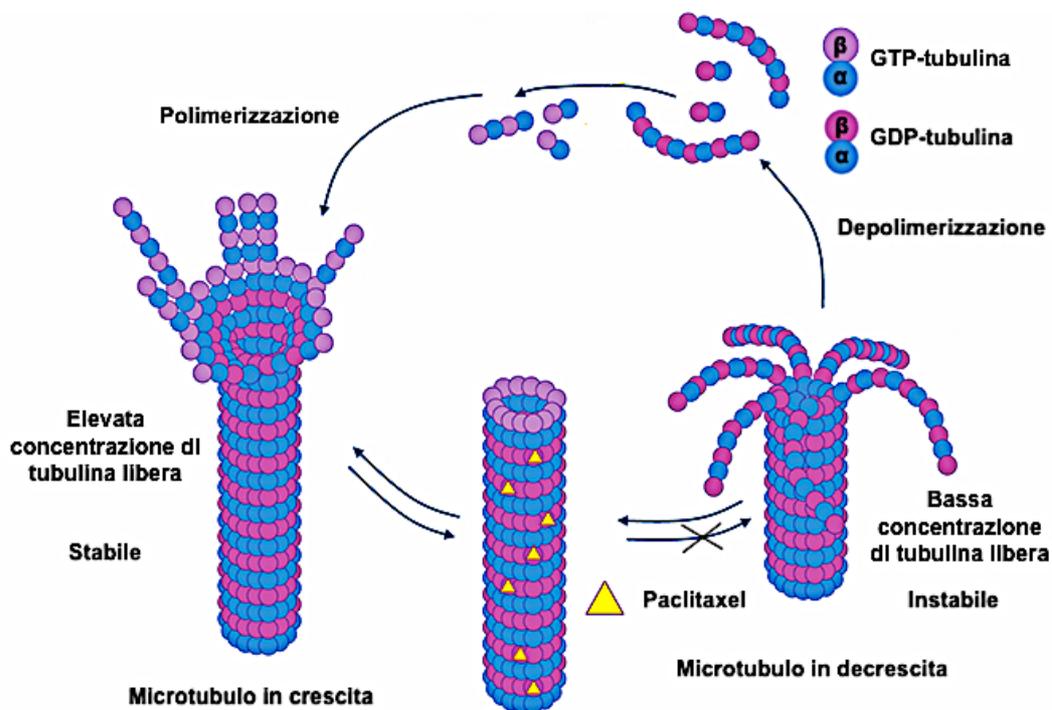
Figura 3. Le fasi del ciclo cellulare.

La mitosi, detta anche fase *M*, consiste nella divisione vera e propria della cellula madre in due cellule figlie identiche. Per dare origine a due cellule geneticamente uguali è necessario che il DNA sia replicato fedelmente e che i cromosomi siano equamente ripartiti tra le cellule figlie. L'errata duplicazione del DNA nella fase *S* e

l'asimmetrica divisione dei cromosomi durante la mitosi possono innescare processi di carcinogenesi o indurre l'apoptosi della cellula.

Il PTX arresta il ciclo cellulare nelle fasi G2/M; esso, infatti, lega i microtubuli alterando il normale equilibrio dinamico di allungamento-accorciamento. I microtubuli sono delle strutture cilindriche, rigide e labili, che si formano dalla polimerizzazione di eterodimeri di due polipeptidi dalla forma globulare, la *tubulina  $\alpha$*  e la *tubulina  $\beta$*  (Figura 4).

Nel processo di crescita del microtubulo più eterodimeri si allineano alternando una subunità  $\alpha$  e una  $\beta$  a formare segmenti lineari, detti *protofilamenti*, i quali si associano e ripiegano assumendo la forma cilindrica. Una volta formata la struttura, avviene l'idrolisi di una molecola di *guanosina trifosfato* (GTP) legata alla tubulina  $\beta$ .



**Figura 4.** I processi di polimerizzazione e depolimerizzazione del microtubulo.

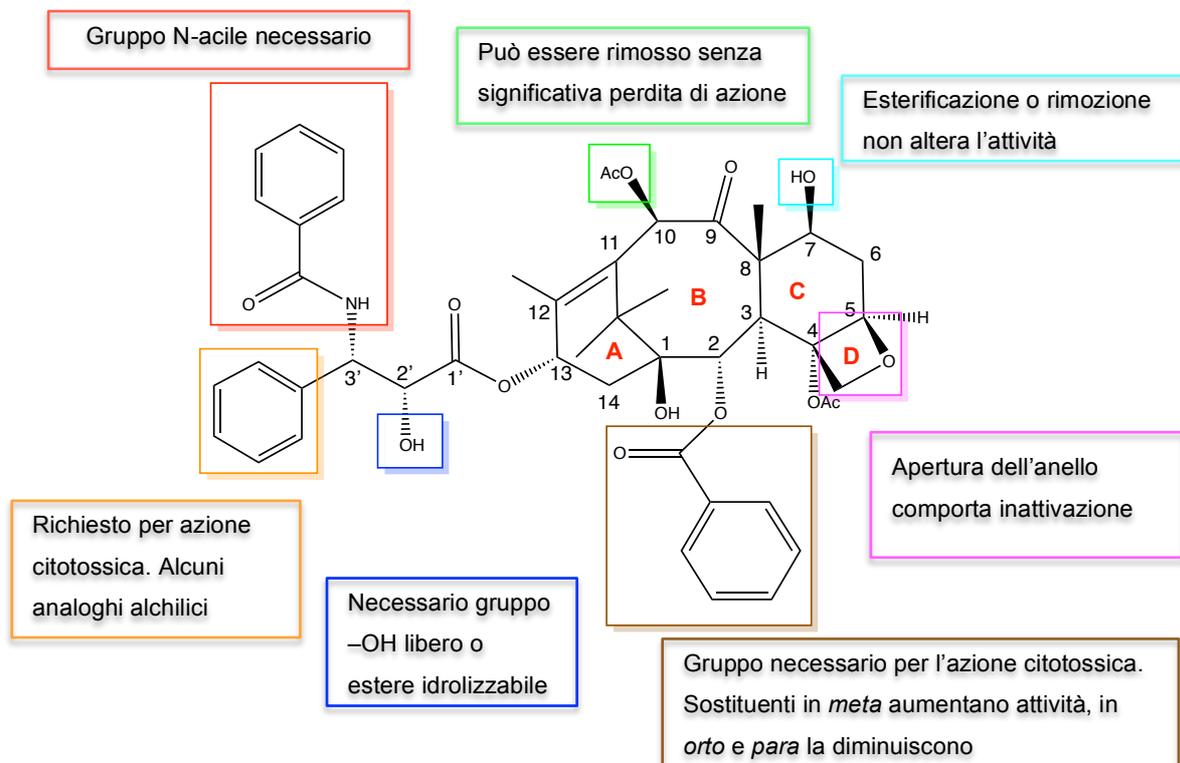
L'interazione del PTX (in giallo) con la struttura impedisce l'accorciamento della struttura.

Al contrario, il microtubulo si accorcia quando l'idrolisi di GTP avviene sugli eterodimeri liberi nel citoplasma o all'estremità del cilindro.

Durante la mitosi i processi di polimerizzazione e depolimerizzazione della struttura avvengono contemporaneamente e la predominanza di uno dei due fenomeni è

controllata dalla concentrazione di eterodimero libero presente nel citoplasma. La coesistenza di questi due meccanismi è definita *instabilità dinamica* ed è fondamentale per il corretto svolgimento della divisione cellulare. Pertanto, il PTX si lega alla tubulina  $\beta$  e stabilizza la struttura, impedendone il normale accorciamento. I microtubuli continuano ad accrescersi poiché viene meno l'equilibrio dinamico di allungamento/accorciamento necessario per lo svolgimento della mitosi e ne consegue che la cellula muore per apoptosi [8].

Oltre ai numerosi studi volti alla sintesi totale e semi-sintesi del tassolo, molti gruppi di ricerca nel mondo hanno dedicato e tuttora dedicano la loro attività alla modificazione sintetica del PTX al fine di: i) migliorarne l'efficacia e selettività nei confronti delle cellule tumorali; ii) ottenere derivati del PTX maggiormente solubili in acqua. L'analisi degli studi di *relazione fra struttura ed attività* (*Structure-Activity Relationship* - SAR) sino ad oggi riportati in letteratura ha consentito di mettere in evidenza quali sono i gruppi funzionali fondamentali per l'azione antitumorale del PTX (**Figura 5**) [9].



**Figura 5.** SAR del Paclitaxel.

In particolare:

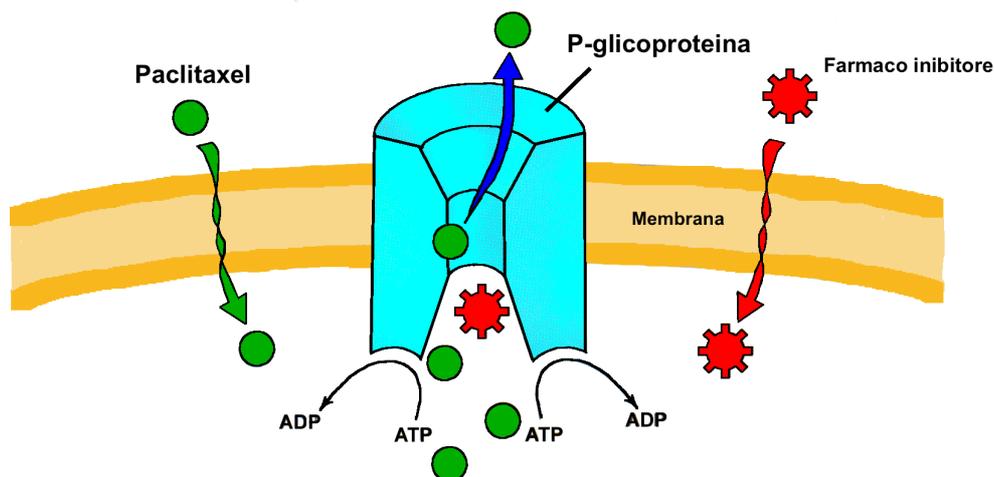
- La catena laterale legata al C13 (N-benzoil-β-fenilioserina) ha un ruolo sostanziale nell'azione citotossica. Dall'idrolisi della catena si ottiene la baccatina III, molto meno attiva del PTX. Al contrario, la sostituzione del gruppo 3'-Ph con altri sostituenti alchilici, come ad esempio 3'-iBu, aumenta la citotossicità [10][11].
- Il gruppo 2'-OH è direttamente implicato nel legame con la tubulina; pertanto, la sua sostituzione o inversione di configurazione rende inattiva la molecola.
- Un analogo ottenuto modificando il gruppo 3'-NHBz è il Taxotere® (docetaxel), che è stato approvato nel 1995 dalla European Medicines Agency (EMA) per il cancro metastatico al seno, il cancro alla prostata e il carcinoma polmonare non a piccole cellule.
- I sostituenti sui carboni 7, 9 e 10 non alterano in maniera sensibile l'attività. In particolare, l'acilazione del gruppo ossidrilico in posizione 7 o la sua rimozione non modificano l'attività. Similmente, la rimozione di 10-OAc comporta solo una lieve riduzione della citotossicità; la riduzione del carbonile in posizione 9 così come l'eossidazione tra i carboni 7 e 8 la aumentano leggermente.
- L'apertura dell'anello ossetanico che coinvolge 4 e 5 comporta l'inattivazione del PTX, come anche la sostituzione di O del ciclo con S o Se. Si pensa che sia coinvolto nel legame idrogeno con un residuo amminoacidico della tubulina.
- Sono stati preparati numerosi analoghi modificando il gruppo benzile in posizione 2. In generale, i composti *meta*-sostituiti sono più citotossici del PTX, mentre quelli *orto* e *para* sono meno attivi.

### 1.3. Meccanismi di resistenza e metabolismo

Numerosi studi hanno stabilito che la resistenza al PTX e a molti altri farmaci chemioterapici deriva in gran parte da una glicoproteina integrale di membrana chiamata *glicoproteina P (P-gp)*, nota anche come *proteina di resistenza multifarmaco 1 (Multidrug Resistance Protein 1, MDR1)*.

P-gp agisce come una pompa che espelle dalla cellula un'ampia varietà di molecole, in particolare xenobiotici lipofili e anfifilici, steroidi, agenti immunosoppressori ecc. È

normalmente presente nelle cellule sane del pancreas, dell'epitelio intestinale, del fegato e dei reni (**Figura 6**). La P-gp mostra un'elevata affinità nei confronti del PTX e questo comporta una consistente diminuzione nella biodisponibilità del farmaco. Inoltre, è stato osservato che la P-gp è sovra-espressa nelle cellule tumorali che derivano da tessuti che normalmente la esprimono; pertanto, la resistenza ad alcuni agenti citotossici risulterebbe in alcuni casi intrinseca, presentandosi ancor prima dell'inizio della chemioterapia. Inoltre, nei tumori in cui l'espressione della P-gp è inizialmente bassa, si è visto che essa aumenta esponenzialmente dopo l'esposizione agli agenti chemioterapici, causando la progressiva perdita di efficacia dei farmaci. Fra le possibili strategie messe in atto per ovviare all'azione della P-gp vi è l'uso di molecole in grado di bloccare selettivamente la sua azione; questo approccio non genera effetti collaterali specifici ed è ben tollerato in quanto la funzione della proteina non è essenziale per l'omeostasi della cellula [12,13].



**Figura 6.** La glicoproteina P e il meccanismo di efflusso del PTX. I farmaci inibitori si legano in prossimità dell'apertura della pompa e inibiscono l'azione della proteina.

Un altro fattore che agisce negativamente sull'efficacia del PTX è stato correlato all'alterazione di alcuni geni che codificano per le tubuline. Giannakakou *et al.* hanno mostrato la presenza di mutazioni nella tubulina  $\beta$  in alcune linee cellulari di cancro ovarico resistenti al PTX [14]. Queste mutazioni coinvolgono alcuni amminoacidi presenti nella tasca idrofobica della tubulina  $\beta$  a cui normalmente si lega il farmaco, i quali ne riducono notevolmente l'interazione.

Il PTX viene somministrato per infusione intravenosa e si distribuisce rapidamente in periferia. La sua emivita è di 6-13 ore e viene eliminato principalmente dal fegato e per il 10-15% dai reni. I suoi metaboliti più abbondanti sono il 6-idrossipaclitaxel, 30 volte meno attivo del PTX, il 3'-*p*-idrossipaclitaxel e il 6,3'-*p*-diidrossipaclitaxel [15,16].

I più gravi effetti collaterali legati al PTX comprendono intorpidimento, neuropatia sensoriale periferica, mielosoppressione, neutropenia e parestesie [17][18].

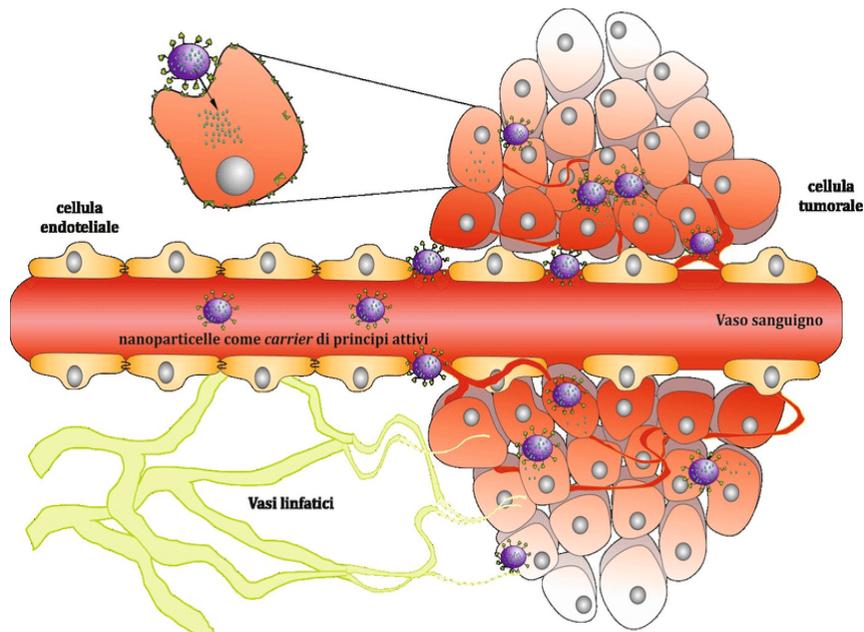
Inoltre, a causa della sua scarsa solubilità in acqua, esso viene somministrato in formulazione contenente Cremophor® EL (Taxol®), una miscela di olio di ricino poli-ossietilato ed etanolo assoluto, 1:1 (v/v). A questa specifica formulazione sono associati numerosi effetti collaterali, quali ipersensibilizzazione, nefrotossicità e neurotossicità [19], che si aggiungono a quelli intrinseci causati dal farmaco stesso. Per questo motivo tutti i pazienti trattati con questo farmaco devono assumere corticosteroidi e antistaminici per ridurre le reazioni di ipersensibilità. Inoltre, Cremophor® EL agisce direttamente sulle cellule dell'endotelio polmonare, causando vasodilatazione, problemi respiratori, broncospasmi ed ipotensione. Sparreboom *et al.* hanno mostrato che il PTX ha una maggiore affinità per il Cremophor® EL rispetto all'albumina, la principale proteina di trasporto presente nel plasma, comportando quindi una diminuzione della frazione di farmaco disponibile [20].

#### **1.4. Sistemi per il *drug delivery***

Al fine di migliorare l'efficacia, la farmacocinetica e la biodistribuzione di un farmaco, la ricerca ha prestato crescente attenzione alla progettazione di sistemi di veicolazione di principi attivi (*drug delivery systems*, DDS). A tale riguardo, la nanomedicina ha consentito lo sviluppo di strutture su scala nanometrica (1-100 nm), destinati alla diagnosi, alla prevenzione e al trattamento di diverse patologie. I DDS offrono numerosi vantaggi: (i) aumentare la concentrazione effettiva di farmaco che raggiunge le cellule target, riducendo la tossicità sistemica; (ii) proteggere il principio attivo dalla degradazione e dal metabolismo, aumentandone l'emivita; (iii) migliorare la selettività, sfruttando l'effetto EPR (*Enhanced Permeability and Retention effect*) o sistemi di targeting attivo. In particolare, l'EPR (targeting passivo) è la capacità dei tessuti tumorali di internalizzare "oggetti" di grandi dimensioni e di trattenerli in modo più efficace rispetto ai tessuti sani, per via delle fenestrazioni che si generano fra le

cellule endoteliali in prossimità del tessuto tumorale e della ridotta attività del sistema linfatico del tessuto malato rispetto a quello sano.

Accanto al targeting passivo, è possibile funzionalizzare i DDS con specifiche “antenne molecolari” in grado di favorire il riconoscimento selettivo da parte di ligandi (anticorpi, piccole molecole, proteine, polisaccaridi) e di recettori sovra-espressi nel sito patologico (**Figura 7**).

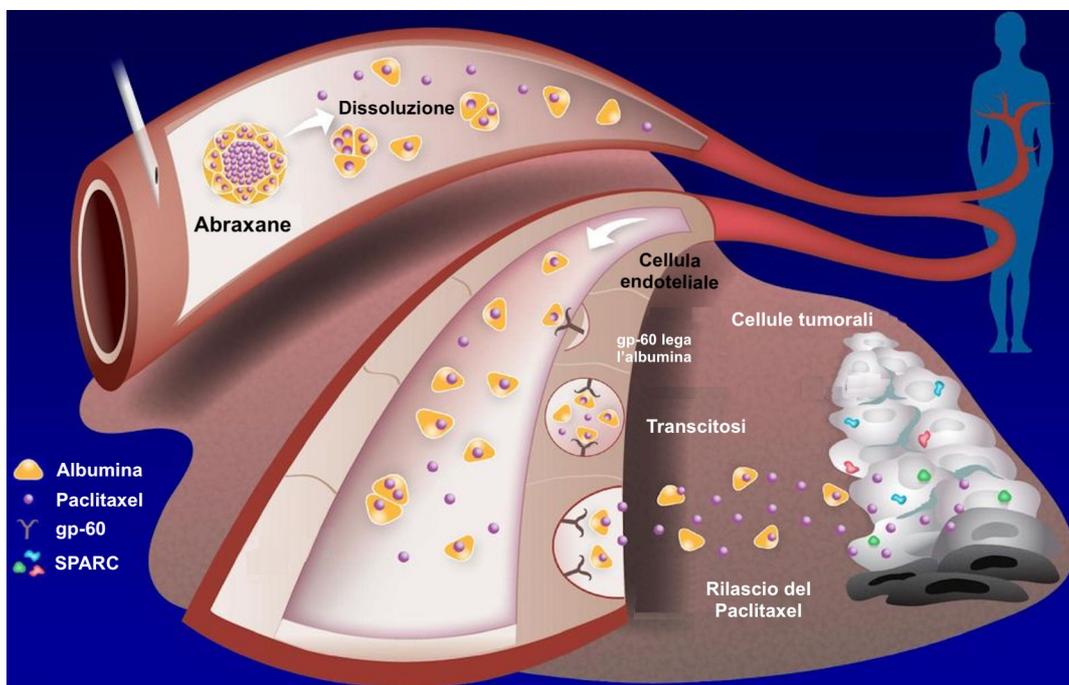


**Figura 7.** L'effetto EPR (enhanced permeability and retention).

In particolare, durante le prime fasi di crescita la rapida proliferazione delle cellule tumorali richiede la formazione di una propria rete di vasi sanguigni (*angiogenesi*) per fornire nutrienti e ossigeno. La rete vascolare che si sviluppa è però irregolare ed eterogenea, e presenta delle fenestrature tra le cellule endoteliali, attraverso le quali macromolecole (30-200 nm) possono selettivamente accumularsi nell'interstizio tumorale. [21] In letteratura è riportata un'ampia varietà di nanoformulazioni di PTX, che includono l'utilizzo di micelle, liposomi, nanoparticelle polimeriche, nanotubi, ecc [22,23].

Nel 2005 la FDA (Food and Drug Administration) ha approvato Abraxane®, una formulazione di PTX legato non covalentemente all'albumina (*Human Serum Albumin*, HSA), per il trattamento del cancro metastatico al seno, al pancreas e al polmone.

I tumori solidi sono particolarmente avidi di HSA, la cui digestione consente di sopperire al fabbisogno di energia e di aminoacidi. In particolare, l'HSA si accumula sfruttando sia l'effetto EPR sia la presenza di due proteine sovra-esprese nelle cellule tumorali che la legano selettivamente: il recettore gp60 sull'endotelio tumorale e la SPARC (*Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine*), una glicoproteina nello spazio interstiziale. In particolare, questa proteina agisce come un recettore legandosi ad HSA e inducendo il rilascio di PTX, che è quindi libero di diffondere attraverso il doppio strato fosfolipidico della membrana e penetrare nella cellula (**Figura 8**).



**Figura 8.** Meccanismo di rilascio di Abraxane.

Contrariamente a Taxol®, Abraxane® è formulato in soluzione acquosa (100 mg di PTX e 900 mg di HSA), riducendo pertanto gli effetti collaterali, i tempi di infusione e consentendo una più elevata dose massima tollerata.

Un'altra importante classe di sistemi per il drug delivery sono i liposomi, vescicole sferiche costituite da un singolo, doppio o multiplo strato fosfolipidico concentrico. Queste strutture sono in grado di accogliere molecole idrofobiche nella membrana e idrofiliche nel core acquoso all'interno della particella [24].

Nel 2006 Lipusu® è stato approvato e commercializzato in Cina per il trattamento del cancro alle ovaie, al seno e allo stomaco [22]. Si tratta di una formulazione liposomiale di PTX (400 nm) a base di lecitina e colesterolo ed è somministrato in dosi comprese tra 100-135 mg/m<sup>2</sup> (30 minuti di infusione). Dopo iniezione intravenosa, il farmaco viene gradualmente rilasciato nel torrente sanguigno, si lega rapidamente alle proteine plasmatiche, e successivamente segue la stessa farmacocinetica della formulazione Taxol®.

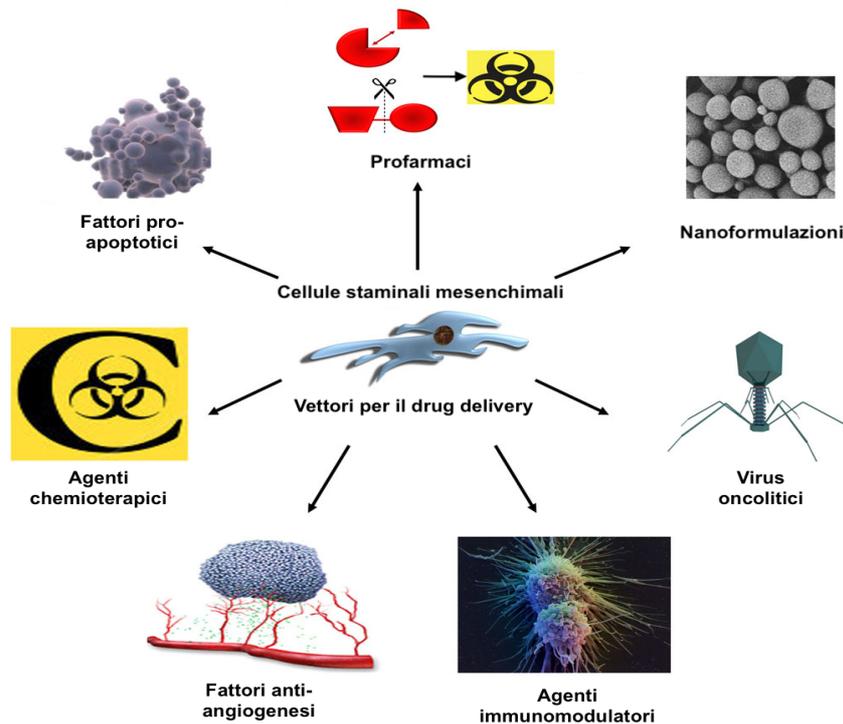
Tuttavia, Lipusu® mostra un'efficacia paragonabile a Taxol® e gli effetti collaterali evidenziati sono gli stessi. In termini di efficacia, gli scarsi miglioramenti osservati con l'utilizzo di liposomi sono largamente imputabili al fatto che, dopo infusione, essi vengono fagocitati dai macrofagi del sistema immunitario ed escreti dall'organismo insieme al farmaco. Per limitare questo fenomeno ed aumentare l'emivita del farmaco, sono state studiate diverse strategie, fra cui la somministrazione di liposomi senza principio attivo prima dell'infusione del farmaco per saturare temporaneamente i macrofagi, oppure la funzionalizzazione della superficie dei liposomi con polimeri idrofilici, come ad esempio il glicole polietilenico (PEG), in grado di "sfuggire" all'azione dei macrofagi stessi [25].

### **1.5. Cellule staminali mesenchimali per il *drug delivery***

In tutti gli organismi multicellulari la rigenerazione dei tessuti è un processo che consiste nel rinnovamento delle cellule necessario alla sopravvivenza dell'organismo. La rigenerazione è garantita dalla presenza di particolari popolazioni di cellule "di riserva" localizzate in quasi tutti gli organi dell'organismo: le *cellule staminali*, che sono cellule indifferenziate in grado di replicarsi e di differenziarsi in cellule specifiche per la riparazione o la rigenerazione di tessuti danneggiati. In particolare, le *cellule staminali mesenchimali* (*Mesenchymal Stem Cells, MSC*) sono cellule multipotenti presenti nel midollo osseo e nel tessuto adiposo in grado di auto-rinnovarsi e di specializzarsi in vari tipi cellulari quali osteoblasti, condrociti, miociti e adipociti [26].

Già da qualche anno numerosi gruppi di ricerca stanno studiando la possibilità di utilizzare le MSC come sistemi di drug delivery per le terapie tumorali. Questo approccio presenta importanti vantaggi: innanzitutto, le MSC presentano un'innata capacità di "homing" verso tessuti infiammati e danneggiati; inoltre, sono facilmente isolabili ed espandibili *in vitro* mediante semplici procedure di propagazione, che non

alterano il loro potenziale differenziativo anche dopo numerosi cicli di divisione. Oltre a ciò, tali cellule sono in grado di internalizzare agenti chemioterapici, profarmaci o virus oncolitici senza alterazione della vitalità e/o delle proprietà migratorie; infine, le MSC possono essere ingegnerizzate per esprimere geni che codificano proteine con attività terapeutica, come fattori antiangiogenici, proapoptotici e immunomodulatori (**Figura 9**) [26].



**Figura 9.** Drug delivery delle cellule staminali mesenchimali.

Tramite somministrazione per via endovenosa o intrarteriosa è stato osservato che le MSC si localizzano principalmente nei polmoni, nel midollo osseo e nel sistema linfatico, con elevata preferenza per i tessuti tumorali. La selettività può essere ulteriormente aumentata inducendo nelle MSC la sovraespressione di recettori di membrana specifici, che legano molecole di segnalazione rilasciate dai tessuti danneggiati [27].

I farmaci possono diffondere passivamente attraverso la membrana delle MSC o essere internalizzati mediante endocitosi, e sono rilasciati nell'ambiente extracellulare all'interno di vescicole o esosomi dotati di recettori di superficie specifici [28].

Come dimostrato in alcuni studi, le MSC, esposte in vitro a concentrazioni elevate di PTX, sono in grado di internalizzare quantità significative del farmaco e rilasciarlo gradualmente nel terreno dopo subcoltura. Le quantità assorbite si sono dimostrate sufficientemente elevate da inibire l'angiogenesi e la proliferazione delle cellule tumorali sia *in vitro* che *in vivo* [29]. Seppur in misura inferiore rispetto ad altre tipologie cellulari, anche le MSC sono sensibili all'azione citotossica degli agenti chemioterapici. Per questo motivo in molti casi si fa ricorso a nanoformulazioni o profarmaci per aumentare il tasso di sopravvivenza delle cellule.

### 1.6. Profarmaci

I sistemi di drug delivery del PTX si basano su interazioni idrofobiche tra la molecola attiva e la matrice di cui è composta la nanoformulazione. Queste interazioni sono molto deboli e comportano un basso carico di farmaco (solitamente inferiore al 10% in peso), scarsa stabilità, tendenza alla cristallizzazione e rilascio indesiderato della molecola attiva nel sistema circolatorio. Per migliorare l'efficacia terapeutica si è ricorso alla sintesi di profarmaci, composti farmacologicamente inattivi che una volta somministrati subiscono trasformazioni (bio)chimiche o enzimatiche all'interno della cellula target, comportando il rilascio della molecola attiva.

I profarmaci sono generalmente progettati legando covalentemente al PTX piccole molecole, polimeri, ligandi specifici per recettori tumorali, vitamine, agenti fotosensibilizzanti o altri agenti chemioterapici. Il legame avviene principalmente in posizione 2'-OH per bloccare temporaneamente l'attività terapeutica del farmaco.

È stato dimostrato che i legami esterei e fosfoesterei vengono facilmente idrolizzati per via enzimatica e chimica all'interno delle cellule tumorali [30]. Inoltre, i tumori presentano un ambiente fortemente riducente a causa della sovrapproduzione intracellulare di *glutathione* (GSH), uno dei più potenti antiossidanti naturali. Il metabolismo accelerato delle cellule tumorali comporta anche la produzione contemporanea di specie reattive all'ossigeno (ROS), originate soprattutto dai processi di respirazione. Alti livelli di GSH e ROS possono coesistere all'interno dello stesso tumore e partecipare alla trasformazione chimica del profarmaco nella molecola attiva [31].

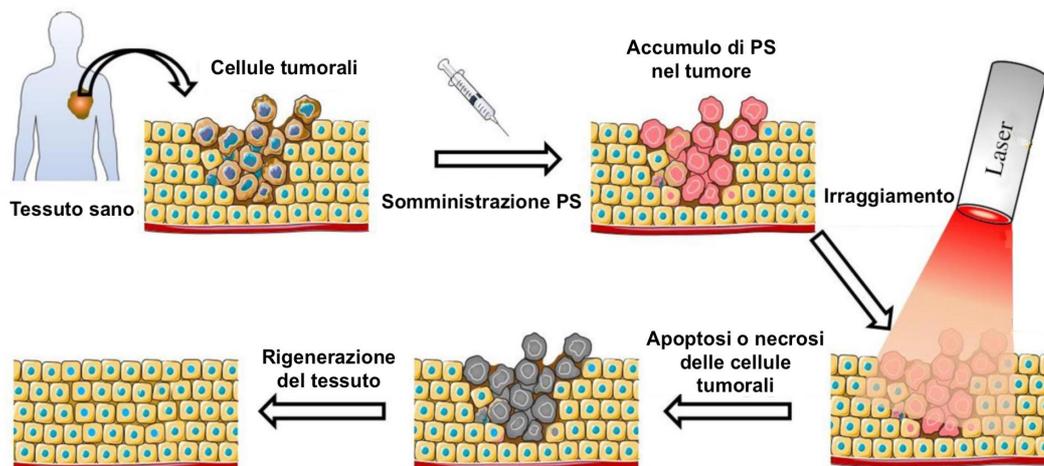
Il coupling del PTX con piccole molecole porta alla formazione di profarmaci anfifilici in grado di autoassemblarsi in nanomicelle dopo iniezione in acqua. Ad esempio, Pei

*et al.* hanno riportato la preparazione di nanomicelle di un dimero di PTX con un tioetere come linker utilizzando il metodo della nanoprecipitazione. La libera rotazione della catena del tioetere conferisce flessibilità alla struttura ed impedisce la precipitazione del PTX, comportando un aumento della solubilità. La rottura del dimero e la liberazione del PTX possono avvenire sia per lisi del linker ad opera di GSH endogeno, sia per ossidazione dello zolfo ad opera dei ROS [32].

### 1.7. Terapia fotodinamica

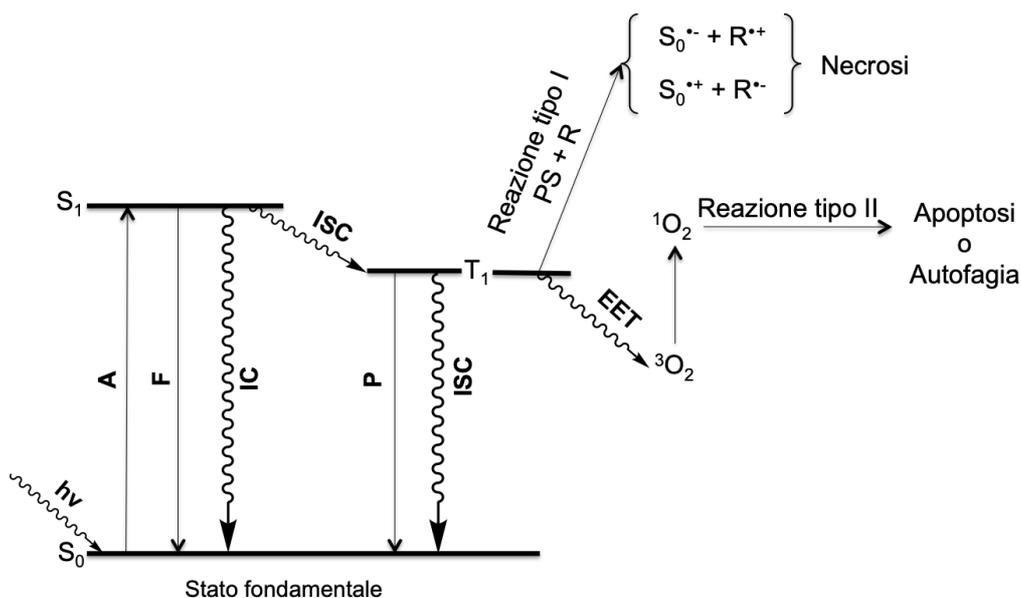
La terapia fotodinamica (PDT) è una modalità di trattamento approvata per varie tipologie di tumori solidi e alcune patologie non oncologiche. Questa tecnica prevede la somministrazione di un agente fotosensibilizzante (PS) e l'irraggiamento ad una specifica lunghezza d'onda (**Figura 10**). Una volta attivato, il PS trasferisce l'energia assorbita all'ossigeno endogeno e induce la produzione di specie citotossiche come l'ossigeno di singoletto ( $^1O_2$ ) e specie reattive all'ossigeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS), che provocano l'apoptosi o la necrosi delle cellule [33].

La lunghezza d'onda utilizzata è solitamente compresa nell'intervallo 600-800 nm, denominato *finestra terapeutica* (PDT window), poiché la luce non viene assorbita dalle specie cromofore presenti nell'organismo (emoglobina,  $H_2O$ , melanina, vitamina B12, ecc.) e non è dannosa per i tessuti sani.



**Figura 10.** I passaggi fondamentali alla base della terapia fotodinamica.

I PS nel loro stato fondamentale di singoletto ( $S_0$ ) possiedono due elettroni antiparalleli localizzati in orbitali a bassa energia. L'assorbimento della luce comporta la transizione allo stato di singoletto eccitato ( $S_1$ ), che consiste nel trasferimento di un elettrone ad un orbitale di energia maggiore senza inversione dello spin. I fenomeni di rilassamento dallo stato altamente instabile  $S_1$  allo stato  $S_0$  possono avvenire per via radiativa (emissione di fluorescenza) oppure attraverso lo sviluppo di calore. Può anche avvenire il fenomeno denominato *intersystem crossing*, in cui si ha la transizione dallo stato  $S_1$  allo stato più stabile di tripletto ( $T_1$ ) mediante inversione dello spin di uno dei due elettroni spaiati. Anche lo stato  $T_1$  può dissipare l'energia per tornare allo stato  $S_0$  emettendo energia radiativa (fosforescenza) o non radiativa (calore). Inoltre, il  $T_1$  ha tempi di vita più lunghi di  $S_0$  e si trova ad energia sufficientemente elevata da reagire rapidamente con le molecole presenti nella cellula e generare specie citotossiche (**Figura 11**).



**Figura 11.** Diagramma di Jablonski semplificato che mostra il meccanismo della PDT. S = stato di singoletto; T = stato di tripletto; A = assorbimento del fotone; F = fluorescenza; IC = conversione interna; P = fosforescenza; ISC = intersystem crossing; EET = trasferimento di energia di eccitazione; R = substrato.

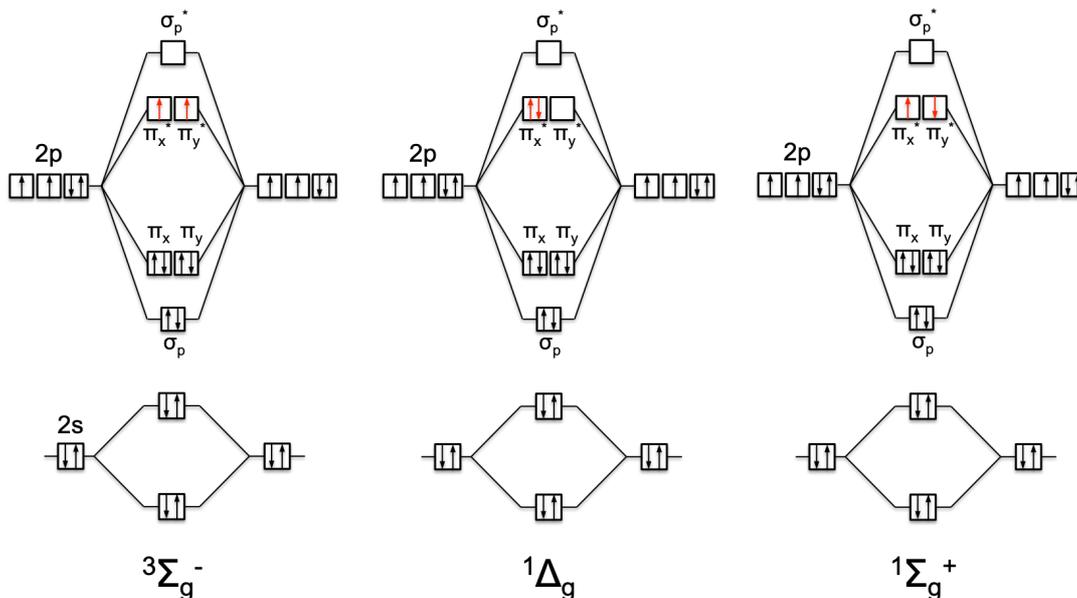
Questo avviene tramite due meccanismi:

- Reazione di tipo I. Il trasferimento elettronico avviene su substrati biologici comportando la formazione di specie radicaliche. Quest'ultime reagiscono con

l'ossigeno e si producono i ROS, come ad esempio il perossido di idrogeno  $\text{H}_2\text{O}_2$ , il radicale superossido  $\bullet\text{O}_2^-$  e ossidrilie  $\bullet\text{OH}$ .

- Reazione di tipo II. Avviene soprattutto nei tessuti ricchi di ossigeno e prevede il trasferimento diretto di energia dal PS all'ossigeno molecolare formando ossigeno di singoletto ( $^1\text{O}_2$ ), una specie molto reattiva che ossida le molecole biologiche.

Lo stato fondamentale dell'ossigeno molecolare è lo stato di tripletto  $^3\Sigma_g^-$ , in cui due elettroni sono spaiati e occupano ciascuno un orbitale di antilegame  $\pi^*$ . Lo stato di singoletto  $^1\Delta_g$  si forma quando viene fornita l'energia necessaria (94 kJ/mol) per l'appaiamento dei due elettroni in un orbitale  $\pi^*$  e l'inversione dello spin di uno di essi. Esiste anche un altro stato eccitato di singoletto  $^1\Sigma_g^+$  a più alta energia, che differisce dallo stato fondamentale per il fatto che i due elettroni presentano spin antiparallelo (**Figura 12**).



**Figura 12.** Gli stati elettronici dell'ossigeno molecolare.

Lo stato  $^1\Sigma_g^+$  ha tempo di vita molto breve e passa rapidamente allo stato  $^1\Delta_g$ . Poiché la transizione  $^1\Delta_g \rightarrow ^3\Sigma_g^-$  è proibita dalle regole di selezione, lo stato  $^1\Delta_g$  presenta tempi di rilassamento sufficientemente lunghi affinché possa avvenire reazione con le molecole biologiche. Contemporaneamente,  $^1\text{O}_2$  ha un'emivita sufficientemente

bassa (4  $\mu$ s) da limitarne la diffusione nei tessuti circostanti, permettendo così una terapia mirata alle cellule bersaglio.

I ROS generati dalla PDT possono distruggere la massa tumorale attraverso tre meccanismi indipendenti: il danno diretto alle cellule, la compromissione del sistema vascolare e l'attivazione della risposta immunitaria. La morte delle cellule indotta direttamente dalla PDT può avvenire attraverso necrosi o apoptosi, una cellula necrotica rilascia i suoi costituenti all'esterno, mentre la cellula apoptotica si frammenta e i residui vengono rimossi da cellule macrofagiche. Il meccanismo che si innesca dipende dal tipo di cellula, dalle dosi di PS e luce somministrate e dal sito di accumulo dell'agente. La localizzazione nei mitocondri o nel reticolo endoplasmatico induce apoptosi, mentre l'accumulo nelle membrane favorisce una morte necrotica. Inoltre, sia le cellule apoptotiche che necrotiche esprimono delle proteine in grado di attivare la risposta immunitaria.

I PS sono solitamente composti organici con una struttura policiclica, come ad esempio le clorine, i derivati porfirinici, le ftalocianine e i derivati fullerenici, in cui l'esteso sistema coniugato favorisce l'assorbimento di fotoni nella regione del rosso o vicino infrarosso. Sono strutture aromatiche, altamente idrofobiche, per questo motivo si ricorre all'utilizzo di nanocarriers come DDS.

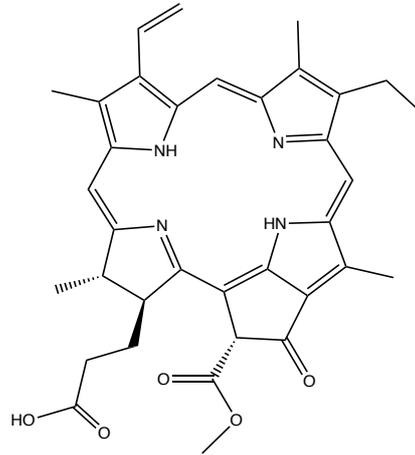
Il PS ideale presenta le seguenti proprietà: minima tossicità al buio ed attivazione solo dopo irraggiamento; elevato coefficiente di estinzione molare ( $\epsilon$ ) nella finestra terapeutica e un'alta emivita nello stato elettronico eccitato per garantire una efficace produzione di specie citotossiche; lo stato  $T_1$  ad energia maggiore di 94 kJ/mol per permettere la transizione elettronica dell'ossigeno molecolare; un accumulo preferenziale nel tessuto tumorale; rapida eliminazione per evitare fotosensibilizzazione e tossicità sistemica [34].

Il primo PS in commercio, Photofrin®, era costituito di una miscela di porfirine in forma monomeriche e oligomeriche ottenute per trattamento acido dell'ematoporfirina. Presentava una composizione variabile e un basso assorbimento nell'unica banda nel rosso a 630 nm, comportando la somministrazione di elevate dosi.

Per limitare gli effetti collaterali e la scarsa efficacia di Photofrin®, sono stati studiati nuovi agenti per la PDT. Le clorine sono un'importante classe di molecole prodotte dalla degradazione della clorofilla, che presentano un intenso assorbimento nella regione del rosso (630-700 nm). A differenza di Photofrin®, mostrano un'elevata resa

quantica di  $^1\text{O}_2$  e non danno reazioni di fotosensibilizzazione poiché vengono rapidamente eliminate dall'organismo [34].

Fra le clorine, la *feoforbide a* (PheoA) è una delle molecole più studiate per la PDT (**Figura 13**) ed è uno dei prodotti principali della degradazione della clorofilla a.



**Figura 13.** Struttura della feoforbide a.

E' insolubile in acqua come tutte le clorine, mentre si scioglie in solventi organici come ad esempio DMSO e DMF (1.5 mg/mL).

E' stata dimostrata la sua efficacia sia *in vitro* che *in vivo* nel trattamento di un'ampia varietà di tumori, come ad esempio il linfoma, il melanoma, il cancro al seno, al colon e ai polmoni [35].

## 2. Scopo del lavoro

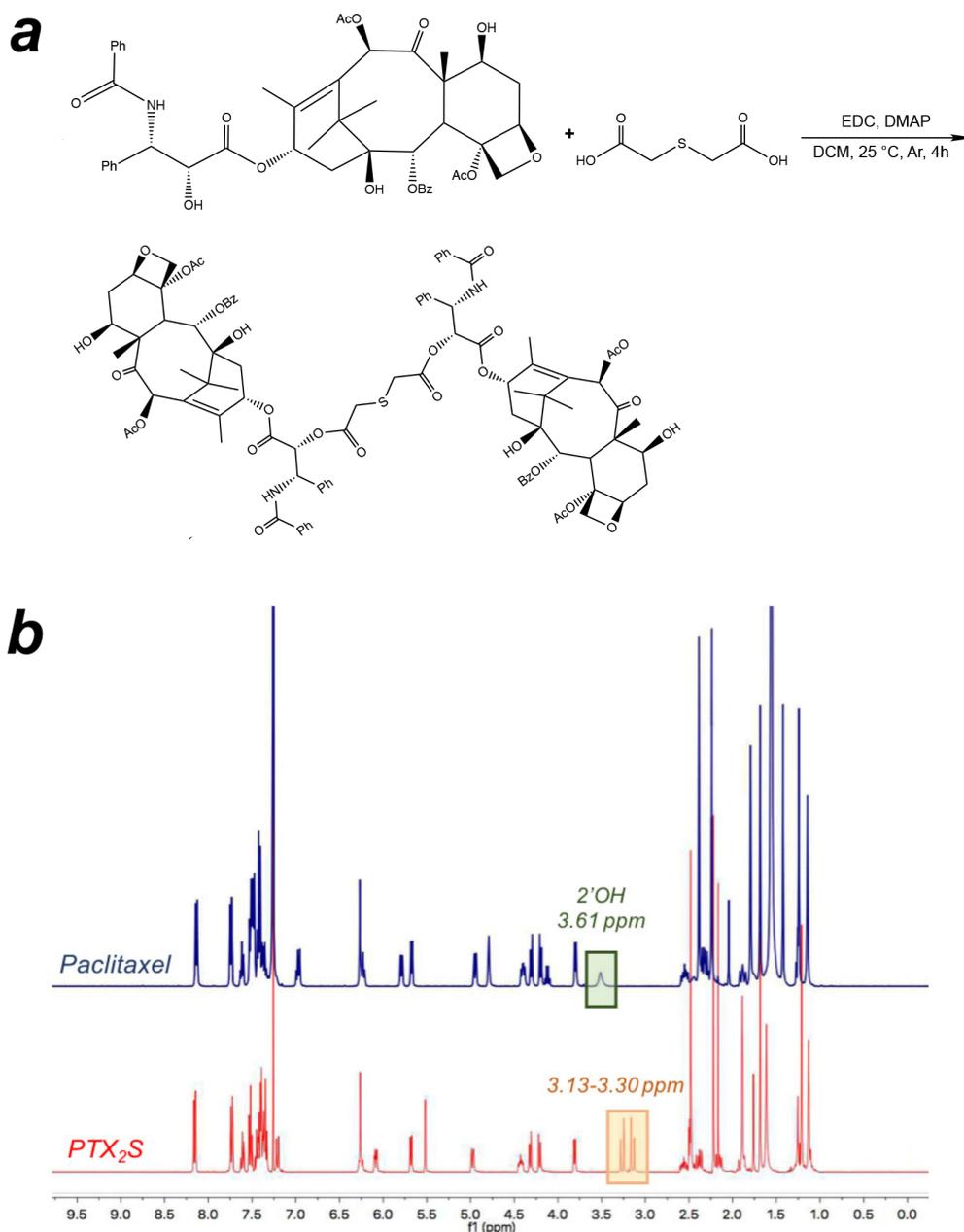
Lo scopo del lavoro di tesi è stato la preparazione di nanomicelle di un pro-farmaco costituito da un dimero del paclitaxel (PTX<sub>2</sub>S) e caricate con la feoforbide a (PheoA), un agente fotosensibile impiegato nella terapia fotodinamica (PDT). Le nanomicelle, ottenute con il metodo della nanoprecipitazione, sono state caratterizzate in termini di proprietà fisiche, capacità di loading e stabilità nel tempo in acqua e in condizioni fisiologiche. Inoltre, è stata valutata la quantità di specie reattive all'ossigeno (ROS) generate dall'irraggiamento dei campioni e la capacità di rilascio del principio attivo in ambiente sia ossidante che riducente.

Sono stati eseguiti test *in vitro* per valutare la possibilità di utilizzare le cellule staminali mesenchimali (MSCs) come sistemi di drug delivery per la veicolazione delle nanomicelle. A tal proposito è stata verificata la capacità da parte delle MSCs di internalizzare la formulazione ed è stato valutato l'eventuale citotossicità del pro-farmaco sulla vitalità delle cellule.

### 3. Risultati e discussione

#### 3.1. Sintesi di PTX<sub>2</sub>S

La sintesi del profarmaco del paclitaxel, **PTX<sub>2</sub>S**, è stata eseguita secondo la procedura riportata in letteratura [32]. La reazione consiste in una condensazione tra due molecole di PTX e l'acido 2,2'-tiodiacetico (**Figura 14a**).

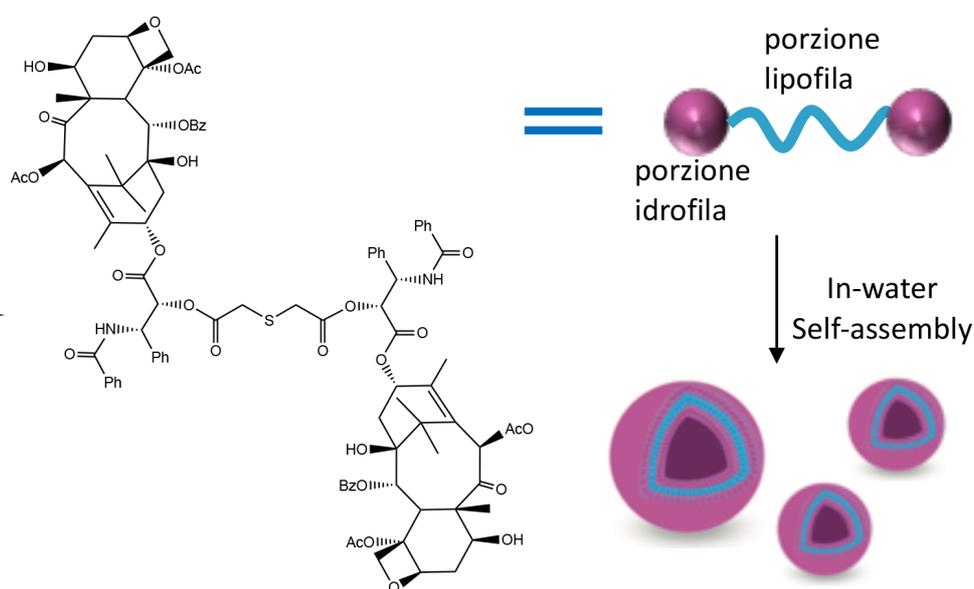


**Figura 14.** a) Reazione di sintesi di PTX<sub>2</sub>S. b) Confronto fra gli spettri <sup>1</sup>H-NMR di PTX (blu) e PTX<sub>2</sub>S (rosso).

Il prodotto ottenuto è stato caratterizzato mediante risonanza magnetica nucleare. L'avvenuta reazione è confermata dallo spettro  $^1\text{H-NMR}$  del prodotto, che mostra la scomparsa del picco caratteristico dell'ossidrilico sul carbonio 2' a 3.61 ppm del PTX. Inoltre, si osserva la comparsa dei segnali a 3.13-3.30 ppm corrispondenti ai protoni del tioetere (**Figura 14b**).

### 3.2. Nanomicelle di $\text{PTX}_2\text{S}$ ( $\text{PTX}_2\text{S\_NMs}$ )

La molecola di PTX è altamente insolubile in acqua, dove cristallizza istantaneamente e precipita. Al contrario, il dimero  $\text{PTX}_2\text{S}$  sciolto in minime quantità di solvente organico, come ad esempio DMSO o EtOH, ed inserito in ambiente acquoso, si ri-organizza attraverso un processo di *self-assembly*, originando micelle stabili (**Figura 15**). Questo fenomeno, ovvero la formazione di micelle in un non-solvente del PTX, è dovuto all'anfifilicità del dimero stesso e alla libera rotazione attorno ai legami  $\sigma$  del tioetere, che conferiscono flessibilità alla molecola e inibiscono l'accrescimento a lungo raggio di cristalli di PTX e la conseguente precipitazione di particelle di grandi dimensioni [30].



**Figura 15.** Formazione di nanomicelle di  $\text{PTX}_2\text{S}$  in soluzione acquosa per *self-assembly*.

Le NMs sono state preparate utilizzando il metodo della nanoprecipitazione. Questa tecnica consiste nell'aggiunta di PTX<sub>2</sub>S sciolto in una minima quantità di un solvente organico (miscibile con l'acqua) in acqua sotto forte agitazione. In queste condizioni si può ipotizzare che il dimero si comporti in maniera analoga ad un fosfolipide, esponendo le porzioni idrofile all'esterno e all'interno della micella e lasciando uno strato lipofilo disponibile ad accomodare sostanze idrofobe. Al fine di ottimizzare la preparazione delle NMs, sono state eseguite numerose prove variando il solvente organico (etanolo, DMSO), la concentrazione del dimero nella soluzione organica e il volume di acqua utilizzato per la formazione delle micelle.

Sulla base dei risultati ottenuti, le condizioni ottimali per la sintesi delle nanomicelle di PTX<sub>2</sub>S, **PTX<sub>2</sub>S\_NMs**, sono state ottenute iniettando 50 µL di una soluzione di PTX<sub>2</sub>S in DMSO (10 mg/mL) in 0.8 mL di H<sub>2</sub>O (**Tabella 1**). In queste condizioni, sono state ottenute NMs con un diametro idrodinamico di 85 nm altamente monodisperse (indice di polidispersità, PDI = 0.085 ± 0.003).

<b>Solvente</b>	<b>[PTX<sub>2</sub>S] (mg/mL in DMSO)</b>	<b>[PTX<sub>2</sub>S] in H<sub>2</sub>O (mg/mL)</b>
H <sub>2</sub> O	10	0.62

**Tabella 1.** Condizioni operative ottimali di sintesi di PTX<sub>2</sub>S\_NMs.

### **3.3. Nanomicelle di PTX<sub>2</sub>S caricate con PheoA (Pheo@PTX<sub>2</sub>S)**

La capacità da parte delle nanomicelle di caricare una molecola lipofila è stata valutata preparando diversi campioni con quantità crescenti dell'agente fotosensibile feoforbide a (PheoA).

Tutti i campioni preparati, denominati **Pheo@PTX<sub>2</sub>S**, hanno concentrazione finale di PTX<sub>2</sub>S pari a 0.25 mg/mL ed un volume complessivo di 2.0 mL.

Per la preparazione di Pheo@PTX<sub>2</sub>S, un'aliquota di soluzione di PheoA è stata mescolata con 50 µL di PTX<sub>2</sub>S in DMSO (10 mg/mL) e la miscela ottenuta è stata iniettata in H<sub>2</sub>O. Le prove preliminari sono state effettuate partendo da una soluzione di PheoA 0.5 mg/mL in DMSO, variando la percentuale caricata (**Tabella 2**).

<b>[PheoA] (mg/mL<sub>DMSO</sub>)</b>	<b>% PheoA (W<sub>PheoA</sub>/W<sub>PTX<sub>2</sub>S</sub>)</b>	<b>V di H<sub>2</sub>O (mL)</b>	<b>% DMSO (V<sub>DMSO</sub>/V<sub>TOT</sub>)</b>	<b>Diametro (nm)</b>	<b>PDI</b>
0.5	15	1.80	10.0	147 ± 1	0.17 ± 0.02
0.5	20	1.75	12.5	157 ± 1	0.14 ± 0.01
0.5	25	1.70	15.0	142 ± 6	0.15 ± 0.01
2.0	30	1.875	6.2	61 ± 2	0.12 ± 0.03
2.0	35	1.86	6.9	93 ± 3	0.11 ± 0.01
2.0	40	1.85	7.5	78 ± 2	0.10 ± 0.02

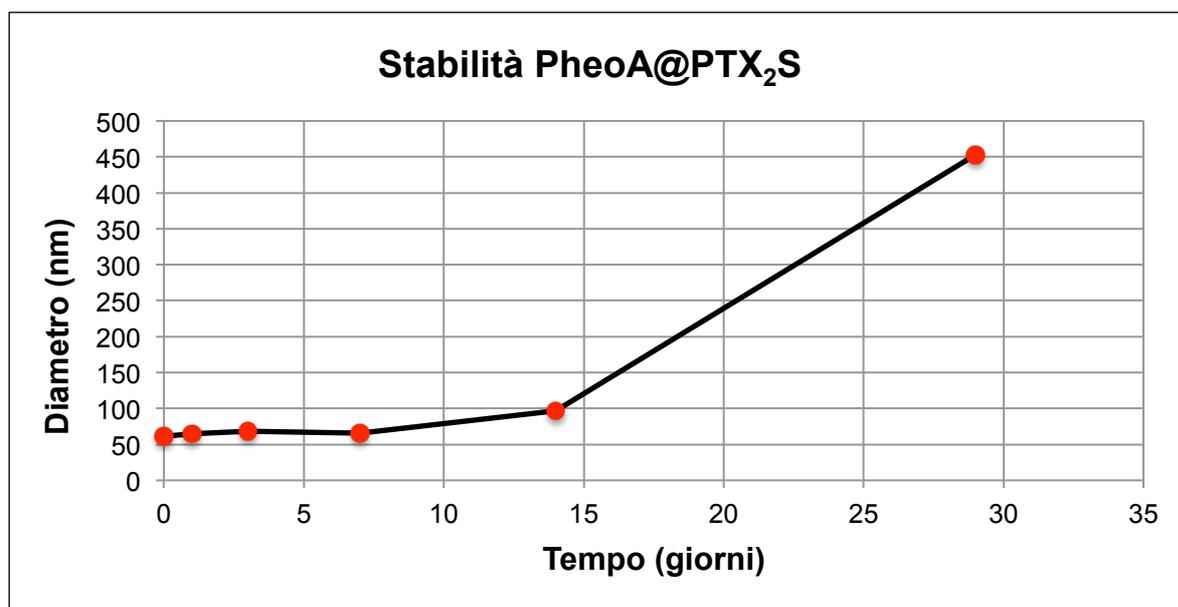
**Tabella 2.** Nanomicelle Pheo@PTX<sub>2</sub>S ottenute miscelando aliquote di PheoA in DMSO (0.5 mg/mL o 2.0 mg/mL) con 50 µL di PTX<sub>2</sub>S in DMSO (10 mg/mL).

La preparazione è stata ottimizzata tenendo in considerazione due fattori limitanti: le caratteristiche fisiche delle micelle (dimensione e polidispersità) e la quantità di DMSO necessaria per sciogliere PTX e PheoA.

Il secondo fattore è determinato dal fatto che il DMSO, presente nel terreno di coltura ad una concentrazione superiore allo 0.1%, risulta tossico per le cellule. Sulla base di queste considerazioni, le condizioni ottimali per la preparazione di Pheo@PTX<sub>2</sub>S prevedono di partire da una soluzione di PheoA in DMSO ad una concentrazione di 2.0 mg/mL, la quale viene premiscelata con la soluzione di PTX ad una concentrazione di 10 mg/mL, assicurando così la completa dissoluzione di entrambi i principi attivi. Questo ha consentito di abbassare considerevolmente il volume totale di DMSO e di aumentare il loading di agente fotosensibile fino al 40% W<sub>PheoA</sub>/W<sub>PTX<sub>2</sub>S</sub>. Tuttavia, per gli studi di stabilità e per i saggi in vitro sulle cellule mesenchimali stromali (MSCs), si è scelto di utilizzare Pheo@PTX<sub>2</sub>S con una percentuale di PheoA del 30%, sufficiente per innescare la produzione di ROS. La grande efficienza di loading dimostra la possibilità di caricare quantità significative di farmaci lipofili all'interno del dimero. Inoltre, si è osservata una netta diminuzione del diametro idrodinamico delle NMs passando da una soluzione di PheoA 0.5 mg/mL ad una soluzione più concentrata (2.0 mg/mL).

### 3.4. Stabilità nel tempo delle nanomicelle Pheo@PTX<sub>2</sub>S

La stabilità nel tempo dei campioni di Pheo@PTX<sub>2</sub>S, conservati al buio a 4°C, è stata valutata eseguendo un'analisi DLS a distanza di 1, 3, 7, 14 e 29 giorni; infatti, un eventuale accrescimento o riduzione delle dimensioni delle nanoparticelle indicherebbe l'insorgenza di fenomeni di aggregazione o di degradazione delle micelle stesse. Come si osserva dal **Grafico 1**, le nanomicelle risultano stabili per due settimane e non mostrano tendenza all'aggregazione.



**Grafico 1.** Studio della stabilità nel tempo di Pheo@PTX<sub>2</sub>S (al buio a 4°C)

Inoltre, come mostrato in **Tabella 3**, Pheo@PTX<sub>2</sub>S sono stabili anche in seguito a rimozione del DMSO effettuata mediante dialisi (MWCO = 12 kDa).

Tempo (g)	Diametro (nm)	PDI
0	73 ± 2	0.11 ± 0.01
1	85 ± 6	0.09 ± 0.01
7	91 ± 3	0.12 ± 0.02

**Tabella 3.** Stabilità nel tempo di Pheo@PTX<sub>2</sub>S in seguito a dialisi (12 kDa).

La stabilità di Pheo@PTX<sub>2</sub>S è stata valutata anche in seguito a rimozione del 70% del volume di acqua mediante ultrafiltrazione (MWCO = 100 kDa). La soluzione concentrata è stata mantenuta a 4°C e poi analizzata dopo diluizione fino a volume originale (**Tabella 4**).

Tempo (h)	Diametro (nm)	PDI
0	77 ± 2	0.11 ± 0.01
1	89 ± 2	0.13 ± 0.02
72	83 ± 3	0.10 ± 0.02

**Tabella 4.** Stabilità nel tempo di Pheo@PTX<sub>2</sub>S dopo concentrazione della soluzione per rimozione del 70% del volume di acqua mediante ultrafiltrazione.

### 3.5. Stabilità delle nanomicelle Pheo@PTX<sub>2</sub>S in condizioni fisiologiche

La stabilità di Pheo@PTX<sub>2</sub>S è stata valutata in PBS a pH = 7.4, per mimare le condizioni di pH fisiologico.

A tal riguardo sono stati utilizzati due approcci:

- sintesi di Pheo@PTX<sub>2</sub>S per nanoprecipitazione direttamente in PBS a pH = 7.4;
- preparazione di Pheo@PTX<sub>2</sub>S in acqua e trasferimento di un'aliquota della sospensione colloidale in PBS a pH = 7.4, in modo da mimare l'iniezione endovenosa.

I risultati ottenuti dimostrano che in queste condizioni le NMs non sono stabili come dimostrato dal fatto che la soluzione intorbida già dopo 15' e in poche ore si ha la completa precipitazione.

Al contrario, le micelle Pheo@PTX<sub>2</sub>S sono stabili quando trasferite in una soluzione di PBS contenente albumina umana (HSA) a 37 °C. Infatti, come si può osservare dai dati in **Tabella 5**, l'HSA è in grado di stabilizzare le micelle prevenendone la flocculazione e la precipitazione. Questo risultato è estremamente rilevante poiché l'HSA rappresenta il 50-60% di tutte le proteine plasmatiche, pertanto la stabilità delle Pheo@PTX<sub>2</sub>S in sua presenza costituisce un risultato molto promettente in vista di una futura applicazione clinica.

Tempo (h)	Diametro (nm)	PDI
0	63 ± 1	0.13 ± 0.02
1	79 ± 3	0.13 ± 0.03
20	69 ± 1	0.28 ± 0.01
60	87 ± 2	0.26 ± 0.01

**Tabella 5.** Studio della stabilità a 37 °C di Pheo@PTX<sub>2</sub>S in soluzione di HSA in PBS (35 mg/mL).

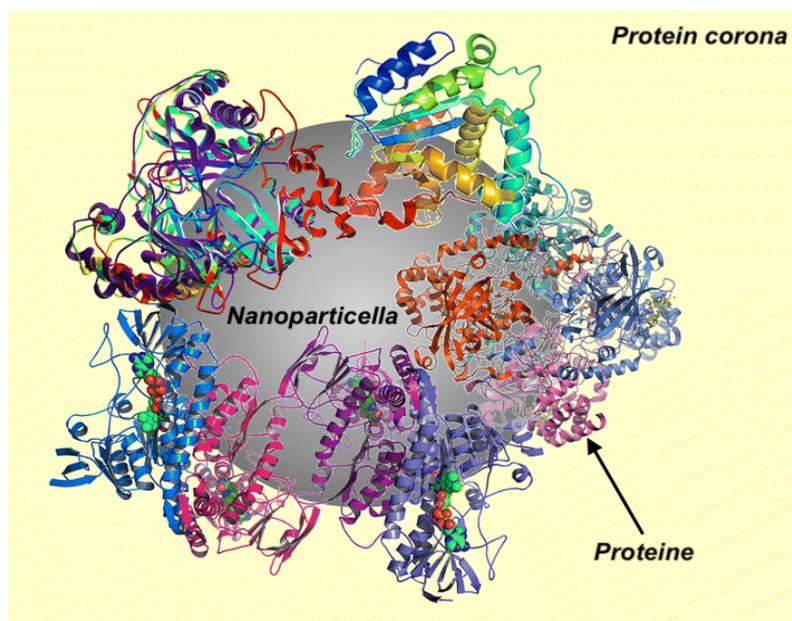
Analogamente, anche in soluzione di PBS con aggiunta di *siero fetale bovino* (Fetal Bovine Serum – FBS), le Pheo@PTX<sub>2</sub>S risultano stabili per 5 giorni a 37°C (**Tabella 6**).

Tempo (g)	Diametro (nm)	PDI
0	109 ± 2	0.19 ± 0.02
1	159 ± 1	0.29 ± 0.03
2	152 ± 2	0.28 ± 0.02
5	178 ± 3	0.28 ± 0.03

**Tabella 6.** Studio di stabilità a 37 °C di Pheo@PTX<sub>2</sub>S in soluzione di FBS in PBS (20% v/v).

Come atteso, in presenza di proteine sieriche, si osserva un aumento iniziale delle dimensioni delle NMs, che poi rimangono costanti nel tempo. Il fenomeno di adesione delle proteine sieriche, fra cui l'HSA, sulle nanoparticelle/nanomicelle è noto come *effetto corona* (**Figura 16**). La composizione dello strato che si forma sulla superficie, detto appunto *corona proteica*, dipende dalle concentrazioni di proteine presenti nel plasma e dall'affinità di ciascuna proteina per la particella. La corona proteica influisce notevolmente su numerose proprietà come la solubilità, la carica superficiale, la capacità di legare recettori cellulari, l'internalizzazione nelle cellule e l'opsonizzazione [36]. In particolare, l'effetto corona incide considerevolmente sia sulla stabilità del nanosistema poiché ne modifica la carica e quindi la repulsione

superficiale, sia sulla sua efficacia poiché ne determina la capacità di evadere il sistema del reticolo endoteliale responsabile dell'eliminazione indiscriminata di tutti gli agenti esogeni eventualmente introdotti nel flusso sanguigno [37].



**Figura 16.** La corona proteica intorno ad una nanoparticella.

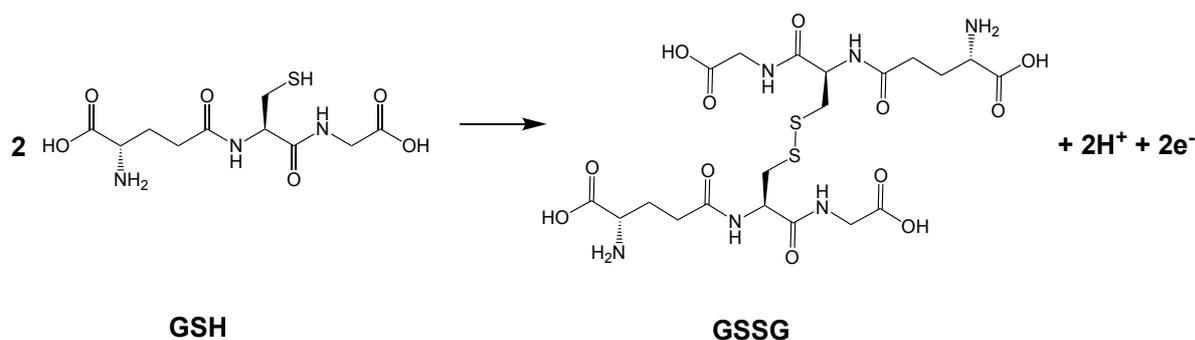
Le NMs descritte in precedenza hanno un potenziale zeta negativo, a conferma dell'esistenza di una repulsione elettrostatica che conferisce stabilità alle NMs (**Tabella 7**). Anche in presenza di HSA si osserva un potenziale zeta negativo poiché la maggior parte delle proteine esibisce una carica debolmente negativa in condizioni fisiologiche (ad esempio, HSA ha un punto isoelettrico a pH = 4.7) [38].

<b>Campione</b>	<b>Potenziale <math>\zeta</math> (mV)</b>
PTX <sub>2</sub> S_NMs	-29.1 ± 0.8
Pheo@PTX <sub>2</sub> S	-29.7 ± 0.6
Pheo@PTX <sub>2</sub> S + HSA	-24.6 ± 0.7

**Tabella 7.** Potenziale zeta delle NMs.

### 3.6. Stabilità delle nanomicelle in ambiente riducente

La rottura delle nanomicelle è stata valutata qualitativamente in presenza di *glutathione* ( $\gamma$ -glutammiL-L-cisteinilglicina, GSH), un tripeptide non proteico presente in concentrazioni millimolari all'interno delle cellule (**Figura 17**). Il GSH svolge un ruolo essenziale nella regolazione di numerose funzioni vitali, come la sintesi di proteine, la riparazione del DNA, l'attivazione di enzimi e il controllo dello stress metabolico sia endogeno che esogeno. In particolare, il GSH protegge le cellule neutralizzando i ROS e i radicali attraverso l'ossidazione del gruppo tiolico presente sulla cisteina. Il glutathione si trova nelle cellule principalmente (>90%) nella forma ridotta (GSH) e solo in piccole quantità nella forma ossidata di glutathione disolfuro (GSSG) (Figura 4). Il rapporto tra forma ossidata e forma ridotta è uno degli indici dello stress ossidativo cellulare.



**Figura 17.** Il glutathione nella forma ridotta (GSH) ed ossidata (GSSG).

Una strategia molto efficace nella progettazione di profarmaci consiste nell'inserire gruppi funzionali, quali tioeteri, disolfuri, tioacetali etc., che in presenza di GSH subiscono reazioni di riduzione e facilitano il rilascio del principio attivo. In particolare, questo processo avviene preferenzialmente all'interno delle cellule tumorali, poiché esse presentano concentrazioni di GSH 10 volte più elevate rispetto alle cellule sane, 10-15 mM vs. 1-2 mM rispettivamente.

La rottura delle micelle è stata valutata trattando le micelle Pheo@PTX<sub>2</sub>S con GSH alla concentrazione di 10 mM, per simulare l'ambiente riducente di una cellula tumorale. In queste condizioni si è osservato un rapido intorbidimento della soluzione e la formazione di un precipitato (**Tabella 8**).

Campione	Tempo (h)	Diametro (nm)	PDI
Pheo@PTX <sub>2</sub> S	0	61 ± 2	0.12 ± 0.03
	1.5	Precipitato	
Pheo@PTX <sub>2</sub> S + HSA	0	61 ± 2	0.12 ± 0.03
	1.5	Precipitato	

**Tabella 8.** Stabilità di Pheo@PTX<sub>2</sub>S in presenza di GSH 10 mM (al buio, 37°C).

Il meccanismo ipotizzato che comporta il rilascio del farmaco, verificato qualitativamente mediante estrazione con solvente del precipitato e TLC, consiste nella tiolisi del linker indotta dal GSH e conseguente idrolisi del legame estereo del PTX [30,32].

La stabilità in ambiente riducente è stata verificata anche alla concentrazione di GSH pari a 10 µM, corrispondente alla quantità di GSH normalmente presente nel flusso sanguigno. Come mostrato in **Tabella 9**, le NMs resistono all'azione riducente del GSH presente nel sangue e non si notano modifiche sostanziali nelle dimensioni anche dopo 24h, confermando pertanto la potenziale efficacia e selettività del sistema qui descritto.

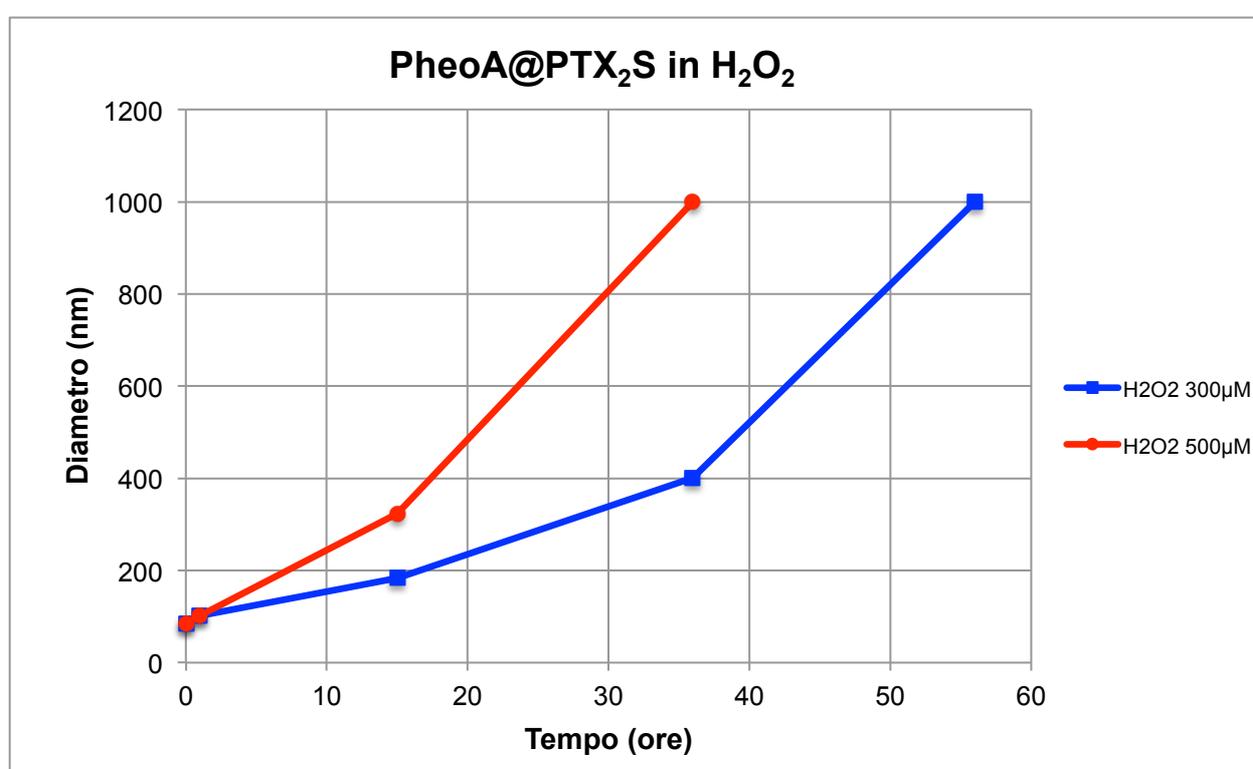
Campione	Tempo (h)	Diametro (nm)	PDI
Pheo@PTX <sub>2</sub> S	0	61 ± 2	0.12 ± 0.01
	1.5	67 ± 3	0.10 ± 0.02
	24	64 ± 3	0.12 ± 0.02
Pheo@PTX <sub>2</sub> S + HSA	0	46 ± 1	0.12 ± 0.03
	1.5	37 ± 1	0.42 ± 0.03
	24	38 ± 1	0.40 ± 0.01

**Tabella 9.** Stabilità di Pheo@PTX<sub>2</sub>S in presenza di GSH 10 µM (al buio, 37°C).

### 3.7. Stabilità delle nanomicelle in ambiente ossidante

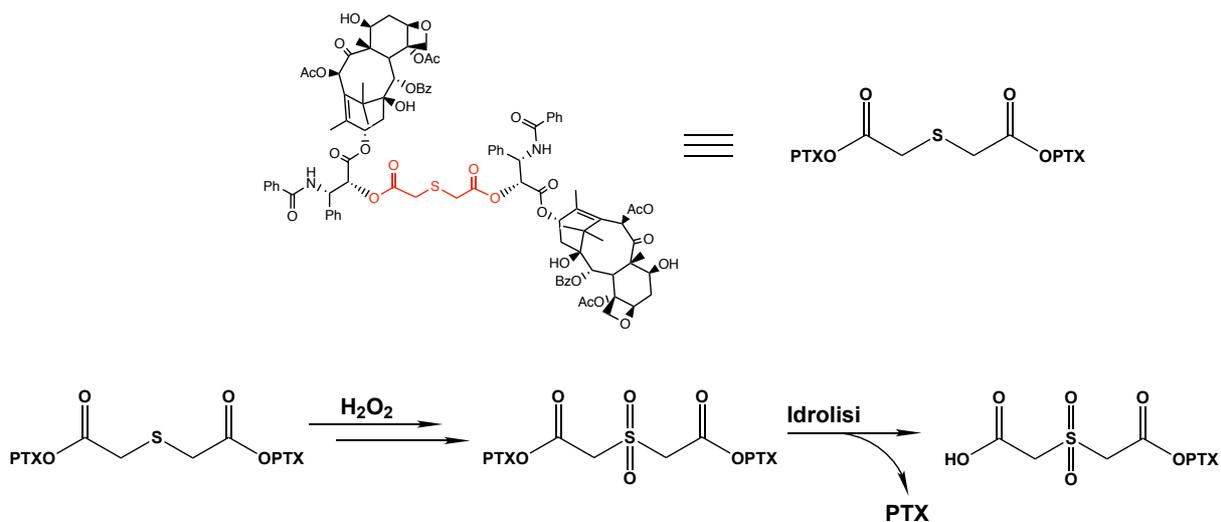
Le cellule tumorali presentano uno stato di forte stress ossidativo con conseguente aumento della concentrazione intracellulare di ROS. Anche in questo caso le specifiche caratteristiche dell'ambiente tumorale possono essere sfruttate per favorire il rilascio selettivo del farmaco dalle micelle.

Al fine di verificare questa ipotesi, le NMs sono state trattate con  $H_2O_2$  a diverse concentrazioni. Come si evince dal **Grafico 2**, il diametro aumenta in modo proporzionale all'aumentare della concentrazione di  $H_2O_2$  e all'aumentare del tempo di incubazione.



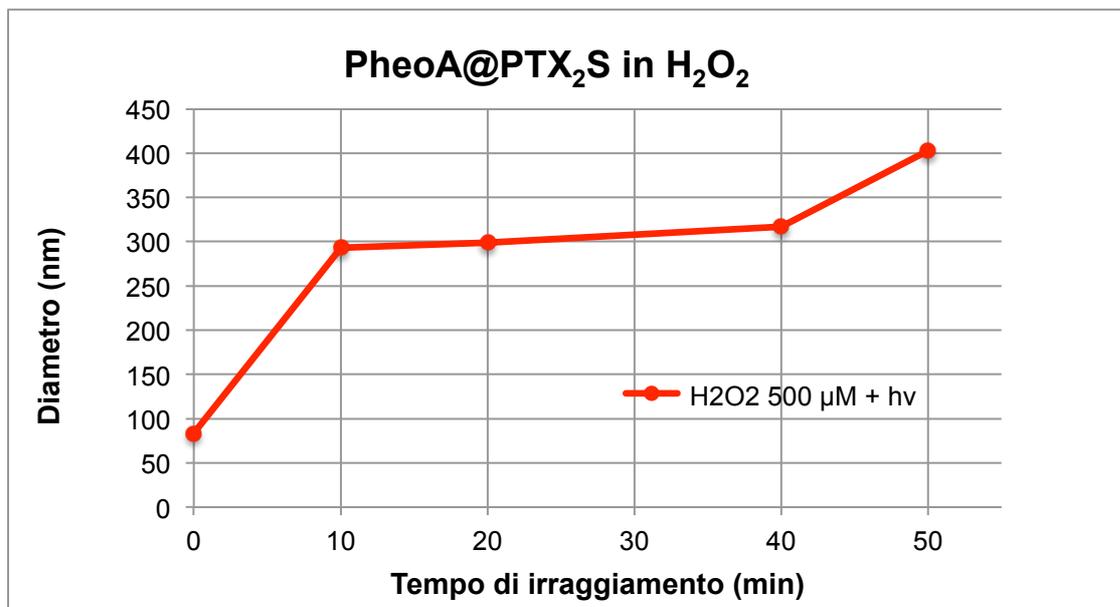
**Grafico 2.** Studio delle dimensioni di Pheo@PTX<sub>2</sub>S in ambiente ossidante ( $H_2O_2$ , al buio, 37°C).

A livello qualitativo l'effettivo rilascio di PTX è stato rilevato mediante TLC in seguito ad estrazione con solvente del precipitato. Il meccanismo di rilascio ipotizzato consiste nell'ossidazione ad opera di  $H_2O_2$  del tioetere a solfossido e solfone, che facilita l'idrolisi del legame estere del PTX (**Figura 18**) [30].



**Figura 18.** Ipotesi di meccanismo attraverso cui avviene il rilascio di PTX in ambiente ossidante.

Vista la presenza sulle micelle di un agente fotosensibile, si è valutato il rilascio di PTX anche in condizioni di irraggiamento con luce bianca. Infatti, in queste condizioni, la PheoA presente sulle micelle dovrebbe generare ROS e rendere più efficace il rilascio del principio attivo, rendendolo inoltre controllabile in modo selettivo. Per questa prova, le Pheo@PTX<sub>2</sub>S sono state incubate con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (500 μM) ed il campione è stato irraggiato con luce bianca ad intervalli di tempo regolari (**Grafico 3**).



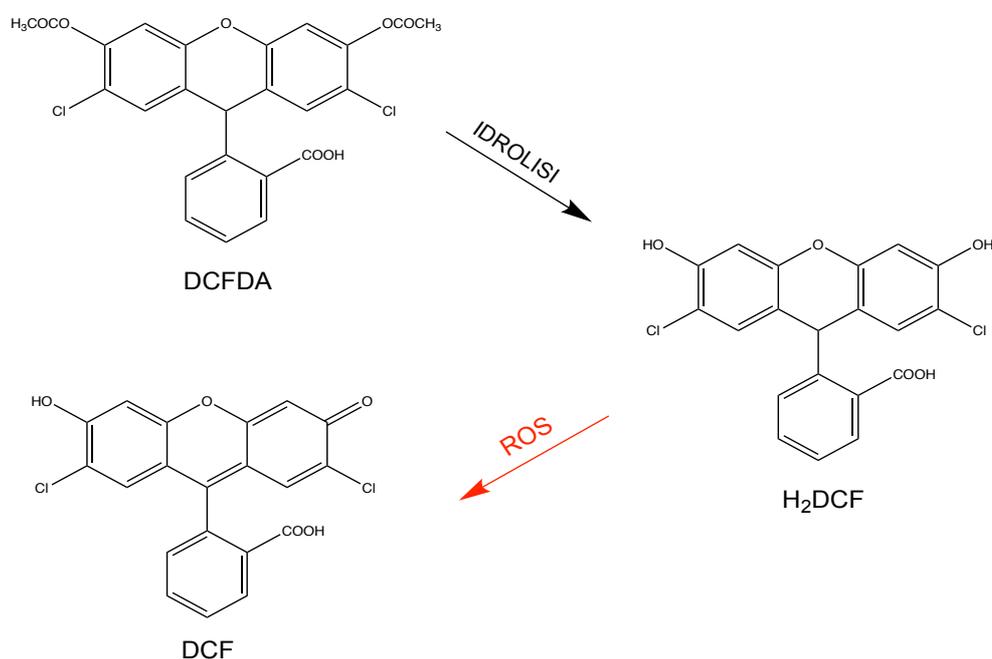
**Grafico 3.** Studio delle dimensioni di Pheo@PTX<sub>2</sub>S sottoposte ad irraggiamento in ambiente ossidante (37°C).

I dati ottenuti dimostrano che l'irraggiamento in ambiente ossidante comporta un notevole aumento delle dimensioni già dopo 10' e la rottura delle NMs risulta molto più rapida rispetto alla sola azione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 3.8. Sviluppo di specie reattive all'ossigeno (ROS)

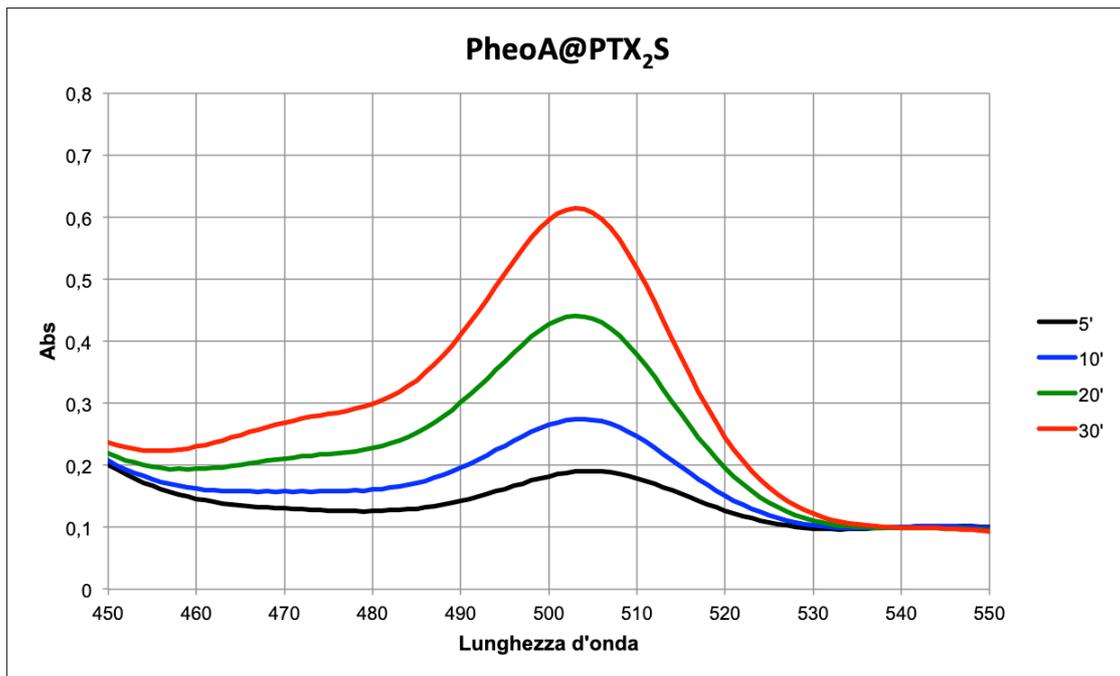
Il razionale che sottende alla preparazione delle micelle Pheo@PTX<sub>2</sub>S è quello di ottenere un sistema multi-modale per il trattamento dei tumori, che sia in grado di rilasciare sia il farmaco chemioterapico PTX che i ROS a seguito di irraggiamento con luce ad una opportuna lunghezza d'onda. I ROS eventualmente prodotti serviranno non solo a favorire la liberazione mirata del farmaco come dimostrato sopra, ma funzioneranno essi stessi come agenti citotossici, inducendo la morte delle cellule tumorali. Pertanto, l'analisi della produzione di ROS da parte di Pheo@PTX<sub>2</sub>S a seguito di irraggiamento luminoso è stata effettuata utilizzando la 2,7-diclorofluorescina diacetato (DCFDA) come rivelatore chimico (ROS Probe) [39]. In particolare, la soluzione di DCFDA (non fluorescente) viene inizialmente idrolizzata in ambiente basico nella specie 2,7-diclorodidrossifluorescina (DCFH<sub>2</sub>). Successivamente, i ROS prodotti dall'irraggiamento dei campioni ossidano la DCFH<sub>2</sub> in una specie fluorescente (DCF) che presenta un picco di assorbimento

caratteristico a 500 nm, di intensità proporzionale alla quantità di specie reattive sviluppata (**Figura 19**).



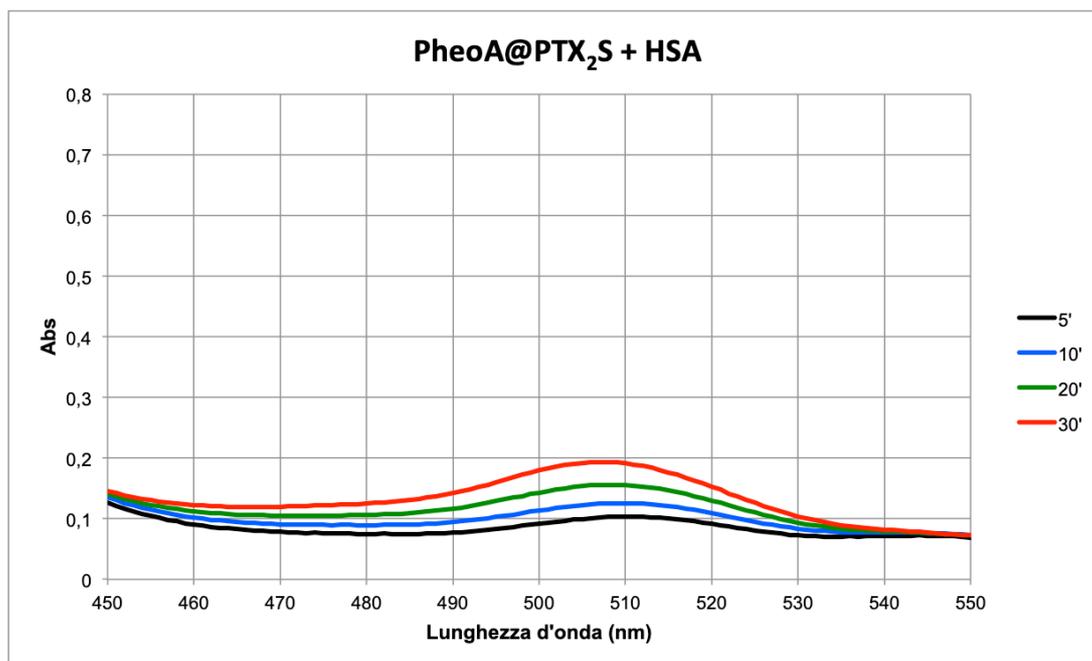
**Figura 19.** Idrolisi della specie DCFDA non fluorescente in H<sub>2</sub>DCF. I ROS che si sviluppano ossidano quest'ultima nella specie fluorescente DCF.

Gli spettri di assorbimento a diversi tempi di irraggiamento di Pheo@PTX<sub>2</sub>S in presenza di una soluzione di DCFDA mostrano l'aumento dell'intensità del picco a 505 nm relativo alla formazione DCF. Inoltre, come mostrato nel **Grafico 4**, la quantità di ROS generati aumenta proporzionalmente al tempo di esposizione alla luce.



**Grafico 4.** Spettro di assorbimento della DCF di Pheo@PTX<sub>2</sub>S in H<sub>2</sub>O.

Lo stesso esperimento è stato ripetuto aggiungendo HSA alla soluzione contenente Pheo@PTX<sub>2</sub>S e DCFDA, questo per verificare che anche in queste condizioni la micella è in grado di produrre ROS. In realtà, come si evince dal **Grafico 5**, lo spettro di assorbimento della DCF risulta notevolmente attenuato in presenza della corona proteica di HSA intorno alle NMs di Pheo@PTX<sub>2</sub>S che sembra “inibire” la formazione di ROS. Tuttavia, come è stato riportato in letteratura per altri tipi di nanosistemi, l’azione “schermante” delle proteine sieriche non è altrettanto evidente/limitante in vivo, pertanto questo dato non rappresenta di per sé una limitazione all’utilizzo di queste micelle [40].



**Grafico 5.** Spettro di assorbimento della DCF di Pheo@PTX<sub>2</sub>S in presenza di HSA.

Mediante analisi DLS si è poi valutato se i ROS prodotti dall'irraggiamento dei campioni fossero in grado di provocare la rottura delle NMs e indurre il rilascio di PTX (**Tabella 10**). Dai dati ottenuti si osserva una diminuzione delle dimensioni delle NMs e un aumento della polidispersità, forse a causa ad una parziale ossidazione del profarmaco.

Irraggiamento (min)	Diametro (nm)	PDI
0	60 ± 4	0.10 ± 0.02
1	41 ± 1	0.28 ± 0.02
3	37 ± 1	0.32 ± 0.01
5	38 ± 1	0.36 ± 0.02
10	48 ± 2	0.32 ± 0.01
20	43 ± 1	0.38 ± 0.03

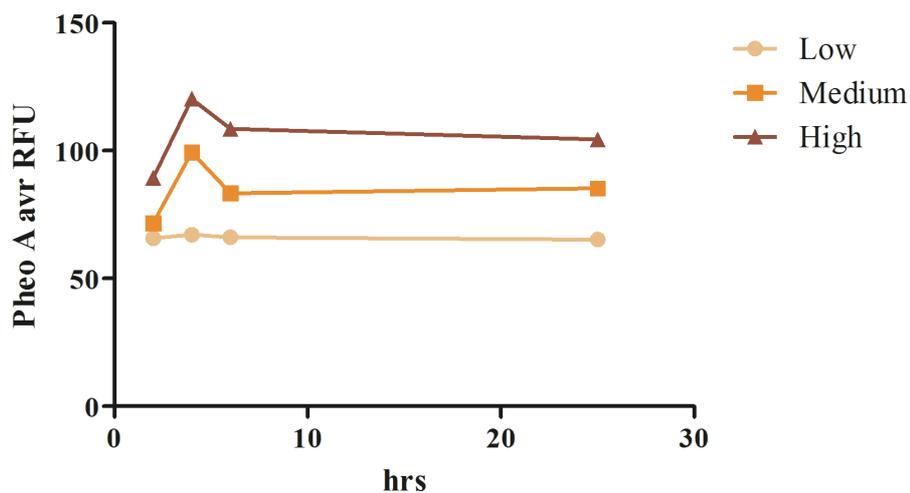
**Tabella 10.** Studio dell'effetto dell'irraggiamento di Pheo@PTX<sub>2</sub>S sulle dimensioni delle NMs.

### 3.9. Test biologici *in vitro*

#### 3.9.1. Analisi dell'internalizzazione delle cellule

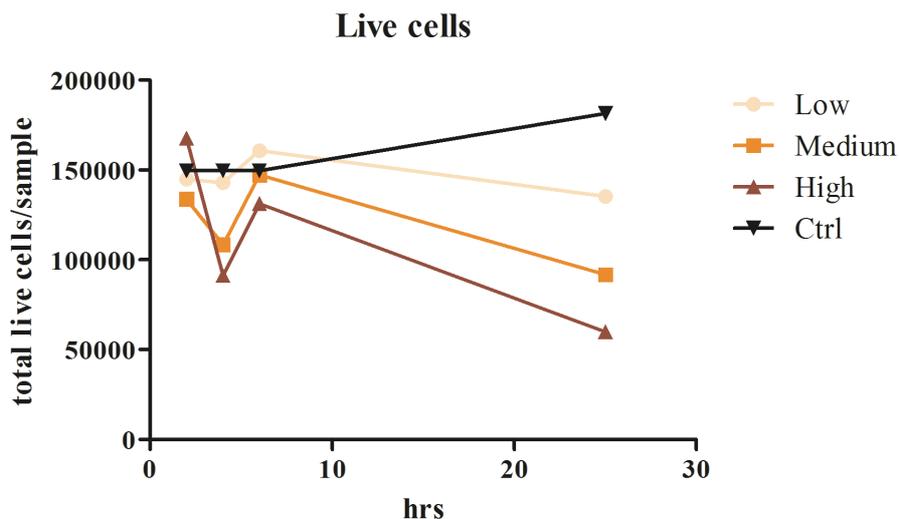
Le nanomicelle fin qui descritte e caratterizzate sono state disegnate per una loro possibile applicazione nel trattamento dei tumori solidi. Al tal fine, però, è fondamentale avere un sistema in grado di veicolare il farmaco direttamente al sito tumorale. Per questo motivo si è pensato di valutare come trasportatore delle nanomicelle le cellule mesenchimali stromali (MSCs), una popolazione primaria presente in diversi tessuti del corpo umano (midollo osseo, il tessuto adiposo, etc...) e ampiamente studiata come mezzo per veicolare farmaci direttamente alle cellule tumorali, riducendo le controindicazioni legate alla somministrazione del farmaco libero. Nel caso specifico, le MSCs agiscono sia favorendo l'accumulo selettivo del farmaco nel sito d'interesse, sia proteggendo le micelle dalle barriere biologiche presenti nell'organismo e dedicate all'eliminazione di tutti gli elementi esogeni.

Attraverso opportuni test biologici *in vitro* è stata pertanto studiata la capacità delle cellule mesenchimali stromali di internalizzare le micelle di Pheo@PTX<sub>2</sub>S, verificando nel contempo l'eventuale compromissione della loro vitalità e morfologia. A tale scopo, le MSCs sono state seminate in appositi pozzetti il giorno precedente il trattamento e lasciate aderire per una notte; il giorno seguente sono state quindi trattate con 3 diverse dosi di Pheo@PTX<sub>2</sub>S, corrispondenti a concentrazioni di PTX<sub>2</sub>S pari a 1 µg/mL (Low), 2.5 µg/mL (Medium) e 5 µg/mL (High). Dal momento che la formulazione presentava un'alta percentuale di DMSO, alcuni pozzetti di cellule sono stati utilizzati come controllo (Ctrl) e trattati solo con DMSO alla concentrazione corrispondente alla dose High (0.4%). Attraverso l'analisi della fluorescenza (PheoA) è stato possibile stabilire che le MSC sono in grado di internalizzare le micelle già dopo 2h dall'inizio del trattamento (**Grafico 6**). Eccetto per la dose Low in cui non si ha un aumento della fluorescenza, negli altri due casi si osserva un picco di fluorescenza dopo 4h dall'esposizione al farmaco, che decade dopo 6h e si mantiene poi costante nel tempo. La fluorescenza risulta proporzionale alle dosi a cui sono state esposte le cellule.



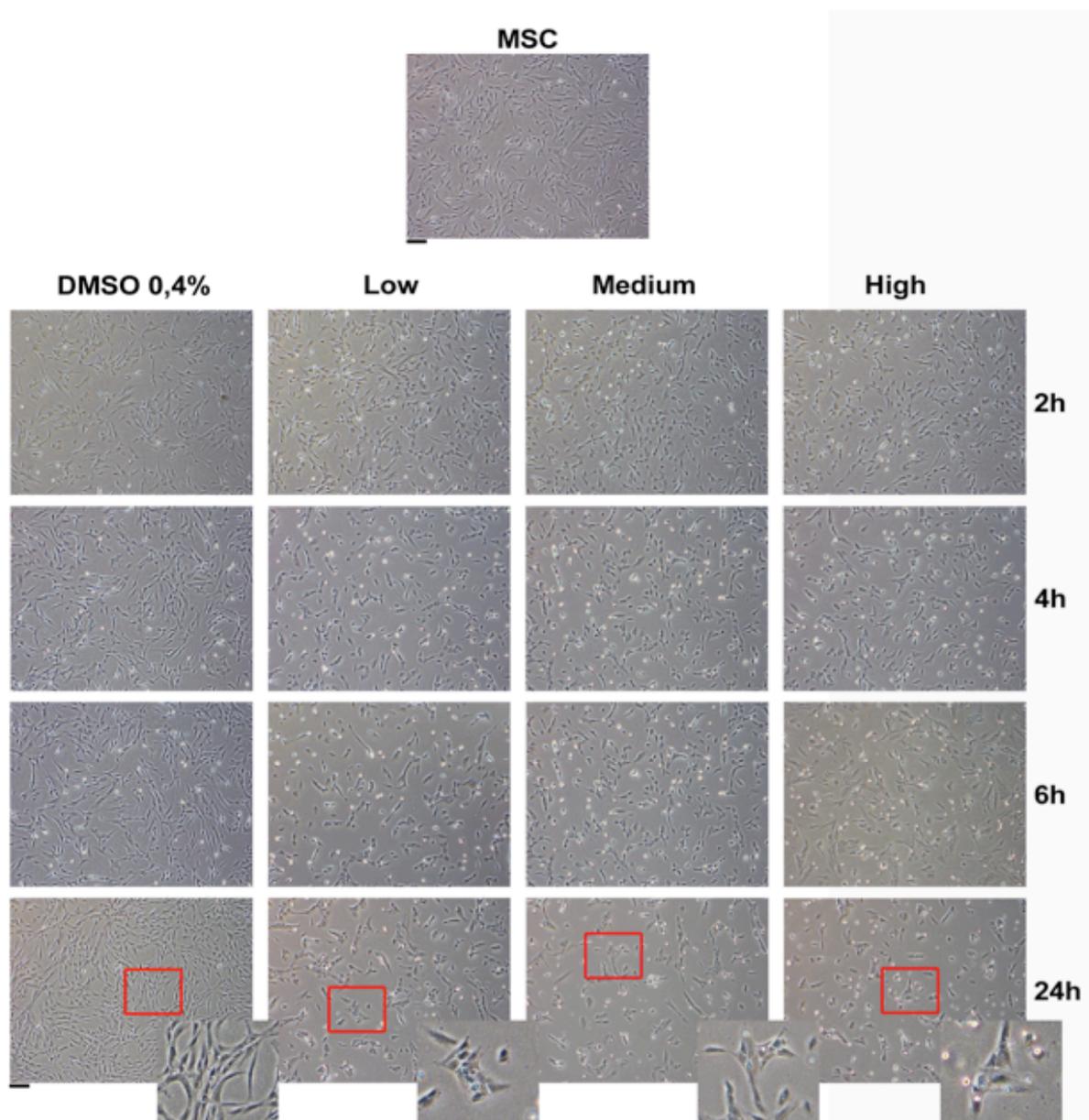
**Grafico 6.** Intensità della fluorescenza di PheoA internalizzata dalle MSC in funzione del tempo di incubazione.

La vitalità cellulare durante l'incubazione rimane stabile fino a 6h dall'inizio del trattamento, mentre dopo 24 h dall'incubazione con le micelle, la vitalità diminuisce in modo costante fino ad una consistente morte cellulare (**Grafico 7**). Come si evince dal grafico (Ctrl, linea nera), l'esposizione delle cellule al solo DMSO alla concentrazione utilizzata per la preparazione dei campioni, non altera la capacità proliferativa delle cellule, indicando che l'effetto osservato negli altri casi è legato esclusivamente all'effetto del farmaco.



**Grafico 7.** Vitalità delle cellule in funzione del tempo di incubazione con Pheo@PTX<sub>2</sub>S.

Al fine di valutare possibili variazioni della morfologia cellulare a seguito del trattamento con Pheo@PTX<sub>2</sub>S, sono state acquisite immagini delle cellule dopo 2, 4 e 24h dall'incubazione con microscopio ottico invertito Nikon (**Figura 20**). L'alterazione della morfologia indotta dall'esposizione di Pheo@PTX<sub>2</sub>S è probabilmente dovuta alla rottura del pro-farmaco e al rilascio di PTX nella cellula.



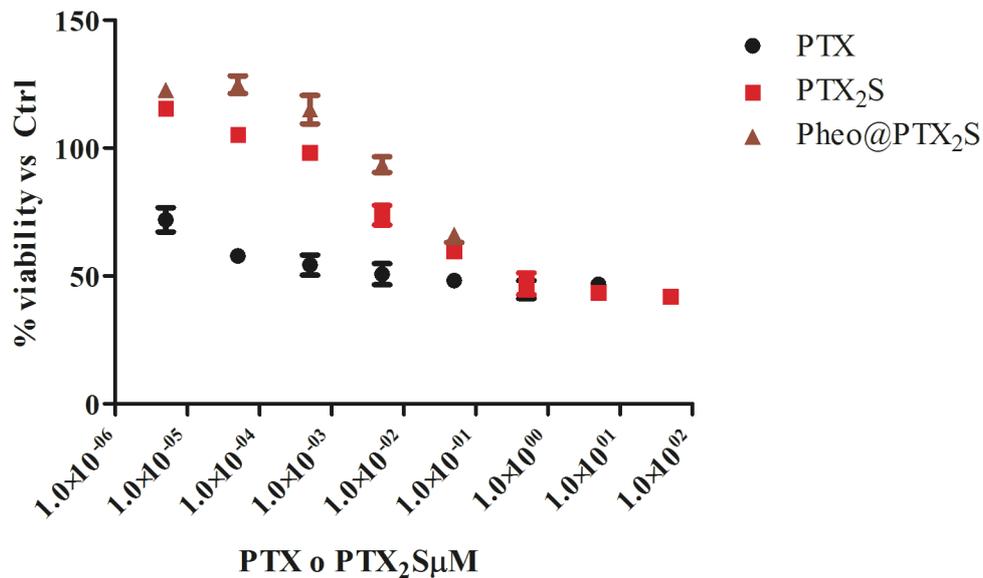
**Figura 20.** Immagini al microscopio delle MSC a diversi tempi di incubazione di Pheo@PTX<sub>2</sub>S. Scale bar 200  $\mu$ m.

### 3.9.2. Valutazione dell'effetto citotossico del pro-farmaco sulle MSC

Dopo i primi risultati *in vitro* che hanno confermato la capacità delle MSC di internalizzare NMs, abbiamo determinato la tossicità delle micelle confrontandola con quella del farmaco libero. È importante sottolineare che questi esperimenti sono stati effettuati al buio per evitare l'effetto della PheoA da parte della luce.

A tale scopo, le cellule sono state trattate per 24h con 8 dosi differenti di farmaco (range 50  $\mu$ M – 50 pM, PTX, PTX<sub>2</sub>S e Pheo@PTX<sub>2</sub>S) e dopo ulteriori 48 ore è stato

effettuato un saggio metabolico (WST-1). I risultati, normalizzati per cellule di controllo non trattate, (**Grafico 8**) mostrano innanzitutto che la dose più elevata di farmaco (50  $\mu\text{M}$ ) non è in grado di indurre la morte massiva delle cellule mesenchimali, come ampiamente riportato in letteratura.



**Grafico 8.** Grafico di sopravvivenza delle MSC dopo 24h di trattamento con PTX, PTX<sub>2</sub>S o Pheo@PTX<sub>2</sub>S normalizzato su cellule di controllo.

Inoltre, il grafico mostra che il farmaco da solo, anche alla dose più bassa, è più tossico rispetto alle nanomicelle. Questo risultato è estremamente significativo in vista di una possibile applicazione terapeutica che utilizzi le MSC come veicolo del farmaco chemioterapico. Infatti, grazie alle loro caratteristiche, le micelle qui descritte vengono efficacemente internalizzate dalle cellule mesenchimali senza alterarne la vitalità, rendendo pertanto questo approccio combinato di “trojan horse” molto interessante nell’ottica di una possibile applicazione clinica.

## 4. Conclusioni

Nel lavoro di tesi è stata descritta la preparazione di nanomicelle di un pro-farmaco costituito da un dimero del paclitaxel (PTX<sub>2</sub>S) e caricate con quantità crescenti dell'agente fotosensibile feoforbide a (PheoA). Il pro-farmaco è stato sintetizzato per condensazione tra due molecole di PTX utilizzando un tioetere come linker.

Con il metodo della nanoprecipitazione sono state ottenute nanomicelle (Pheo@PTX<sub>2</sub>S) con quantità di PheoA caricata fino al 40% ( $W_{\text{Pheo}}/W_{\text{PTX}_2\text{S}}$ ) e di diametro idrodinamico compreso tra i 70-90 nm. I campioni sono risultati stabili sia in acqua che in condizioni fisiologiche.

La rottura delle micelle e il rilascio del principio attivo è stato valutato in condizioni che mimano il microambiente tumorale. È stato dimostrato che i campioni sono sensibili agli agenti riducenti (GSH) e a quelli ossidanti (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) tipicamente presenti in concentrazioni elevate nel microambiente tumorale, che sono in grado di indurre la rottura delle nanomicelle e causare il rilascio del principio attivo.

L'irraggiamento delle nanomicelle ha permesso di verificare che la PheoA è in grado di produrre ROS e che la quantità prodotta è proporzionale al tempo di esposizione alla luce. Inoltre, i ROS formati dall'irraggiamento sono in grado in parte di indurre il rilascio del farmaco.

Infine, dai test *in vitro* è stata dimostrata attraverso l'analisi della fluorescenza della PheoA la capacità delle cellule staminali mesenchimali (MSCs) di internalizzare le nanomicelle. Inoltre, è stato osservato che durante l'incubazione la vitalità delle cellule rimane stabile fino a 6h a contatto con il farmaco.

## 5. Parte sperimentale

### 5.1. Note generali

Il Paclitaxel (PTX, 99.5%, 853.91 g/mol, CAS 33069-62-4) è stato acquistato da AlfaAesar. La Feoforbide a (PheoA,  $\geq 90\%$ , 592.7 g/mol, CAS 15664-29-6) è stata acquistata da Cayman Chemicals. Tutti gli altri reagenti utilizzati sono stati acquistati da Sigma-Aldrich.

La cromatografia su colonna (*Flash Chromatography*, FC) è stata eseguita utilizzando come fase stazionaria gel di silice (0.037-0.063 mm, Merck), per la cromatografia su strato sottile (TLC) è stato utilizzato gel di silice 60 (FlukaAnalytical). I solventi utilizzati sono stati distillati seguendo le procedure standard.

Per tutte le nanomicelle è stata utilizzata H<sub>2</sub>O ultra pura Milli-Q.

Gli spettri di risonanza magnetica nucleare (<sup>1</sup>H NMR) sono stati registrati con uno spettrometro Varian (500 MHz) utilizzando CDCl<sub>3</sub> come solvente (7.26 ppm, 1H).

Le misurazioni di Dynamic Light Scattering (DLS) e potenziale  $\zeta$  sono state eseguite con uno strumento NanoBrook Omni, utilizzando cuvette in polistirene.

Gli spettri UV-Vis sono stati acquisiti mediante spettrofotometro Cary 100 UV-Vis della Agilent Technologies.

Per la concentrazione delle nanomicelle è stata utilizzata una centrifuga Allegra 64R (Beckman Coulter) e filtri per ultrafiltrazione della Millipore Corporation (MWCO 100 kDa, volume 0.5 mL).

Per determinare la produzione di ROS, i campioni sono stati irradiati mediante una lampada bianca al tungsteno (Philips) di potenza 300 W, ad una distanza di 40 cm.

Per gli esperimenti *in vitro* le cellule staminali mesenchimali sono state isolate dal prelievo di midollo osseo (secondo la procedura riportata da Pierini *et al.* [41]) di pazienti inclusi in uno studio approvato dal comitato etico dell'istituto (0029817/2015), operati chirurgicamente all'Istituto Ortopedico Rizzoli dopo firma del consenso informato.

Alpha Modification Minimum Essential Medium Eagle ( $\alpha$ -MEM), Dulbecco-modified Phosphate Buffered Solution (D-PBS), Fetal Bovine Serum (FBS) e Tryple Select utilizzati per l'espansione e gli esperimenti sono stati acquistati da Gibco, il reagente

WST-1 è stato acquistato da Roche e il Trypan Blue acquistato da Thermo Fisher Scientific.

Per visualizzare le cellule dopo internalizzazione, è stato utilizzato un microscopio invertito NIKON Eclipse TE2000-U (Nikon, Amsterdam, The Netherlands).

Per valutare l'internalizzazione delle nanomicelle Pheo@PTX<sub>2</sub>S è stato utilizzato un contatore di cellule automatico, Countess, (Thermo Fisher Scientific).

Per effettuare la lettura spettrofotometrica del campione è stato utilizzato un lettore di piastre (Synergy HT, BioTek Winooski, VT, USA) settato per una lettura a 450 nm con una correzione a 690 nm.

## 5.2. Sintesi di PTX<sub>2</sub>S

In un pallone a tre colli contenente una soluzione di PTX (99 mg, 0.12 mmol, 1 eq) in 2.0 mL DCM anidro sono stati aggiunti sequenzialmente acido 2,2'-tiodiacetico (13 mg, 0.085 mmol, 0.73 eq), EDC·HCl (46 mg, 0.24 mmol, 2 eq) e DMAP (1.5 mg, 0.012 mmol, 0.1 eq) sotto flusso di argon. Dopo 1h sono stati aggiunti ulteriori 23 mg di EDC·HCl (0.12 mmol, 1 eq) e 1.5 mg di DMAP (0.012 mmol, 0.1 eq). La miscela di reazione è poi stata agitata per 4h a temperatura ambiente. Successivamente il solvente è stato eliminato al rotavapor e il grezzo purificato mediante colonna cromatografica su silice, eluente DCM/EA 2:1. Dopo purificazione sono stati ottenuti 95 mg di PTX<sub>2</sub>S (0.051 mmol, resa 88%) sotto forma di solido bianco.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.19 – 8.13 (m, 4H), 7.74 (d, *J* = 7.7 Hz, 4H), 7.61 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.52 (t, *J* = 7.6 Hz, 4H), 7.49 – 7.41 (m, 4H), 7.43 – 7.29 (m, 12H), 7.24 (d, *J* = 9.4 Hz, 2H), 6.30 – 6.22 (m, 4H), 6.09 (dd, *J* = 9.5, 3.0 Hz, 2H), 5.68 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H), 5.53 (d, *J* = 3.1 Hz, 2H), 4.98 (dd, *J* = 9.5, 2.2 Hz, 2H), 4.43 (dd, *J* = 10.9, 6.7 Hz, 2H), 4.32 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 4.21 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 3.81 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.27 (d, *J* = 14.7 Hz, 2H), 3.16 (d, *J* = 14.7 Hz, 2H), 2.61 – 2.51 (m, 2H), 2.49 (s, 6H), 2.43 – 2.33 (m, 2H), 2.26 (s, 6H), 2.22 – 2.11 (m, 2H), 1.83 (s, 6H), 1.69 (s, 6H), 1.18 (m, 6H), 1.14 (s, 6H).

## 5.3. Preparazione di nanomicelle di PTX<sub>2</sub>S (PTX<sub>2</sub>S\_NMs)

Le nanomicelle di PTX<sub>2</sub>S sono state preparate mediante tecnica di nanoprecipitazione.

0.5 mg di PTX<sub>2</sub>S sciolti in 50 µL di DMSO (soluzione 10 mg/mL) sono stati iniettati lentamente in una vial contenente 0.8 mL di H<sub>2</sub>O milliQ, sotto vigorosa agitazione. Dopo 10' le nanomicelle sono state caratterizzate mediante tecnica di dynamic light scattering (DLS) previa diluizione del campione (400 µL di PTX<sub>2</sub>S\_NMs in 1,6 mL di H<sub>2</sub>O). La soluzione si conserva stabilmente a 4 °C.

#### **5.4. Preparazione di nanomicelle di PTX<sub>2</sub>S e PheoA (Pheo@PTX<sub>2</sub>S)**

Le nanomicelle Pheo@PTX<sub>2</sub>S sono state ottenute mediante tecnica di nanoprecipitazione.

0.15 mg di PheoA sciolti in 75 µL di DMSO (soluzione 2 mg/mL) vengono aggiunti ad una soluzione di 0.5 mg di PTX<sub>2</sub>S in 50 µL di DMSO (soluzione 10 mg/mL), e la miscela viene addizionata a 1.9 mL di H<sub>2</sub>O milliQ sotto agitazione.

Dopo 10' le nanomicelle sono state caratterizzate mediante DLS. La soluzione viene conservata al buio a 4 °C.

#### **5.5. Studi di stabilità di Pheo@PTX<sub>2</sub>S**

##### ***5.5.1. Stabilità di Pheo@PTX<sub>2</sub>S in H<sub>2</sub>O***

Le nanomicelle Pheo@PTX<sub>2</sub>S (0.25 mg/mL) sono state mantenute al buio a 4°C e caratterizzate mediante DLS dopo 1, 3, 7, 14, 29 giorni.

##### ***5.5.2. Stabilità di Pheo@PTX<sub>2</sub>S in condizioni fisiologiche***

Per valutare la stabilità delle nanomicelle in presenza delle proteine sieriche, vengono preparate due diverse formulazioni, poi analizzate a diversi intervalli di tempo mediante DLS:

- A) 0.8 mL di Pheo@PTX<sub>2</sub>S (0.25 mg/mL) vengono incubati a 37°C con 1.2 mL di una soluzione di HSA in PBS (60 mg/mL).
- B) 0.8 mL di Pheo@PTX<sub>2</sub>S (0.25 mg/mL) vengono incubati a 37°C con 0.4 mL di FBS e 0.8 mL di PBS a pH = 7.4.

### **5.5.3. Stabilità dopo ultrafiltrazione**

2.0 mL di Pheo@PTX<sub>2</sub>S (0.25 mg/mL) sono state concentrate per ultrafiltrazione mediante centrifugazione (5000 rpm per 3', filtri con MWCO da 100 kDa) fino a rimozione del 65-70% del volume di H<sub>2</sub>O milliQ. Dopo mantenimento al buio a 4°C, alla soluzione è stata aggiunta H<sub>2</sub>O milliQ fino a volume originale. Successivamente si è proceduto ad analisi DLS.

### **5.5.4. Stabilità dopo rimozione di DMSO tramite dialisi**

5 mL di Pheo@PTX<sub>2</sub>S (0.25 mg/mL) sono stati dializzati mediante membrana (MWCO 12-14 kDa) per rimuovere il DMSO. La stabilità nel tempo è stata valutata sia a 4°C che a 37°C.

### **5.5.5. Stabilità in ambiente riducente**

Le variazioni nella dimensione e polidispersità delle nanomicelle in ambiente riducente sono state valutate aggiungendo glutatione (GSH) alla soluzione di Pheo@PTX<sub>2</sub>S (0.25 mg/mL), in presenza e in assenza di HSA. Le prove sono state eseguite in duplicato.

- GSH 10 mM  
A 2.0 ml di Pheo@PTX<sub>2</sub>S (0.25 mg/mL) vengono aggiunti 6 mg di GSH.
- GSH 10 mM in presenza di HSA  
A 1.5 mL di Pheo@PTX<sub>2</sub>S (0.25 mg/mL) vengono addizionati 0.5 mL di HSA in H<sub>2</sub>O milliQ (60 mg/mL) e 6 mg di GSH.
- GSH 10 µM  
Il campione è stato preparato aggiungendo 6 µL di GSH in H<sub>2</sub>O (1 mg/mL) a 2.0 mL di Pheo@PTX<sub>2</sub>S (0.25 mg/mL).
- GSH 10 µM in presenza di HSA  
A 1.5 mL di Pheo@PTX<sub>2</sub>S (0.25 mg/mL) sono stati aggiunti 0.5 mL di HSA in H<sub>2</sub>O (60 mg/mL) e 6 µL di GSH in H<sub>2</sub>O milliQ (1 mg/mL).

Tutti i campioni sono stati incubati a 37°C al buio e caratterizzati alla DLS dopo 1.5 h e 24h. La verifica qualitativa del rilascio di PTX è stata effettuata mediante estrazione con DCM del precipitato e successiva TLC.

#### **5.5.6. Stabilità in ambiente ossidante**

Il comportamento delle micelle in ambiente ossidante è stato valutato aggiungendo una soluzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a Pheo@PTX<sub>2</sub>S al buio o con irraggiamento. I campioni sono stati mantenuti a 37 °C e caratterizzati mediante DLS.

- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 300 µM  
Il campione è stato preparato aggiungendo 0.5 mL di una soluzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in H<sub>2</sub>O milliQ 1mM a 1.2 mL di Pheo@PTX<sub>2</sub>S (0.25 mg/mL).
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500 µM  
A 1.2 mL di Pheo@PTX<sub>2</sub>S (0.25 mg/mL) sono stati addizionati 1.2 mL di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in H<sub>2</sub>O 1 mM.
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500 µM con irraggiamento  
A 1.2 mL di Pheo@PTX<sub>2</sub>S (0.25 mg/mL) sono stati aggiunti 1.2 mL di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in H<sub>2</sub>O 1 mM. Il campione è stato mantenuto al buio per 1h a 37 °C ed è stato sottoposto a irraggiamento con lampada bianca a distanza di 40 cm per 10', 20', 40', 50'.

Il rilascio di PTX è stato valutato qualitativamente mediante estrazione con DCM della soluzione contenente Pheo@PTX<sub>2</sub>S e TLC.

#### **5.6. Determinazione della produzione di ROS**

Per valutare la generazione di specie reattive all'ossigeno è stata preparata una soluzione di ROS Probe: 500 µL 2,7-diclorofluoresceinadiacetato (H<sub>2</sub>DCDFA) in metanolo (5.36 mg in 10 mL di metanolo) sono stati addizionati a 2 mL di NaOH 0.01 M. La soluzione è stata lasciata a riposo 30' al buio a temperatura ambiente e poi sono stati aggiunti 10 mL di tampone fosfato a pH = 7.4.

Per l'analisi UV sono stati preparati 2 campioni diversi:

- Pheo@PTX<sub>2</sub>S

Il campione è stato preparato miscelando 500 µL di tampone fosfato, 218 µL di ROS Probe, 127 µL di Pheo@PTX<sub>2</sub>S (0.25 mg/mL) e 155 µL di H<sub>2</sub>O milliQ.

- Pheo@PTX<sub>2</sub>S in presenza di HSA

A 0.5 mL di Pheo@PTX<sub>2</sub>S (0.25 mg/mL) sono stati aggiunti 135 µL di una soluzione di HSA in H<sub>2</sub>O milliQ (35 mg/mL), in modo da avere un rapporto molare dimero/HSA pari a circa 1:1. La soluzione è stata incubata a 37 °C per 1 h al buio. Per l'analisi 161 µL della soluzione sono stati aggiunti a 500 µL di tampone fosfato, 218 µL di ROS Probe e 121 µL di H<sub>2</sub>O.

Le 2 soluzioni sono state irraggiate per 1', 3', 5', 10', 20', 30' mediante lampada bianca a distanza di 40 cm ed è stato registrato lo spettro UV-Vis nell'intervallo 200-800 nm.

Per valutare l'effetto dei ROS sulle dimensioni delle nanomicelle mediante analisi DLS sono stati addizionati 0.5 mL di ROS Probe a 1.5 mL di Pheo@PTX<sub>2</sub>S (0.25 mg/mL) e sottoposti a irraggiamento con lampada bianca a distanza di 40 cm per 1', 3', 5', 10', 20', 30'.

## 5.7. Saggi *in vitro*

### 5.7.1. Internalizzazione cellulare delle nanomicelle

Per gli esperimenti le MSC sono state seminate in una piastra da 6 pozzetti (area 9,6 cm<sup>2</sup>) ad una densità di 2x10<sup>4</sup> cellule/cm<sup>2</sup> e lasciate aderire per tutta la notte. Il giorno seguente sono state incubate con 3 diverse dosi di nanomicelle, definite come:

**Low:** PTX<sub>2</sub>S 1 µg/mL e PheoA 0,3 µg/mL;

**Medium:** PTX<sub>2</sub>S 2.5 µg/mL e PheoA 0.75 µg/mL;

**High:** PTX<sub>2</sub>S 5 µg/mL e PheoA 1.5 µg/mL;

in terreno completo composto da α-MEM con l'aggiunta del 20% di siero.

Dopo rispettivamente 2h, 4h e 24h sono state acquisite delle immagini in *brightfield* per valutare il possibile cambiamento morfologico. Il terreno è stato eliminato, ed il monostrato cellulare è stato lavato con D-PBS; le cellule sono state quindi staccate dal fondo della piastra incubandole per 3 min a 37°C con Tryple Select. La

sospensione cellulare è stata raccolta in una Eppendorf, centrifugata per creare un pellet e risospesa in D-PBS. La fluorescenza della PheoA e la vitalità cellulare, mediante incubazione con Trypan Blue sono state analizzate mediante contatore di cellule Countess.

### **5.7.2. Valutazione dell'effetto citotossico sulle MSC**

Il giorno precedente l'esperimento, le MSC sono state seminate in una 96 *well plate* in terreno completo ( $\alpha$ -MEM arricchito con il 20% siero bovino) ad una densità pari a 5000 cellule/cm<sup>2</sup>. I farmaci PTX, PTX<sub>2</sub>S e Pheo@PTX<sub>2</sub>S sono stati testati sulle cellule precedentemente seminate in un range di concentrazione che va da 50 $\mu$ M a 5pM per 8 punti sperimentali e in quadruplicato per concentrazione. Come controllo sono state seminate cellule MSC e trattate o con terreno completo (Control) o con terreno addizionato con una concentrazione di DMSO pari alla dose più alta somministrata nei trattati (Sample Control) al fine di verificare che la dose massima di DMSO testato non fosse di per sé tossica per le cellule. Le soluzioni madri sono state risospese rispettivamente in DMSO (PTX e PTX<sub>2</sub>S) o in H<sub>2</sub>O (Pheo@PTX<sub>2</sub>S), per essere poi diluite in terreno completo e somministrate alle cellule in un volume di 100  $\mu$ L/well.

Le cellule sono state esposte ai farmaci per 24 ore, al termine delle quali è stato eliminato il terreno, sono stati effettuati due lavaggi in D-PBS sterile per eliminare eventuali residui, è stato aggiunto nuovo terreno e sono state mantenute a 37°C 5%CO<sub>2</sub> per 48 ore. Al termine è stato eseguito come saggio WST-1 come da protocollo fornito dal produttore. Brevemente è stata preparata una soluzione di WST-1 al 10% diluendo la madre in terreno completo, è stato eliminato il terreno dai pozzetti, aggiunti 100  $\mu$ L/well e incubati per 2 ore a 37°C 5%CO<sub>2</sub>. Al termine dell'incubazione, è stata effettuata una lettura in assorbanza ad una lunghezza d'onda di 450 nm con una correzione a 690 nm. Per determinare la curva di tossicità è stato utilizzato il software GraphPad Prism 6 (GraphPad; San Diego, CA, USA) nel quale sono stati inseriti i dati di differenza tra le due lunghezze d'onda (detta delta OD) sia dei campioni trattati che dei campioni controllo. I valori sono stati normalizzati per i campioni controllo e inseriti in un grafico xy riportante rispettivamente le concentrazioni di farmaco o di farmaco equivalente e la % di vitalità cellulare.

## Riferimenti bibliografici

- [1] T.R. Cox, J.L. Chitty, E.C. Filipe, M.C. Lucas, D. Herrmann, P. Timpson, Recent advances in understanding the complexities of metastasis, *F1000Research*. 7 (2018). doi:10.12688/f1000research.15064.1.
- [2] S. Ezrahi, A. Aserin, N. Garti, Basic principles of drug delivery systems – the case of paclitaxel, *Adv. Colloid Interface Sci.* 263 (2019) 95–130. doi:10.1016/j.cis.2018.11.004.
- [3] P. Ballone, A density functional study of a new family of anticancer drugs: paclitaxel, taxotere, epothilone, and discodermolide, *J. Phys. Chem. A.* 103 (1999) 3097–3102. doi:10.1021/jp983679q.
- [4] D.G.I. Kingston, A.G. Chaudhary, A.A.L. Gunatilaka, M.L. Middleton, Synthesis of taxol from baccatin III via an oxazoline intermediate, *Tetrahedron Lett.* 35 (1994) 4483–4484. doi:10.1016/S0040-4039(00)60706-2.
- [5] R.A. Holton, H.B. Kim, C. Somoza, F. Liang, R.J. Biediger, P.D. Boatman, M. Shindo, C.C. Smith, S. Kim, H. Nadizadeh, Y. Suzuki, C. Tao, P. Vu, S. Tang, P. Zhang, K.K. Murthi, L.N. Gentile, J.H. Liu, First total synthesis of taxol. 2. Completion of the C and D rings, *J. Am. Chem. Soc.* 116 (1994) 1599–1600. doi:10.1021/ja00083a067.
- [6] K.C. Nicolaou, Z. Yang, J.-J. Liu, P.G. Nantermet, C.F. Claiborne, J. Renaud, R.K. Guy, K. Shibayama, Total Synthesis of Taxol, *Nature*. 367 (1994) 630–634. doi:10.1038/367630a0.
- [7] S.L. Richeimer, D.M. Tinnermeier, D.W. Timmons, High-Performance Liquid Chromatographic Assay of Taxol, *Anal. Chem.* 64 (1992) 2323–2326. doi:10.1021/ac00044a004.
- [8] T.H. Wang, H.S. Wang, Y.K. Soong, Paclitaxel-induced cell death: Where the cell cycle and apoptosis come together, *Cancer*. 88 (2000) 2619–2628. doi:10.1002/1097-0142(20000601)88:11<2619::AID-CNCR26>3.0.CO;2-J.
- [9] W.- Fang, X.- Liang, Recent Progress in Structure Activity Relationship and Mechanistic Studies of Taxol Analogues, *Mini-Reviews Med. Chem.* 5 (2012) 1–12. doi:10.2174/1389557053402837.
- [10] I. Ojima, J.C. Slater, E. Michaud, S.D. Kuduk, P.Y. Bounaud, P. Vrignaud, M.C. Bissery, J.M. Veith, P. Pera, R.J. Bernacki, Syntheses and structure-activity

- relationships of the second-generation antitumor taxoids: Exceptional activity against drug-resistant cancer cells, *J. Med. Chem.* 39 (1996) 3889–3896. doi:10.1021/jm9604080.
- [11] I. Ojima, T. Wang, M.L. Miller, S. Lin, C.P. Borella, X. Geng, P. Pera, R.J. Bernacki, Synthesis and structure-activity relationships of new second-generation taxoids, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 9 (1999) 3423–3428. doi:10.1016/S0960-894X(99)00629-0.
- [12] H. Thomas, H.M. Coley, Overcoming multidrug resistance in cancer: An update on the clinical strategy of inhibiting P-glycoprotein, *Cancer Control.* 10 (2003) 159–165. doi:10.1177/107327480301000207.
- [13] A. Gruber, S. Vitols, S. Norgren, I. Arestrom, C. Peterson, M. Bjdrkholm, P. Reizenstein, H. Luthman, Quantitative determination of mdrl gene expression in leukaemic cells from patients with acute leukaemia, *Br. J. Cancer.* 66 (1992) 266–272. doi:10.1038/bjc.1992.255.
- [14] P. Giannakakou, D.L. Sackett, Y.K. Kang, Z. Zhan, J.T.M. Buters, T. Fojo, M.S. Poruchynsky, Paclitaxel-resistant human ovarian cancer cells have mutant  $\beta$ -tubulins that exhibit impaired paclitaxel-driven polymerization, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 17118–17125. doi:10.1074/jbc.272.27.17118.
- [15] J. Spratlin, M.B. Sawyer, Pharmacogenetics of paclitaxel metabolism, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 61 (2007) 222–229. doi:10.1016/j.critrevonc.2006.09.006.
- [16] M. Wright, B. Monsarrat, P. Alvinerie, Taxol Metabolism by Human Liver Microsomes: Identification of Cytochrome P450 Isozymes Involved in Its Biotransformation, *Cancer Res.* 54 (1994) 386–392.
- [17] A.K. Singla, A. Garg, D. Aggarwal, Paclitaxel and its formulations, *Int. J. Pharm.* 235 (2002) 179–192. doi:10.1016/S0378-5173(01)00986-3.
- [18] E. Gornstein, T.L. Schwarz, The paradox of paclitaxel neurotoxicity: Mechanisms and unanswered questions, *Neuropharmacology.* 76 (2014) 175–183. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.08.016.
- [19] H. Gelderblom, J. Verweij, K. Nooter, A. Sparreboom, Cremophor EL: The drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation, *Eur. J. Cancer.* 37 (2001) 1590–1598. doi:10.1016/S0959-8049(01)00171-X.
- [20] A. Sparreboom, L. Van Zuylen, E. Brouwer, W.J. Loos, P. De Bruijn, H. Gelderblom, M. Pillay, K. Nooter, G. Stoter, J. Verweij, Cremophor EL-

- mediated alteration of paclitaxel distribution in human blood: Clinical pharmacokinetic implications, *Cancer Res.* 59 (1999) 1454–1457.
- [21] M.E. Davis, Z. Chen, D.M. Shin, Nanoparticle therapeutics: An emerging treatment modality for cancer, in: *Nanosci. Technol. A Collect. Rev. from Nat. Journals*, World Scientific Publishing Co., 2009: pp. 239–250. doi:10.1142/9789814287005\_0025.
- [22] F. Wang, M. Porter, A. Konstantopoulos, P. Zhang, H. Cui, Preclinical development of drug delivery systems for paclitaxel-based cancer chemotherapy, *J. Control. Release.* 267 (2017) 100–118. doi:10.1016/j.jconrel.2017.09.026.
- [23] P. Ma, R.J. Mumper, Paclitaxel nano-delivery systems: A comprehensive review, *J. Nanomedicine Nanotechnol.* 4 (2013) 6. doi:10.4172/2157-7439.1000164.
- [24] A. Akbarzadeh, R. Rezaei-Sadabady, S. Davaran, S.W. Joo, N. Zarghami, Y. Hanifehpour, M. Samiei, M. Kouhi, K. Nejati-Koshki, Liposome: Classification, preparation, and applications, *Nanoscale Res. Lett.* 8 (2013) 1–8. doi:10.1186/1556-276X-8-102.
- [25] T. Yang, F. De Cui, M.K. Choi, J.W. Cho, S.J. Chung, C.K. Shim, D.D. Kim, Enhanced solubility and stability of PEGylated liposomal paclitaxel: In vitro and in vivo evaluation, *Int. J. Pharm.* 338 (2007) 317–326. doi:10.1016/j.ijpharm.2007.02.011.
- [26] H.H. Wu, Y. Zhou, Y. Tabata, J.Q. Gao, Mesenchymal stem cell-based drug delivery strategy: from cells to biomimetic, *J. Control. Release.* 294 (2019) 102–113. doi:10.1016/j.jconrel.2018.12.019.
- [27] T.E.G. Krueger, D.L.J. Thorek, S.R. Denmeade, J.T. Isaacs, W.N. Brennen, Concise Review: Mesenchymal Stem Cell-Based Drug Delivery: The Good, the Bad, the Ugly, and the Promise, *Stem Cells Transl. Med.* 7 (2018) 651–663. doi:10.1002/sctm.18-0024.
- [28] B. Crivelli, T. Chlapanidas, S. Perteghella, E. Lucarelli, L. Pascucci, A.T. Brini, I. Ferrero, M. Marazzi, A. Pessina, M.L. Torre, Mesenchymal stem/stromal cell extracellular vesicles: From active principle to next generation drug delivery system, *J. Control. Release.* 262 (2017) 104–117. doi:10.1016/j.jconrel.2017.07.023.
- [29] L. Pascucci, V. Coccè, A. Bonomi, D. Ami, P. Ceccarelli, E. Ciusani, L. Viganò,

- A. Locatelli, F. Sisto, S.M. Doglia, E. Parati, M.E. Bernardo, M. Muraca, G. Alessandri, G. Bondiolotti, A. Pessina, Paclitaxel is incorporated by mesenchymal stromal cells and released in exosomes that inhibit in vitro tumor growth: A new approach for drug delivery, *J. Control. Release.* 192 (2014) 262–270. doi:10.1016/j.jconrel.2014.07.042.
- [30] C. Luo, J. Sun, D. Liu, B. Sun, L. Miao, S. Musetti, J. Li, X. Han, Y. Du, L. Li, L. Huang, Z. He, Self-Assembled Redox Dual-Responsive Prodrug-Nanosystem Formed by Single Thioether-Bridged Paclitaxel-Fatty Acid Conjugate for Cancer Chemotherapy, *Nano Lett.* 16 (2016) 5401–5408. doi:10.1021/acs.nanolett.6b01632.
- [31] F.Y.F. Lee, A. Vessey, E. Rofstad, D.W. Siemann, R.M. Sutherland, Heterogeneity of Glutathione Content in Human Ovarian Cancer, *Cancer Res.* 49 (1989) 5244–5248.
- [32] Q. Pei, X. Hu, J. Zhou, S. Liu, Z. Xie, Glutathione-responsive paclitaxel dimer nanovesicles with high drug content, *Biomater. Sci.* 5 (2017) 1517–1521. doi:10.1039/c7bm00052a.
- [33] K. Plaetzer, B. Krammer, J. Berlanda, F. Berr, T. Kiesslich, Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: Fundamental aspects, *Lasers Med. Sci.* 24 (2009) 259–268. doi:10.1007/s10103-008-0539-1.
- [34] M.A. Calin, S. V Parasca, Photodynamic therapy in oncology, in: *J. Optoelectron. Adv. Mater.*, 2006: pp. 1173–1179. doi:10.1517/14656566.2.6.917.
- [35] C. Tanielian, M. Kobayashi, C. Wolff, Mechanism of photodynamic activity of pheophorbides, *J. Biomed. Opt.* 6 (2001) 252. doi:10.1117/1.1352750.
- [36] V.H. Nguyen, B.J. Lee, Protein corona: A new approach for nanomedicine design, *Int. J. Nanomedicine.* 12 (2017) 3137–3151. doi:10.2147/IJN.S129300.
- [37] E. Casals, T. Pfaller, A. Duschl, G.J. Oostingh, V. Puntès, Time evolution of the nanoparticle protein corona, *ACS Nano.* 4 (2010) 3623–3632. doi:10.1021/nn901372t.
- [38] I. Lynch, K.A. Dawson, *Protein-nanoparticle interactions*, 2008.
- [39] X. Chen, Z. Zhong, Z. Xu, L. Chen, Y. Wang, 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy, *Free Radic. Res.* 44 (2010) 587–604. doi:10.3109/10715761003709802.

- [40] E.L.L. Yeo, J.U.J. Cheah, B.Y. Lim, P.S.P. Thong, K.C. Soo, J.C.Y. Kah, Protein Corona around Gold Nanorods as a Drug Carrier for Multimodal Cancer Therapy, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 3 (2017) 1039–1050. doi:10.1021/acsbiomaterials.7b00231.
- [41] M. Pierini, C. Di Bella, B. Dozza, T. Frisoni, E. Martella, C. Bellotti, D. Remondini, E. Lucarelli, S. Giannini, D. Donati, The Posterior Iliac Crest Outperforms the Anterior Iliac Crest When Obtaining Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, *JBJS.* 95 (2013). [https://journals.lww.com/jbjsjournal/Fulltext/2013/06190/The\\_Posterior\\_Iliac\\_Crest\\_Outperforms\\_the\\_Anterior.8.aspx](https://journals.lww.com/jbjsjournal/Fulltext/2013/06190/The_Posterior_Iliac_Crest_Outperforms_the_Anterior.8.aspx).