

**Alma Mater Studiorum - Università di Bologna**

---

**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

**Progettazione, Sintesi e Caratterizzazione di  
nanoparticelle a base di HSA-MnO<sub>2</sub> per la  
terapia multimodale del cancro**

Tesi di laurea sperimentale

**CANDIDATO**

Giacomo Corelli

**RELATORE**

**Prof.ssa** Mariafrancesca Fochi

**CORRELATORE**

**Dott.ssa** Claudia Ferroni

**Dott.ssa** Greta Varchi

---

**Anno Accademico 2019-2020**

---



*Al nonno Efrem*



# ABSTRACT

## Italiano

Una strategia promettente per potenziare l'efficacia di un trattamento antitumorale limitandone gli effetti collaterali sistemici e i fenomeni di resistenza, è quella di combinare, all'interno di un nanoveicolo, l'azione sinergica/additiva di diversi trattamenti terapeutici, come ad esempio la terapia fotodinamica (PDT) e l'immunoterapia. In questo lavoro di tesi sono state preparate nanoparticelle multimodali altamente biodegradabili e biocompatibili, a base di albumina umana (HSA) caricate con un pro-farmaco del paclitaxel (PTX), un agente chemioterapeutico approvato per il trattamento di diversi tumori solidi; una molecola fotosensibile, IR780, che illuminata a una specifica lunghezza d'onda, induce la formazione di specie radicaliche dell'ossigeno (ROS) e ossigeno di singoletto ( $^1\text{O}_2$ ), in grado di uccidere le cellule malate; ed infine con Indoximod (IND), in grado di inibire un checkpoint immunitario, con azione indiretta sull'enzima indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO-1). Le nanoparticelle sono poi state rivestite con un guscio di  $\text{MnO}_2$ , per limitare l'ipossia caratteristica dell'ambiente tumorale, potenziando così l'azione citotossica. Le nanoparticelle ottenute sono state caratterizzate in termini di dimensioni, capacità di loading, stabilità in acqua e in ambiente fisiologico. Inoltre, mediante spettroscopia UV-vis, è stata studiata la capacità dell'IR780 di produrre specie reattive all'ossigeno (ROS). In futuro, saranno studiati i fenomeni di rilascio dei diversi agenti dalle nanoparticelle e sarà verificato se la presenza dell'ossido di manganese sia in grado di migliorare l'ossigenazione del microambiente tumorale.

## English

The combination of different yet synergic drugs or treatment modalities, such as chemotherapy, immunotherapy and photodynamic therapy, within a single nano-vehicle represents a promising strategy that is increasingly applied for improving cancer therapy outcome, while limiting side effects and resistance phenomena.

To address this issue, in this work we propose the preparation and characterization of biocompatible and biodegradable human serum albumin multimodal nanoparticles. In particular, nanoparticles were loaded with: i) a prodrug of paclitaxel (PTX), a well-established chemotherapy agent approved for the treatment of different type of cancers; ii) IR780, a photosensitizer that upon irradiation with light at a specific wavelength, induces the formation reactive oxygen species (ROS) and singlet oxygen ( $^1\text{O}_2$ ), capable of killing diseased cells; and iii) Indoximod ((IND), a checkpoint inhibitor acting indirectly on the indoleamine 2,3-

dioxygenase pathway (IDO). Tumor hypoxia is a well-established phenomenon that largely reduces anticancer treatment efficacy. In order to decrease degree of tumour microenvironment hypoxia, our tri-loaded HSA nanoparticles were additionally coated with MnO<sub>2</sub>. Nanoparticles size, morphology, drugs loading content, ROS production, stability in water and physiological conditions were investigated in detail.

In the future, we aim to assess the release kinetics of the drugs from the nanoparticles as well as to determine whether the manganese oxide increases tumour microenvironment oxygenation. Additionally, *in vitro* studies on a selected panel of cancer cell lines will provide the proof-of-concept on the ability of our system to synergically kill tumour cells.

# INDICE

<b>1. ACRONIMI</b> .....	<b>1</b>
<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	<b>3</b>
1.1. IMMUNOTERAPIA NEL TRATTAMENTO DEI TUMORI .....	3
1.1.1. Sistema immunitario.....	4
1.1.2. Processo infiammatorio .....	5
1.1.3. Tipi di immunoterapia.....	6
1.1.4. IDO-1 .....	8
1.1.4.1. IDO Inibitori .....	10
1.1.5. Morte cellulare immunogenica .....	12
1.1.5.1 Induttori di morte cellulare immunogenica .....	13
1.2. CHEMIOTERAPIA E PACLITAXEL .....	14
1.2.1. Meccanismo d'azione e SAR del Paclitaxel.....	15
1.2.2. Meccanismi di resistenza, metabolismo e effetti collaterali del PTX .....	17
1.2.3. Profarmaci e dimero .....	17
1.3. TERAPIA FOTODINAMICA.....	18
1.3.1. Limiti della Terapia Fotodinamica .....	20
1.3.2. IR780.....	22
1.4. NANOMEDICINA E DRUG DELIVERY .....	23
1.4.1. Albumina .....	24
<b>2. SCOPO DELLA LAVORO</b> .....	<b>26</b>
<b>3. RISULTATI E DISCUSSIONE</b> .....	<b>27</b>
3.1. SINTESI DI PTX <sub>2</sub> S .....	27
3.2. NANOPARTICELLE A BASE DI HSA.CON PTX <sub>2</sub> S COME AGENTE STABILIZZANTE .....	28
3.3. STABILITÀ NEL TEMPO DELLE NANOPARTICELLE .....	32
3.3.1. Stabilità nel tempo delle nanoparticelle Ind_PT <sub>X</sub> <sub>2</sub> S@HSA.....	32
3.3.2. Stabilità nel tempo delle nanoparticelle Ind_PT <sub>X</sub> <sub>2</sub> S@HSA-MnO <sub>2</sub> .....	34
3.4. SVILUPPO DI SPECIE REATTIVE ALL'OSSIGENO (ROS).....	35
3.4.1. Sviluppo di ROS da IR780_vitE@HSA .....	35
3.4.2. Sviluppo di ROS da IR780_vitE@HSA@MnO <sub>2</sub> .....	36
3.4.3. Sviluppo di ROS da Ind_IR780_PT <sub>X</sub> <sub>2</sub> S@HSA-MnO <sub>2</sub> .....	37

<b>4. CONCLUSIONI .....</b>	<b>38</b>
<b>5. PARTE SPERIMENTALE .....</b>	<b>39</b>
5.1. SINTESI DI PTX <sub>2</sub> S .....	39
5.2. SINTESI HSA-MnO <sub>2</sub> .....	39
5.3. PREPARAZIONE NANOPARTICELLE .....	39
5.3.1. Preparazione NPs di HSA con vitamina E e IR780 (IR780_vitE@HSA) .....	39
5.3.2. Deposizione di MnO <sub>2</sub> su IR780_vitE@HSA (IR780_vitE@HSA@MnO <sub>2</sub> ).....	40
5.3.3. Preparazione NPs di HSA con vitamina E e indoximod (Ind_vitE@HSA).....	40
5.3.4. Preparazione NPs di HSA con vitamina E, indoximod e IR780 (Ind_IR780_vitE@HSA).....	40
5.3.5. Deposizione di MnO <sub>2</sub> su Ind_IR780_vitE@HSA (Ind_IR780_vitE@HSA@MnO <sub>2</sub> ) .....	40
5.3.6. Preparazione NPs di HSA con PTX <sub>2</sub> S e indoximod (Ind_PTX <sub>2</sub> S@HSA).....	41
5.3.7. Preparazione NPs di HSA con PTX <sub>2</sub> S, indoximod e IR780 (Ind_IR780_PTX <sub>2</sub> S@HSA).....	41
5.3.8. Deposizione di MnO <sub>2</sub> su Ind_IR780_PTX <sub>2</sub> S@HSA (Ind_IR780_PTX <sub>2</sub> S@HSA@MnO <sub>2</sub> ) .....	41
5.3.9. Preparazione NPs di HSA-MnO <sub>2</sub> con PTX <sub>2</sub> S e indoximod (Ind_PTX <sub>2</sub> S@HSA-MnO <sub>2</sub> ).....	41
5.3.10. Preparazione NPs di HSA-MnO <sub>2</sub> con PTX <sub>2</sub> S, indoximod e IR780 (Ind_IR780_PTX <sub>2</sub> S@HSA-MnO <sub>2</sub> ).....	42
5.4. PROVE DI STABILITÀ DELLE NPs.....	42
5.4.1. Prove di stabilità di Ind_PTX <sub>2</sub> S@HSA .....	42
5.4.2. Prove di stabilità di Ind_PTX <sub>2</sub> S@HSA-MnO <sub>2</sub> .....	42
5.5. DETERMINAZIONE DELLA PRODUZIONE DI ROS.....	43
5.5.1. Produzione ROS da IR780_vitE@HSA.....	43
5.5.2. Produzione ROS da IR780_vitE@HSA@MnO <sub>2</sub> .....	43
5.5.3. Produzione ROS da Ind_IR780_PTX <sub>2</sub> S@HSA-MnO <sub>2</sub> .....	43
<b>6. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI.....</b>	<b>44</b>





# ACRONIMI

APC: Antigen presenting cell  
ARNT: AhR nuclear translocator  
ATP: Adenosine triphosphate  
CTLA-4: Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4  
DAMP: Damage associated molecular pattern  
DC: Dendritic cell  
DDS: drug delivery system  
EPR: Enhanced Permeability and Retention  
ER: Endoplasmic Reticulum  
FBS: Fetal Serum Bovine  
FDA: Food and Drug Administration  
GCN-2: General control non-derepressible-2  
GSH: Glutathione  
HMGB-1: High-mobility group box-1  
HSA: Human Serum Albumin  
Hsp: Heat shock protein  
ICD: Immunogenic cell death  
IDO: Indoleamine 2,3 dioxygenase  
IL: Interleukin  
INF: Interferon  
MDR-1: Multidrug resistance protein-1  
MDSC: Myeloid-derived suppressor cell  
MHC: Major histocompatibility complex  
MRI: Magnetic resonance imaging  
mTOTC-1: Mammalian target of rapamycin complex-1  
NK: Natural killer  
OATPs: Organic anion-transporting polypeptides  
ORR: Objective response rate  
PD1: Programmed cell death protein 1  
PD-L: Programmed dead ligand  
PDT: Photodynamic therapy  
PS: Photosensitizer

ROS: Reactive oxygen species  
SAR: Structure-activity relationship  
SDT: Sonodynamic therapy  
SPARC: Secreted protein acidic and rich in cysteine  
T CAR: Chimeric antigen receptor T  
TAATs: Tumor associated antigens  
TCR: T cell receptor  
TDO: Tryptophan 2,3 dioxygenase  
TEM: Transmission electron microscope  
TGF: Transforming growth factor  
TIL: Tumor infiltrating lymphocytes  
TLR: Toll-like receptor  
TME: Tumor microenvironment  
VEGF: Vascular endothelial growth factor

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 Immunoterapia nel trattamento dei tumori

L'immunoterapia è una strategia innovativa che consiste nella soppressione o stimolazione della risposta immunitaria dell'organismo ospite al fine di trattare e curare diverse patologie. L'immunoterapia di soppressione è in grado di deprimere il sistema immunitario per prevenire e limitare fenomeni legati ad ipersensibilizzazione da allergie, al rigetto da trapianti d'organo e all'insorgenza di malattie autoimmuni, mentre l'immunoterapia di attivazione, potenzia i meccanismi di difesa e trova ampia applicazione nel trattamento dei tumori, nell'eradicazione di infezioni batteriche e nello sviluppo di vaccini.<sup>1</sup> In particolare, la capacità da parte del sistema immunitario di riconoscere specifiche proteine esposte sulla membrana delle cellule tumorali come agenti estranei e di attivare i meccanismi di difesa propri dell'organismo ospite ha focalizzato l'attenzione della comunità scientifica e ha portato allo sviluppo dell'**immunoterapia oncologica**.<sup>2,3</sup>

Nel 1863, Rudolf Virchow dimostrò per primo la presenza di un infiltrato leucocitario nel tessuto tumorale e ipotizzò l'esistenza di una stretta correlazione tra infiammazione e cancro. Verso la fine del XIX secolo, il caso di un uomo affetto da sarcoma, suscitò l'interesse del Dr. William Coley, oggi considerato il padre fondatore dell'immunoterapia.<sup>4</sup> In seguito ad un intervento chirurgico per rimuovere la massa tumorale, il paziente sviluppò un'infezione da *Streptococcus pyogenes*, che inaspettatamente portò alla remissione completa del tumore. Coley ipotizzò che la risposta dell'organismo all'infezione batterica avesse apportato dei benefici anche nel trattamento del cancro e iniziò ad inoculare miscele di batteri, "tossine di Coley", per trattare diversi tipi di tumori maligni, tra cui il sarcoma, il linfoma e il carcinoma testicolare. Tuttavia, a causa della scarsa riproducibilità dei risultati ottenuti e del contemporaneo e più promettente sviluppo di radioterapia e chemioterapia, quest'approccio venne accantonato. All'inizio degli anni novanta, la Food and Drug Administration (FDA) approvò l'uso del vaccino BCG, sviluppato per prevenire la tubercolosi, per il trattamento del carcinoma vescicale superficiale, e di interleuchina 2 (IL-2) prima per il trattamento del carcinoma renale metastatico e poi per il melanoma metastatico.<sup>5</sup> Attualmente, sono sempre più numerosi i trattamenti immunoterapici (citochine, anticorpi monoclonali, inibitori del checkpoint immunitario, vaccini e trasferimento cellulare adottivo) clinicamente approvati o in corso di sperimentazione.<sup>4,6</sup>

### 1.1.1 Sistema Immunitario

Il sistema immunitario rappresenta il principale meccanismo di difesa da parte dell'organismo, in grado di intervenire contrastando l'azione di agenti patogeni, come funghi o batteri, e rimuovendo cellule danneggiate o cellule tumorali. Esistono due tipi di risposta immunitaria: l'immunità innata e l'immunità adattativa.<sup>7</sup>

**Immunità innata:** comprende sia barriere fisico-chimiche (epidermide, membrane mucose e secrezioni come saliva e sudore), che cellule e proteine che fungono da mediatori della risposta infiammatoria:<sup>8</sup>

- *Granulociti*, caratterizzati dalla presenza di granulazioni specifiche (eosinofile, basofile e neutrofile), che migrano dai vasi sanguigni ai tessuti, fagocitando gli agenti esterni.
- *Mastociti*, che aumentano la permeabilità vascolare tramite rilascio di istamina, permettendo un maggior afflusso di cellule immunitarie, e mediano le reazioni allergiche e di ipersensibilità.<sup>9</sup>
- *Cellule NK*, che sono specializzate nel riconoscere e nell'indurre l'apoptosi di cellule tumorali o infettate da virus. Inoltre, sono coinvolte nei processi autoimmuni e nei fenomeni di rigetto in seguito a trapianto.<sup>10</sup>
- *Cellule presentanti l'antigene (APC)*, sono cellule che, fagocitando i patogeni, legano l'antigene al complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) esponendolo sulla membrana e rendendolo riconoscibile dai recettori dei linfociti T. Le principali cellule che svolgono questa funzione sono: (i) le *cellule dendritiche* (DC), caratterizzate da una particolare forma ramificata, che nascono dalle cellule staminali del midollo osseo e, una volta legato l'antigene, si differenziano all'interno dei linfonodi e della milza; (ii) i *macrofagi*, che maturano all'interno di diversi organi, fegato e polmoni, e secernono citochine, che richiamano cellule citotossiche, enzimi e altri fattori di crescita; (iii) i *linfociti B*, pur ricoprendo un ruolo cruciale nell'immunità adattativa, possono essere considerati delle APC.<sup>11</sup>

**Immunità adattativa:** A differenza di quella innata, l'immunità adattativa deve essere attivata ed impiega quindi più tempo per agire rispetto alla prima, ma la sua risposta risulta più mirata ed efficace. L'immunità adattativa si divide in umorale e cellulo-mediata.<sup>12</sup> L'immunità umorale è mediata dai linfociti B, i quali nascono e maturano nel midollo osseo, e presentano dei domini costanti con funzione strutturale e dei domini variabili deputati al riconoscimento specifico di un antigene da parte di un anticorpo. Una volta maturati, i linfociti B si differenziano in plasmacellule, che producono anticorpi, e in cellule della memoria, che

permettono all'organismo di attivare una risposta immunitaria molto rapida, in caso di una nuova esposizione allo stesso antigene.<sup>13</sup> Le cellule che costituiscono l'immunità cellulo-mediata sono invece i linfociti T, prodotti nel midollo osseo, maturano nel timo e riconoscono, mediante il recettore TCR, il complesso peptide/MHC esposto sulla superficie delle cellule APC.<sup>14</sup> Una volta attivati, i linfociti T proliferano e si differenziano in:

- Linfociti CD8<sup>+</sup> citotossici: caratterizzati dalla presenza della proteina di superficie CD8, ed eliminano le cellule patogene tramite apoptosi.<sup>15</sup>
- Linfociti CD4<sup>+</sup>: caratterizzati dalla presenza, sulla loro membrana, della proteina di superficie CD4, si dividono in:
  - T reg, sono linfociti che inibiscono la proliferazione di cellule T citotossiche, in modo da evitare risposte eccessive da parte del sistema immunitario e preservando l'organismo da malattie autoimmuni.
  - T helper, sono linfociti che contribuiscono alla risposta immunitaria, promuovendo la crescita e la proliferazione delle cellule T citotossiche (TH1, TH2, TH17).<sup>16</sup>

### 1.1.2 Processo Infiammatorio

L'infiammazione è un meccanismo di difesa, prevalentemente locale, che avviene in risposta a un danno tissutale e favorisce l'intervento del sistema immunitario. Essa si distingue in acuta o cronica, in base alla durata del processo, agli agenti patogeni e ai mediatori coinvolti.<sup>17</sup> I fenomeni clinici dell'infiammazione sono *calor*, dilatazione dei vasi sanguigni periferici, seguita da *rubor*, aumento del flusso, *tumor*, gonfiore e tumefazione della parte infiammata, con *dolor*, stimolazione dei recettori del dolore e menomazione della funzionalità (*functio laesa*).

L'**infiammazione acuta** si risolve in poche ore o giorni. Nella fase iniziale si verifica un aumento dell'apporto di sangue e della permeabilità vascolare, in seguito, i leucociti, reclutati nella zona della lesione, rilasciano i mediatori chimici dell'infiammazione: (i) le citochine, proteine di segnalazione (pro-infiammatorie, IL-1 o IFN- $\gamma$ , oppure anti-infiammatorie, come IL-4 e TGF $\beta$ ); (ii) la trombina, enzima responsabile della conversione del fibrogeno in fibrina e dell'attivazione del processo di coagulazione del sangue; (iii) gli eicosanoidi, mediatori infiammatori lipidici derivati dell'acido arachidonico (prostaglandine e leucotrieni) e il fattore attivante piastrine. Il processo infiammatorio può terminare con (i) necrosi, quando gli enzimi lisosomiali danneggiano anche i tessuti; (ii) cronicizzazione, quando non viene eliminata

completamente la causa alla base del processo infiammatorio; (iii) guarigione, quando la parte liquida dell'essudato viene riassorbita e i leucociti vanno incontro a morte cellulare programmata.<sup>18</sup>

L' **infiammazione cronica** è un processo di lunga durata che può innescarsi in seguito all'esposizione a microrganismi a bassa virulenza, a sostanze esogene dannose, o per incompleta eliminazione dell'agente patogeno nel processo infiammatorio acuto. L'infiammazione cronica è caratterizzata dal continuo reclutamento di leucociti e di fibroblasti e può essere distinta in interstiziale, se diffusa in tutto l'organismo, o granulomatosa, se circoscritta.<sup>19</sup>

### **1.1.3 Tipi di immunoterapia**

Nel 1957 Frank Macfarlane Burnet e Lewis Thomas postulano la teoria della "immunosorveglianza" secondo la quale il sistema immunitario è in grado di riconoscere ed eliminare le cellule in trasformazione e di eradicare, eventualmente, i tumori. L'immunosorveglianza si articola in tre fasi: Elimination (eliminazione), Equilibrium (equilibrio), Escape (fuga). Nella fase di eliminazione le cellule tumorali, che si riproducono in maniera incontrollata, sono identificate e distrutte efficacemente dal sistema immunitario. A questa fase segue una condizione di equilibrio in cui l'organismo non è in grado di eliminare completamente tutte le cellule tumorali, ma conserva il controllo sulla crescita della massa tumorale. Infine, nell'ultima fase, la fuga, il tumore prende il sopravvento ed elude le risposte immunitarie, creando un microambiente infiammatorio favorevole alla proliferazione e alla diffusione.<sup>20</sup>

L'obiettivo dell'immunoterapia oncologica è quello di riconoscere antigeni tumore-associati (TAATs) e di mediare una risposta immunitaria in grado di eliminare le cellule neoplastiche, bloccando i meccanismi di immunosoppressione attivati dal tumore. Poiché l'approccio immunoterapico non attacca direttamente le cellule tumorali, ma agisce sui meccanismi e sulle dinamiche difensive dell'organismo ospite, esso richiede in genere tempistiche più lunghe rispetto ai trattamenti convenzionali per ottenere i primi benefici. Infatti, nel 15% dei casi, si può verificare una pseudo-progressione del tumore, seguita dalla riduzione. Inoltre, grazie alla memoria immunologica dell'organismo, che è in grado di ricordare gli antigeni che hanno indotto la risposta immunitaria, l'effetto di tale terapia può perdurare anche dopo la sospensione del trattamento. Al contrario, i trattamenti oncologici classici provocano mediamente risposte meno durature, in quanto possono indurre la formazione di cellule tumorali intrinsecamente

resistenti al farmaco. Inoltre, gli effetti collaterali derivati da trattamento immunoterapico risultano essere più contenuti, e correlati a reazioni infiammatorie, es. rash cutaneo, colite, polmonite interstiziale, epatite, ipotiroidismo, ipertiroidismo, diabete e disfunzione renale.<sup>21</sup>

L'immunoncologia comprende diversi approcci terapeutici:

- 1) Anticorpi monoclonali: si tratta di sostanze proteiche altamente specifiche, ottenute in laboratorio dai linfociti B. In seguito al legame con antigeni espressi dalle cellule tumorali, l'anticorpo esplica la sua azione citotossica portando direttamente la cellula all'apoptosi o al riconoscimento da parte del sistema immunitario che la elimina. Inoltre, possono agire bloccando i fattori di crescita tumorali. Ad esempio, il bevacizumab ostacola l'angiogenesi inibendo il fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF).<sup>22</sup>
- 2) Vaccini: lo scopo di questo trattamento è addestrare il sistema immunitario a riconoscere gli antigeni delle cellule tumorali ed eliminarle (v. a cellule intere, v. ad antigene, v. a cellule dendritiche).<sup>23,24</sup> Sipuleucel-T, un vaccino a DC, è stato approvato nel 2010 da FDA per il trattamento del carcinoma prostatico.<sup>25</sup>
- 3) Modulatori del sistema immunitario: si tratta di agenti terapeutici che modificano la risposta immunitaria, inibendola o incrementandola. Imiquimod (Aldara®), utilizzato nel trattamento dei tumori della cute, si lega al recettore TLR7, presente sulle cellule immunitarie, stimolando la produzione di linfociti TH1 e citochine, INF- $\alpha$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ .<sup>26</sup>
- 4) Terapia di trasferimento delle cellule T: le cellule T prelevate dal paziente proliferano in laboratorio e in seguito vengono reinfuse. Si distinguono:
  - terapia con linfociti infiltranti tumore (TIL), ovvero dei linfociti prelevati dal paziente che sono in grado di riconoscere il tumore e attaccarlo.<sup>27</sup>
  - terapia con cellule T CAR (Chimeric Antigen Receptor-T), recettori chimerici delle cellule T, in questo caso i linfociti T prelevati vengono modificati geneticamente per produrre la proteina CAR, in modo da potenziare la loro capacità di riconoscere e attaccare le cellule tumorali.<sup>28</sup>
- 5) Inibitori del checkpoint immunitario: il sistema immunitario, in condizioni normali, regola la durata e l'intensità della sua risposta tramite precisi segnali di stop, chiamati checkpoint immunologici. Questi segnali si attivano quando i recettori dei linfociti T, CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte Antigen 4) e PD1 (Programmed cell death protein 1), interagiscono con i rispettivi ligandi.

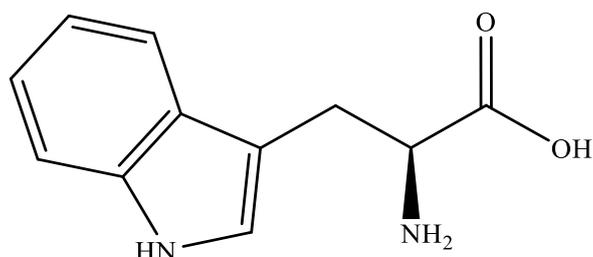
CTLA-4 è un regolatore negativo che blocca la funzione dei linfociti T mediante l'interazione col ligando B7 espresso sulle APC. Ipilimumab, un anticorpo

monoclonale, rappresenta il primo inibitore del recettore CTLA-4, approvato da FDA nel 2011 per il trattamento del melanoma avanzato, del carcinoma renale e del tumore polmonare. Questo farmaco infatti, somministrato per via endovenosa, si lega alla proteina CTLA-4 e inibisce la sua attività, permettendo così ai linfociti T di proliferare.<sup>29</sup> Il recettore PD1, presente sia sui linfociti T, che sui linfociti B e sulle cellule NK, interagisce con i ligandi PD-L1 e PD-L2 (Programmed Dead Ligand-1,2), espressi dalle cellule tumorali, bloccando la risposta immunitaria. I farmaci inibitori si legano a PD-1 o ai ligandi PD-L1 e PD-L2, impedendo l'attivazione del segnale.<sup>30</sup> Nivolumab e Pembrolizumab sono anticorpi monoclonali che bloccano la proteina PD-1 e sono impiegati nel trattamento del melanoma e del tumore polmonare non a piccole cellule.<sup>21</sup> I principali limiti di questa terapia derivano dalla resistenza innata o acquisita della massa tumorale, nei confronti del trattamento. L'obiettivo principale degli studi sugli inibitori del checkpoint immunitario è proprio quello di trovare terapie combinate per superare questa resistenza.<sup>31</sup>

La soppressione della risposta immunitaria può avvenire anche ad opera di Indoleammina-2,3-diossigenasi-1 (IDO-1). A differenza dei checkpoint immunologici trattati in precedenza, IDO-1 non si lega alle cellule immunitarie, ma consuma i nutrienti essenziali, in particolare il triptofano, alla proliferazione dei linfociti T. Gli inibitori di questo enzima agiscono o bloccando la sua attività o andando a sopperire alla mancanza di triptofano.

#### 1.1.4 IDO-1

IDO-1 è un enzima intracellulare, appartenente alla classe delle metalloproteine, contenente il gruppo eme, che catalizza lo stadio lento del metabolismo del triptofano (Trp) in chinurenina (Kyn) e nei suoi metaboliti secondari.

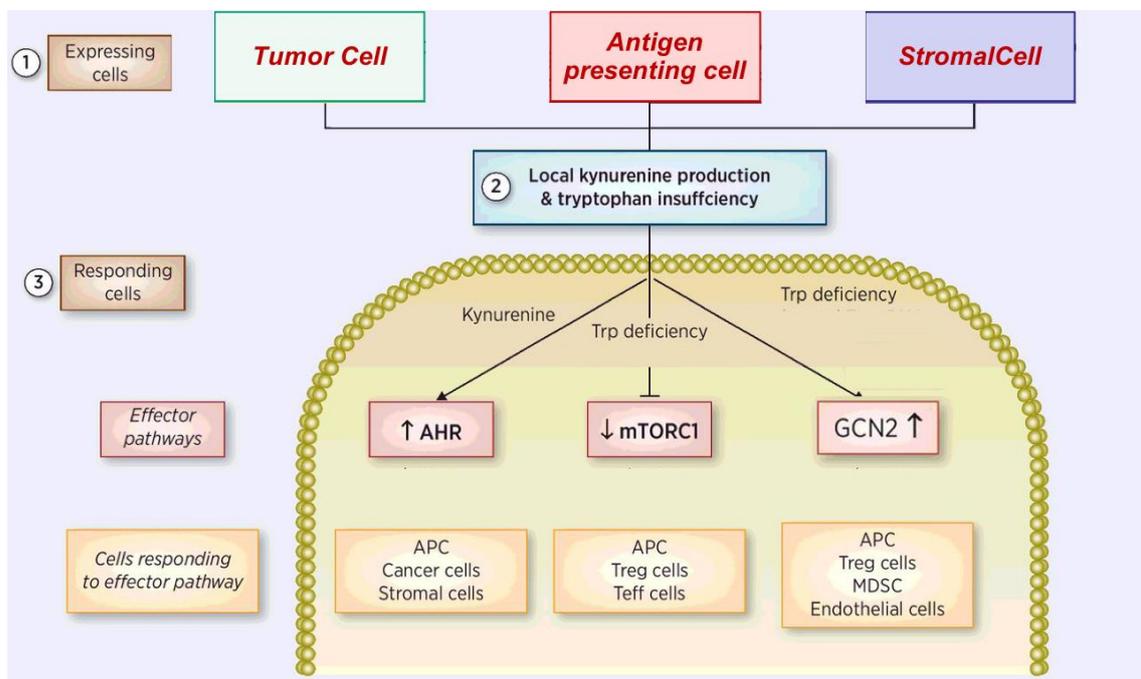


**Figura 1.** Struttura del Triptofano.

IDO-1 risulta sovraespresso in un'ampia varietà di tumori, fra cui la leucemia mieloide acuta, il melanoma, il carcinoma della tiroide, dei polmoni, del seno, dell'esofago, dello stomaco e del colon, e risulta esercitare un ruolo chiave nella resistenza all'immunoterapia e proprio per questi motivi rappresenta un potenziale bersaglio per il blocco dei checkpoint immunologici.

L'effetto di IDO-1 sulla risposta immunitaria può essere mediato da due pathway (Fig. 2):

- 1) La deplezione di Trp, che provoca la contemporanea attivazione della chinasi metabolica sensibile agli stress cellulari, GCN2 (general control non-derepressible 2) e innesca una condizione di anergia e di maggiore sensibilità all'apoptosi,<sup>32</sup> e l'inibizione della mTORC-1, con conseguente diminuzione della proliferazione delle cellule T citotossiche e un aumento delle cellule Treg.<sup>33</sup>
- 2) La Kyn, prodotta dal metabolismo del Trp, viene riconosciuta come ligando dal recettore degli idrocarburi arilici, AhR. Una volta attivato, AhR trasloca dal citosol al nucleo, dove si dissocia dalla chaperonina, Hsp-90, e si lega alla proteina ARNT (AhR Nuclear Translocator), promuovendo la trascrizione dell'IL-10 nelle DCs e nelle cellule NK, e di IL6 nelle cellule tumorali e nei macrofagi.<sup>34</sup>



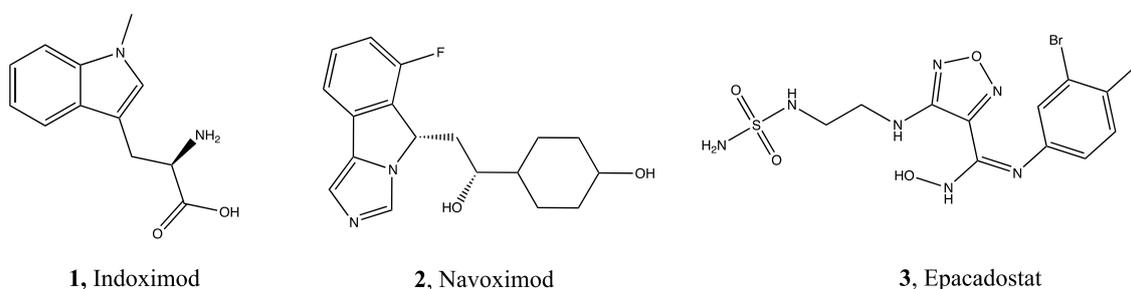
**Figura 2.** Siti di espressione di IDO-1 e organi effettori.

All'interno del microambiente tumorale, la sovraespressione di IDO1 si traduce quindi nella soppressione delle cellule effettrici CD8<sup>+</sup>T e NK, e nell'incremento dell'attività delle cellule regolatorie T (Treg) e delle cellule soppressorie di derivazione mieloide (MDSC).<sup>34</sup>

Oltre a IDO-1, anche gli enzimi indoleamina-2,3-diossigenasi-2 (IDO-2) e triptofano 2,3-diossigenasi (TDO) svolgono un ruolo importante nel metabolismo del triptofano. IDO-2 svolge un'attività catalitica quasi trascurabile, ma compete per il legame-eme con IDO-1, regolando l'attività di quest'ultimo.<sup>35</sup> TDO è strutturalmente differente rispetto agli altri due enzimi, è espresso principalmente nel fegato e regola l'omeostasi sistemica dei livelli di triptofano. La presenza di TDO nelle cellule tumorali aumenta la resistenza alla risposta immunitaria e favorisce la metastasi.<sup>36</sup>

#### 1.1.4.1 IDO Inibitori

Numerosi studi preclinici hanno dimostrato l'efficacia degli IDO inibitori, soprattutto quando somministrati in combinazione con agenti chemioterapici, radioterapia, o in associazione con altri inibitori del checkpoint immunitario. Tra gli IDO inibitori, le molecole Indoximod, Navoximod e Epacadostat (Fig. 3) sono attualmente in sperimentazione clinica (trial clinici di fase II e III).



**Figura3.** Struttura di 1) Indoximod; 2) Navoximod; 3) Epacadostat.

Indoximod (**1**, Fig. 3) agisce come mimetico del Trp ripristinando l'azione di mTORC-1 (IC<sub>50</sub> ~ 70 nM) e promuovendo la proliferazione dei linfociti T citotossici, responsabili della risposta immunitaria. A causa della scarsa specificità d'azione, Indoximod è in grado di interferire con tutti gli enzimi catabolici del triptofano, IDO-1, IDO-2 e TDO, coinvolti nell'immunosoppressione e, proprio per questo, risulta meno sensibile allo sviluppo di resistenza, intrinseca o acquisita.<sup>33</sup> La sua scarsa solubilità in acqua (0.721 mg/mL) lo rende somministrabile solo per via orale, tuttavia alla dose di 2000 mg due volte/die risulta ben

tollerato. A causa della scarsa efficacia come monoterapia, attualmente sono in corso diversi studi clinici in cui Indoximod viene somministrato in combinazione con altri agenti terapeutici (Tab. 1).

Tipo di tumore	Fase clinica	Dose Indoximod	Agente combinato	Risultati
<b>Melanoma metastatico</b>	2	1200 mg, due volte al dì	Anti CTLA-4 e anti PD-1/PDL-1	Più del 50% dei pazienti ha risposto alla terapia, tra cui il 18% ha avuto completa remissione del tumore. <sup>37</sup>
<b>Prostata</b>	2	1200 mg, due volte al dì	Vaccino Sipuleucel-T	Rallentamento della progressione del tumore e aumento della sopravvivenza globale (OS) rispetto al placebo. <sup>38</sup>
<b>Leucemia mieloide acuta</b>	1b/2	dosi variabili	Citarabina + Idarubicina	Riduzione della massa tumorale (5 pazienti su 6) dopo un solo ciclo del trattamento. <sup>39</sup>
<b>Glioblastoma</b>	1b/2a	dosi variabili	Temozolomide + Bevacizumab + radioterapia	Stabilizzazione del tumore. <sup>40</sup>

**Tabella 1.** Studi in fasi cliniche su terapie combinate con Indoximod.

Inoltre, studi recenti hanno dimostrato come il trattamento con Indoximod riduca lo sviluppo dell'artrite reumatoide autoimmune, indotta da inibitori del checkpoint immunitario e induca benefici comportamentali su pazienti oncologici che soffrono d'ansia, depressione o forti dolori.<sup>33</sup>

Navoximod (**2**, Fig. 3) è un inibitore selettivo di IDO-1, che agisce riducendo il consumo di Trp e attenuando l'immunosoppressione.<sup>36</sup> Navoximod è stato testato clinicamente, per via orale, sia in monoterapia che in terapia combinata. In uno studio in fase Ia, il farmaco è stato somministrato a 22 pazienti con tumori solidi, di cui 8 hanno raggiunto una condizione di stabilità. In un altro, di fase Ib, su 52 pazienti con tumori solidi, Navoximod è stato somministrato in combinazione ad Atezolizumab, un anticorpo anti-PD-L1. 4 pazienti hanno mostrato una risposta parziale, mentre 11 hanno mostrato una condizione di stabilità.<sup>35</sup>

Epacadostat (**3**, Fig. 3) è un inibitore altamente selettivo per IDO-1, somministrato oralmente, alla dose di 100 mg due volte/die risulta ben tollerato, attualmente si trova alla fase III della sperimentazione clinica.<sup>36</sup> In uno studio di fase I, Epacadostat è stato somministrato a 52 pazienti con tumori solidi avanzati e 7 hanno raggiunto una condizione di stabilità per più di 16 settimane. In un altro studio di fase II, è stato somministrato a 15 pazienti con sindrome

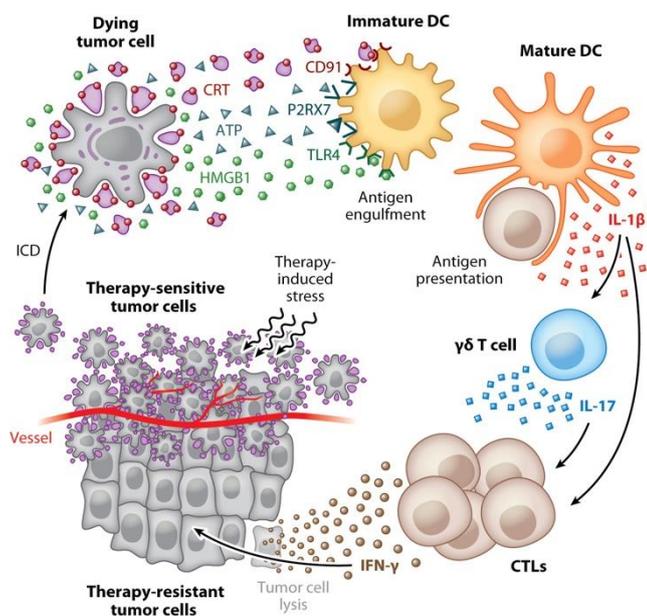
mielodisplastica (SMD) e 12 hanno mostrato una condizione di stabilità. Epacadostat è stato testato in combinazione con Pembrolizumab, un anticorpo anti-PD-1, su 444 pazienti con carcinoma uroteliale, renale, melanoma e cancro polmonare non a piccole cellule (fase I/II) raggiungendo il 35%- 58% di ORR (Objective Response Rate).<sup>35</sup>

### **1.1.5 Morte cellulare immunogenica**

In seguito al rilascio di TAAs dalle cellule tumorali si innescano una serie di meccanismi immunologici che culminano nella morte cellulare immunogenica (immunogenic cell death, ICD), che pur essendo apoptotica nella morfologia, è caspasi-dipendente e altamente efficace nello stimolare una risposta immunitaria. Le cellule morenti rilasciano, infatti, dei mediatori (danger-associated molecular pattern, DAMPs) che si legano ai recettori intracellulari o presenti sulla superficie delle cellule immunitarie.<sup>41</sup>

Il meccanismo di ICD, mostrato in Fig. 4, è caratterizzato da una serie di eventi che promuovono il reclutamento, la sopravvivenza e il differenziamento delle DCs e la secrezione di IL-6 e altre citochine infiammatorie.<sup>42</sup>

- nelle fasi iniziali dell'ICD, l'esposizione ad agenti chemioterapici o a radiazioni ionizzanti genera un notevole stress a carico del reticolo endoplasmatico (ER), che si traduce nella traslocazione della proteina calreticulina (CRT) sulla membrana cellulare. L'esposizione della CRT funge da segnale "mangiami" per le DCs, CRT si lega al recettore CD-91, innescando il processo apoptotico caspasi-dipendente e la fagocitosi delle cellule morte. Contemporaneamente, le proteine da shock termico (Hsp90 e Hsp70) riconoscono e legano i TAAs, potenziando l'immunogenicità.
- Successivamente, viene rilasciata HMGB-1 (high-mobility group box 1), una proteina nucleare altamente conservata, che promuove il ripiegamento del DNA nella struttura cromatinica influenzando la trascrizione. HMGB-1 si lega al recettore toll-like receptor 4 (TLR4) delle DCs, inducendone la maturazione, e, inoltre, blocca l'azione immunosoppressiva delle cellule Treg.<sup>43</sup>
- Infine, il nucleotide adenosina trifosfato (ATP), che funge da segnale "trovami", viene rilasciato a livello extracellulare e si lega al recettore P2X7 delle DCs, promuovendo la secrezione della citochina IL-1 $\beta$ . L' IL-1 $\beta$  è fondamentale per un adeguato reclutamento dei linfociti T secernenti IL-17 e la generazione di linfociti T citotossici CD8<sup>+</sup> tumore-specifici.



**Figura 4.** Meccanismo di morte cellulare immunogenica (ICD).<sup>43</sup>

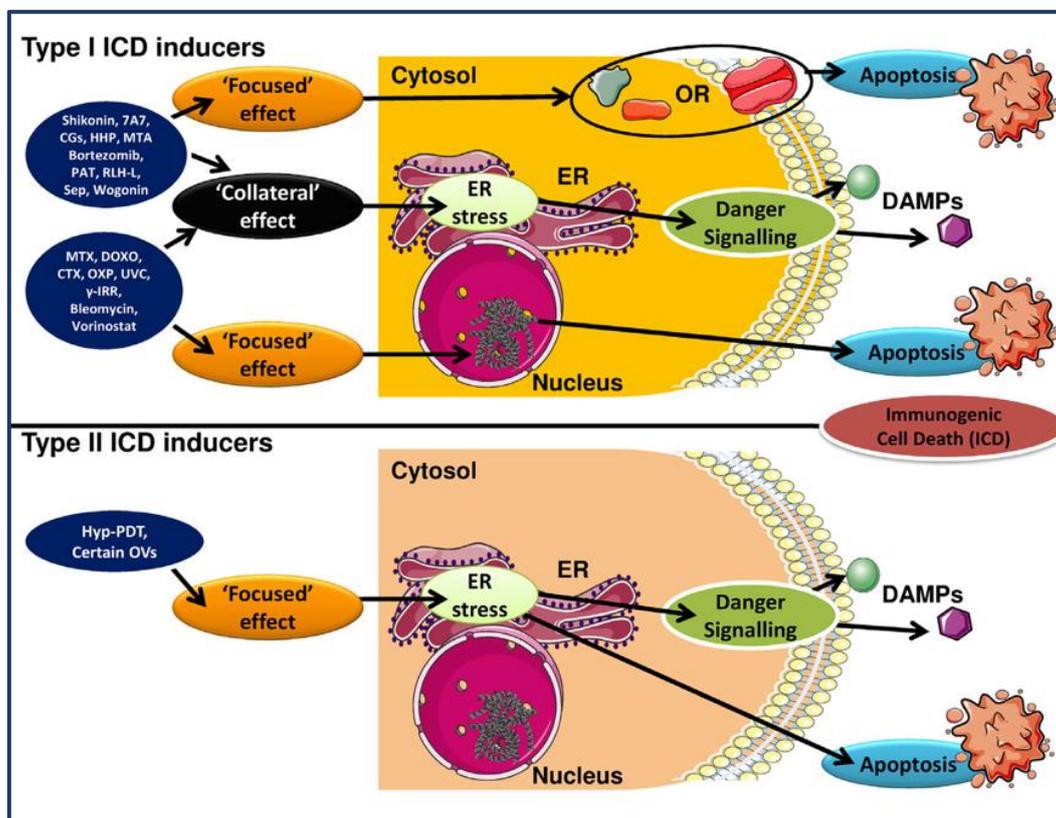
#### 1.1.5.1 Induttori di morte cellulare immunogenica

Nel 2005, per la prima volta, in seguito all'inoculazione in topi, di linee cellulari tumorali trattate con doxorubicina, si è osservata l'inibizione della crescita della massa tumorale.<sup>41</sup> Quest'evento chiave ha aperto la strada all'identificazione di agenti in grado di innescare ICD, denominati induttori di ICD, es. radiazioni ionizzanti e alcuni chemioterapici (antracicline, ciclofosfamide, oxaliplatin e mitoxantrone). Gli induttori di ICD si dividono in due grandi categorie: tipo I e tipo II (Fig. 5).<sup>42</sup>

Gli induttori di tipo I causano l'apoptosi delle cellule agendo (i) sulla replicazione del DNA e sui processi di riparazione delle proteine, (ii) sulle proteine di transmembrana e di canale e (iii) sulle proteine citoplasmatiche. Sono induttori di tipo I, le radiazioni ionizzanti, le microonde<sup>44</sup> ed alcuni chemioterapici. Tra i farmaci antineoplastici, la doxorubicina, rappresenta il primo induttore approvato dalla FDA, nel 1974,<sup>45</sup> il mitoxantrone, anch'esso appartenente alla famiglia delle antracicline, e il paclitaxel, un agente antimittotico, si sono dimostrati capaci di indurre ICD.<sup>46,47</sup>

Gli induttori di tipo II promuovono la morte cellulare e la morte immunogenica alterando l'equilibrio del reticolo endoplasmatico (ER) e stimolano le cellule tumorali a produrre più DAMPs, attraverso il rilascio di ROS indotto dallo stress del reticolo.<sup>42</sup> I principali induttori di tipo II sono gli agenti utilizzati nella terapia fotodinamica (PDT) e coxsackievirus B3 (CVB3), un virus oncolitico con proprietà immunostimolanti. In particolare, tra gli agenti fotosensibilizzanti, l'ipericina, Hyp-PDT, si accumula nelle membrane dell'ER e, una volta

attivata tramite radiazione luminosa, genera specie reattive all'ossigeno (ROS) che causano lo stress dell'ER e quindi ICD.<sup>48</sup>



**Figura 5.** Induttori di ICD tipo I e II. 7A7, anticorpo per il recettore del fattore di crescita anti-epidermico; CGs, glicosidi cardiaci; CTX, ciclofosfamide; DOXO, doxorubicina; HHP, alta pressione idrostatica; Hyp-PDT, terapia fotodinamica basata su ipericina; IRR, irraggiamento (radioterapia); MTA, ablazione termica microonde; MTX, mitoxantrone; OXP, oxaliplatino; PAT, patupilone; RLH-L, RIG-I-like helicase ligando; Sep, septacidin; UVC, UV.

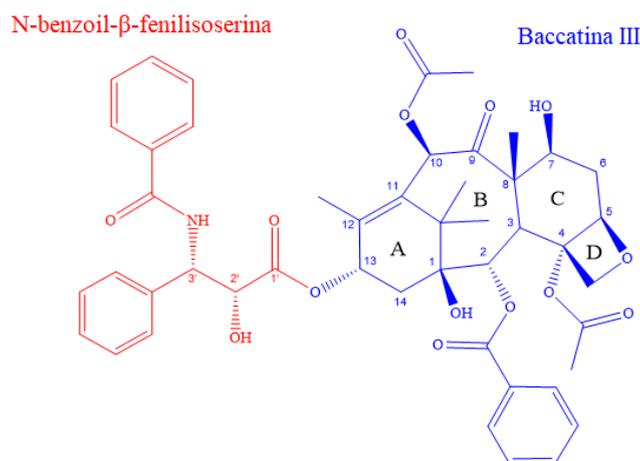
## 1.2 Chemioterapia e Paclitaxel

La chemioterapia rappresenta l'approccio terapeutico di prima scelta per il trattamento dei tumori. Sfruttando i meccanismi di riproduzione accelerati ed incontrollati delle cellule tumorali, le sostanze citotossiche somministrate in chemioterapia interferiscono sul ciclo cellulare, inducendo la morte delle cellule neoplastiche. I farmaci impiegati in chemioterapia vengono classificati in base al loro meccanismo d'azione: agenti alchilanti, antimetaboliti, antimitotici ecc. In particolare, il paclitaxel (PTX) o tassolo, è un agente antimitotico, approvato dalla FDA per il trattamento del carcinoma ovarico in stadio avanzato, del tumore al seno, al polmone e per il sarcoma di Kaposi associato all'AIDS. Inoltre è impiegato in seconda linea, in pazienti affetti da carcinoma gastroesofageo, endometriale, cervicale, e prostatico.<sup>49</sup> Il PTX è stato isolato nel 1963 dalla corteccia del *Taxus brevifolia*. A causa della scarsa resa di

estrazione, della ridotta disponibilità del *Taxus brevifolia* e dell'elevata complessità della sintesi totale,<sup>50</sup> l'impiego del PTX è stato fortemente limitato fino alla scoperta di un processo semisintetico, che consentiva di ottenere PTX, facendo reagire la 10-deacetilbaccatina III, estratta dagli aghi del tasso Europeo, con un derivato ossazolinico sul carbonio 13 e successiva apertura dell'anello.<sup>51</sup>

Dal punto di vista strutturale, il PTX è un diterpenoide costituito da un core tetraciclico (*baccatina III*, in blu Fig. 6) e da una catena lineare (*N-benzoil-β-fenilioserina*, in rosso, Fig. 6). I cicli vengono convenzionalmente nominati come anello A (cicloesene), anello B (cicloottano), anello C (cicloesano) e anello D (ossetano).<sup>49</sup>

Il PTX presenta una scarsa solubilità in acqua (0,3 µg/mL), mentre si scioglie in 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%).<sup>52</sup>

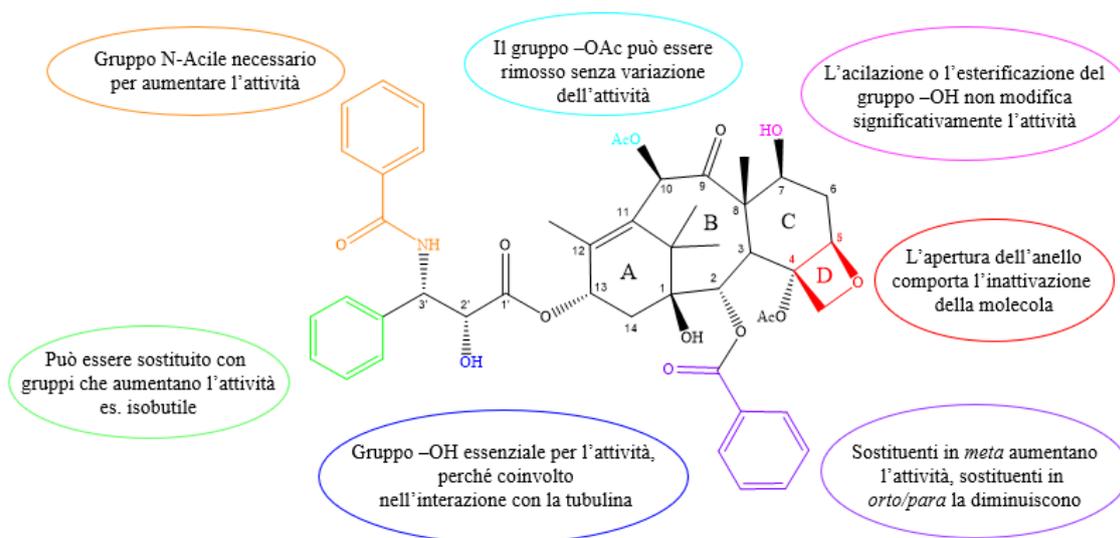


**Figura 6.** Struttura del paclitaxel.

### 1.2.1 Meccanismo d'azione e SAR del Paclitaxel

Il PTX si lega ai microtubuli durante la divisione cellulare, alterando il processo di polimerizzazione/depimerizzazione (instabilità dinamica) determinando l'arresto del ciclo cellulare nella fase G2/M e l'induzione della morte cellulare per apoptosi.<sup>47</sup>

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 siano i gruppi funzionali fondamentali per l'azione antitumorale del PTX (Fig. 7).<sup>53,54</sup>



**Figura 7.** SAR del Paclitaxel.

- La catena legata al C<sub>13</sub> svolge un ruolo fondamentale nell'azione citotossica; idrolizzandola infatti, si ottiene una molecola (*baccatina III*) che risulta molto meno attiva. Se invece si sostituisce il gruppo fenile su C<sub>3'</sub> con gruppi come l'isobutile, la citotossicità aumenta.<sup>55</sup>
- Il gruppo 2'-OH è direttamente coinvolto nell'interazione con la tubulina, pertanto la sua presenza e la corretta configurazione risultano indispensabili per conservare l'attività della molecola.<sup>56</sup>
- La rimozione del gruppo OAc legato a C<sub>10</sub> diminuisce solo leggermente la citotossicità del farmaco, così come l'acilazione o la rimozione del gruppo OH legato a C<sub>7</sub> non variano in maniera significativa l'attività. La riduzione del carbonile C<sub>9</sub>, come l'epossidazione tra C<sub>7</sub> e C<sub>8</sub>, aumentano lievemente la citotossicità.<sup>57</sup>
- Sostituenti in posizione orto-para dell'anello benzenico in posizione 2 comportano una diminuzione dell'attività, mentre i composti meta-sostituiti risultano più citotossici.<sup>58</sup>
- L'apertura dell'anello ossetanico che coinvolge C<sub>4</sub> e C<sub>5</sub> comporta l'inattivazione del PTX, come anche la sostituzione di O del ciclo con S o Se. Si ritiene, infatti, che questo atomo di ossigeno sia coinvolto nel legame idrogeno con un residuo amminoacidico della tubulina.<sup>59</sup>

### 1.2.2 Meccanismi di resistenza, metabolismo e effetti collaterali del PTX

L'efficacia del trattamento con PTX è limitata dalla sua scarsa solubilità, dalla ridotta selettività d'azione e dall'insorgenza di resistenza. In particolare, i meccanismi di resistenza sono strettamente correlati alla presenza di una glicoproteina integrale di membrana, glicoproteina P (P-gp), nota anche come proteina di resistenza multifarmaco 1 (Multidrug Resistance Protein 1, MDR1). Sovraespressa nelle cellule tumorali, P-gp agisce come una pompa che espelle dalla cellula stessa un'ampia varietà di molecole e che mostra un'elevata affinità per il PTX. L'attività del PTX è inoltre influenzata negativamente anche dalle mutazioni a carico degli amminoacidi presenti all'interno della tasca idrofobica della tubulina  $\beta$ , che ne riducono drasticamente l'affinità.<sup>60</sup>

Il PTX viene somministrato per infusione intravenosa e si distribuisce rapidamente nelle zone periferiche. La sua emivita è di 6-13 ore e viene eliminato principalmente dal fegato e dai reni. Sono stati identificati cinque metaboliti del paclitaxel, tra cui i principali sono, il 6-idrossipaclitaxel, il 3'-para-idrossipaclitaxel e il 6,3'-para-diidrossipaclitaxel.<sup>61</sup>

Il trattamento con PTX può causare gravi effetti collaterali (Fig. 8), derivanti sia dal principio attivo stesso, sia dalla formulazione con cui viene somministrato: Cremophor® EL (Taxol®), una miscela di olio di ricino poliossietilato ed etanolo assoluto, 1:1 (v/v).<sup>62,63</sup>

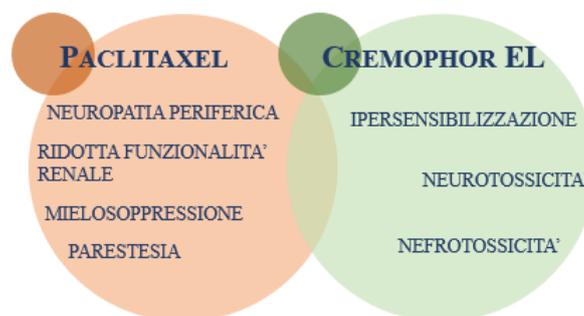


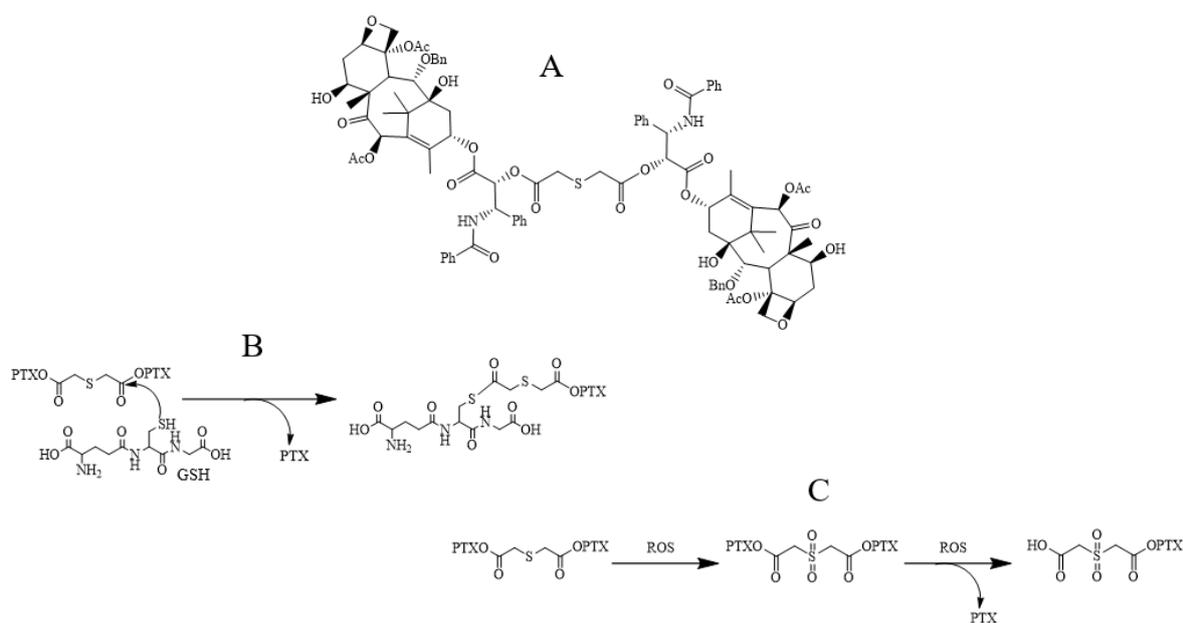
Figura 8. Effetti collaterali PTX e Cremophor ® EL

### 1.2.3 Profarmaci e dimero (PTX)<sub>2</sub>S

Per migliorare la biodisponibilità di un farmaco, aumentarne l'efficacia del trattamento e ridurre la tossicità sistemica, si ricorre all'utilizzo di profarmaci. Un profarmaco è un composto farmacologicamente inattivo che, in particolari condizioni, subisce reazioni biochimiche o enzimatiche che portano al rilascio del principio attivo. In particolare, i profarmaci del PTX sono progettati legando polimeri, vitamine o altre molecole in posizione 2'-OH, bloccando, temporaneamente, l'attività del farmaco. Per sintetizzare tali profarmaci vengono spesso

utilizzati legami esterei che vengono poi facilmente idrolizzati, per via enzimatica o chimica, nelle cellule tumorali.<sup>64</sup>

Recentemente, Pei et al. hanno scoperto che il dimero del paclitaxel, (PTX)<sub>2</sub>S, costituito da due molecole di PTX legate in 2' mediante un tioetere (A, Fig. 9), è in grado di formare delle micelle stabili in ambiente acquoso.<sup>65-68</sup> A differenza del PTX, il dimero non precipita in seguito a cristallizzazione, grazie alla flessibilità conferitagli dalla presenza del tioetere stesso, pertanto, in forma dimerica, il PTX aumenta di 2000 volte la sua solubilità, mostrando un'elevata stabilità in ambiente fisiologico. (PTX)<sub>2</sub>S viene ottenuto in resa elevata mediante condensazione di due molecole di PTX con l'acido 2,2'-tiodiacetico. La molecola una volta all'interno della cellula, reagisce con glutatione (GSH, B Fig. 9) e/o con i ROS (C Fig. 9), entrambi sovraespressi nell'ambiente tumorale, liberando il principio attivo.<sup>64,67</sup>



**Figura 9.** A: struttura di (PTX)<sub>2</sub>S, B: reazione del dimero con GSH, C: reazione del dimero con ROS

### 1.3 Terapia Fotodinamica

La terapia fotodinamica (PDT) fu inizialmente utilizzata per la cura di malattie dermatologiche, acne, lupus vulgaris ed alcuni tumori dell'epidermide. L'estensione del suo utilizzo per il trattamento di tumori interstiziali solidi è stata vincolata all'evolversi della tecnologia delle fibre ottiche, fondamentale per la veicolazione della luce all'interno delle zone da trattare.<sup>69</sup>

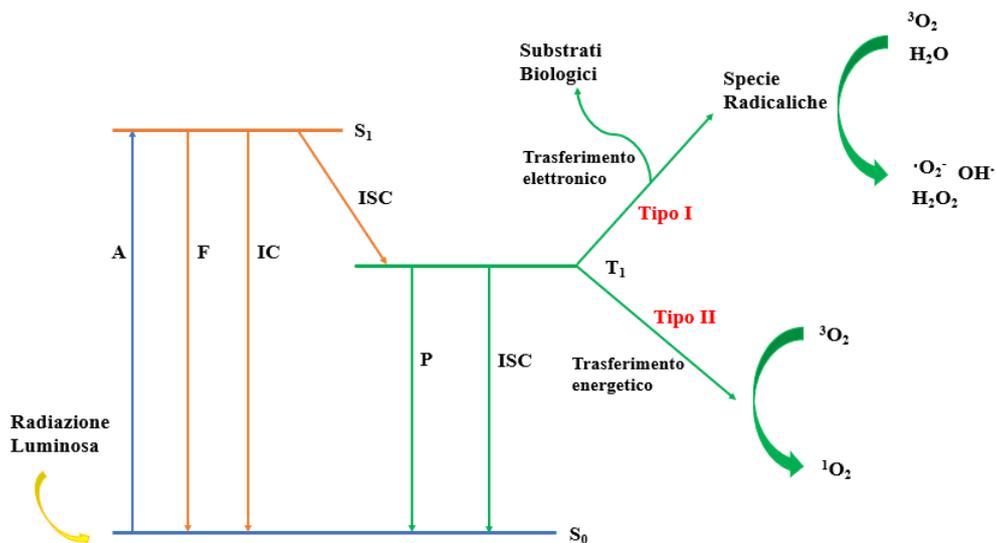
La PDT richiede la presenza di un agente fotosensibilizzante (PS), di una sorgente luminosa e di ossigeno. Il PS, dopo essere stato irraggiato ad un'opportuna lunghezza d'onda, cede l'energia assorbita all'ossigeno molecolare così da produrre delle sostanze citotossiche, le

specie reattive dell'ossigeno (ROS), come perossido di idrogeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), l'anione superossido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), il radicale ossidrilico ( $\text{OH}\cdot$ ) e l'ossigeno di singoletto ( $^1\text{O}_2$ ). La lunghezza d'onda utilizzata è compresa nell'intervallo tra 600 e 800 nm (finestra terapeutica), al fine di evitare l'assorbimento dell'energia da parte dei cromofori presenti nei tessuti (emoglobina, melanina, vitamina B12,  $\text{H}_2\text{O}$ ).<sup>70</sup>

I PS nel loro stato fondamentale di singoletto  $\text{S}_0$ , presentano una coppia di elettroni con spin antiparallelo sull'orbitale a più bassa energia. In seguito all'assorbimento di una radiazione luminosa, con sufficiente energia, avviene la transizione di uno degli elettroni nello stato di singoletto eccitato ( $\text{S}_1$ ), senza inversione di spin (Fig. 10). Poiché lo stato fondamentale è energeticamente favorito rispetto agli stati eccitati, il sistema tenderà a tornare rapidamente allo stato  $\text{S}_0$  tramite fenomeni di rilassamento. Questi fenomeni possono avvenire per via radiativa (emissione di fluorescenza, **F**), attraverso lo sviluppo di calore (conversione interna, **IC**), oppure mediante *intersystem crossing* (trasferimento di energia di eccitazione, **ISC**), in cui si ha la transizione dallo stato  $\text{S}_1$  allo stato di tripletto ( $\text{T}_1$ ), in seguito all'inversione dello spin di uno dei due elettroni. Dallo stato  $\text{T}_1$  può verificarsi un fenomeno di rilassamento radiativo (emissione di fosforescenza, **P**) oppure sviluppo di calore. Inoltre lo stato  $\text{T}_1$ , essendo più stabile rispetto a  $\text{S}_1$ , ha un tempo di vita sufficientemente lungo da poter permettere al PS di reagire con le altre molecole presenti all'interno della cellula.

Esistono due meccanismi di reazione:

- Reazione di tipo I: avviene un trasferimento elettronico su substrati biologici, che porta alla formazione di specie radicaliche. Questi radicali reagiscono con l'ossigeno presente per formare ROS ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\cdot\text{O}_2^-$ ,  $\text{OH}\cdot$ ).<sup>70,71</sup>
- Reazione di tipo II: Se la concentrazione di ossigeno risulta sufficientemente elevata, può avvenire un trasferimento di energia direttamente dal PS alle molecole di ossigeno, portando alla formazione di ossigeno di singoletto,  $^1\text{O}_2$ .<sup>70,71</sup>



**Figura 10.** Schema reazioni PDT con didascalie. A = assorbimento fotonico; F = fluorescenza (emissione); P = fosforescenza; S = singoletto; T = tripletto; IC = conversione interna; ISC = intersystem crossing.

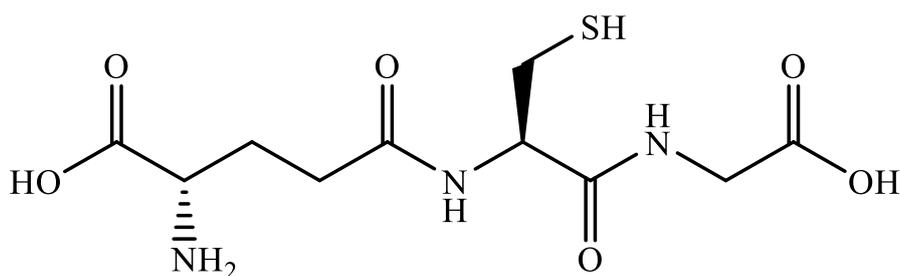
I ROS esercitano la loro azione mediante (i) danneggiamento diretto delle cellule, (ii) compromissione del sistema vascolare, (iii) attivazione della risposta immunitaria da parte dell'organismo: la generazione di ROS porta al rilascio di 1-metiltriptofano, che causa l'attivazione delle cellule-T.<sup>69</sup> La morte delle cellule tumorali può avvenire per apoptosi, necrosi o autofagocitosi, a seconda del tipo di PS utilizzato, della dose e della sua localizzazione. In particolare, se il PS si accumula prevalentemente nei mitocondri le cellule muoiono per apoptosi, mentre se si localizza nella membrana plasmatica la morte avviene per necrosi o autofagocitosi.<sup>72</sup>

### 1.3.1 Limiti della Terapia Fotodinamica

Nonostante la PDT abbia le potenzialità per trattare tumori in diverse fasi, viene principalmente impiegata per il trattamento delle lesioni superficiali, o accessibili tramite endoscopi e come adiuvante alla terapia chirurgica. Il principale limite all'utilizzo della PDT è la scarsa penetrabilità della luce nei tessuti che pertanto non consente di trattare tumori in profondità o ampiamente diffusi nell'organismo. Lo sviluppo di fibre ottiche, come detto precedentemente, sta in parte risolvendo queste limitazioni. Un altro problema deriva dalla mancanza di una precisa correlazione tra l'intensità della radiazione luminosa e l'efficacia del trattamento. Se la radiazione risulta troppo poco intensa c'è il rischio che il tumore non regredisca completamente e che possa ripresentarsi. Tuttavia non si possono utilizzare radiazioni troppo intense, che danneggerebbero i tessuti sani.<sup>72</sup> Inoltre, i PS sono generalmente lipofili, il che permette loro

di legarsi e accumularsi nelle cellule, ma ne rende difficile il trasporto all'interno dell'organismo, per questo motivo, negli ultimi anni, si è ricorsi sempre più frequentemente all'utilizzo di sistemi di veicolazione nanometrici.<sup>73</sup>

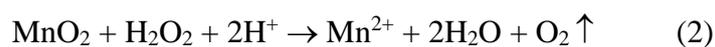
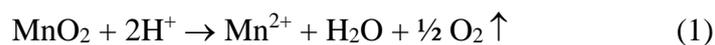
Un fattore chiave che limita drasticamente l'efficacia della PDT, è rappresentato dalla scarsa ossigenazione (ipossia) caratteristica del microambiente tumorale (TME). L'ipossia è causata dalla scarsa diffusione dell'ossigeno all'interno della massa tumorale e dall'irregolarità della microvascolatura tumorale.<sup>69,74</sup> Questa condizione è ulteriormente esacerbata dalla PDT stessa, che per generare ROS, consuma il poco ossigeno presente, aumentando la severità dell'ipossia e di conseguenza la resistenza del tumore. In aggiunta, il TME è caratterizzato, oltre che da un'elevata concentrazione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,<sup>75</sup> anche da livelli di GSH 4 volte superiori a quelli presenti nelle cellule sane (0.5-10 mM vs 10-25 mM).<sup>76</sup> Il GSH (Fig.11) è un tripeptide non proteico, uno dei più potenti antiossidanti dell'organismo che regola la sintesi di proteine, la riparazione del DNA e il controllo dello stress metabolico.



**Figura 11.** Struttura Glutathione (GSH).

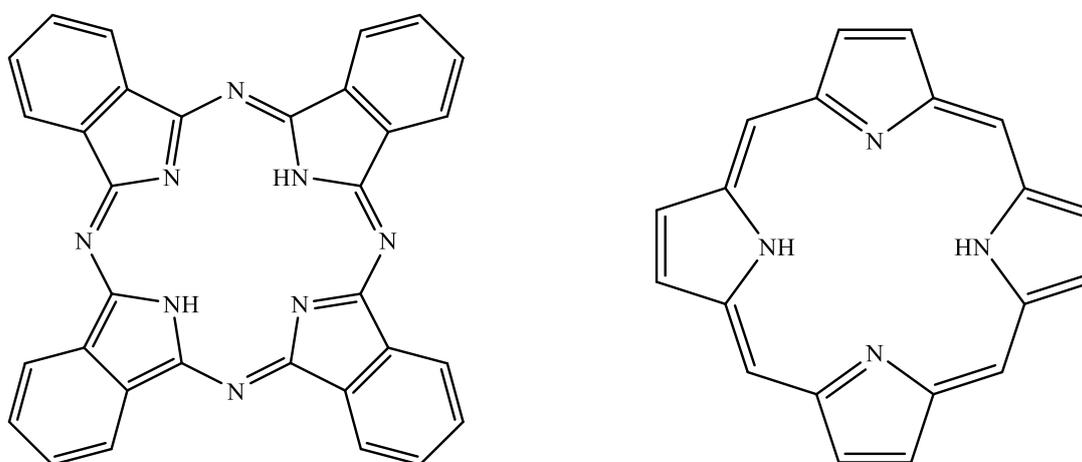
Tuttavia, l'elevata concentrazione di GSH presente nelle cellule tumorali rappresenta un limite nella terapia fotodinamica, infatti reagendo con l'<sup>1</sup>O<sub>2</sub> prodotto dalla PDT stessa, diminuisce l'efficacia del trattamento.

Al fine di aumentare la disponibilità di ossigeno all'interno dei tessuti tumorali e quindi di potenziare l'efficacia della PDT, sono stati progettati sistemi in grado di mimare l'azione della catalasi, un enzima responsabile della conversione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O,<sup>77</sup> come ossidi inorganici, in particolare il MnO<sub>2</sub> che, oltre a generare ossigeno, è in grado di reagire con il GSH, ossidandolo e limitando quindi il consumo di <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (1-3).<sup>74,78</sup>



### 1.3.2 IR780

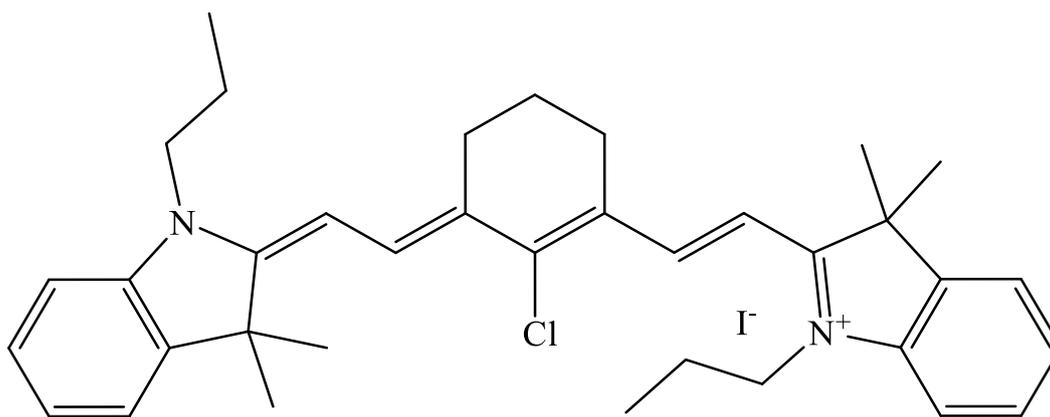
In generale, i PS sono composti organici con un esteso sistema coniugato che favorisce l'assorbimento di fotoni nella regione del rosso o vicino infrarosso; fra questi troviamo derivati porfirinici, clorine, ftalocianine, derivati fullerenici, etc.



**Figura 12.** Struttura Ftalocianina (sinistra); Struttura Porfirina (destra)

Un PS ideale deve avere una trascurabile tossicità al buio, un tempo di emivita sufficientemente lungo per generare un quantitativo adeguato di ROS, deve essere selettivo e facilmente eliminato dall'organismo, così da evitare fotosensibilizzazione e tossicità sistemica.<sup>72</sup>

In particolare, IR780, un catione idrofobico, appartenente alla famiglia delle cianine (Fig. 13) è ampiamente utilizzato in terapia fotodinamica e fototermica (PTT), sia in campo diagnostico come agente di imaging.



**Figura 13.** Struttura IR780

IR780 presenta un picco di assorbimento a 780 nm, con elevato potere penetrante nel vicino infrarosso, ed emette con elevate intensità intorno a 807–823 nm. Inoltre, IR780 presenta un'eccellente stabilità e si accumula preferenzialmente nella zona tumorale, grazie al forte legame che crea con i polipeptidi trasportatori di anioni organici (organic-anion-transporting polypeptides, OATPs). OATPs sono proteine presenti nel doppio strato lipidico della membrana cellulare e regolano il trasporto, attraverso di essa, di molte molecole; queste proteine sono sovraesprese nelle cellule patogene.<sup>73</sup> L'IR780 viene somministrato per via intravenosa; tuttavia, il suo impiego è fortemente limitato dalla sua natura idrofobica, che lo rende difficile da trasportare all'interno dell'organismo, dalle scarse proprietà farmacocinetiche (scarso assorbimento, elevata clearance) e da una elevata tossicità acuta. Per risolvere, almeno in parte, questi problemi, l'IR780 viene incapsulato all'interno di diverse tipologie di nanostrutture, per migliorarne la veicolazione e, contemporaneamente, diminuirne la tossicità.<sup>79</sup> Recentemente Zheng e collaboratori hanno dimostrato l'efficacia di IR780 come agente sonosensibilizzante nel trattamento del tumore al seno.<sup>80</sup> In particolare, la terapia sonodinamica (SDT), diversamente dalla PDT, sfrutta l'alto potere penetrante degli ultrasuoni (US) per attivare dei sensitizer e generare ROS.

## 1.4 Nanomedicina e drug delivery

Lo sviluppo della nanomedicina e la progettazione di sistemi per il trasporto dei principi attivi (drug delivery system, DDS) ha portato numerosi vantaggi nella somministrazione e nell'efficacia dei farmaci. Utilizzando strutture nanometriche (dimensioni attorno ai 100 nm) si riesce ad aumentare la concentrazione effettiva di principio attivo nella zona d'interesse, permettendo di utilizzare quantità minori di farmaco, così da prevenire la tossicità sistemica e

ridurre gli effetti collaterali. I DDS permettono, da un lato di aumentare la solubilità del principio attivo, e dall'altro di proteggerlo dalla degradazione e dal metabolismo, incrementandone l'emivita. Inoltre, viene notevolmente migliorata la selettività, sfruttando l'effetto EPR (Enhanced Permeability and Retention). L'EPR è la capacità dei tessuti tumorali di internalizzare molecole e particelle di grandi dimensioni e di trattenerli in modo più efficace rispetto ai tessuti sani, a causa 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.<sup>79</sup> La rapida crescita delle cellule tumorali rende necessaria la formazione di una propria rete di vasi sanguigni (angiogenesi), così da poter fornire ossigeno e nutrienti. Tuttavia la rete si sviluppa in maniera irregolare dando origine a fenestrate attraverso le quali le macromolecole possono entrare e accumularsi.

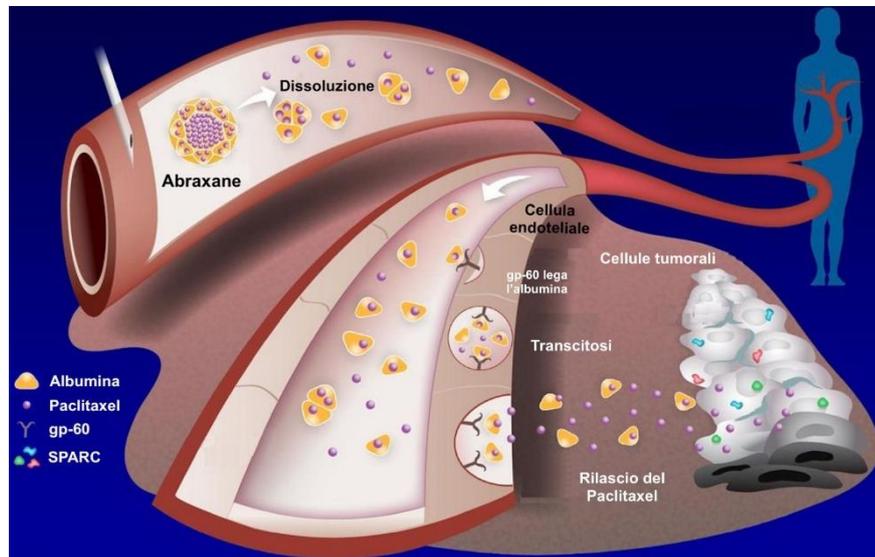
Oltre a sfruttare l'effetto EPR le nanoparticelle possono essere funzionalizzate con molecole o proteine che si legano a recettori presenti preferenzialmente sulle cellule tumorali. In questo modo aumentano la selettività del trasporto, sfruttando il meccanismo di endocitosi di questi recettori per entrare all'interno delle cellule.<sup>81</sup>

### **1.4.1 Albumina**

La nanomedicina sfrutta diversi tipi di carriers, polimeri biodegradabili naturali e sintetici, dendrimeri, materiali inorganici, liposomi, carboidrati e proteine.<sup>81</sup>

Un biomateriale ampiamente studiato per la produzione di DDS è l'albumina (HSA, *Human Serum Albumin*), la proteina umana più abbondante nel sangue, con una concentrazione di attorno ai 40 mg/mL, ed un peso molecolare di 66,5 KDa. HSA è responsabile della veicolazione di una grande varietà di composti, sia endogeni che esogeni all'interno dell'organismo. Inoltre, i tessuti tumorali sono particolarmente avidi di albumina che consente loro di sopperire al fabbisogno di energia e di amminoacidi, rendendola un carrier ideale per farmaci antitumorali.<sup>82</sup> Oltre a sfruttare l'effetto EPR, i sistemi a base di HSA utilizzano recettori specifici presenti nelle cellule tumorali per essere internalizzati. In particolare, Abraxane®, una formulazione di PTX legato non covalentemente all'HSA (100 mg di PTX per 900 mg di HSA in soluzione acquosa), viene riconosciuto dal recettore gp60 sull'endotelio tumorale e dalla SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine), una glicoproteina nello spazio interstiziale. HSA si lega a GP60, attivando la Caveolina-1, una proteina che induce la formazione delle caveole, le quali trasportano HSA all'interno del tessuto tumorale (Fig. 14). Una volta entrata nel tessuto, l'HSA si lega alla SPARC inducendo il rilascio di PTX che è così

in grado di diffondere attraverso il doppio strato fosfolipidico della membrana e di penetrare nella cellula.<sup>83</sup>



**Figura 14.** Meccanismo di rilascio di Abraxane.

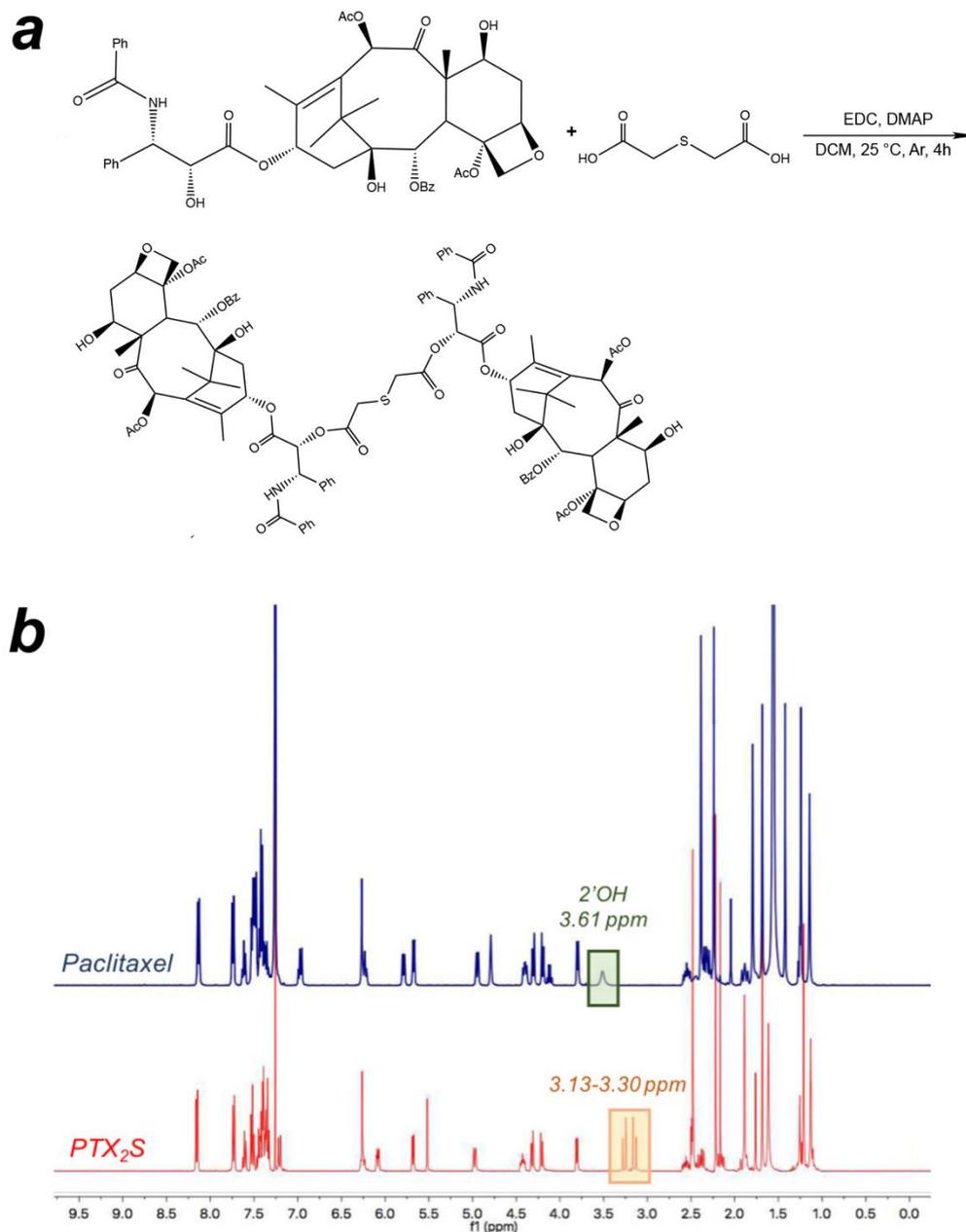
## 2. SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo di questo lavoro di tesi è quello di produrre e caratterizzare nanoparticelle multimodali a base di albumina umana (human serum albumin, HSA), caricate con i) un pro-farmaco costituito da un dimero del paclitaxel; ii) un agente fotosensibilizzante (IR780), utilizzato anche come agente diagnostico, e iii) un inibitore di IDO1 (Indoximod). Considerando il razionale alla base di questa combinazione, è atteso che l'azione sinergica/additiva dei componenti selezionati migliori l'effetto terapeutico. Un ulteriore obiettivo di questo lavoro di tesi, è quello di rivestire le nanoparticelle sopra descritte con un guscio di  $MnO_2$ . È noto infatti, che il microambiente tumorale è caratterizzato da elevate concentrazioni di  $H_2O_2$  (stress ossidativo), e basse quantità di ossigeno (ipossia). Il  $MnO_2$ , mimando l'effetto dell'enzima catalasi, è in grado di convertire  $H_2O_2$  in  $O_2$ , alleviando le condizioni ipossiche e favorendo l'efficacia del trattamento terapeutico. Inoltre, poiché il Mn viene utilizzato come agente di contrasto nella risonanza magnetica (MRI), il guscio di  $MnO_2$  può essere sfruttato anche a fini diagnostici, generando nel contempo un sistema teranostico.

Le nanoparticelle ottenute sono state caratterizzate in termini di dimensioni, capacità di loading, stabilità in acqua ed in ambiente fisiologico. Inoltre, è stata determinata mediante spettroscopia UV-Vis, la capacità dell'IR780 incapsulato nelle nanoparticelle di produrre specie reattive all'ossigeno (ROS), in seguito all'irraggiamento con luce bianca.

## 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

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



**Figura 15.** 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).

La sintesi del profarmaco del paclitaxel, PTX<sub>2</sub>S, è stata eseguita secondo la procedura riportata in letteratura.<sup>67</sup> La reazione consiste in una condensazione tra due molecole di PTX e l'acido 2,2'-tiodiacetico (Fig. 15a).

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 (Fig. 15b).

### 3.2 Nanoparticelle di HSA con PTX<sub>2</sub>S come agente stabilizzante

La preparazione delle nanoparticelle oggetto di questo lavoro di tesi, si è posta due obiettivi principali:

1. migliorare il trasporto di farmaci all'interno dell'organismo, aumentandone la selettività d'azione e la concentrazione nel sito target.
2. veicolare contemporaneamente diversi agenti terapeutici, in modo da combinare diverse strategie terapeutiche per migliorare l'efficacia del trattamento e superare fenomeni di resistenza.

Il biomateriale scelto per la preparazione delle NPs è l'HSA, infatti, la facile funzionalizzazione, la biocompatibilità e la biodegradabilità, la presenza di domini idrofili e idrofobici capaci di ospitare diversi principi attivi, e soprattutto l'esistenza di Abraxane®, una formulazione a base di HSA e PTX già approvata per il trattamento di diverse forme tumorali, la rendono una dei polimeri naturali più usati nel drug delivery.

All'interno delle NPs sono stati incapsulati diversi agenti terapeutici in modo da sviluppare un sistema multimodale in grado di aggredire le cellule tumorali sinergicamente:

- il dimero PTX<sub>2</sub>S, un prodrug del paclitaxel in grado di rilasciare il principio attivo in ambiente redox;
- IR780, un fotosensibilizzante utilizzato in PDT, PTT e SDT ed agente diagnostico;
- Indoximod, un IDO inibitore, in grado di innescare e potenziare la risposta immunitaria dell'organismo ospite contro il tumore;
- infine MnO<sub>2</sub>, in grado di ossigenare il tessuto target, per potenziare l'effetto della PDT stessa.

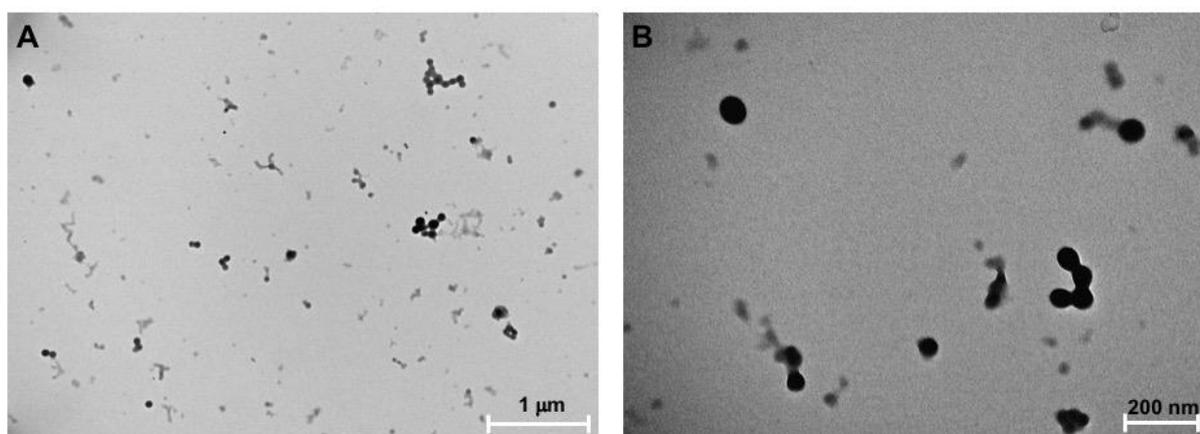
In particolare, la molecola di PTX è altamente insolubile in acqua, dove cristallizza istantaneamente e precipita. Al contrario, il dimero PTX<sub>2</sub>S sciolto in minime quantità di solvente organico ed iniettato in ambiente acquoso, si ri-organizza attraverso un processo di *self-assembly*, originando micelle stabili. Questo fenomeno, ovvero la formazione di micelle in un non-solvente del PTX, è dovuto 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. Inoltre, il dimero, in presenza di HSA, agisce da agente aggregante e stabilizzante per la formazione di NPs, consentendo, peraltro, di caricare quantità considerevoli di altri principi attivi lipofili. Al fine di poter valutare biologicamente le formulazioni senza l'effetto chemioterapico del PTX, il dimero è stato sostituito dalla vitamina E, un antiossidante privo di effetti citotossici. Sulla base dei risultati ottenuti, le quantità e le combinazioni ottimali per la preparazione delle diverse tipologie di NPs sono riportate in tabella 2:

Campione	HSA	PTX <sub>2</sub> S	Vitamina E	Indoximod	IR780	Diametro (nm)	PI
<b>Vitamina E</b>							
<i>IR780_vitE@HSA</i>	88%		6%		6%	136	0.11
<i>Ind_vitE@HSA</i>	79%		5%	16%		170	0.14
<i>Ind_IR780_vitE@HSA</i>	74%		5%	16%	5%	173	0.12
<b>PTX<sub>2</sub>S</b>							
<i>Ind_PT<sub>2</sub>S@HSA</i>	71%	11%		18%		108	0.17
<i>Ind_IR780_PT<sub>2</sub>S@HSA</i>	69%	14%		12%	5%	145	0.18

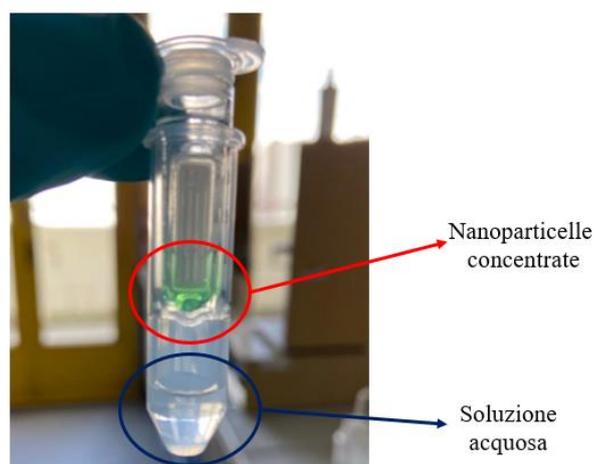
**Tabella 2.** NPs di HSA caricate con agente aggregante (PTX<sub>2</sub>S o vitamina E), Indoximod e/o IR780.

Le condizioni ottimali per la sintesi delle diverse NPs sono state ottenute partendo da una soluzione di HSA sciolta in H<sub>2</sub>O milliQ (~ 3.5 mg/mL) (Tabella 2) a cui viene aggiunta lentamente e sotto vigorosa agitazione (600 rpm) una soluzione etanolica dei principi attivi che si intende caricare sulle NPs. In queste condizioni, sono state ottenute NPs altamente monodisperse con un diametro idrodinamico tra i 108-173 nm. Per verificare la morfologia delle micelle ottenute, una soluzione acquosa di Ind\_IR780\_PT<sub>2</sub>S@HSA (0,1 mg/mL), è stata analizzata al microscopio elettronico a trasmissione (TEM), confermando la forma sferica delle NPs e dimensioni di circa 95 nm (Fig. 16).



**Figura 16.** Immagini al TEM di Ind\_IR780\_PT<sub>2</sub>S@HSA A) scala = 1 µm; B) scala = 200 nm.

Le NPs di Ind\_IR780\_PTX<sub>2</sub>S@HSA si sono dimostrate stabili in soluzione a 4°C per diverse settimane, anche dopo concentrazione. È importante sottolineare che, una volta liofilizzate, le NPs possono essere risospese in acqua, ripristinando le dimensioni iniziali. Inoltre, in seguito al processo di ultrafiltrazione (100 kDa, 12000 rpm, 10') non si osserva passaggio di IR780 attraverso il filtro, confermando la stabilità dell'interazione idrofobica tra IR780 ed HSA all'interno delle NPs (Fig. 17).



**Figura 17.** Ultrafiltrazione di Ind\_IR780\_PTX<sub>2</sub>S@HSA (12000 rpm, 10')

Al fine di migliorare le condizioni ipossiche, caratteristiche delle zone più profonde ed aggressive del tumore, le NPs sono state decorate con un guscio di MnO<sub>2</sub>, il quale, mimando l'azione della catalasi, converte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sovraespresso nelle cellule tumorali, in O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O.



Per ottenere questo coating, una soluzione acquosa di KMnO<sub>4</sub> (2.4 mg/mL) viene aggiunta alle soluzioni di NPs (IR780\_vitE@HSA, Ind\_IR780\_vitE@HSA, Ind\_IR780\_PTX<sub>2</sub>S@HSA). La miscela così ottenuta viene agitata a 37 °C per 30', secondo quanto riportato in letteratura,<sup>84</sup> ottenendo così delle NPs rivestite con MnO<sub>2</sub> (Tab. 3).

Campione	NPs solution	% KMnO <sub>4</sub> aggiunta	Diametro (nm)	PI
<b>Vitamina E</b>				
<i>IR780_vitE@HSA@MnO<sub>2</sub></i>	IR780_vitE@HSA	8%	-	-
<i>Ind_IR780_vitE@HSA@MnO<sub>2</sub></i>	Ind_IR780_vitE@HSA	3%	161	0.17
<b>PTX<sub>2</sub>S</b>				
<i>Ind_IR780_PTX<sub>2</sub>S@HSA@MnO<sub>2</sub></i>	Ind_IR780_PTX <sub>2</sub> S@HSA	58%	213	0.29

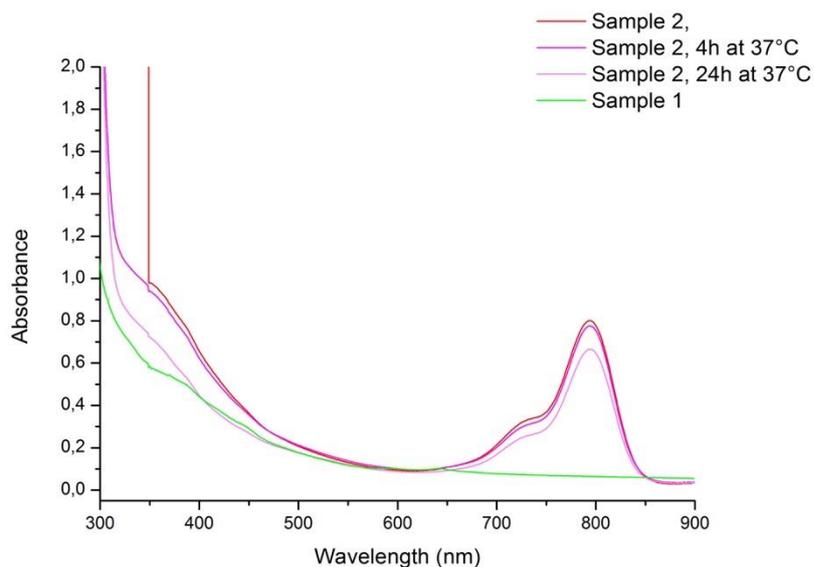
**Tabella 3.** NPs trattate con una soluzione di KMnO<sub>4</sub>.

Tuttavia, seguendo questa procedura, nello spettro di assorbimento di *Ind\_IR780\_PTX<sub>2</sub>S@HSA@MnO<sub>2</sub>* si osserva la scomparsa del picco a 793 nm (Sample 1, linea verde, Fig. 18), relativo all'IR780 incapsulato nelle NPs. Tale effetto potrebbe essere legato ad un'eventuale coordinazione del Mn<sup>2+</sup> da parte del PS, al fine di comprendere tale fenomeno sono in previsioni ulteriori studi volti ad approfondire le proprietà chimico-fisiche del sistema. Pertanto, per ripristinare l'assorbimento, è stato scelto di sintetizzare inizialmente HSA-MnO<sub>2</sub>, facendo reagire la proteina sciolta in PBS con KMnO<sub>4</sub> per 2 h a 37°C. In seguito la soluzione è stata purificata dall'eccesso di KMnO<sub>4</sub> mediante dialisi in H<sub>2</sub>O (MCWO: 14 kDa), e poi liofilizzata. In questo modo il manganese si lega direttamente ai gruppi carbossilici e ai tioli dell'HSA, e non si coordina all'IR780.<sup>74,85</sup> Sulla base dei risultati ottenuti, le quantità e le combinazioni ottimali per la preparazione delle NPs di HSA-MnO<sub>2</sub> sono riportate in tabella 4:

Campione	HSA-MnO <sub>2</sub>	PTX <sub>2</sub> S	Indoximod	IR780	Diametro (nm)	PI
<i>Ind_PTX<sub>2</sub>S@HSA-MnO<sub>2</sub></i>	71%	10%	19%		150	0.13
<i>Ind_IR780_PTX<sub>2</sub>S@HSA-MnO<sub>2</sub></i>	67%	10%	18%	5%	186	0.19

**Tabella 4.** NPs di HSA-MnO<sub>2</sub> caricate con agente aggregante (PTX<sub>2</sub>S o vitamina E), Indoximod e/o IR780.

Come mostrato in Fig. 18, il picco di assorbimento dell'IR780 viene ripristinato per le NPs di HSA-MnO<sub>2</sub> (Sample 2, Fig. 18) e si mantiene stabile in soluzione anche dopo 24 h a 37°C (linea magenta chiara, Fig. 18).



**Figura 18.** Spettro di assorbimento di Ind\_IR780\_PTX<sub>2</sub>S@HSA@MnO<sub>2</sub> (Sample 1, linea verde) e di Ind\_IR780\_PTX<sub>2</sub>S@HSA-MnO<sub>2</sub> (Sample 2, linea rossa, magenta e magenta chiaro) a diversi tempi.

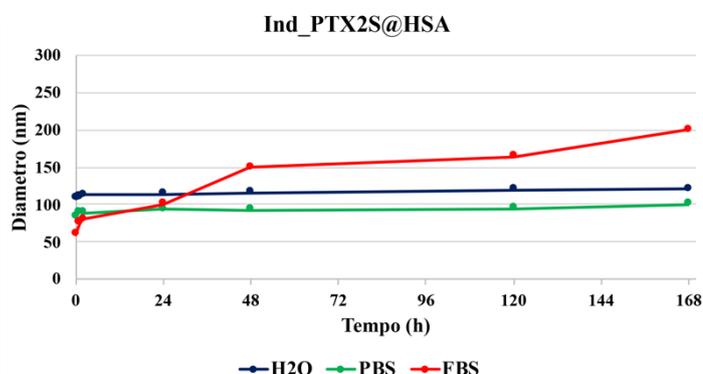
### 3.3 Stabilità nel tempo delle nanoparticelle

#### 3.3.1 Stabilità nel tempo delle nanoparticelle Ind\_PTX<sub>2</sub>S@HSA

La stabilità nel tempo dei campioni di Ind\_PTX<sub>2</sub>S@HSA, conservati al buio a 37 °C, è stata valutata mediante analisi DLS a differenti intervalli di tempo (1, 2, 24, 48, 120, 168 ore) e in diverse condizioni: H<sub>2</sub>O, PBS a pH 7.4 (per mimare le condizioni di pH fisiologico), ed in presenza di siero fetale bovino, FBS (18%), per osservare il comportamento in presenza di proteine sieriche. L'eventuale accrescimento o riduzione delle dimensioni delle nanoparticelle potrebbe essere indice dell'insorgenza di fenomeni di aggregazione o degradazione. In figura 16, è riportata la stabilità nel tempo delle NPs nelle tre diverse condizioni e in tabella sono elencati i valori delle dimensioni rilevati nel tempo.

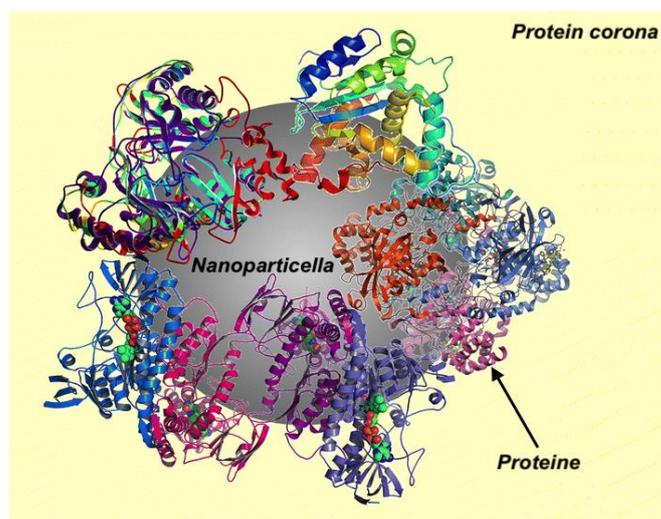
In ambiente acquoso (linea blu, Fig. 19) e in PBS (linea verde, Fig. 19) le NPs rimangono stabili per diversi giorni e non mostrano variazioni rilevanti nelle dimensioni.

Tempo (h)	Diametro (nm) in H <sub>2</sub> O	Diametro (nm) in PBS	Diametro (nm) in FBS
0	108	84	60
1	110	90	75
2	113	89	80
24	114	94	100
48	116	93	150
120	120	95	164
168	121	100	200



**Figura 19.** Stabilità nel tempo di Ind\_PT X<sub>2</sub>S@HSA a 37 °C in H<sub>2</sub>O (linea blu), in PBS (linea verde) e in FBS (linea rossa). In tabella sono riportati i valori del diametro delle NPs a diversi intervalli di tempo.

Come atteso, in presenza di FBS (linea rossa, Fig. 19), si osserva un aumento iniziale delle dimensioni delle NPs. Infatti le proteine sieriche presenti in FBS aderiscono sulla superficie delle NPS, a causa di un fenomeno noto come effetto corona (Fig. 20).



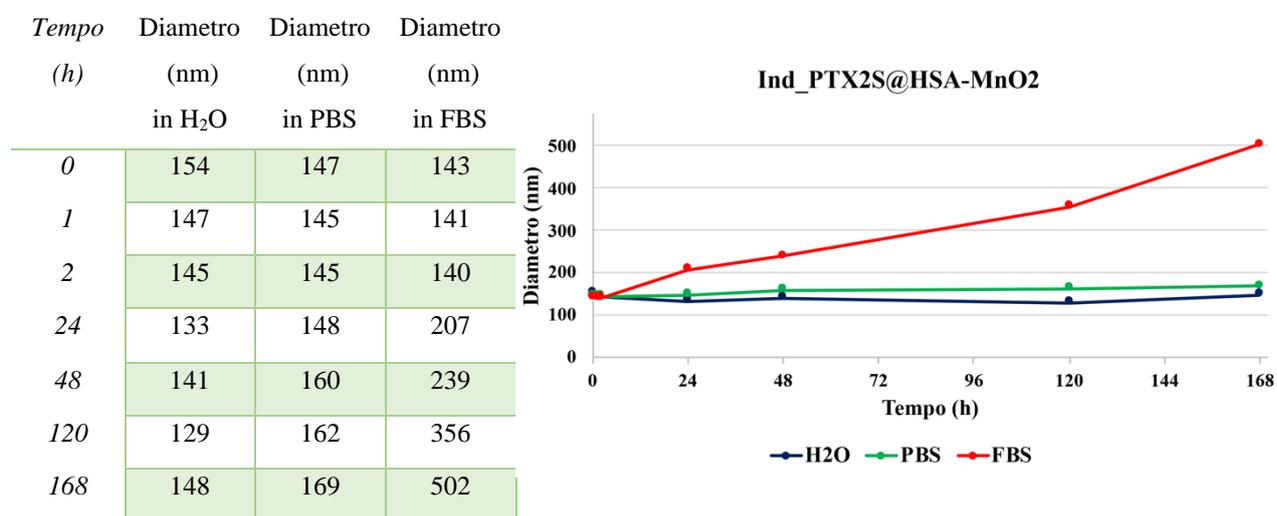
**Figura 20.** La corona proteica intorno ad una nanoparticella

La composizione del guscio superficiale che si forma, corona proteica, dipende dalla concentrazione delle proteine e dall'affinità di ciascuna proteina per la nanoparticella. La corona proteica influisce notevolmente su numerose proprietà delle NPs come la solubilità, la carica superficiale, la capacità di legare recettori cellulari e l'internalizzazione nelle cellule. 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.<sup>86</sup>

### 3.3.2 Stabilità nel tempo delle nanoparticelle Ind\_PTX<sub>2</sub>S@HSA-MnO<sub>2</sub>

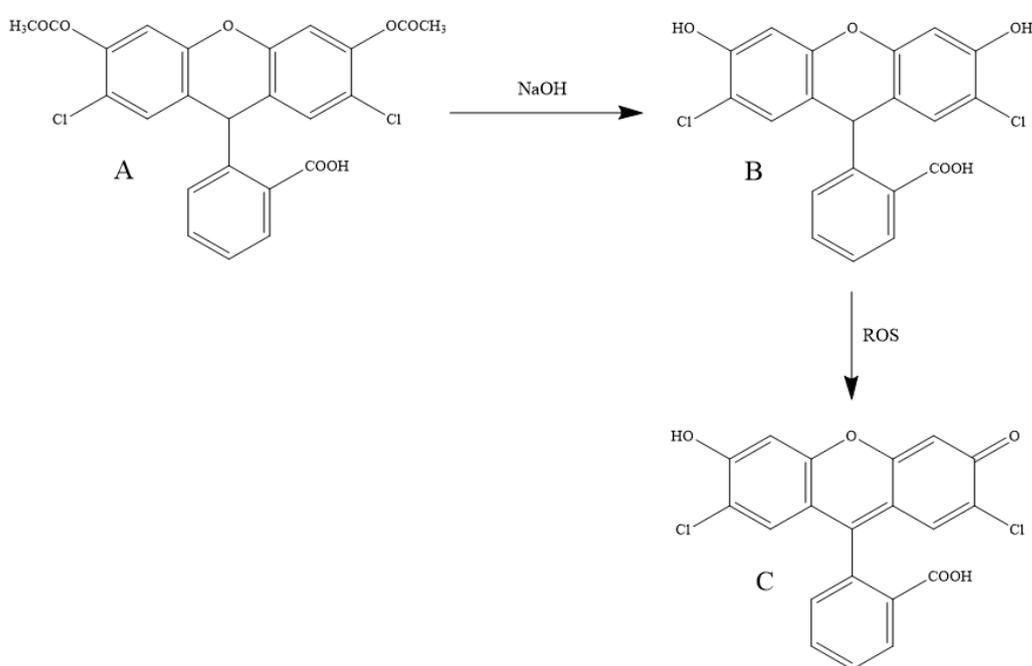
La stabilità, nel tempo, dei campioni di Ind\_PTX<sub>2</sub>S@HSA-MnO<sub>2</sub>, conservati al buio a 37 °C, è stata valutata mediante analisi DLS, a differenti intervalli di tempo (1, 2, 24, 48, 120, 168 ore) e in diverse condizioni (H<sub>2</sub>O, PBS a pH 7.4 con o senza FBS). In figura 18, è riportata la stabilità nel tempo delle NPs nelle tre diverse condizioni e in tabella sono elencati i valori delle dimensioni rilevati nel tempo. In ambiente acquoso (linea blu, Fig. 21) e in PBS (linea verde, Fig. 21) le NPs rimangono stabili per diversi giorni e non mostrano variazioni rilevanti nelle dimensioni. Come atteso, in presenza di FBS (linea rossa, Fig. 21), si osserva un significativo aumento delle dimensioni delle NPs nel tempo, a differenza di quanto osservato per le NPs senza il guscio di MnO<sub>2</sub>, probabilmente la presenza del manganese attrae più fortemente le proteine del siero.<sup>87</sup>



**Figura 21.** Stabilità nel tempo di Ind\_PTX<sub>2</sub>S@HSA-MnO<sub>2</sub> a 37 °C in H<sub>2</sub>O (linea blu), in PBS (linea verde) e in FBS (linea rossa). In tabella sono riportati i valori del diametro delle NPs a diversi intervalli di tempo.

### 3.4 Sviluppo di specie reattive all'ossigeno (ROS)

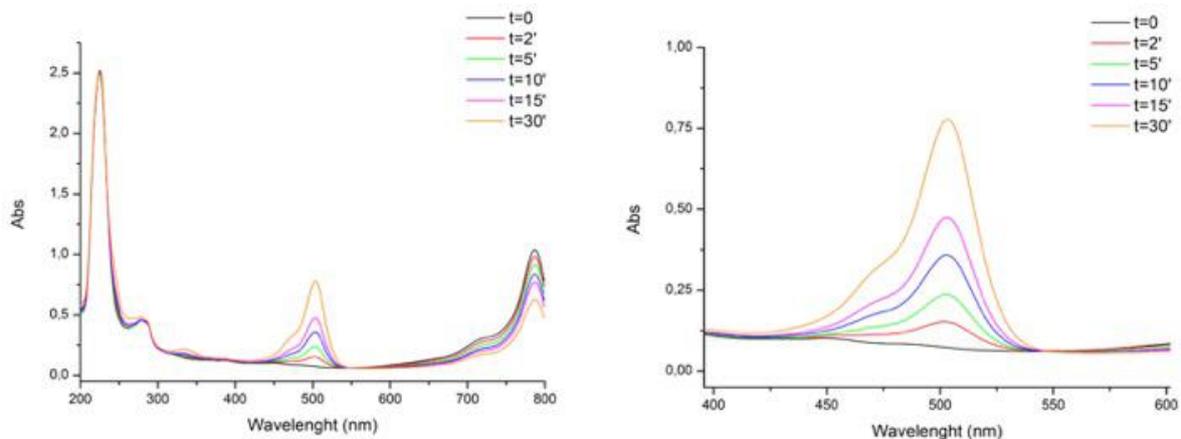
I ROS prodotti da IR780 agiscono come agenti citotossici, in grado di indurre la morte delle cellule tumorali. Pertanto, l'analisi della produzione di ROS da parte delle NPs a seguito di irraggiamento luminoso è stata condotta utilizzando la 2,7-diclorofluoresceina diacetato (DCFDA) come rivelatore chimico. La soluzione di DCFDA, non fluorescente, viene inizialmente idrolizzata in ambiente basico, con una soluzione di NaOH (0,01M), nella specie 2,7-diclorodiidrofluoresceina (DCFH<sub>2</sub>). I ROS prodotti, in seguito ad irraggiamento, ossidano la DCFH<sub>2</sub> in una specie fluorescente (DCF), che presenta un picco di assorbimento a 500 nm, d'intensità proporzionale alla quantità di ROS prodotti (Fig. 22).



**Figura 22.** DCFDA (A) idrolizzata, con NaOH, in DCFH<sub>2</sub> (B), i ROS ossidano DCFH<sub>2</sub> a DCF (C).

#### 3.4.1 Sviluppo di ROS da IR780\_vitE@HSA

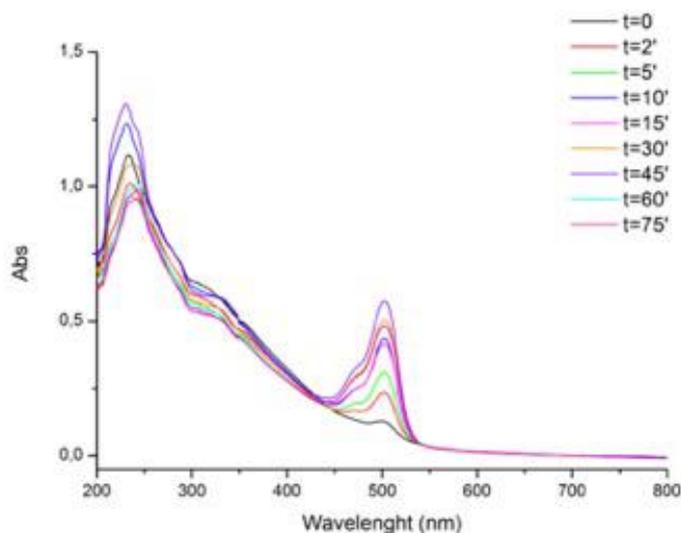
In figura 23 è riportato lo spettro di assorbimento a diversi tempi di irraggiamento di IR780\_vitE@HSA in presenza di una soluzione di DCFH<sub>2</sub>. Le NPs sono in grado di generare una quantità crescente di ROS, che aumenta proporzionalmente al tempo di irraggiamento.



**Figura 23.** Spettro di assorbimento della DCF del campione IR780\_vitE@HSA

### 3.4.2 Sviluppo di ROS da IR780\_vitE@HSA@MnO<sub>2</sub>

In Figura 24 è riportato lo spettro di assorbimento a diversi tempi di irraggiamento di IR780\_vitE@HSA@MnO<sub>2</sub> in presenza di una soluzione di DCFH<sub>2</sub>. Le NPs sono in grado di generare una quantità crescente di ROS, che aumenta proporzionalmente al tempo di irraggiamento, tuttavia la quantità di ROS prodotta risulta inferiore rispetto a quella generata da IR780\_vitE@HSA. Una possibile spiegazione potrebbe essere legata al fatto che MnO<sub>2</sub> sia in grado di consumare l'eventuale H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formatosi in seguito all'irraggiamento dell'agente fotosensibilizzante. Inoltre, si osserva la mancanza del picco di assorbimento a 793 nm, caratteristico dell'IR780, che potrebbe essere legata ad un'eventuale coordinazione del Mn<sup>2+</sup> da parte di IR780.

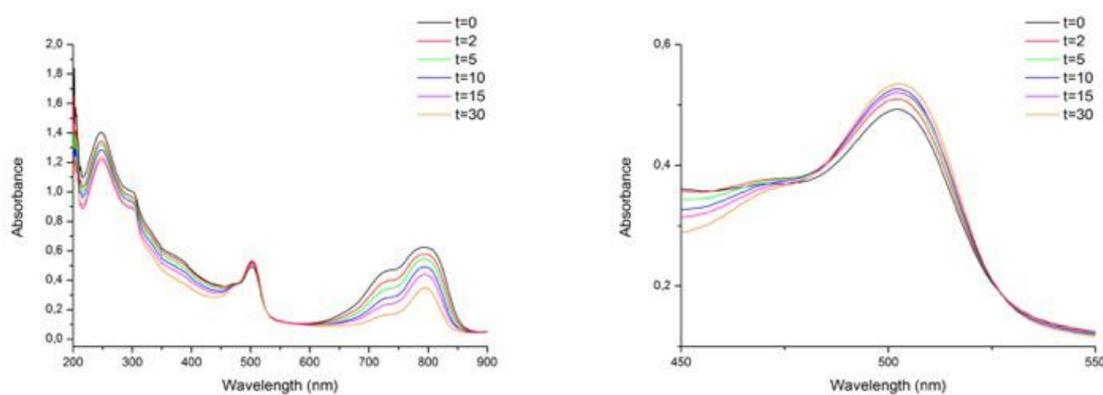


**Figura 24.** Spettro di assorbimento della DCF del campione IR780\_vitE@HSA@MnO<sub>2</sub>

Al fine di comprendere il razionale sotteso a questi due ultimi fenomeni descritti, sono in previsione ulteriori studi e approfondimenti.

### 3.4.3 Sviluppo di ROS da *Ind\_IR780\_PTX<sub>2</sub>S@HSA-MnO<sub>2</sub>*

In figura 25 è riportato lo spettro di assorbimento a diversi tempi di irraggiamento di *Ind\_IR780\_PTX<sub>2</sub>S@HSA-MnO<sub>2</sub>* in presenza di una soluzione di DCFH<sub>2</sub>. Le NPs sono in grado di generare una quantità crescente di ROS, che aumenta proporzionalmente al tempo di irraggiamento, paragonabile i ROS generati da *IR780\_vitE@HSA@MnO<sub>2</sub>*.



**Figura 25.** Spettro di assorbimento della DCF e dell'IR780 del campione *Ind\_IR780\_PTX<sub>2</sub>S@HSA-MnO<sub>2</sub>*

## 4. CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi viene descritta la sintesi e la caratterizzazione chimico-fisica di nanoparticelle multi-modali a base di albumina umana (human serum albumin, HSA), caricate con un pro-farmaco del paclitaxel (PTX<sub>2</sub>S), un agente fotosensibilizzante (IR780), un inibitore di IDO1 (Indoximod) e rivestite da un guscio di MnO<sub>2</sub>. Le analisi condotte mediante microscopio elettronico a trasmissione (TEM) e Dynamic Light Scattering (DLS) hanno rivelato che le nanoparticelle sono caratterizzate da forma sferica e da un diametro idrodinamico compreso tra i 108 e i 173 nm, pertanto adatte alla veicolazione di agenti antitumorali. Inoltre, la potenziale applicazione clinica del nanosistema sviluppato, è stata ulteriormente approfondita e confermata dalla straordinaria stabilità dimostrata in acqua, in ambiente fisiologico, e in seguito a liofilizzazione/ri-sospensione. Le nanoparticelle ottenute sono state inoltre sottoposte ad ultrafiltrazione, al fine di valutare la stabilità dell'interazione del sistema con IR780, dimostrando che l'agente fotosensibile non viene rilasciato e, quindi, rimane ancorato alle nanoparticelle di HSA. Infine, le nanoparticelle sono state irraggiate con luce bianca a tempi crescenti ed in presenza di un probe chimico, per verificare la loro capacità di produrre specie reattive dell'ossigeno (ROS). I dati ottenuti confermano che la produzione di ROS aumenta all'aumentare del tempo di irraggiamento. È importante sottolineare che, dagli studi preliminari, la presenza del guscio di MnO<sub>2</sub> non impedisce la produzione di ROS, pur diminuendone la quantità. Una possibile spiegazione potrebbe essere legata al fatto che MnO<sub>2</sub> sia in grado di consumare l'eventuale perossido di idrogeno formatosi in seguito all'irraggiamento dell'agente fotosensibile, ma sono in corso ulteriori studi per approfondire e verificare tale fenomeno.

Attualmente, presso l'Università di Torino si stanno completando le prime prove di citotossicità su linee di carcinoma mammario.

In futuro, saranno studiati i fenomeni di rilascio dei diversi agenti dalle nanoparticelle e sarà verificato se la presenza dell'ossido di manganese migliori l'ossigenazione del microambiente tumorale.

## 5. PARTE SPERIMENTALE

### 5.1 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).

### 5.2 Sintesi HSA-MnO<sub>2</sub>

Ad una soluzione di 50 mg di HSA in 1.4 mL di PBS è stata aggiunta goccia a goccia sotto vigorosa agitazione (600 rpm) una soluzione di 6.32 mg di KMnO<sub>4</sub> sciolti in 0.6 mL di H<sub>2</sub>O milliQ. La soluzione è agitata per 2h a 37 °C. HSA-MnO<sub>2</sub> è stata purificata mediante dialisi in H<sub>2</sub>O (MCWO: 14 kDa) per eliminare il PBS e il KMnO<sub>4</sub> in eccesso, e poi liofilizzata.

### 5.3 Preparazione nanoparticelle

#### 5.3.1 Preparazione NPs di HSA con vitamina E e IR780 (IR780\_vitE@HSA)

A 11 mg di HSA sciolti in 3 mL di H<sub>2</sub>O milliQ (3.7 mg/mL) viene aggiunta goccia a goccia sotto vigorosa agitazione una miscela di 0.77 mg di vitamina E in etanolo (15 mg/mL) e 0.77 mg di IR780 in etanolo (8 mg/mL). La soluzione viene agitata per 10 minuti (600 rpm) a temperatura ambiente. Le NPs sono state caratterizzate mediante tecnica di dynamic light scattering (DLS) previa diluizione del campione (200 µL in 1.8 mL di H<sub>2</sub>O), diametro 136 nm, P.I. 0.11. La soluzione si conserva stabilmente a 4 °C.

### *5.3.2 Deposizione di MnO<sub>2</sub> su IR780\_vitE@HSA (IR780\_vitE@HSA@MnO<sub>2</sub>)*

4 mg di IR780\_vitE@HSA liofilizzati vengono risospesi in 1 mL di H<sub>2</sub>O milliQ e posti sotto vigorosa agitazione. In seguito, sono stati aggiunti lentamente sotto vigorosa agitazione 0.138 mL di una soluzione acquosa di KMnO<sub>4</sub> (2.4 mg/mL). La soluzione viene agitata al buio per 30 minuti (600 rpm) a 37°C. Le NPs sono state liofilizzate.

### *5.3.3 Preparazione NPs di HSA con vitamina E e Indoximod (Ind\_vitE@HSA)*

A 0.76 mg di Indoximod vengono aggiunti sotto vigorosa agitazione 3.8 mg di HSA sciolti in 1.14 mL di H<sub>2</sub>O milliQ (3.3 mg/mL). La miscela è stata agitata vigorosamente e sonicata per circa un'ora fino a risultare limpida. In seguito, 0.23 mg di vitamina E in etanolo (15 mg/mL), sono stati aggiunti lentamente sotto agitazione. La soluzione viene agitata per 10 minuti (600 rpm) a temperatura ambiente. Le NPs sono state caratterizzate mediante tecnica di dynamic light scattering (DLS) previa diluizione del campione (200 µL in 1.8 mL di H<sub>2</sub>O), diametro 170 nm, P.I. 0.14. La soluzione si conserva stabilmente a 4 °C.

### *5.3.4 Preparazione NPs di HSA con vitamina E, Indoximod e IR780 (Ind\_IR780\_vitE@HSA)*

A 3.3 mg di Indoximod viene aggiunta sotto vigorosa agitazione una soluzione di 15.5 mg di HSA in 3.5 mL di H<sub>2</sub>O milliQ (3.6 mg/mL). La miscela è stata agitata vigorosamente e sonicata per circa un'ora fino a risultare limpida. In seguito, una soluzione contenente 1.1 mg di vitamina E in etanolo (15 mg/mL) e 1.1 mg di IR780 in etanolo (8 mg/mL) è stata aggiunta lentamente sotto agitazione. La soluzione viene agitata per 10 minuti (600 rpm) a temperatura ambiente. Le NPs sono state caratterizzate mediante tecnica di dynamic light scattering (DLS) previa diluizione del campione (200 µL in 1.8 mL di H<sub>2</sub>O), diametro 173 nm, P.I. 0.12. La soluzione si conserva stabilmente a 4 °C.

### *5.3.5 Deposizione di MnO<sub>2</sub> su Ind\_IR780\_vitE@HSA (Ind\_IR780\_vitE@HSA@MnO<sub>2</sub>)*

A 1.12 mL di una soluzione di Ind\_IR780\_vitE@HSA (4.9 mg/mL) sono stati aggiunti lentamente sotto vigorosa agitazione 0.08 mL di una soluzione acquosa di KMnO<sub>4</sub> (2.4 mg/mL). La soluzione viene agitata al buio per 30 minuti (600 rpm) a 37°C. Le NPs sono state caratterizzate mediante tecnica di dynamic light scattering (DLS) previa diluizione del campione (200 µL in 1.8 mL di H<sub>2</sub>O), diametro 161 nm, P.I. 0.17. La soluzione si conserva stabilmente a 4 °C.

### *5.3.6 Preparazione NPs di HSA con PTX<sub>2</sub>S e Indoximod (Ind\_PT<sub>2</sub>S@HSA)*

A 2.8 mg di Indoximod vengono aggiunti sotto vigorosa agitazione 10.7 mg di HSA sciolti in 3 mL di H<sub>2</sub>O milliQ (3.6 mg/mL). La miscela è stata agitata vigorosamente e sonicata per 3 h fino a risultare limpida. In seguito, 1.6 mg di PTX<sub>2</sub>S in etanolo (2 mg/mL) sono stati aggiunti lentamente sotto agitazione. La soluzione viene agitata per 10 minuti (600 rpm) a temperatura ambiente. Le NPs sono state caratterizzate mediante tecnica di dynamic light scattering (DLS) previa diluizione del campione (200 µL in 1.8 mL di H<sub>2</sub>O), diametro 108 nm, P.I. 0.17. La soluzione si conserva stabilmente a 4 °C.

### *5.3.7 Preparazione NPs di HSA con PTX<sub>2</sub>S, Indoximod e IR780 (Ind\_IR780\_PT<sub>2</sub>S@HSA)*

Ad 1 mg di Indoximod vengono aggiunti 5.5 mg di HSA sciolti in 1.5 mL di H<sub>2</sub>O milliQ (3.7 mg/mL). La miscela è stata agitata vigorosamente e sonicata per circa un'ora, fino a risultare perfettamente limpida. In seguito, una soluzione contenente 1.1 mg di PTX<sub>2</sub>S in etanolo (10 mg/mL) e 0.38 mg di IR780 in etanolo (10 mg/mL) è stata aggiunta lentamente sotto agitazione. La soluzione viene agitata per 10 minuti (600 rpm) a temperatura ambiente. Le NPs sono state caratterizzate mediante tecnica di dynamic light scattering (DLS) previa diluizione del campione (200 µL in 1.8 mL di H<sub>2</sub>O), diametro 145 nm, P.I. 0.18. La soluzione si conserva stabilmente a 4 °C.

### *5.3.8 Deposizione di MnO<sub>2</sub> su Ind\_IR780\_PT<sub>2</sub>S@HSA (Ind\_IR780\_PT<sub>2</sub>S@HSA@MnO<sub>2</sub>)*

A 0.6 mL di una soluzione di Ind\_IR780\_PT<sub>2</sub>S@HSA (5.7 mg/mL) sono stati aggiunti lentamente sotto vigorosa agitazione 2 mL di una soluzione acquosa di KMnO<sub>4</sub> (2.4 mg/mL). La soluzione viene agitata al buio per 30 minuti (600 rpm) a 37°C. Le NPs sono state caratterizzate mediante tecnica di dynamic light scattering (DLS) previa diluizione del campione (200 µL in 1.8 mL di H<sub>2</sub>O), diametro 213 nm, P.I. 0.29. La soluzione si conserva stabilmente a 4 °C.

### *5.3.9 Preparazione NPs di HSA-MnO<sub>2</sub> con PTX<sub>2</sub>S e Indoximod (Ind\_PT<sub>2</sub>S@HSA-MnO<sub>2</sub>)*

Ad una soluzione di 4.5 mg di HSA-MnO<sub>2</sub> in 1.26 mL di H<sub>2</sub>O milliQ (3.6 mg/mL) sono stati aggiunti a 1.2 mg di Indoximod. La miscela è stata agitata e sonicata, per circa 1h e 20', fino a risultare limpida. In seguito, 0.67 mg di PTX<sub>2</sub>S in etanolo (10 mg/mL) sono stati aggiunti lentamente alla miscela, sotto agitazione. Le NPs sono state caratterizzate mediante tecnica di dynamic light scattering (DLS) previa diluizione del campione (200 µL in 1.8 mL di H<sub>2</sub>O), diametro 150 nm, P.I. 0.13. La soluzione si conserva stabilmente a 4 °C.

### 5.3.10 Preparazione NPs di HSA-MnO<sub>2</sub> con PTX<sub>2</sub>S, Indoximod e IR780 (Ind\_IR780\_PTX<sub>2</sub>S@HSA-MnO<sub>2</sub>)

Ad una soluzione di 5.2 mg di HSA-MnO<sub>2</sub> in 1.46 mL di H<sub>2</sub>O milliQ (3.6 mg/mL) sono stati aggiunti a 1.4 mg di Indoximod. La miscela è stata agitata e sonicata, per circa 1h e 20', fino a risultare limpida. In seguito, una soluzione di 0.77 mg di PTX<sub>2</sub>S in etanolo (10 mg/mL) e 0.36 mg di IR780 in etanolo (10 mg/mL) è stata aggiunta lentamente alla miscela, sotto agitazione. Le NPs sono state caratterizzate mediante tecnica di dynamic light scattering (DLS) previa diluizione del campione (200 µL in 1.8 mL di H<sub>2</sub>O), diametro 186 nm, P.I. 0.19. La soluzione si conserva stabilmente a 4 °C.

## 5.4 Prove di stabilità delle NPs

### 5.4.1 Prove di stabilità di Ind\_PTX<sub>2</sub>S@HSA

- Stabilità in H<sub>2</sub>O: A 200 µL di una soluzione di Ind\_PTX<sub>2</sub>S@HSA (4 mg/mL) sono stati aggiunti 1.8 mL di H<sub>2</sub>O milliQ. La soluzione è incubata a 37 °C e le dimensioni delle NPs sono monitorate tramite DLS, a diversi intervalli di tempo.
- Stabilità in PBS a pH fisiologico=7.4: A 200 µL di una soluzione di Ind\_PTX<sub>2</sub>S@HSA (4 mg/mL) sono stati aggiunti 1.8 mL di PBS. La soluzione è incubata a 37 °C e le dimensioni delle NPs sono monitorate tramite DLS, a diversi intervalli di tempo.
- Stabilità in Fetal Bovine Serum: Per valutare la stabilità delle NPs in presenza delle proteine sieriche, a 200 µL di una soluzione di Ind\_PTX<sub>2</sub>S@HSA (4 mg/mL) sono stati aggiunti 1.44 mL di PBS e 360 µL di FBS. La soluzione è stata mantenuta alla temperatura di 37 °C e le dimensioni delle NPs sono monitorate tramite DLS, a diversi intervalli di tempo.

### 5.4.2 Prove di stabilità di Ind\_PTX<sub>2</sub>S@HSA-MnO<sub>2</sub>

- Stabilità in H<sub>2</sub>O: A 200 µL di una soluzione di Ind\_PTX<sub>2</sub>S@HSA-MnO<sub>2</sub> (4.8 mg/mL) sono stati aggiunti 1.8 mL di H<sub>2</sub>O milliQ. La soluzione è incubata a 37 °C e le dimensioni delle NPs sono monitorate tramite DLS, a diversi intervalli di tempo.
- Stabilità in PBS a pH fisiologico=7.4: A 200 µL di una soluzione di Ind\_PTX<sub>2</sub>S@HSA-MnO<sub>2</sub> (4.8 mg/mL) sono stati aggiunti 1.8 mL di PBS. La soluzione è incubata a 37 °C e le dimensioni delle NPs sono monitorate tramite DLS, a diversi intervalli di tempo.
- Stabilità in Fetal Bovine Serum: Per valutare la stabilità delle NPs in presenza delle proteine sieriche, a 200 µL di una soluzione di Ind\_PTX<sub>2</sub>S@HSA-MnO<sub>2</sub> (4.8 mg/mL)

sono stati aggiunti 1.44 mL di PBS e 360  $\mu$ L di FBS. La soluzione è stata mantenuta alla temperatura di 37 °C e le dimensioni delle NPs sono monitorate tramite DLS, a diversi intervalli di tempo.

## **5.5 Determinazione della produzione di ROS**

Per valutare la generazione di specie reattive all'ossigeno è stata preparata una soluzione di ROS Probe: 500  $\mu$ L 2,7-diclorofluoresceina diacetato (H<sub>2</sub>DCFDA) 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. Le soluzioni dei campioni di NPs sono state irraggiate, mediante lampada bianca a distanza di 40 cm, per diversi intervalli di tempo, ed è stato registrato lo spettro UV-Vis nell'intervallo 200-800 nm.

### *5.5.1 Produzione ROS da IR780\_vitE@HSA*

Il campione è stato preparato miscelando 500  $\mu$ L di tampone fosfato, 218  $\mu$ L di soluzione ROS probe, 100  $\mu$ L di una soluzione di IR780\_vitE@HSA (4 mg/mL) e 182  $\mu$ L di H<sub>2</sub>O milliQ.

La soluzione è stata irraggiata per 2', 5', 10', 15' e 30' mediante lampada bianca a distanza di 40 cm ed è stato registrato lo spettro UV-Vis nell'intervallo 200-800 nm.

### *5.5.2 Produzione ROS da IR780\_vitE@HSA@MnO<sub>2</sub>*

Il campione è stato preparato miscelando 500  $\mu$ L di tampone fosfato, 218  $\mu$ L di soluzione ROS probe, 100  $\mu$ L di una soluzione di IR780\_vitE@HSA@MnO<sub>2</sub> (5.7 mg/mL) e 182  $\mu$ L di H<sub>2</sub>O milliQ. La soluzione è stata irraggiata per 2', 5', 10', 15', 30', 45', 60', 75' mediante lampada bianca a distanza di 40 cm ed è stato registrato lo spettro UV-Vis nell'intervallo 200-800 nm.

### *5.5.3 Produzione ROS da Ind\_IR780\_PTX<sub>2</sub>S@HSA-MnO<sub>2</sub>*

Il campione è stato preparato miscelando 500  $\mu$ L di tampone fosfato, 218  $\mu$ L di soluzione ROS probe, 100  $\mu$ L di una soluzione di Ind\_IR780\_PTX<sub>2</sub>S@HSA-MnO<sub>2</sub> (5 mg/mL) e 182  $\mu$ L di H<sub>2</sub>O milliQ. La soluzione è stata irraggiata per 2', 5', 10', 15' e 30' mediante lampada bianca a distanza di 40 cm ed è stato registrato lo spettro UV-Vis nell'intervallo 200-900 nm.

## 6. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. Immunotherapies for autoimmune diseases. *Nat. Biomed. Eng.* 3, 247 (2019).
2. Blattman, J. N. & Greenberg, P. D. *Cancer Immunotherapy: A Treatment for the Masses. New Series* vol. 305.
3. Waldmann, T. A. Immunotherapy: past, present and future. *Nat. Med.* 9, 269–277 (2003).
4. Brassil, K. J. & Ginex, P. K. *History of Immunotherapy.* (2018).
5. Eric J. Askeland, Mark R. Newton, Michael A. O'Donnell, Y. L. Bladder Cancer Immunotherapy: BCG and Beyond. *Adv. Urol.* (2012) doi:10.1155/2012/181987.
6. Mellman, I., Coukos, G. & Dranoff, G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* 480, 480–489 (2011).
7. Parkin, J. & Cohen, B. An overview of the immune system. *Lancet* 357, 1777–1789 (2001).
8. Turvey, S. E. & Broide, D. H. Innate immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, S24–S32 (2010).
9. Marshall, J. S. & Jawdat, D. M. Mast cells in innate immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 114, 21–27 (2004).
10. Zwirner, N. W. & Ziblat, A. Regulation of NK Cell Activation and Effector Functions by the IL-12 Family of Cytokines: The Case of IL-27. *Front. Immunol.* 8, (2017).
11. Knight, Stella C. ; Stagg, A. J. Antigen-presenting cell types. *Curr. Opin. Immunol.* 5, 374–382 (1993).
12. Bonilla, F. A. & Oettgen, H. C. Adaptive immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, S33–S40 (2010).
13. William Hoffman , Fadi G Lakkis, G. C. B Cells, Antibodies, and More. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 7, 137–154 (2016).
14. Andersen, M. H., Schrama, D. & Becker, J. C. Cytotoxic T Cells. *Perspect. 32 J. Investig. Dermatology* 126, 32–41 (2006).
15. Zhang, N. & Bevan, M. J. CD8+ T Cells: Foot Soldiers of the Immune System. *Immunity* 35, 161–168 (2011).
16. Zhu, J. & Paul, W. E. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* doi:10.1182/blood-2008.
17. Varela, M. L., Mogildea, M., Moreno, I. & Lopes, A. Acute Inflammation and Metabolism. *Inflammation* 41, 1115–1127 (2018).

18. Lordan, R., Tsoupras, A. & Zabetakis, I. Inflammation. in *The Impact of Nutrition and Statins on Cardiovascular Diseases* 23–51 (Elsevier, 2019). doi:10.1016/B978-0-12-813792-5.00002-1.
19. Fleit, H. B. Chronic Inflammation. in *Pathobiology of Human Disease* 300–314 (Elsevier, 2014). doi:10.1016/B978-0-12-386456-7.01808-6.
20. Giannatempo, P. SPECIALITIES CORNER: Oncologia L'immunoterapia in oncologia. *Riv. Soc. Ital. di Med. Gen.* (2018).
21. Benelli, R. *Immunoncologia e Immunoterapia Oncologica: " la quinta strada " CORSO DI FORMAZIONE A DISTANZA.*
22. Buss, N. A. P. S., Henderson, S. J., McFarlane, M., Shenton, J. M. & De Haan, L. Monoclonal antibody therapeutics: History and future. *Current Opinion in Pharmacology* vol. 12 615–622 (2012).
23. DeMaria, P. J. & Bilusic, M. Cancer Vaccines. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 33, 199–214 (2019).
24. Butterfield, L. H. Cancer vaccines. *BMJ (Online)* vol. 350 (2015).
25. Hammerstrom, A. E., Cauley, D. H., Atkinson, B. J. & Sharma, P. Cancer Immunotherapy: Sipuleucel-T and beyond. *Pharmacotherapy* (2011) doi:10.1592/phco.31.8.813.
26. Kruti S. Jobanputra, Aruna V. Rajpal, N. G. N. Imiquimod. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* 72, (2006).
27. Ahmadzadeh, M. *et al.* Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood* 114, (2009).
28. Sadelain, M. CAR therapy: The CD19 paradigm. *Journal of Clinical Investigation* vol. 125 3392–3400 (2015).
29. Lipson, E. J. & Drake, C. G. Ipilimumab: An anti-CTLA-4 antibody for metastatic melanoma. *Clin. Cancer Res.* (2011) doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-1595.
30. Hamanishi, J., Mandai, M. & Konishi, I. Immune checkpoint inhibition in ovarian cancer. *Int. Immunol.* 28, 339–348 (2016).
31. Jenkins, R. W., Barbie, D. A. & Flaherty, K. T. Mechanisms of resistance to immune checkpoint inhibitors. *Br. J. Cancer* 118, 9–16 (2018).
32. Munn, D. H. *et al.* GCN2 Kinase in T Cells Mediates Proliferative Arrest and Anergy Induction in Response to Indoleamine 2,3-Dioxygenase. *Immunity* 22, 633–642 (2005).
33. Fox, E. *et al.* Indoximod: An Immunometabolic Adjuvant That Empowers T Cell Activity in Cancer. *Front. Oncol.* 8, (2018).

34. Cheong, J. E. & Sun, L. Targeting the IDO1/TDO2–KYN–AhR Pathway for Cancer Immunotherapy – Challenges and Opportunities. *Trends Pharmacol. Sci.* 39, 307–325 (2018).
35. Zhu, M. M. T., Dancsok, A. R. & Nielsen, T. O. Indoleamine Dioxygenase Inhibitors: Clinical Rationale and Current Development. *Curr. Oncol. Rep.* 21, 2 (2019).
36. Prendergast, G. C., Malachowski, W. P., DuHadaway, J. B. & Muller, A. J. Discovery of IDO1 Inhibitors: From Bench to Bedside. *Cancer Res.* 77, 6795–6811 (2017).
37. Yousef Zakharia, Olivier Rixe, John Harris Ward, Joseph J. Drabick, Montaser F. Shaheen, M. M. M. Phase 2 trial of the IDO pathway inhibitor indoximod plus checkpoint inhibition for the treatment of patients with advanced melanoma. *J. Clin. Oncol.* (2018) doi:10.1200/JCO.2018.36.15\_suppl.9512.
38. Gautam Gopalji Jha, Shilpa Gupta, Scott T. Tagawa, Joseph S Koopmeiners, Sithara Vivek, A. Z. D. A phase II randomized, double-blind study of sipuleucel-T followed by IDO pathway inhibitor, indoximod, or placebo in the treatment of patients with metastatic castration resistant prostate cancer (mCRPC). *J. Clin. Oncol.* (2017) doi:10.1200/JCO.2017.35.15\_suppl.3066.
39. Ashkan Emadi, Noa G. Holtzman, Mohammad Imran, Firas El Chaer, Madhurima Koka, Zeba Singh, Amir Shahlaee, Edward A. Sausville, Jennie Law, Seung Tae Lee, Arnob Banerjee, Aaron Rapoport, Maria R. Baer, Vu H. Duong, David H. Munn, Michael Loken, Eugene Kenn, C. L. INDOXIMOD IN COMBINATION WITH IDARUBICIN AND CYTARABINE FOR UPFRONT TREATMENT OF PATIENTS WITH NEWLY DIAGNOSED ACUTE MYELOID LEUKEMIA (AML): PHASE 1 REPORT. in *II Congress of the European Hematology Association* (2017).
40. Colman H, Mott F, Spira AI, Johnson TS, Zakharia Y, Vahanian NN, et al. A Phase I/II Study of the Combination of Indoximod and Temozolomide for Adult Patients With Temozolomide-Refractory Primary Malignant Brain Tumors. *J. Clin. Oncol.* (2015).
41. Wang, Q. *et al.* Immunogenic cell death in anticancer chemotherapy and its impact on clinical studies. *Cancer Lett.* 438, 17–23 (2018).
42. Garg, A. D., Dudek-Peric, A. M., Romano, E. & Agostinis, P. Immunogenic cell death. *Int. J. Dev. Biol.* 59, 131–140 (2015).
43. Kroemer, G., Galluzzi, L., Kepp, O. & Zitvogel, L. Immunogenic Cell Death in Cancer Therapy. *Annu. Rev. Immunol.* 31, 51–72 (2013).
44. S. Stangl, G. Themelis, L. Friedrich, V. Ntziachristos, A. Sarantopoulos, M. Molls, A. Skerra, G. M. Detection of irradiation-induced, membrane heat shock protein 70 (Hsp70)

- in mouse tumors using Hsp70 Fab fragment. *Radiother. Oncol.* (2011) doi:<https://doi.org/10.1016/j.radonc.2011.05.051>.
45. Tacar, O., Sriamornsak, P. & Dass, C. R. Doxorubicin: An update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J. Pharm. Pharmacol.* (2013) doi:10.1111/j.2042-7158.2012.01567.x.
  46. Michel Obeid, Antoine Tesniere, François Ghiringhelli, Gian Maria Fimia, Lionel Apetoh, Jean-Luc Perfettini, Maria Castedo, Grégoire Mignot, Theoharis Panaretakis, Noelia Casares, Didier Métivier, Nathanael Larochette, Peter van Endert, Fabiola Ciccosanti, L. Z. & G. K. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat. Med.* 54–61 (2007) doi:<https://doi.org/10.1038/nm1523>.
  47. Wang, T. H., Wang, H. S. & Soong, Y. K. Paclitaxel-induced cell death: Where the cell cycle and apoptosis come together. *Cancer* 88, 2619–2628 (2000).
  48. Garg, A. D. & Agostinis, P. ER stress, autophagy and immunogenic cell death in photodynamic therapy-induced anti-cancer immune responses. *Photochem. Photobiol. Sci.* 13, 474–487 (2014).
  49. Ezrahi, S., Aserin, A. & Garti, N. Basic principles of drug delivery systems – the case of paclitaxel. *Adv. Colloid Interface Sci.* 263, 95–130 (2019).
  50. Nicolaou, K. C. *et al.* Total synthesis of Taxol. *Nature* 367, 630–634 (1994).
  51. Kingston, D. G. I., Chaudhary, A. G., Gunatilaka, A. A. L. & Middleton, M. L. Synthesis of taxol from baccatin III via an oxazoline intermediate. *Tetrahedron Lett.* 35, 4483–4484 (1994).
  52. Richheimer, S. L., Tinnermeier, D. M. & Timmons, D. W. *High-Performance Liquid Chromatographic Assay of Taxol*. vol. 64 <https://pubs.acs.org/sharingguidelines> (1992).
  53. Fang, W.- & Liang, X.-. Recent Progress in Structure Activity Relationship and Mechanistic Studies of Taxol Analogues. *Mini-Reviews Med. Chem.* 5, 1–12 (2005).
  54. Fang, W.-S. & Liang, X.-T. *Recent Progress in Structure Activity Relationship and Mechanistic Studies of Taxol Analogues. Reviews in Medicinal Chemistry* vol. 5 (2005).
  55. Ojima, I.; Slater, J.C.; Michaud, E.; Kuduk, S.D.; Bounaud, P.-Y.; Vrignaud, P.; Bissery, M.-C.; Veith, J.; Pera, P.; Bernacki, R. J. J. Syntheses and Structure–Activity Relationships of the Second-Generation Antitumor Taxoids: Exceptional Activity against Drug-Resistant Cancer Cells. *J. Med. Chem* 30, 3889–3896 (1996).
  56. Barboni, L.; Lambertucci, C.; Ballini, R.; Appendino, G.; Bombardelli, E. Synthesis of a conformationally restricted analogue of paclitaxel. *Tetrahedron Lett.* 39, 7177–7180 (1998).

57. Walker, M.A.; Johnson, T.D.; Huang, S.; Vyas, D.M.; Kadow, J. F. B. Synthesis of a novel C-10 spiro-epoxide of paclitaxel. *Bioorg Med Chem Lett* (2001) doi:10.1016/s0960-894x(01)00280-3.
58. Chordia, M.D.; Yuan, H.; Jagtap, P.G.; Kadow, J.F.; Long, B.H.; Fairchild, C.R.; Johnston, K.A.; Kingston, D. G. I. Synthesis and bioactivity of 2,4-diacyl analogues of paclitaxel. *Bioorg. Med. Chem.* 9, 171–178 (2001).
59. Merckle, L.; Dubois, J.; Place, E.; Thoret, S.; Gueritte, F.; Guenard, D.; Poupat, C.; Ahand, A.; Potier, P. J. Semisynthesis of D-Ring Modified Taxoids: Novel Thia Derivatives of Docetaxel. *J. Org. Chem* 66, 5058–5065 (2001).
60. Giannakakou, P. *et al.* Paclitaxel-resistant Human Ovarian Cancer Cells Have Mutant  $\beta$ -Tubulins That Exhibit Impaired Paclitaxel-driven Polymerization. *J. Biol. Chem.* 272, 17118–17125 (1997).
61. Spratlin, J. & Sawyer, M. B. Pharmacogenetics of paclitaxel metabolism. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 61, 222–229 (2007).
62. Gornstein, E. & Schwarz, T. L. The paradox of paclitaxel neurotoxicity: Mechanisms and unanswered questions. *Neuropharmacology* 76, 175–183 (2014).
63. Gelderblom, H., Verweij, J., Nooter, K. & Sparreboom, A. Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. *Eur. J. Cancer* 37, 1590–1598 (2001).
64. Luo, C. *et al.* Self-Assembled Redox Dual-Responsive Prodrug-Nanosystem Formed by Single Thioether-Bridged Paclitaxel-Fatty Acid Conjugate for Cancer Chemotherapy. *Nano Lett.* 16, 5401–5408 (2016).
65. Lin, W. *et al.* Effect of Molecular Structure on Stability of Organic Nanoparticles Formed by Bodipy Dimers. *Langmuir* 32, 9575–9581 (2016).
66. Pei, Q., Hu, X., Li, Z., Xie, Z. & Jing, X. Small molecular nanomedicines made from a camptothecin dimer containing a disulfide bond. *RSC Adv.* 5, 81499–81501 (2015).
67. Pei, Q., Hu, X., Zhou, J., Liu, S. & Xie, Z. Glutathione-responsive paclitaxel dimer nanovesicles with high drug content. *Biomater. Sci.* 5, 1517–1521 (2017).
68. Li, Z. *et al.* Unadulterated BODIPY-dimer nanoparticles with high stability and good biocompatibility for cellular imaging. *Nanoscale* 6, 5662–5665 (2014).
69. Yang, B., Chen, Y. & Shi, J. Reactive Oxygen Species (ROS)-Based Nanomedicine. *Chem. Rev.* 119, 4881–4985 (2019).
70. Plaetzer, K., Krammer, B., Berlanda, J., Berr, F. & Kiesslich, T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers Med. Sci.* 24,

- 259–268 (2009).
71. Ferroni, C., Del Rio, A., Martini, C., Manoni, E. & Varchi, G. Light-Induced Therapies for Prostate Cancer Treatment. *Front. Chem.* **7**, (2019).
  72. Lucky, S. S., Soo, K. C. & Zhang, Y. Nanoparticles in Photodynamic Therapy. *Chem. Rev.* **115**, 1990–2042 (2015).
  73. Jiang, C. *et al.* Hydrophobic IR780 encapsulated in biodegradable human serum albumin nanoparticles for photothermal and photodynamic therapy. *Acta Biomater.* **14**, 61–9 (2015).
  74. Chen, Q. *et al.* Intelligent Albumin-MnO<sub>2</sub> Nanoparticles as pH-/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Responsive Dissociable Nanocarriers to Modulate Tumor Hypoxia for Effective Combination Therapy. *Adv. Mater.* **28**, 7129–7136 (2016).
  75. Szatrowski<sup>2</sup>, T. P. & Nathan, C. F. *Production of Large Amounts of Hydrogen Peroxide by Human Tumor Cells*<sup>1</sup>. (1991).
  76. Wang, T. *et al.* Bis-sulfide bioconjugates for glutathione triggered tumor responsive drug release. *Chem. Commun.* **50**, 1116–1118 (2014).
  77. Nicholls, P., Fita, I. & Loewen, P. C. Enzymology and structure of catalases. in *Advances in Inorganic Chemistry* vol. 51 51–106 (Academic Press Inc., 2000).
  78. Zhu, P., Chen, Y. & Shi, J. Nanoenzyme-Augmented Cancer Sonodynamic Therapy by Catalytic Tumor Oxygenation. *ACS Nano* **12**, 3780–3795 (2018).
  79. Alves, C. G., Lima-Sousa, R., de Melo-Diogo, D., Louro, R. O. & Correia, I. J. IR780 based nanomaterials for cancer imaging and photothermal, photodynamic and combinatorial therapies. *Int. J. Pharm.* **542**, 164–175 (2018).
  80. Li, Y. *et al.* IR-780 Dye as a Sonosensitizer for Sonodynamic Therapy of Breast Tumor. *Sci. Rep.* **6**, 25968 (2016).
  81. Davis, M. E., Chen, Z. & Shin, D. M. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **7**, 771–782 (2008).
  82. Hoogenboezem, E. N. & Duvall, C. L. Harnessing albumin as a carrier for cancer therapies. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **130**, 73–89 (2018).
  83. Zhao, S., Wang, W., Huang, Y., Fu, Y. & Cheng, Y. Paclitaxel loaded human serum albumin nanoparticles stabilized with intermolecular disulfide bonds. *Medchemcomm* **5**, 1658–1663 (2014).
  84. Meng, L. *et al.* Oxygen-rich chemotherapy via modified Abraxane to inhibit the growth and metastasis of triple-negative breast cancer. *Biomater. Sci.* **7**, 168–177 (2019).
  85. Pan, J. *et al.* Mimicking Drug–Substrate Interaction: A Smart Bioinspired Technology

- for the Fabrication of Theranostic Nanoprobes. *Adv. Funct. Mater.* 27, (2017).
86. Casals, E., Pfaller, T., Duschl, A., Oostingh, G. J. & Puntès, V. Time Evolution of the Nanoparticle Protein Corona. *ACS Nano* 4, 3623–3632 (2010).
87. Baral, A., Satish, L., Das, D. P., Sahoo, H. & Ghosh, M. K. Construing the interactions between MnO<sub>2</sub> nanoparticle and bovine serum albumin: insight into the structure and stability of a protein–nanoparticle complex. *New J. Chem.* 41, 8130–8139 (2017).