Nanoparticelle

Le nanoparticelle (NP) sono particelle di materiali organici o inorganici con dimensioni lineari tra 1 nm (la miliardesima parte del metro, cioè 10^{-9} m, ossia 10 Å) e 500 nm (raramente >700 nm e comunque inferiori a 1 μm). Poiché gli atomi hanno mediamente un diametro di un terzo di nanometro, una nanoparticella solida di 5 nm sarà costituita da poche migliaia di atomi, mentre una di 50 nm da qualche milione di atomi. Si possono avere NP metalliche (Au, Ag, ecc.) o di materiali semiconduttori (Si, CdSe, ecc.). Si possono anche avere NP composte da due o più parti di materiali diversi. Per esempio, NP cosiddette *core-shell*, con un nocciolo (*core*) di CdSe ricoperte da un sottile strato (*shell*) di CdS.

Le nanoparticelle hanno due caratteristiche che le rendono particolarmente importanti:

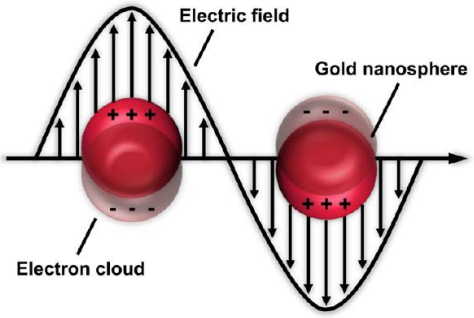
1. Le loro proprietà dipendono non solo dalla loro composizione, ma anche dalla loro **dimensione** e dalla loro **forma** (possono essere sferiche, cilindriche, a stella, cave…).
2. Hanno un elevatissimo rapporto superficie/volume. Questo è molto importante, perché ogni interazione delle NP con l'ambiente esterno avviene tramite gli atomi alla superficie.

Per quanto riguarda la terapia fototermica, che tratteremo fra poco, ci interessa capire come le nanoparticelle interagiscono con la radiazione elettromagnetica. Questa interazione definisce innanzitutto il loro colore che, per alcuni tipi di NP, dipende sia dalla dimensione che dalla forma, un fenomeno che non avviene a livello macro.

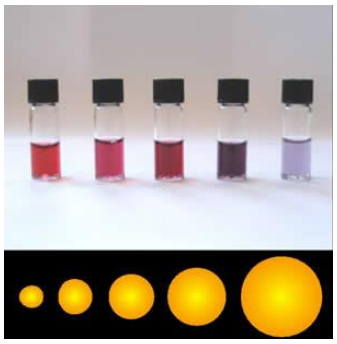
Le NP sono spesso disperse in una **soluzione collodiale**, cioè uno stato finemente disperso formato da particelle/aggregati di dimensioni microscopiche (diametro da 1 nm a 1000 nm) disperse in una fase liquida; le particelle non tendono a depositarsi rapidamente. In pratica un colloide è uno stato intermedio tra la soluzione omogenea e la dispersione eterogenea o sospensione (particelle > 1 μm). Normalmente le soluzioni sono limpide. I sistemi colloidali, invece, si presentano spesso torbidi, benché questo non sia un criterio assoluto. Il colloide d'oro appare molto limpido, mentre quello d'argento è effettivamente torbido con colori "fangosi".

Nel caso dei metalli massivi esposti a una radiazione con frequenze nel visibile e nell'ultravioletto, la risposta del materiale è dovuta principalmente agli elettroni di valenza. Contrariamente ai materiali isolanti o semiconduttori, infatti, gli elettroni di valenza sono legati debolmente agli ioni metallici (sono praticamente elettroni liberi) e possono rispondere facilmente a un campo elettrico oscillante. Questi elettroni sono in grado di sostenere oscillazioni collettive, in cui cioè si muovono tutti in fase, a una **frequenza propria**, detta **frequenza di plasma** (che dipende essenzialmente dalla densità di elettroni di valenza). Questo moto oscillatorio degli elettroni che seguono il moto sinusoidale del campo elettrico (cioè della radiazione elettromagnetica, ossia della luce incidente) è detto **moto plasmonico** o plasmone. I **plasmoni** sono le oscillazioni degli elettroni di valenza del metallo, cioè quelli della banda di conduzione. Le oscillazioni sono conseguenti alla formazione di un dipolo elettrico nel materiale causato dal campo elettrico della radiazione incidente. Gli elettroni si spostano nel materiale per ripristinare il suo stato iniziale, cioè annullare il dipolo. Siccome il campo elettrico della radiazione luminosa è oscillante, e quindi inverte di continuo il dipolo, esso costringe gli elettroni a oscillare anch'essi alla frequenza di plasma. Quando la frequenza della luce incidente è uguale alla frequenza del plasma di elettroni si ha il massimo accoppiamento (questa è detta **frequenza di risonanza**). Il campo elettromagnetico può propagarsi efficacemente in un metallo solo alla frequenza di risonanza, poiché in questo caso campo elettrico e oscillazione di plasma sono sfasati di 90° e non si ha dissipazione. A frequenze diverse, invece, si ha poca o non si ha affatto propagazione, e il metallo perciò riflette la luce ricevuta. Poiché la frequenza di plasma dei metalli massivi cade generalmente nella regione ultravioletta, la luce visibile non si può propagare nel metallo. Perciò molti metalli sono totalmente riflettenti, in accordo con l'esperienza quotidiana. L'oro fa eccezione, in quanto a causa dei cosiddetti "effetti relativistici" la differenza di energia fra gli orbitali 5d e 6s diventa sufficientemente piccola da fare si che la transizione 5d → 6s cada nella regione blu dello spettro visibile, che viene quindi assorbita (in alternativa si può dire che la frequenza di plasma cade a lunghezze d'onda maggiori che in altri metalli). Il colore giallo che

noi vediamo è la componente della luce bianca non assorbita ma riflessa, cioè la luce complementare (e il giallo è complementare al blu).
Anche nel caso delle nanoparticelle metalliche l'assorbimento della luce (e quindi il colore) è dovuto alle oscillazioni collettive degli elettroni di valenza, cioè i plasmoni, come nel caso macroscopico. Tuttavia, nella nanoscala queste oscillazioni dipendono non solo dal materiale, ma anche dalla dimensione e dalla forma degli oggetti e dal mezzo che li circonda. Come nei metalli massivi, quando la radiazione elettromagnetica incide sulle NP induce un dipolo elettrico istantaneo spostando gli elettroni di valenza lungo la direzione del campo. In questo modo sulla superficie si produce una carica negativa netta a un estremo, e una carica positiva di uguale intensità all'estremità opposta della nanoparticella (figura). Questo sbilanciamento di carica induce a sua volta una forza di richiamo per gli elettroni, come in un sistema massa-molla, analogamente al caso del metallo massivo. Qui, tuttavia, l'intensità della forza di richiamo dipende dalla **densità di carica di superficie** e, perciò, dalla **dimensione** e dalla **forma** della superficie stessa. Dipende inoltre dal mezzo che la circonda, tramite la sua costante dielettrica. Nell'analogia del sistema massa-molla, la **costante dielettrica del mezzo** che circonda la NP può essere pensata come una misura della viscosità di una sostanza quale un olio. Come una molla nel vuoto oscillerà con una frequenza più alta rispetto ad una molla immersa nell'olio, così anche per le oscillazioni plasmoniche.

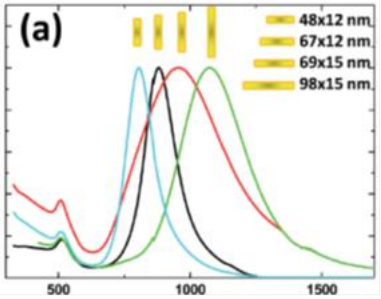


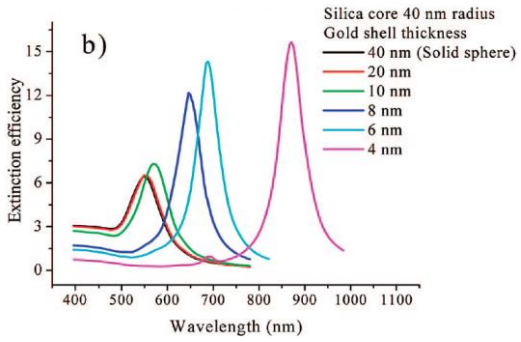
Queste eccitazioni collettive delle cariche elettroniche sono dette *Localized Surface Plasmon Resonances* (**LSPR**), per sottolineare il fatto che tali moti collettivi hanno luogo vicino alla superficie del materiale, e sono localizzati nel volume ridotto di una nanoparticella. Queste eccitazioni infatti sono possibili solo se la lunghezza d'onda della luce è molto più grande del diametro della particella. Poiché la luce visibile ha lunghezze d'onda dell'ordine delle centinaia di nanometri, è necessario che la particella abbia diametro nanometrico per dare luogo a queste eccitazioni. D'altra parte, se la radiazione elettromagnetica ha una frequenza risonante con queste oscillazioni, l'interazione tra la radiazione e la nanoparticella è estremamente intensa, cioè le bande di assorbimento sono **molto intense**, 5 ordini di grandezza o anche più rispetto ai migliori cromofori organici. In altre parole, ogni NP metallica può essere considerata come equivalente fino a un milione di molecole di un colorante classico. Per questo motivo le NP metalliche, che sono anche fluorescenti e soprattutto diffrangono la luce incidente (*scattering*), in particolare alla LSPR, trovano sempre maggiori applicazioni come sensori ottici al posto dei classici cromofori. Ad esempio, una NP di oro del diametro di 80 nm alla LSPR dà uno *scattering* della luce che è 5 ordini di grandezza più intenso della tipica emissione di fluorescenza di un colorante. Inoltre, al contrario dei cromofori organici, le NP sono foto-stabili (non subiscono il cosiddetto *photo-bleaching*) e quindi possono venire eccitate con luce di intensità maggiore e per tempi più lunghi.



Le LSPR delle nanoparticelle di oro (**AuNP**) hanno energia più bassa di quelle dell'oro macroscopico, e cadono generalmente nel visibile. Le NP danno perciò una specifica colorazione alla matrice in cui sono immerse. All'aumentare delle dimensioni delle nanoparticelle, la frequenza di risonanza diminuisce, cioè si sposta verso il rosso per AuNP sferiche a diametro crescente (figura). Ancora più sensibile è la dipendenza della frequenza di assorbimento dall'indice di rifrazione (costante dielettrica) del mezzo. Una costante dielettrica maggiore induce una frequenza plasmonica, e quindi di assorbimento, più bassa, sempre più spostata verso il rosso.
Come già detto, nella scala nanometrica anche la **forma** ha influenza sulle frequenze di assorbimento della luce, e quindi sul colore della soluzione colloidale delle NP. Infatti, con le nanosfere la LSPR si sposta verso il rosso al crescere del diametro, ma non va oltre 700 nm. Però

particelle meno simmetriche hanno LSPR che arrivano nel vicino infrarosso (NIR). Per esempio, NP di forma allungata, come per esempio i nanocilindri (*nanorods*), avranno due modi principali di oscillazione e quindi due bande di assorbimento: un modo longitudinale, parallelo all'asse maggiore, con una banda intensa a frequenza più bassa (variabile fra 640 e 850 nm), e uno trasversale con una banda poco intensa a frequenza più alta (ca. 520 nm, figura).



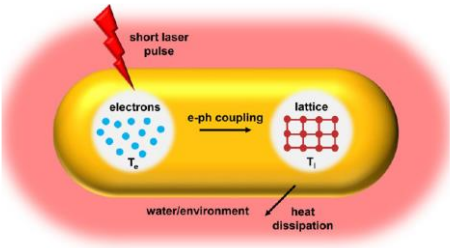


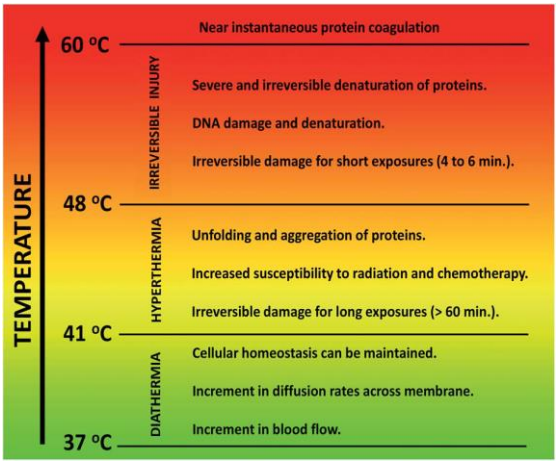
Il colore dei nanocilindri dipende marcatamente dal rapporto fra le due dimensioni (*aspect ratio*). Anche con le *nanoshell*, aventi un *core* di silice ricoperto da uno strato di oro, è possibile modulare la LSPR variando lo spessore dello strato metallico: diminuendo lo spessore si arriva nel NIR (figura). Le cosiddette *nanocages*, vuote all'interno, hanno andamenti simili. Inoltre, se due o più nanoparticelle si avvicinano molto, un fenomeno di aggregazione molto comune nelle soluzioni colloidali, possono sviluppare modi di oscillazione della carica elettronica comuni. In pratica, dal punto di vista ottico, più NP aggregate appariranno come un'unica nanoparticella più grande e, quindi, con una frequenza di assorbimento più bassa.

Terapia fototermica (Photothermal Therapy, PTT)

Nel campo biomedico, il settore che ha visto il maggior sviluppo dell'uso di nanoparticelle è senza dubbio quello del **drug delivery**. Ci sono già numerose formulazioni approvate e commercialmente disponibili e senza dubbio altre seguiranno. La motivazione che spinge la ricerca in questo settore è quella di migliorare le caratteristiche farmaco-cinetiche, di *targeting* e di stabilità dei farmaci. Tuttavia in questi casi le NP non sono esse stesse attive dal punto di vista terapeutico, ma fungono da *carrier*. Noi esaminiamo i **casi in cui le NP stesse sono il farmaco (indirettamente)**.

L'ultimo ventennio ha visto una fortissima crescita di interesse nella possibilità di utilizzare la **terapia fototermica** (**PTT**) per la rimozione (ablazione) dei tumori solidi (i primi esperimenti su colture cellulari *in vitro* risalgono solo al 2003 e quelli su cavie al 2004). La PTT prevede l'utilizzo di nanoparticelle plasmoniche che devono localizzarsi nel tumore. Le NP sono somministrate per via endovena o direttamente intra-tumorale.

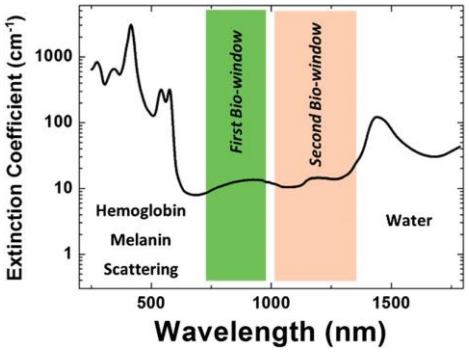




Irraggiando il tumore con luce della frequenza di risonanza plasmonica, questa viene assorbita dalle NP. Il **decadimento non-radiativo** genera calore che può fare aumentare la temperatura abbastanza da causare danni cellulari irreversibili e conseguente regressione del tumore. L'energia degli elettroni eccitati nella banda di conduzione viene trasferita prima al reticolo di nuclei d'oro della NP, e poi da questo all'ambiente circostante (figura). La differenza tra i tradizionali trattamenti di ipertermia (spesso condotti in combinazione con chemio e radio-terapia), che prevedono di riscaldare il tumore fra 41 e 48 °C per un certo tempo, e la terapia fototermica sta nel fatto che il **riscaldamento fototermico** è **localizzato** nelle immediate vicinanze delle nanoparticelle e la temperatura locale può salire di decine di gradi (per tempi brevi, con i laser pulsati). Ciò implica che il riscaldamento fototermico può essere più focalizzato sul tumore (purché la localizzazione

delle NP sia selettiva!), inducendo danni minori ai tessuti sani circostanti. Da tenere presente tuttavia che in certi tipi di tumori si è vista una sovra-espressione delle proteine *heat shock*, rendendo le cellule tumorali più resistenti nei confronti della terapia termica, per cui c'è da aspettarsi che tumori diversi possano rispondere alla PTT in modo diverso. La figura mostra gli effetti causati alla materia vivente da temperature crescenti. Riscaldamento a temperature >48°C per alcuni minuti porta a danni irreversibili.

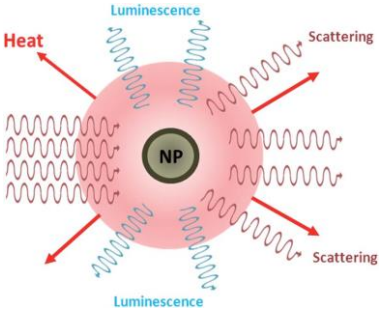
L'aumento di temperatura nel tumore dipende dall'efficienza della conversione fototermica delle NP, dalla concentrazione di NP nel tumore e dalla dose di luce somministrata. Per massimizzare la probabilità di successo dell'ablazione termica bisogna utilizzare NP in grado di assorbire luce nel

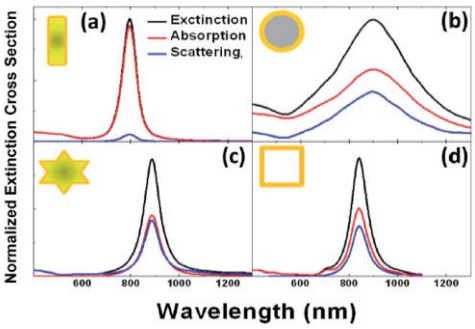


vicino infrarosso (NIR), che come già sappiamo penetra più a fondo nei tessuti poiché viene assorbita meno dai componenti endogeni, in particolare l'emoglobina, e dall'acqua. L'**estinzione complessiva** della radiazione luminosa da parte di un tessuto è dovuta a due componenti, l'assorbimento e lo *scattering* (che diminuisce al crescere della lunghezza d'onda). La figura mostra un tipico spettro di estinzione complessiva per un tessuto umano; l'assorbimento è dovuto principalmente a emoglobina e all'acqua. La finestra utile (dove comunque l'estinzione non si azzera mai) si estende da 700 a 1400 nm (con un buco fra 980 e 1000 nm dovuto a una banda di assorbimento dell'acqua). La regione del NIR (*first bio-window*) è preferita perché minimizza l'assorbimento di energia luminosa da parte dell'acqua, che produce riscaldamento generalizzato (*background heating*).

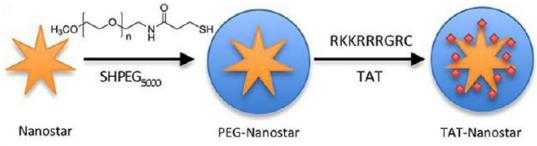
In pratica la PTT utilizza nanoparticelle inserite nei tumori per convertire l'energia luminosa (di solito generata da un laser) in calore per distruggere le cellule tumorali.

I principali criteri di cui bisogna tenere conto nella progettazione di NP per PTT sono: *i*) minima tossicità e massima biocompatibilità; *ii*) diametro fra 30 e 200 nm per garantire un lungo tempo di permanenza in circolo e aumentare l'accumulo nel tumore (EPR); *iii*) capacità di assorbire luce NIR; *iv*) una **assorbanza elevata** in modo da massimizzare la conversione della luce in calore. Fra le varie NP studiate, le AuNP sono quelle che meglio soddisfano questi criteri, soprattutto perché le loro proprietà ottiche possono essere modulate modificando la loro dimensione, forma e struttura. La cosiddetta *absorption cross-section* (cioè l'equivalente del coefficiente di estinzione di una molecola) delle AuNP nel NIR è $10^8 - 10^{10}$ M^{-1} cm^{-1}, cioè diversi ordini di grandezza superiore anche alla più intensa banda di un cromoforo organico. L'assorbanza, caratterizzata da un *absorption cross-section*, rappresenta normalmente il contributo principale all'estinzione complessiva (il resto è dato dallo *scattering*), e dal momento che le AuNP più piccole di solito hanno un coefficiente di estinzione maggiore rispetto a quelle più grandi, esse sono dei "nano-riscaldatori" più efficienti. Infatti, per massimizzare la conversione della luce incidente in calore, è opportuno che la luce diffusa (*scatterata*) – e quindi non assorbita – sia minima e che il decadimento radiativo (luminescenza, utile eventualmente per *imaging*) sia anche minimo (di solito la resa quantica per la luminescenza è molto bassa). La figura sopra riassume queste possibilità. La figura successiva mostra come, al variare della forma della AuNP, varia il contributo relativo di *scattering* e assorbanza all'estinzione complessiva; sono considerati i casi di *nanorod*, *nanoshell* (con un *core* di silice), *nanostar*, e *nanocage* (cave).



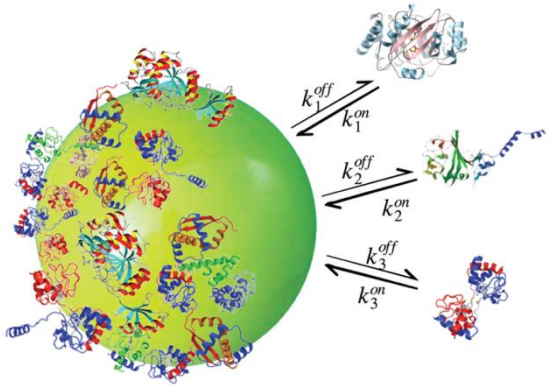


Molto spesso poi le AuNP sono funzionalizzate sulla superficie con polimeri biocompatibili, tipo PEG (polietilen-glicole) che serve a minimizzare l'aggregazione delle NP e ad aumentare il tempo di permanenza nel circolo sanguigno. Il PEG viene funzionalizzato con un gruppo terminale SH (SHPEG) per ancorarlo all'oro, in quanto il legame Au–S è molto forte.
Tra gli ulteriori vantaggi dell'uso di AuNP per PTT ricordiamo: *i*) le preparazioni vengono fatte (quasi sempre) in fase acquosa ed è possibile controllare efficacemente forma e dimensioni delle NP. Tuttavia, anche se è stato dimostrato che è possibile effettuare lo *scale up* di alcune preparazioni, bisogna ricordare che la sintesi di nanomateriali è nota per essere scarsamente riproducibile e non esistono due batch della stessa NP che siano esattamente uguali; *ii*) l'oro è un metallo molto inerte (e quindi potenzialmente biocompatibile) e le AuNP non dimostrano citotossicità a concentrazioni clinicamente rilevanti; *iii*) a causa dell'effetto EPR (*ma vedi anche quanto riportato sotto e nelle slides!*), nanoparticelle con diametro compreso fra 60 e 400 nm possono extra-vasare nei tumori solidi, godendo così di un meccanismo passivo di selettività (*passive targeting*) per i tumori; *iv*) infine è possibile funzionalizzare la loro superficie con relativa facilità, cioè è possibile generare *targeted*-AuNP, funzionalizzando la superficie con opportuni *targeting vectors* che ne favoriscano la concentrazione nel tumore. Sono state utilizzate a questo proposito una varietà di piccole molecole, proteine, peptidi (e.g. *cell-penetrating peptides*, CPP), anticorpi monoclonali che si leghino a proteine sovra-espresse dai tumori… Ad esempio, AuNP sono state funzionalizzate con anticorpi monoclonali anti-*epidermal growth factor receptor* (EGFR) allo scopo di aumentare l'*uptake* delle nanoparticelle in quei tumori che sovra-esprimono EGFR. Fra le piccole molecole ricordiamo il folato, che facilita la traslocazione delle AuNP nelle cellule tumorali che sovra-esprimono i recettori del folato tramite endocitosi mediata dal recettore. I *targeting vectors*, così come il PEG, vengono tipicamente funzionalizzati con gruppi SH, per formare il legame Au–S. La figura mostra schematicamente una nanoparticella di oro a forma di stella, *nanostar*, ricoperta prima di PEG e poi funzionalizzata con il *cell-penetrating peptide* TAT. Da notare, tuttavia, che il ricoprimento superficiale delle NP può modificarne la capacità termica e quindi alterare l'efficienza di riscaldamento fototermico.



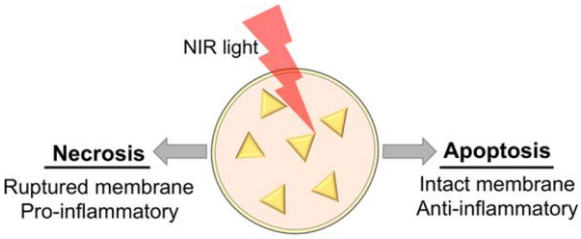
Sono state studiate anche AuNP multifunzionali, cioè combinazioni di AuNP con altri sistemi sia per *imaging* sia per trattamenti combinati. Ad esempio, si è cercato di combinare la PTT con la terapia fotodinamica, PDT, per aumentare la probabilità di uccidere le cellule tumorali. Come fotosensibilizzatori sono stati usati dei macrocicli tetrapirrolici con bande di assorbimento nella zona 600 – 800 nm già approvati per PDT, coniugati alle AuNP.
Rimane aperta la questione se il notevole sforzo aggiuntivo che bisogna fare per preparare le *targeted*-AuNP (anche in termini di costi) sia sufficientemente efficace per aumentare l'accumulo di nanoparticelle nel tumore e se questo comporti un significativo aumento di successo per la PTT *in vivo* piuttosto che affidarsi soltanto all'effetto EPR (che tuttavia studi recenti mettono in discussione). Alcuni studi hanno dimostrato che mentre la funzionalizzazione (*active targeting*) fa effettivamente aumentare l'*uptake* delle AuNP *in vitro*, non è parimenti efficace *in vivo*, dove l'accumulo nel tumore è solitamente meno del 10% della dose somministrata endovena, cioè non c'è differenza significativa rispetto al *passive targeting*. Studi recenti hanno trovato che *in vivo*, per NP inorganiche funzionalizzate con *cancer targeting vectors*, solo una piccola frazione (0.7%) di quelle somministrate endovena raggiunge il tumore e una quantità molto piccola (0.0014%) riesce effettivamente ad entrare nelle cellule tumorali.
Una delle ragioni per il modesto *uptake* nel tumore è il forte accumulo di nanoparticelle da parte del **sistema reticolo-endoteliale**, la prima linea di difesa del nostro organismo (anche noto come sistema fagocitario mononucleare, *mononuclear phagocyte system*). I suoi componenti, cioè i monociti, le cellule dendritiche e i macrofagi che sono presenti nel fegato, nella milza e nel sangue sequestrano particelle più grandi di *ca*. 100 nm (la grande maggioranza di NPs viene catturata nel giro di pochi minuti). Particelle più piccole di 5 nm vengono escrete rapidamente tramite i reni. Una

buona percentuale di particelle fra 5 e 100 nm può anche venire sequestrata dai macrofagi, ma in minor quantità rispetto a quelle più grandi. Questo spiegherebbe perché la maggior parte delle AuNP *in vivo* vengono accumulate nel fegato e nella milza, malgrado le differenze nel loro design. La PEGilazione delle AuNP fa diminuire la loro cattura da parte del sistema reticolo-endoteliale. Si ritiene che un ulteriore motivo per lo scarso accumulo di AuNP nei tumori, cioè la sostanziale inefficienza dei *targeting vectors*, è la formazione di una **"biocorona" di proteine** intorno alle NP *in vivo* (figura) Questa corona di proteine può schermare i *targeting vectors* e così ridurne l'efficacia.



Sebbene il maggiore interesse per l'uso in PTT si sia concentrato sulle AuNP, ci sono studi che riguardano sia NP di altri metalli, soprattutto Ag, ma anche nanoparticelle differenti: nanocristalli di semiconduttori (i cosiddetti *quantum dots*), nanocristalli drogati con ioni dei lantanidi, nanoparticelle a base di carbonio, nanoparticelle di silice porosa, e infine nanoparticelle organiche (tipicamente polimeriche). Le NP di carbonio, e soprattutto i nanotubi di carbonio, pur essendo meno efficienti delle AuNP nella conversione luce-calore hanno, in linea di principio, il vantaggio di assorbire la luce in modo praticamente costante su tutto lo spettro, fino a oltre il NIR. Quindi sono eccitabili in un intervallo di frequenze molto ampio. Le nanoparticelle di silice hanno caratteristiche spettrali simili ai nanotubi di carbonio, ma hanno il vantaggio che si degradano *in vivo* ad acido silicico, non tossico. I *quantum dots*, nanocristalli di semiconduttori naturali (i cosiddetti *direct band gap semiconductors*) come CdSe, CdS, CdTe, InP e PbSe, sono molto studiati per il *bio-imaging* di fluorescenza (vedi dopo). Essi emettono con alta efficienza quando vengano eccitati nel visibile (si eccita la transizione tra banda di valenza e banda di conduzione) o anche nell'IR, sopra 800 nm, dove si ha assorbimento multi-fotonico. Le loro proprietà ottiche (e.g. la lunghezza d'onda della luce emessa) dipendono dalle dimensioni. Ai fini del loro potenziale uso in TPP bisogna notare che hanno coefficienti di estinzione che sono ordini di grandezza inferiori a quelli delle AuNP.

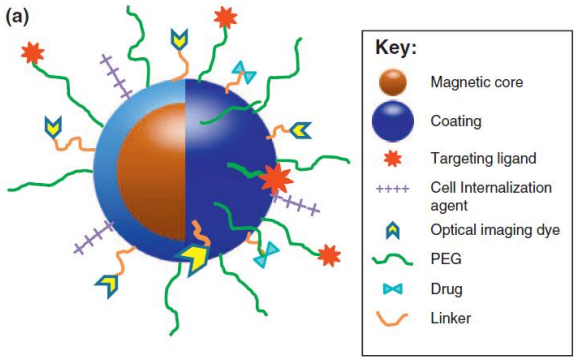
Allo stato attuale, le NP maggiormente avanzate verso l'applicazione clinica sono *nanoshell* di oro del tipo *core/shell*, cioè costituite da un nucleo di silice ricoperto da uno strato di Au. Nel 2015 sono iniziati studi clinici per il trattamento PTT di tumori solidi umani con *nanoshell* di oro. L'irraggiamento viene fatto utilizzando un laser a fibra ottica inserito direttamente dentro o molto vicino al tumore. Infatti la luce NIR riesce a penetrare al massino fino a 10 cm di tessuto, e quindi i tumori profondi non possono essere trattati con laser esterni.



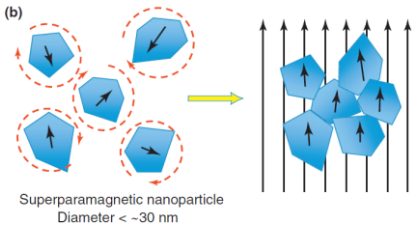
È importante comprendere il meccanismo con cui questa tecnica induce la morte cellulare, e la sua cinetica, in modo da massimizzare l'efficacia terapeutica e minimizzare gli effetti indesiderati. Infatti, la PTT può indurre morte cellulare tramite due meccanismi, apoptosi e necrosi (figura). Quando una cellula subisce apoptosi, essa mantiene integra la sua membrana e produce dei segnali chimici (cosiddetti "*eat-me signals*") che "etichettano" la membrana esterna e portano alla sua fagocitosi senza indurre infiammazione. Invece nella necrosi primaria la membrana cellulare perde la sua integrità e la cellula rilascia il suo contenuto nell'ambiente extracellulare generando infiammazione e risposta immunogenica. Dal momento che l'infiammazione influisce negativamente sulla terapia, la necrosi è un meccanismo di morte cellulare indesiderabile. Negli esperimenti *in vitro*, si riscontra che il meccanismo di morte cellulare più comune indotto dalla PTT è la necrosi, tuttavia si è anche visto che utilizzando potenza di irraggiamento (W/cm^2) più bassa, compensata da tempi più lunghi, prevale l'apoptosi. Inoltre,

anche il sito di localizzazione delle AuNP nelle cellule, cioè sulla superficie, nel citoplasma o nel nucleo, influisce sull'esito della terapia fototermica. A questo riguardo si è visto, in esperimenti *in vitro*, che le AuNP sferiche vengono internalizzate tramite endocitosi meglio dei *nanorods*, indipendentemente dal tipo di *coating*, e la massima efficienza (che porta al massimo ad alcune migliaia di NP per cellula) si ha per un diametro intorno a 50 nm.
In generale, si può concludere che sia i dati sperimentali che gli studi teorici su *design* delle nanoparticelle e condizioni di irraggiamento dimostrano che il processo di riscaldamento fototermico alla base della PTT è piuttosto complicato. L'efficienza del riscaldamento fototermico e la conseguente variazione di temperatura dipendono non solo da caratteristiche delle AuNP come dimensioni, forma, lunghezza d'onda di risonanza plasmonica, concentrazione, e natura dei leganti superficiali (*coating*), ma anche dalle condizioni di irraggiamento, come tempo di irraggiamento, potenza del laser, tipo di laser (pulsato o continuo), e sua lunghezza d'onda. Al momento tutti questi parametri vengono ottimizzati in modo piuttosto empirico, a seconda anche del tipo di sistema biologico. In altre parole questa terapia sperimentale, ancor più della PDT, è ben lontana dall'essere standardizzata. Nei vari studi *in vivo* compiuti sia su AuNP "semplici" che multifunzionali c'è una grossa variabilità che riguarda i tipi di tumore, il modello animale, le dimensioni del tumore, i dosaggi e le condizioni di irraggiamento (compreso l'intervallo fra somministrazione e irraggiamento), rendendo difficile sia valutare il vero potenziale di un certo sistema di AuNP, sia ottimizzare i trattamenti. Infine, un importante fattore da considerare è il costo di un potenziale trattamento PTT che dipende soprattutto dal tempo (e quindi dalla complessità) della preparazione delle AuNP. Nel 2015 si è stimato che un singolo trattamento per un paziente con Au-*nanorods* PEGilati (commerciali) costerebbe circa 7500 $. È chiaro che il costo aumenterebbe ancora per AuNP funzionalizzate.
Nel 2019 sono stati pubblicati su PNAS i risultati di una sperimentazione clinica di *photothermal ablation* su 16 pazienti affetti da tumore localizzato alla prostata e trattati con *gold-silica nanoshells*, cioè nano-particelle di silice ricoperte di uno strato di oro con un diametro totale di circa 150 nm ed eccitate con un laser nel vicino-infrarosso. Gli autori concludono che "*This treatment protocol appears to be feasible and safe in men with low- or intermediate-risk localized prostate cancer without serious complications or deleterious changes in genitourinary function.*"

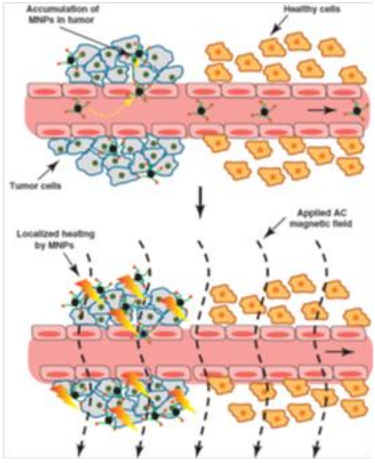
Terapia magnetotermica



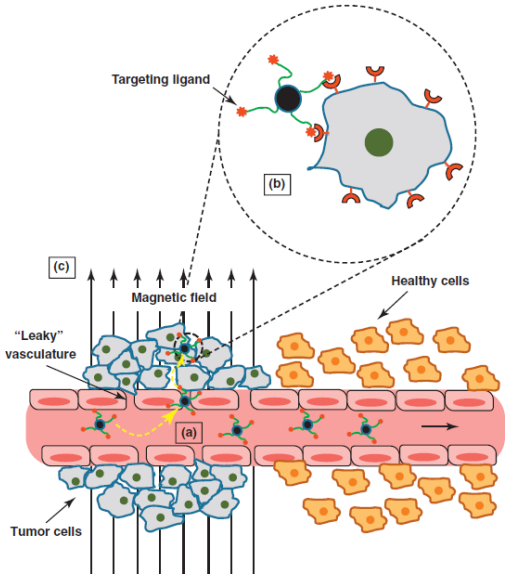
La figura illustra la tipica composizione di una generica **nanoparticella magnetica** (*Magnetic NanoParticle*, MNP): un *core* di ossido di ferro ricoperto da un *coating* biocompatibile, e tutte le possibili funzionalizzazioni come per le AuNP (PEG, sensori per *imaging*, *targeting vectors*, farmaci per *drug delivery*…). Il **super-paramagnetismo** è un fenomeno che si manifesta in particelle magnetiche che siano tanto piccole (< 30 nm). Rispetto a un normale materiale paramagnetico, le MNP super-paramagnetiche presentano una maggiore suscettività magnetica e una maggiore saturazione magnetica. In assenza di un campo magnetico esterno le loro rapidissime fluttuazioni termiche causano una distribuzione casuale dei loro momenti magnetici, così che la magnetizzazione media è nulla (figura).



La **terapia magnetotermica**, illustrata in figura, è simile alla PTT, ma utilizza nanoparticelle magnetiche il cui riscaldamento, tramite diversi meccanismi (che non trattiamo), è ottenuto sottoponendole a **campi magnetici oscillanti**. Il primo studio di fase clinica con questa terapia è del 2007 ed ha utilizzato SPIO (*super-paramagnetic iron oxide*



nanoparticles) ricoperte con un aminosilano. Sebbene la terapia magnetotermica sia – in linea di principio – promettente, rimane sempre il rischio di surriscaldamento locale, con conseguente danneggiamento dei tessuti sani. Queste particelle permettono di effettuare anche l'*imaging* tramite MRI (vedi dopo), quindi sono dei potenziali agenti teranostici. Come illustrato in figura, per le MNP c'è, in linea di principio, un altro modo per aumentarne la concentrazione nel tumore, oltre alle strategie di *passive targeting* (effetto EPR) e di *active targeting* (*targeting vectors*) già ampiamente illustrate per le AuNP: il cosiddetto ***magnetic targeting***. Si può applicare un campo magnetico esterno nella regione del tumore, producendo un **gradiente di campo attraverso il tumore**. La forza magnetica generata dal gradiente (proporzionale alla suscettività magnetica e al volume delle MNP) attrae le particelle magnetiche nel tumore (attraverso i vasi sanguigni permeabili) e favorisce la successiva ritenzione. Allo stato attuale vi sono alcune (poche) evidenze che questo approccio funzioni *in vivo*, anche a causa dell'attenuazione del gradiente magnetico applicato dovuta ai tessuti. In pratica, con gli attuali gradienti, si potrebbe applicare solo a tumori superficiali. Inoltre, per futuri sviluppi reali, sarebbe necessario sviluppare gradienti di campo più focalizzati, in modo da evitare che il gradiente interessi anche i tessuti fra il magnete e il tumore, per evitare accumulo di MNP *off-target*.



In conclusione, si può affermare che sebbene vi siano molti studi con risultati promettenti, lo sviluppo di reali terapie antitumorali di MNP, compreso il loro eventuale utilizzo come *carrier* per *drug delivery*, procede molto lentamente.

Radiosensibilizzazione

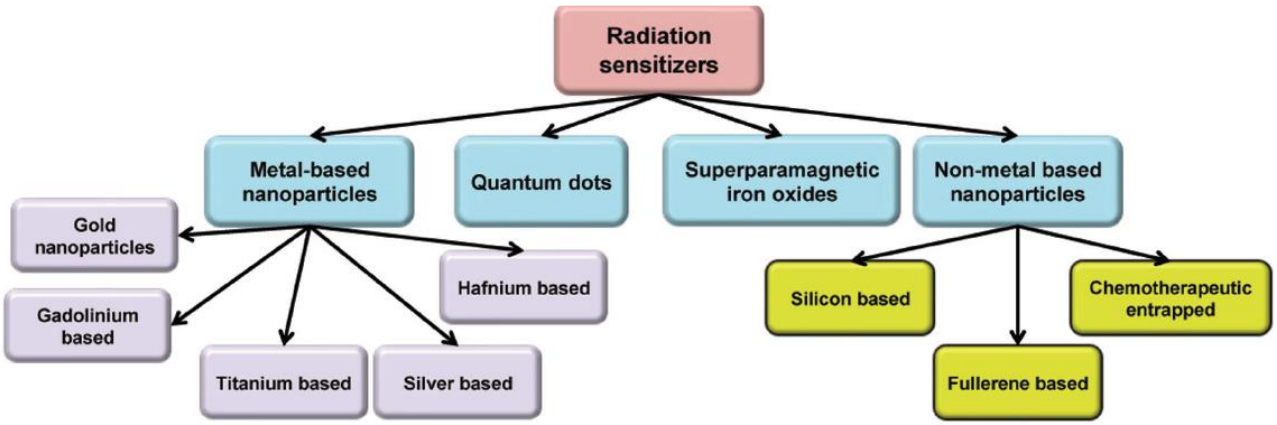
Circa il 50% di tutti i pazienti malati di cancro sono sottoposti a radioterapia nel corso del loro trattamento. Normalmente per la radioterapia del cancro si utilizza una **radiazione ionizzante**, cioè una radiazione che ha sufficiente energia per strappare elettroni dagli atomi, generando ioni ed elettroni "acquati". La radiazione ionizzante può essere costituita da particelle cariche, ma più spesso da fotoni ad alta energia, ad esempio raggi γ generati dal decadimento di un elemento radioattivo (esterno) o raggi X prodotti da un generatore. Attualmente per la radioterapia si usano principalmente dei **generatori esterni** al paziente, degli acceleratori lineari, che generano fasci di raggi X ad alta energia che vengono collimati con precisione sul tumore. I fotoni causano **danni indiretti** alle cellule **tramite la formazione di ROS**, che a loro volta danneggiano la cellula. I danni causati sono particolarmente gravi quando interessano il DNA (soprattutto i *double-strand breaks*), e tipicamente – se non riparati – portano alla morte della cellula. Le cellule tumorali sono (un pò) più esposte a questo tipo di danno rispetto a quelle sane perché si dividono con maggior frequenza e hanno spesso meccanismi di riparo del DNA meno efficienti.

Ai pazienti vengono tipicamente somministrati 1.8 – 2 Gy (Gy = Gray, l'unità di misura della dose assorbita di radiazione. Un Gray corrisponde a una radiazione che deposita un joule per chilo di materia), frazionati in diversi trattamenti nel corso di 4 – 8 settimane per limitare la tossicità ai tessuti sani. È oggi possibile anche applicare una diversa modalità di trattamento, chiamata radio-chirurgia (o *stereotactic body radiation therapy*) che consente di somministrare al tumore in maniera ritenuta sicura un piccolo numero di dosi elevate di radiazione (15 – 20 Gy). Si sono sviluppati anche irraggiamenti con particelle cariche ad alta energia, soprattutto protoni (*proton therapy*) ma anche cationi più pesanti come i *carbon-ions*, al posto dei raggi X. Il maggior vantaggio sta nel fatto che le particelle cariche si fermano nel tessuto irradiato (cioè non escono dalla parte opposta come i raggi X) e quindi depositano la maggior parte della loro energia in un'area piuttosto piccola chiamata *Bragg peak*. In linea di principio quindi questa modalità dovrebbe essere più selettiva per il tumore rispetto ai tessuti sani.

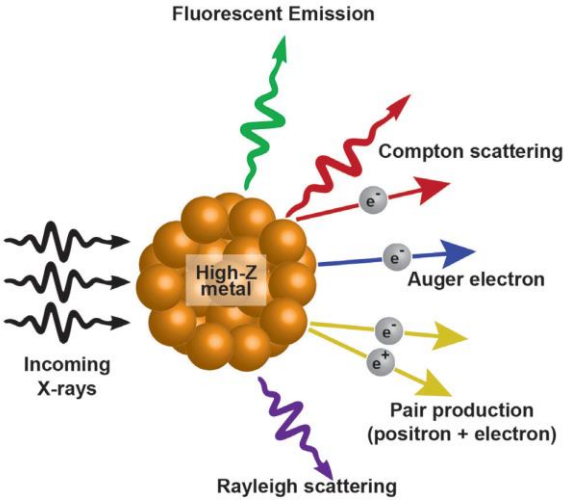
La radioterapia può essere utilizzata per ridurre le dimensioni del tumore prima della chirurgia (radioterapia neo-adiuvante), oppure dopo la chirurgia, per eliminare piccoli aggregati di cellule tumorali residue o linfonodi. Tuttavia, molto spesso la radioterapia è insoddisfacente in termini di risultati, anche in considerazione dei danni fisiologici collaterali ai tessuti sani. Molto rilevante è il problema legato al fatto che le cellule tumorali possono sviluppare resistenza alle radiazioni ionizzanti, portando come conseguenza ad un aumento delle dosi necessarie e quindi al danneggiamento anche dei tessuti sani (anche se più resistenti di quelli tumorali). Inoltre i tumori solidi molto spesso sono ipossici, e questo pone un limite all'efficacia della radioterapia, in quanto essa ha bisogno di ossigeno per generare i ROS (vedi PDT). In altre parole, O_2 è un potente radiosensibilizzante. Un altro radiosensibilizzante naturale è l'acqua che, essendo il componente maggioritario delle cellule, è ritenuto da alcuni essere il bersaglio principale della radiazione ionizzante. Per radiolisi della molecola d'acqua si ottengono sia specie cariche (elettroni acquati e cationi come H_2O^+) che radicali, come il radicale idrogeno $H^{\cdot}$, il radicale idrossile $OH^{\cdot}$, il radicale superossido $O_2^{-\cdot}$.

Una strategia per **aumentare l'efficacia della radioterapia** con radiazioni ionizzanti è quella di utilizzare dei sensibilizzatori, cioè delle sostanze che aumentino la predisposizione dei tessuti tumorali a subire danni irreparabili in seguito all'esposizione alla radiazione. I **radio-sensibilizzatori** (*radiosensitizers*) sono quindi degli agenti terapeutici o anche inerti che aumentano gli effetti della radioterapia, consentendo di ridurre le dosi e di circoscrivere quindi il danno ai tessuti tumorali risparmiando quelli sani. Idealmente, un radio-sensibilizzatore dovrebbe: *i*) potenziare l'attività della radiazione somministrata nel tumore ma non nei tessuti sani circostanti; *ii*) operare con un meccanismo che funzioni sia nelle cellule ossigenate che in quelle ipossiche e che non dipenda dall'incorporazione nel DNA; *iii*) avere una bassa tossicità.

Negli ultimi anni la ricerca per lo sviluppo di radio-sensibilizzatori si è soprattutto concentrata sulle **nanoparticelle** (figura), con alcune eccezioni che vedremo brevemente al termine di questo



capitolo. In generale, si ritiene che atomi di elementi con **elevato numero atomico *Z*** che si accumulino in una cellula possano fungere da radio-sensibilizzatori (infatti, il primo radio-sensibilizzatore usato è stato lo iodio). La necessità di un numero atomico elevato dipende dal fatto che la **sezione d'urto fotoelettronica** di un atomo, cioè la probabilità che esso interagisca con un fotone incidente, **dipende ca. da Z^4**. Come rappresentato in figura, quando i raggi X (o γ) colpiscono un atomo di metallo, possono avvenire numerosi fenomeni. Fra le varie emissioni che si possono avere, quelle più rilevanti ai fini della radioterapia sono i fotoni dispersi (*scattered*), l'emissione di fluorescenza e soprattutto una serie di emissioni di elettroni: **fotoelettroni**, (anche



detti elettroni "Compton", a seconda dell'energia del fotone incidente) ed elettroni Auger. L'emissione di un fotoelettrone Compton si ha quando il fotone incidente colpisce un elettrone dell'atomo, gli trasferisce la sua energia causandone l'espulsione, con un'energia cinetica pari a quella del fotone incidente meno l'energia di legame dell'elettrone al nucleo (quindi elettroni emessi da orbitali interni avranno energia cinetica inferiore). L'energia cinetica dell'elettrone emesso ne decide il cammino medio nel tessuto. **L'effetto fotoelettrico dipende da $(Z/E)^3$**, dove E è l'energia del fotone incidente, ed è quindi evidente che servono atomi a numero atomico elevato. Gli elettroni Auger (vedi il meccanismo di cattura elettronica nella sezione radiofarmaci) e la fluorescenza si producono quando i fotoelettroni emessi da orbitali interni vengono rimpiazzati da elettroni di orbitali esterni. La differenza di energia viene emessa sotto forma di un fotone: quando questo colpisce un elettrone di un orbitale esterno, ne può causare l'emissione. Quindi **gli elettroni Auger sono fotoelettroni secondari**, e in genere hanno energia piuttosto bassa e quindi un cammino medio molto più breve rispetto a un normale fotoelettrone primario, ma sono in grado di generare una elevata densità di specie ionizzate in un'area ristretta. Viceversa i fotoni hanno cammini medi più lunghi ma minore energia. Complessivamente, queste emissioni di fotoni ed elettroni dovrebbero causare la radiolisi dell'acqua e/o di eventuale O_2, generando altri radicali e amplificando l'effetto della sola radiazione.

Le NP, essendo formate da atomi fortemente impaccati, hanno una grande sezione d'urto con le radiazioni γ o X, e quindi sono in grado di disperderle e/o assorbirle più efficacemente di atomi singoli. Fra le NP quelle più studiate sono le AuNP, soprattutto perché l'oro ha numero atomico molto elevato (Z = 79) ed essendo inerte è in genere considerato non tossico, e così pure le sue NP.

Come già visto parlando delle AuNP nella PTT, esse hanno una *clearance* più lunga rispetto a composti molecolari (se PEGilate) e quindi hanno più tempo per accumularsi nel tumore, anche sfruttando l'effetto EPR. Ovviamente, oltre al *targeting* passivo (EPR) si può anche funzionalizzare

la AuNP con *targeting vectors* per tentare un *targeting* attivo, cioè valgono le stesse considerazioni già fatte a proposito di PTT.
Al momento, numerosi sistemi a base di AuNP sia con *targeting vectors* che solo PEGilate, sono stati studiati *in vitro* e alcuni su animali come potenziali radio-sensibilizzatori. Non risultano ad oggi studi clinici sull'uomo. Come già visto nel caso di altre terapie binarie come la PTT, anche in questo caso ci sono molti parametri da ottimizzare per ottenere i risultati migliori: alcuni riguardano le AuNP, e.g. dimensione e forma, la dose, il modo di somministrazione, il loro reale accumulo nel tumore, e altri fattori riguardano la radioterapia, e.g. il tempo tra somministrazione e radioterapia, il dosaggio e la frammentazione della dose. Negli esperimenti *in vitro*, condotti su cellule, si definisce un **rapporto di sensibilizzazione** (*sensitization enhancement ratio*) come il rapporto fra la dose di radiazione necessaria a uccidere il 95% delle cellule irradiate in assenza e in presenza del sensibilizzatore. È chiaro che quanto più grande di 1 è questo rapporto e tanto migliore è il sensibilizzatore. Negli studi *in vivo* si valuta il rapporto fra il volume del tumore in presenza o assenza del radio-sensibilizzatore. Sebbene siano stati previsti, con dosi elevate di AuNP localizzate nel tumore, rapporti di sensibilizzazione fino a 5.6, negli esperimenti *in vitro* e *in vivo* (su animali) si misurano al massimo valori intorno a 1.5.
Altri studi *in vitro* sono stati fatti con nanoparticelle di ossido di gadolinio e di ossido di afnio ricoperte da una *shell* di poli-silossano (le prime hanno il vantaggio di poter essere seguite tramite MRI, vedi dopo), con nanotubi di TiO_2 (hanno il potenziale vantaggio di contenere elevate quantità di acqua, ossigeno e idrossidi che potrebbero amplificare la produzione di ROS), con AgNP (dove si ritiene possibile il rilascio di ioni Ag^+ che potrebbero contribuire ad aumentare il danno al DNA).
Oltre alle nanoparticelle, sono stati fatti studi (*in vitro*) soprattutto con i complessi antitumorali di Pt in quanto si sa che si vanno a legare (in parte) al DNA. Essendo il Pt un nucleo pesante, potrebbe agire come radio-sensibilizzatore e generare ROS nelle immediate vicinanze del DNA. O comunque i danni causati al DNA dal cisplatino potrebbero rendere le cellule tumorali più sensibili alla radioterapia (minore efficacia dei meccanismi di riparo del DNA). Tuttavia, la tossicità combinata della chemio- e radioterapia pone dei seri limiti, soprattutto se si volessero raggiungere le concentrazioni di Pt necessarie affinché esso possa agire come radio-sensibilizzatore. Inoltre, non essendo il cisplatino (come altri agenti che danneggiano il DNA, come 5-fluorouracile e mitomicina-c) specifico per le cellule tumorali, la chemioterapia rende più sensibili alla radiazione anche le cellule sane. In un esperimento *in vitro*, su una sola linea cellulare, il cisplatino non si è dimostrato un radiosensibilizzatore, mentre carboplatino e ossaliplatino hanno mostrato radiosensibilizzazione solo a dosi $>IC_{50}$, cioè impraticabili *in vivo*. Si sono invece avuti dei risultati più promettenti utilizzando Lipoplatin^{TM}, cioè la formulazione liposomiale del cisplatino, probabilmente perché i liposomi caricati col cisplatino hanno un migliore *uptake* e al contempo minore citotossicità rispetto al complesso. Recentemente si è anche proposto di utilizzare complessi di rutenio, meno citotossici di quelli di Pt e quindi potenzialmente utilizzabili a dosi più elevate, come radiosensibilizzatori.