



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

Scuola di
Scienze Matematiche
Fisiche e Naturali

Corso di Laurea in Chimica
Curriculum Scienze Chimiche

Sistema di trasporto dell'anigopressina basato su nanotubi di carbonio

Delivery system of the anigopreissin based on carbon nanotubes

Relatore

Stefano Cicchi

Correlatore

Paolo Paoli

Candidato

Debora Pratesi

Anno Accademico 2015/2016

Indice

1 Scopo del lavoro	2
2 Introduzione	4
2.1 Struttura dei nanotubi di carbonio.....	4
2.1.1 Nanotubi di carbonio a parete singola.....	5
2.1.2 Nanotubi di carbonio a parete multipla.....	7
2.1.3 Difetti dei nanotubi di carbonio.....	8
3 Funzionalizzazione nanotubi di carbonio	9
3.1 Funzionalizzazione covalente.....	9
3.2 Funzionalizzazione non covalente.....	11
4 Drug delivery	12
5 Acido folico	18
6 Anigopressina	22
7 Descrizione del lavoro	25
7.1 Sintesi derivato linker da acido folico.....	25
7.2 Decorazione CNT con anigopressina.....	46
8 Conclusioni e sviluppi futuri	57
9 Parte sperimentale	59
10 Bibliografia	76

1 Scopo del lavoro

Lo scopo di questo lavoro di tesi è stato realizzare un sistema di Drug Delivery basato sull'utilizzo di nanotubi di carbonio.

I nanotubi di carbonio hanno trovato molte applicazioni possibili in campo biomedico e rappresentano un argomento importante nella ricerca moderna soprattutto come vettori per varie classi di agenti terapeutici. Il loro particolare successo è spiegato dalla loro abilità nel superare membrane biologiche e di presentare varie funzionalizzazioni.^{1,2} Nonostante il meccanismo specifico di internalizzazione non sia ancora chiaro, è riconosciuta la capacità dei nanotubi di entrare nelle cellule indipendentemente dal tipo e dai gruppi funzionali presenti sulla parete dei CNT. La loro elevata area superficiale consente l'attacco di varie molecole consentendone una funzionalizzazione multipla. Inoltre numerosi studi, in vitro o in vivo, hanno mostrato una biocompatibilità dei CNT a seguito di una funzionalizzazione chimica. In questo lavoro è iniziato uno studio di decorazione di CNT per un sistema di Drug Delivery con selettore e farmaco.

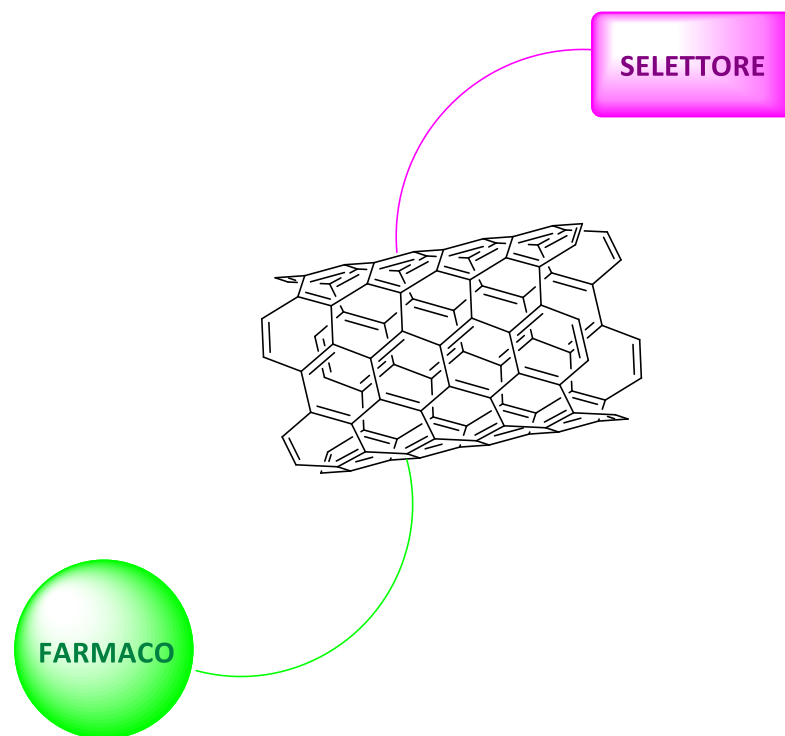


Figura 1.1- Sistema di Drug Delivery basato su CNT

L'utilizzo del selettore è mirato ad una maggior efficienza e selettività nell'internalizzazione nelle cellule tumorali di CNT. Per quanto riguarda il selettore è stata utilizzata la biotina, molecola già usata nel laboratorio in cui ho svolto la tesi e inoltre si è iniziato uno studio sintetico per utilizzare l'acido folico.

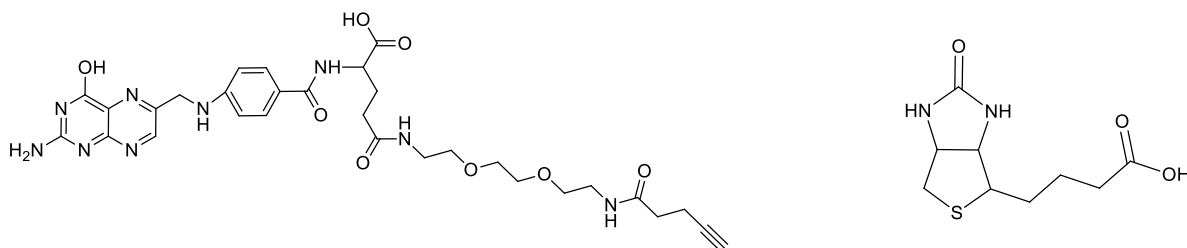


Figura 1.2- Derivato linker da acido folico e biotina

La decorazione di CNT con selettori avviene attraverso una reazione di CuAAC, che appartiene al gruppo delle reazioni *Click*, che si articola in tre diversi passaggi: 1- i CNT sono funzionalizzati con gruppi azide, 2- acido folico e biotina sono funzionalizzati con una funzione alchinnica terminale, 3- si procede al coupling tra i CNT e le molecole con gruppo alchinnico terminale. In particolare, il lavoro si è articolato in una sintesi lunga con molti passaggi di reazione per sviluppare la molecola linker con gruppo alchinnico terminale a partire da acido folico.

Il farmaco utilizzato in questo specifico lavoro è l'anigopressina, dimero del resveratrolo e contenente lo scheletro dello stilbene. L'interesse su questo farmaco è aumentato molto negli ultimi anni visto il potenziale biologico del resveratrolo.³ Si è dimostrato come l'anigopressina aderisce attraverso interazioni π - π stacking con la superficie dei CNT.

2 Introduzione

2.1 Struttura dei nanotubi di carbonio

La prima descrizione di nanotubi risale al 1991⁴ e riporta la formazione di *tubi aghiformi* ottenuti con una apparecchiatura dove ha luogo una scarica ad arco tra due elettrodi di grafite. La microscopia elettronica rivela che ciascun *tubo aghiforme* è in realtà una struttura formata da un numero di cilindri coassiali che varia tra 2 e 50. Gli esagoni di atomi di carbonio che compongono la parete grafonica di ciascun tubo sono disposti a formare un'elica attorno all'asse principale dell'ago. I nanotubi sono delle strutture completamente distinte da tutte quelle fino ad adesso conosciute. Essi possono essere considerati dei veri sistemi macromolecolari con struttura completamente nota fino a livello atomico, in base a questo si possono usare modelli teorici per predirne le proprietà chimico fisiche in modo molto accurato. E' stato osservato che i CNT si possono suddividere in due categorie:

- Nanotubi a parete singola o SWCNT
- Nanotubi a parete multipla o MWCNT

2.1.1 Nanotubi di carbonio a parete singola

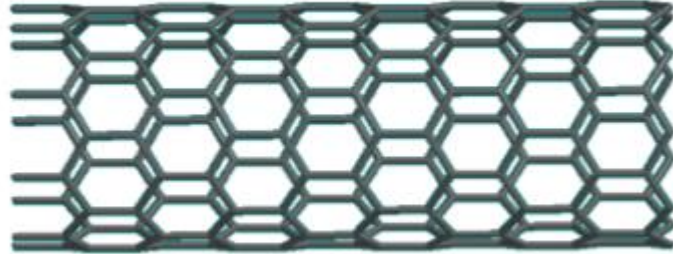


Figura 2.1- Struttura nanotubi single walled

Questa varietà di nanotubi sono riconducibili ad una fibra ideale a struttura fullerenica, essi sono simili per dimensioni e sono formati da un singolo strato che si estende da un capo all'altro. Il loro diametro può variare da 1 a 2 nm. Essi si organizzano in grandi fasci chiamati funi (ropes) che consistono in alcune decine di SWNT con una distanza intertubo di circa 0,315 nm. Un modo, in teoria, per ottenere i SWCNT è quello di piegare un foglio di grafene in modo da creare un cilindro. L'arrotolamento può essere eseguito in diverse modalità. Questi diversi modi di arrotolare il foglio di grafene per ottenere un nanotubo sono caratterizzati da una coppia di numeri interi n, m che soddisfano la seguente equazione:

$$C_h = na_1 + ma_2 \equiv (n, m)$$

A sua volta la coppia di numeri interi n, m insieme ai vettori base del foglio di grafene definiscono il vettore chirale C_h (vedi figura 2.2). Il vettore chirale viene definito come parametro strutturale per definire la posizione del reticolo insieme all'angolo di arrotolamento Θ . Nel complesso si possono identificare tre tipologie di arrotolamento classificate in base all'angolo Θ :

- Nanotubi *zig zag*: $n = m \neq 0$ e $\Theta = 30^\circ$
- Nanotubi *armchair*: $n \neq 0$ $m = 0$ e $\Theta = 0^\circ$
- Nanotubi *chirali*: $n \neq m$ e $0^\circ < \Theta > 30^\circ$

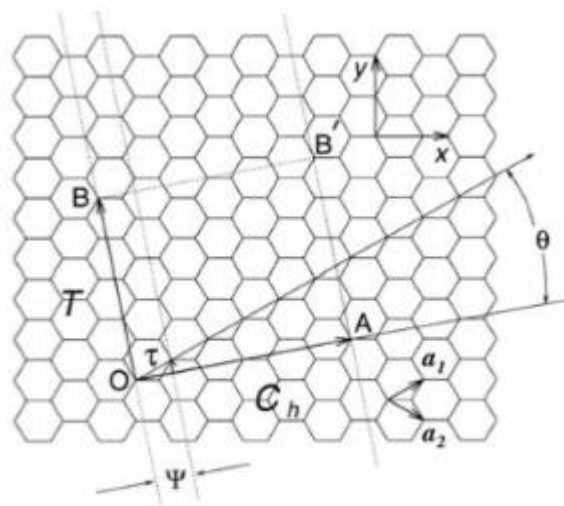
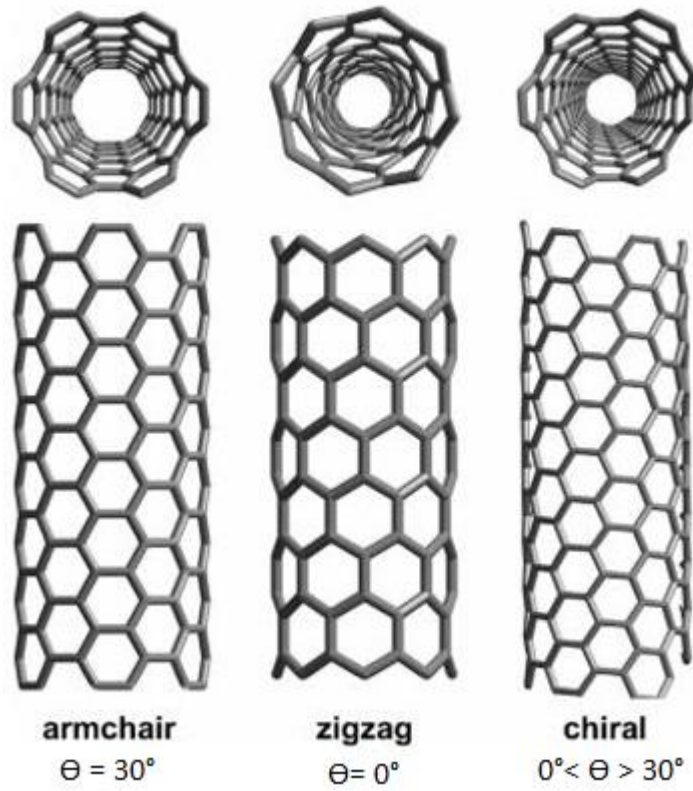


Figura 2.2- Tipologie di arrotolamento di fogli di grafene e definizione vettore chirale

2.1.2 Nanotubi di carbonio a parete multipla

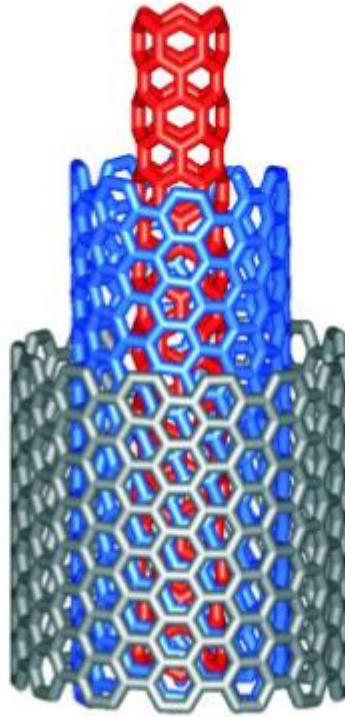


Figura 2.3- Struttura nanotubi multi walled

I nanotubi di carbonio a parete multipla sono costituiti da più fogli di grafene arrotolati su se stessi secondo le modalità prima discusse. Essi presentano un diametro che varia da 2 a 25 nm con una distanza di 0.340 nm tra ogni strato. La loro lunghezza varia tra decine di nm a decine di μm .

2.1.3 Difetti dei nanotubi di carbonio

I nanotubi di carbonio possono presentare sulla superficie alcuni difetti con conseguente deformazione locale delle pareti grafite e conseguente cambiamento della reattività. Gran parte dei difetti è causata dalla presenza di pentagoni ed eptagoni incorporati nel reticolo esagonale. In particolare essi portano alla formazione di forme molto diverse, come nanotubi piegati, ramificati (ad L, Y, T) ed elicoidali.

Generalmente la presenza di un anello pentagonale può portare alla formazione di una zona convessa mentre un eptagono può portare alla formazione di una zona concava. Grazie alla presenza di queste diverse forme si ha la formazione di vari angoli permettendo, inoltre, la fusione di nanotubi di diverso diametro. In linea di massima i nanotubi a parete multipla presentano un numero maggiore di difetti rispetto ai nanotubi a parete singola.

Una tipologia di difetto molto diffusa è lo *Stone-Wales defect*, causato dalla presenza di due coppie di cicli a cinque e sette termini, per questo motivo anche chiamato *difetto 7-5-5-7*. La particolarità di questo difetto è di andare ad introdurre una maggiore curvatura e quindi una maggiore reattività.

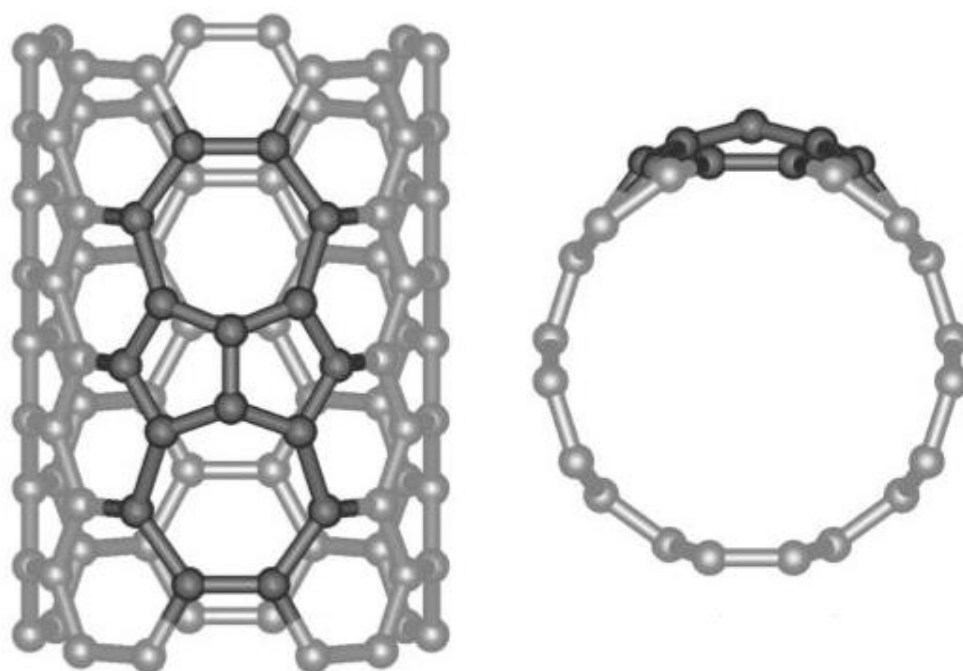


Figura 2.4- Stone-Wales defect o difetto 7-5-5-7

3 Funzionalizzazione dei nanotubi di carbonio

La scarsa reattività nei confronti di elettrofili e la scarsissima solubilità dei CNT in acqua, e nei più comuni solventi organici, ne impedisce l'utilizzo per applicazioni pratiche. In modo da superare queste limitazioni, negli ultimi anni sono state messe a punto diverse strategie per la funzionalizzazione e la solubilizzazione dei CNT.^{5,6,7} Le diverse strategie di funzionalizzazione dei nanotubi di carbonio sono principalmente due:

- Funzionalizzazione covalente
- Funzionalizzazione non covalente

3.1 Funzionalizzazione covalente

Questa tipologia di funzionalizzazione può indurre cambiamenti più o meno importanti sulle proprietà chimico-fisiche del nanotubo. Infatti questo tipo di funzionalizzazione incide direttamente sulla *rete p* del sistema portando alla trasformazione di alcuni carboni con ibridazione sp^2 in carboni con ibridazione sp^3 alterando la delocalizzazione del sistema. L'effetto più evidente è la perdita della conducibilità intrinseca dei nanotubi. Nonostante questo, l'approccio covalente si è dimostrato molto utile e versatile. Inoltre avendo a disposizione l'intera parete del nanotubo, il grado di derivatizzazione può essere molto elevato.

Di particolare interesse è la funzionalizzazione secondo la quale si ottiene l'ossidazione dei nanotubi di carbonio. L'interesse deriva soprattutto dal fatto che questa funzionalizzazione, avvenendo in due passaggi, non ha grande influenza sulle proprietà chimico-fisiche od elettriche dei nanotubi.

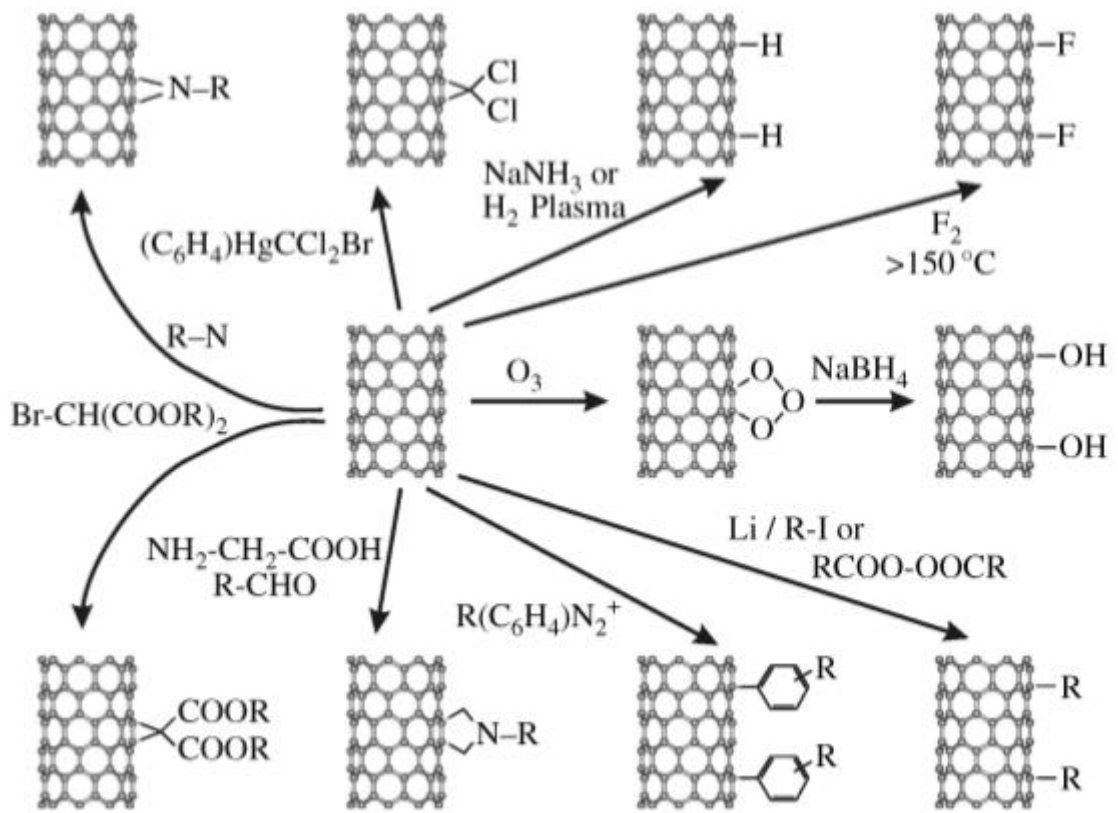


Figura 3.1- Schema funzionalizzazioni covalenti

3.2 Funzionalizzazione non covalente

Una strategia che non altera le proprietà meccaniche ed elettroniche dei nanotubi è quella di apportare delle modifiche strutturali non covalenti o supramolecolari. Questo tipo di decorazione avviene attraverso interazioni quali principalmente forze idrofobiche, Van der Waals ed elettrostatiche. Questa funzionalizzazione consiste nell'adsorbimento fisico di opportune molecole sulle pareti dei nanotubi. Le interazioni π - π stacking sono molto importanti per l'adsorbimento sulla superficie di nanotubi di carbonio. La funzionalizzazione non covalente si può ottenere tramite avvolgimento di polimeri, adsorbimento di surfattanti o di piccole molecole aromatiche, interazione con porfirine o biomolecole come DNA o peptidi.

Le funzionalizzazioni non covalenti sono state ampiamente studiate e, ad esempio, è stato possibile funzionalizzare la parete dei nanotubi di carbonio con derivati antraceni, sistema di anelli condensati. L'analisi di questi sistemi è avvenuta tramite spettroscopia UV-Vis e tramite fluorescenza. La sensibile variazione riscontrata tra la fluorescenza dell'antracene e la fluorescenza del sistema antracene-nanotubi è indice dell'interazione avvenuta con trasferimento di carica. Questo metodo di analisi risulta essere molto interessante e utile, infatti è stato utilizzato in questo lavoro di tesi per determinare l'interazione del farmaco con il sistema di nanotubi.

4 Drug delivery

La tossicità intrinseca di molti potenziali farmaci influenza così tanto il loro potenziale farmacologico, che la loro efficacia terapeutica è fortemente compromessa a tal punto che la maggior parte di loro vengono espulsi dallo sviluppo farmaceutico in fase avanzata.⁸ Questo fenomeno ha portato l'industria farmaceutica a scoprire nuovi programmi di applicazione per modulare gli effetti indesiderati dei farmaci e creare nuovi coniugati per migliorare il potenziale farmacologico. In particolare si è sfruttata la nuova frontiera delle nanotecnologie. Ad esempio, è stato documentato l'utilizzo di liposomi e polimeri per trasportare farmaci all'interno delle cellule e questi sistemi coniugati hanno mostrato una maggior efficacia e una diminuzione della tossicità.^{8,10} L'uso di queste nuove tecnologie però comporta una spesa elevata. Le strategie più recenti hanno previsto l'applicazione di nanotubi di carbonio con una funzionalizzazione chimica.¹¹ La capacità dei nanotubi di carbonio funzionalizzati di agire come vettori terapeutici con farmaci può essere considerata una nuova strategia in ambito terapeutico e diagnostico.^{12,13} Il loro successo come vettori terapeutici è spiegato dalla loro abilità di penetrare le membrane cellulari in modo da raggiungere il sito desiderato. Sono state effettuate numerose ricerche per studiare il processo secondo il quale il sistema riesce ad entrare in cellula. I numerosi studi sul meccanismo di internalizzazione nella cellula con conseguente penetrazione della membrana cellulare non hanno portato ad un processo ben chiaro, ancora le ricerche sono in corso di sviluppo. Alcuni studi hanno portato alla luce come l'internalizzazione possa avvenire tramite endocitosi. L'endocitosi è noto come un meccanismo di entrata generico per vari materiali extracellulari ed è un processo energia-dipendente.¹⁴⁻¹⁶ Inoltre l'endocitosi è ostacolata quando le incubazioni cellulari vengono condotte a temperature basse (4°C invece di 37°C) e in ambienti impoveriti di ATP (adenosina trifosfato).¹⁵⁻¹⁷

Alcune ricerche hanno realizzato incubazioni cellulari con i coniugati SWCNT a 4 ° C e con cellule pretrattate con NaN_3 , in modo parallelo sono state effettuate incubazioni in condizioni regolari, ovvero a 37°C. Il trattamento con NaN_3 è noto per disturbare la produzione di ATP in cellule, impedendo la via dell'endocitosi. Infatti, i livelli di fluorescenza osservati con microscopia confocale in cellule dopo l'incubazione di coniugati SWNT a 4 ° C (figura 3.3 b) e in condizioni di

deplezione di ATP da NaN_3 (figura 3.3 c) sono bassi. Questo indica quindi che l'endocitosi avviene come meccanismo di internalizzazione cellulare per i coniugati SWNT a 37°C (figura 3.3. a).¹⁸

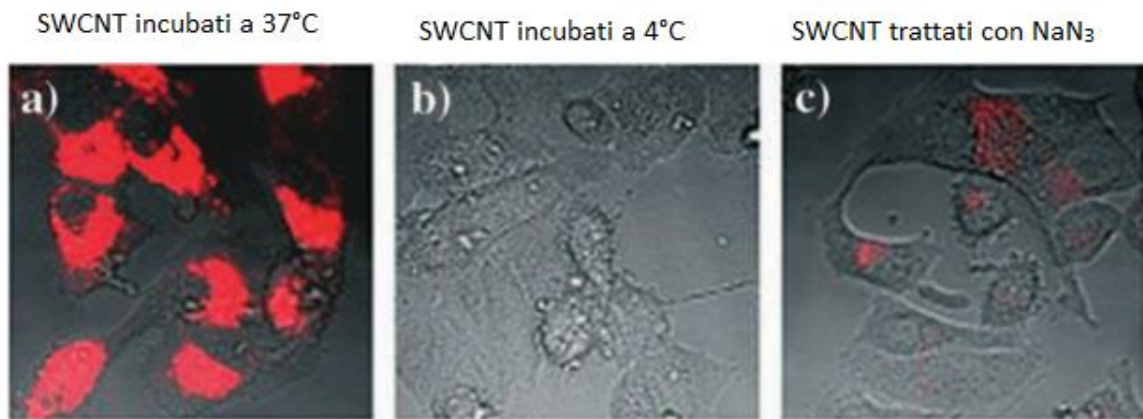


Figura 4.1- Immagini effettuate con microscopia confocale di SWCNT incubati A) a 37°C B) a 4°C e C) in ambiente di NaN_3

Tuttavia in letteratura sono riportati alcuni studi dove non si registra nessun cambiamento tra campione di CNT incubati in campioni cellulari in condizioni normali a 37°C e in condizioni sfavorevoli per l'endocitosi ovvero a 4°C .¹⁹ Questo sottolinea come ancora non si abbia un meccanismo chiaro per l'internalizzazione dei nanotubi. Si sostiene l'ipotesi che i CNT penetrino attraverso la barriera cellulare sfruttando il loro "effetto ago".

Stabilita la loro abilità di penetrare in cellula è stato necessario analizzare la tossicità dei nanotubi. L'utilizzo dei nanotubi come sistema di trasporto all'interno delle cellule prevede l'utilizzo di farmaci con un certo potenziale citotossico ma è altrettanto necessario che tutto il sistema utilizzato non provochi effetti indesiderati all'ambiente cellulare. Alcune osservazioni hanno dimostrato che la funzionalizzazione riduce notevolmente gli effetti citotossici di CNT,²⁰ aumentandone invece la biocompatibilità.²¹ I CNT possono essere funzionalizzati per mezzo di

legami covalenti oppure tramite interazioni non-covalenti.^{22,23} Le prove raccolte finora evidenziano che maggiore è il grado di funzionalizzazione dei nanotubi, più sicuro è il materiale, in particolare rispetto ai CNT *pristine*, CNT puri senza nessuna funzionalizzazione.⁸

Alcuni studi condotti su nanotubi di carbonio a parete multipla, senza nessuna funzionalizzazione, hanno mostrato come potessero avere un certo potenziale nel causare fibrosi polmonare. Questi studi suggeriscono che il potenziale fibrotico dei MWCNT dipende da un numero di parametri, quali le loro proprietà fisico-chimiche (compresa la lunghezza, rigidità, difetti superficiali, e funzionalizzazione), percentuale e tipo di impurità, metodo di dispersione, scelta della dose, percorso e durata dell'esposizione e il sistema preso sotto analisi.²⁴ Mentre molti test in vivo mostrano come i CNT funzionalizzati, una volta iniettati nel sangue, rispettano i parametri clinici di tossicità, rendendo i CNT un buon sistema di trasporto.²⁵

Alcuni studi sulla biodistribuzione mostrano come marcando CNT funzionalizzati con atomi radiattivi ¹¹¹In, si possa analizzare l'accumulo dei nanotubi in vivo dopo 0,5 ore, 3,5 ore e 24 ore di esposizione. Dall'analisi risulta un accumulo prevalente nel fegato, seguito dall'accumulo nella milza e polmoni. E' stato osservato come dopo un periodo molto breve, 0,5 ore, si ritrovi i CNT anche nella vescica per una escrezione immediata di una frazione di nanotubi.²⁶

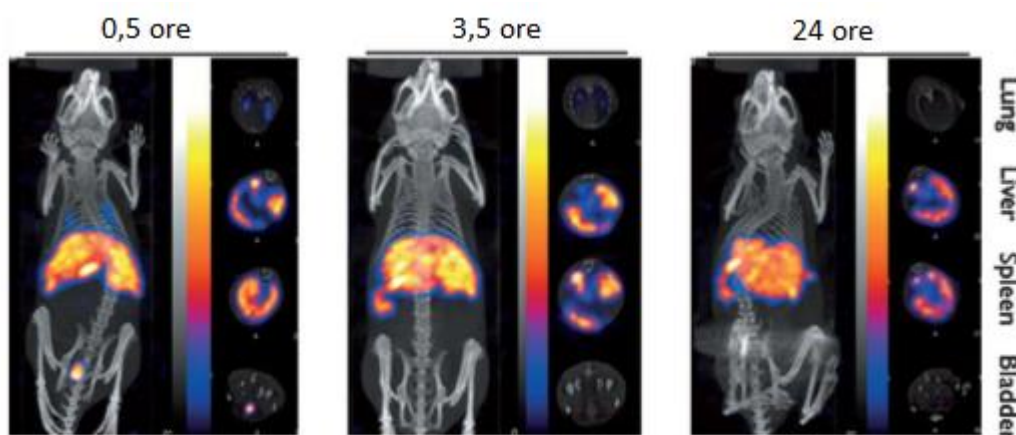


Figura 4.2- Biodistribuzione CNT funzionalizzati in vivo

L'escrezione renale di nanotubi è stata confermata da immagini transmission electron microscopy (TEM) dove sono stati osservati SWCNT e MWCNT intatti in urine di animali. Il meccanismo eliminazione delle strutture a forma cilindrica, come CNT, attraverso la membrana di filtrazione rimane ancora da determinare.²⁷

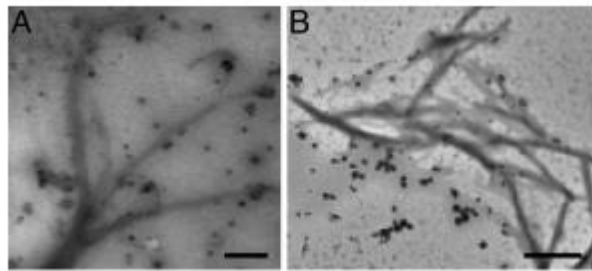


Figura 4.3- Immagini TEM contenenti SWCNT funzionalizzati nelle urine

Diversi fattori sono ritenuti avere un ruolo decisivo nel destino in vivo del CNT, compreso il tipo di modifica della superficie e il grado di funzionalizzazione chimica.²⁸

Una volta provata la non tossicità dei CNT in sistemi biologici, il potenziale dei nanotubi di carbonio come sistema di trasporto ha ampliato il suo utilizzo nella cura delle cellule cancerogene con farmaci anticancro. Il sistema di Drug Delivery basato su nanotubi di carbonio è composto principalmente dal farmaco, dal selettore e, in alcuni casi, da una sonda fluorescente per osservare il sistema una volta inserito in cellula. I farmaci sono attaccati alle pareti dei CNT attraverso la formazione di legami chimici (spesso in modo indiretto attraverso alcuni *spacer* molecolari) o con un semplice adsorbimento fisico. Stesso processo per i selettori biologici, che sono utilizzati per migliorare le prestazioni di *targeting* dell'intero sistema. Un ulteriore tipo di strategia, ancora in via di sviluppo sperimentale, è l'incapsulamento di farmaci nella cavità interna dei CNT.^{29,30}

Molte applicazioni dei nanotubi come base per il Drug Delivery hanno utilizzato come agente chemioterapeutico un membro importante della classe delle antracicline ovvero la doxorubicina. Nella maggior parte dei casi l'attacco della doxorubicina sulla superficie dei CNT avviene attraverso l'adsorbimento fisico, mentre il rilascio è innescato da un pH acido.³¹⁻³⁵

I dati sperimentali confermano l'attacco della doxorubicina alle pareti laterali di nanotubi di carbonio, funzionalizzati in precedenza con alcune sostanze biocompatibili e di targeting come, per esempio, chitosano e acido folico. Questi sistemi hanno rivelato un rilascio basso della doxorubicina a pH fisiologico 7,4 e un aumento del rilascio a condizioni pH leggermente acido, cioè circa a pH 5,5. Il meccanismo di rilascio della doxorubicina a pH acido sembra essere poco chiaro. Di solito, questo è attribuito alla protonazione del gruppo $-NH_2$ del farmaco a bassi valori di pH, che ne migliora la solubilità.³⁶

Ulteriori studi hanno osservato come utilizzando il selettore biologico metotrexato, un importante membro degli antagonisti dell'acido folico, legato covalentemente o adsorbito sulla superficie del nanotubo, utilizzato come sistema di trasporto, si avesse un rilascio maggiore della doxorubicina sia a pH acido, sia a pH neutro.³⁷

Da uno studio condotto nel 2007 è possibile osservare come l'utilizzo di nanocarrier come i nanotubi di carbonio per trasporto di farmaci in area tumorale possa aumentare l'efficienza del farmaco e migliorarne la prestazione. Le ricerche sono state condotte su nanotubi di carbonio funzionalizzati con copolimeri, in modo da esser solubili in ambiente cellulare, e successivamente si è attaccato il farmaco doxorubicina tramite legami π - π stacking. Per valutare la citotossicità su tessuto mammario cancerogeno MCF7 è stato effettuato il *MTT assay*, test che valuta la vitalità cellulare attraverso l'attività enzimatica mitocondriale. Dai test è risultato un aumento statisticamente significativo della capacità citotossica della doxorubicina attaccata ai MWNT rispetto alla capacità della doxorubicina senza nessun supporto nanotecnologico. Questo aumento della citotossicità ottenuta con il sistema doxorubicina-MWNT suggerisce che i MWNT possono mediare la consegna doxorubicina e quindi migliorare l'assorbimento cellulare del farmaco.³⁸

Oggi la ricerca sui sistemi per il Drug Delivery sta cercando di realizzare costrutti sempre più selettivi e più efficienti in modo da ridurre i problemi derivanti dall'utilizzo dei farmaci antitumorali. Molte ricerche sono attive per riuscire a comprendere l'effettivo potenziale che i CNT possono offrire nella terapia contro il cancro. Di particolare interesse sarà studiare nuovi farmaci, innovativi nel panorama medico, e applicarli alle nanotecnologie.

5 Acido folico

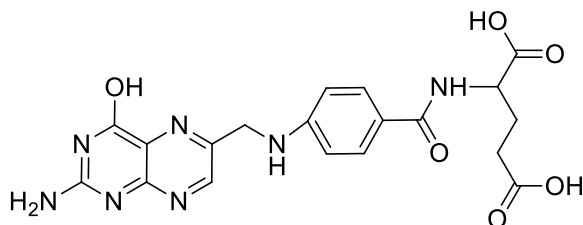


Figura 5.1- Struttura dell'acido folico

L'acido folico, vitamina B9, ha attratto una considerevole attenzione come potenziale mezzo di trasporto per farmaci coniugati attraverso legami covalenti.³⁹

Molte ricerche su cellule tumorali umane hanno riscontrato livelli molto alti della proteina sopra espressa che lega l'acido folico⁴⁰, una scoperta che sta cominciando ad essere sfruttata con la preparazione di sistemi folato – farmaco.⁴¹

Il loro potenziale ha portato ad un ampio utilizzo dei vari analoghi folati sintetici come strumenti terapeutici e di indagine in una varietà di malattie infettive, immunologiche e malattie neoplastiche.⁴² Ad esempio si è osservato come è possibile introdurre in cellula alcuni semplici vettori polimerici che sono contrassegnati con acido folico e si è osservato come le cellule tumorali abbiano una speciale affinità per questa sostanza, ciò è dovuto al fatto che il recettore dei folati è espresso sopra la membrana esterna della cellula tumorale.⁴³

Questa facile introduzione nelle cellule tumorali ha incrementato l'interesse nell'utilizzare l'acido folico in sistemi di trasporto di farmaci anticancro. Alcuni lavori si sono concentrati sullo studio di nanoparticelle del polisaccaride chitosano modificate con acido folico come sistema di

trasporto per il farmaco doxorubicina.⁴⁴ Le nanoparticelle sono utilizzate come sistema innovativo di trasporto di farmaci con una bassa tossicità. Questo è possibile perché l'acido folico, nonostante sia modificato da altri gruppi funzionali, mantiene la sua normale affinità con il recettore e può, pertanto, essere interiorizzato grazie ad esso mediante endocitosi.

La proteina che lega il folato è generalmente assente nel tessuto cellulare normale, ma in modo selettivo accresce sulla superficie di molti tipi di cellule tumorali umane, incluse quelle delle ovaie, del rene, polmone, ghiandola mammaria, cervello e altri organi,⁴⁵ infatti il recettore del folato è altamente selettivo per le cellule tumorali e presenta un'alta affinità per i folati e i suoi coniugati ($K_d=0.1nM$).⁴⁶ Studi innovativi hanno previsto l'utilizzo di coniugati dell'acido folico che includono strutture monovalenti in cui l'acido è legato a proteine,^{47,48} agenti chemioterapeutici⁴⁹ e agenti di imaging,⁵⁰ oligonucleotidi,⁵¹ apteni,⁵² e agenti immunoterapeutici.⁵³ Oltre alle strutture monovalenti sono utilizzati costrutti polivalenti dove unità multiple del folato sono raggruppate con impalcature di polimeri,⁵⁴ dendrimeri,⁵⁵ nanoparticelle organiche o inorganiche,⁵⁶ liposomi⁵⁷ e virus.⁵⁸

Ulteriori studi riguardano l'acido folico come selettore in un sistema di trasporto basato su nanotubi di carbonio multiwalled. Lo scopo è stato quello di funzionalizzare la superficie di MWCNT con acido folico ed estrone per trasportare il farmaco doxorubicina. Le cellule tumorali, come si trova in letteratura, sovra esprimono i recettori per il folato e quindi riescono a riconoscere la presenza di questa molecola anche se legata ai CNTs. Grazie al legame creato selettivamente con i recettori per l'acido folico (FRs) e per l'estrone (ERs) sulla cellula cancerogena, il processo di internalizzazione alla cellula avviene con maggior efficienza attraverso endocitosi.⁵⁹

Altre ricerche si sono focalizzate sulla realizzazione di CNT avvolti in polisaccaridi anionici (alginato di sodio) e cationici (chitosano) e successivamente funzionalizzati con doxorubicina attraverso interazioni π - π .⁶⁰ Per migliorare ulteriormente la selettività dei sistemi realizzati, i CNT sono stati funzionalizzati con acido folico. La prova che effettivamente ci sia un miglioramento

nell'internalizzazione cellulare del sistema con l'acido folico è ottenuta attraverso un'analisi di fluorescenza, incubando i CNT con cellule del carcinoma cervicale umano.

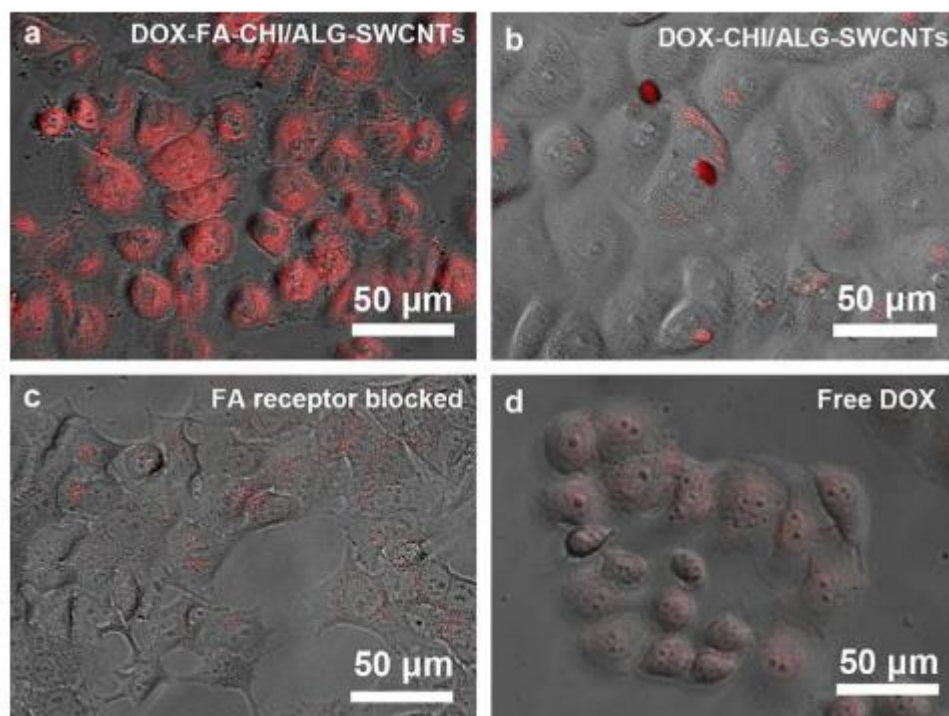


Figura 5.2- Immagini in fluorescenza di cellule incubate con (a) DOX-FA-CHI/ALG-SWNT, (b) DOX- CHI/ALG-SWNT, (c) FA per 2 ore seguito da DOX-FA-CHI/ALG-SWNT e (d) DOX libera.

Le cellule trattate con il sistema DOX-FA-CHI / Alg-SWCNT (Figura 5.3 a) mostrano una fluorescenza rossa brillante rispetto agli altri due campioni. Questo indica come i nanotubi coniugati con acido folico vengano assorbiti più efficientemente nelle cellule. E' evidente inoltre dalla Figura 5.3a e 5.3b che la fluorescenza è concentrata nel citoplasma, suggerendo che i nanotubi non possano attraversare le membrane intracellulari. Per valutare ulteriormente il ruolo dell'acido folico nell'assorbimento cellulare dei nanotubi, il recettore dei folati è stato bloccato sulla superficie delle cellule pretrattandole con acido folico per circa 2 h. Come mostrato in Figura 5.3c, dopo tale trattamento è osservata una fluorescenza molto più debole, a dimostrazione che l'assorbimento di DOX-FA-CHI / ALG-SWCNT e l'assorbimento dell'acido folico

sono competitivi. Queste analisi inoltre suggeriscono che DOX-FA-CHI / Alg-SWCNT sono interiorizzati in cellula mediante il recettore per l'acido folico.

Riconosciuto il potenziale biologico dell'acido folico in un sistema di trasporto in ambiente tumorale, abbiamo utilizzato l'acido folico come selettore per un sistema di Drug Delivery basato su nanotubi di carbonio. In particolare si è sintetizzato un derivato linker con gruppo alchamico terminale a partire da acido folico.

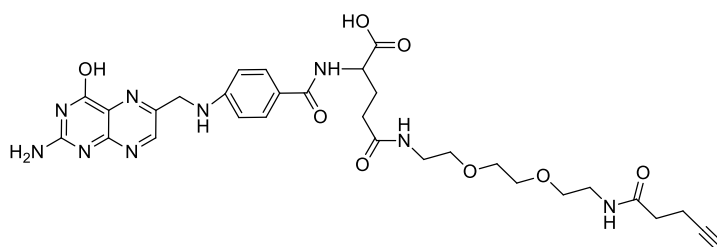
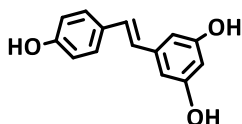


Figura 5.3- Struttura del linker sintetizzato da acido folico

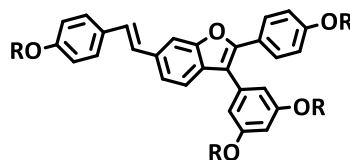
6 Anigopressina

L'Anigopressina A è una sostanza presente in natura e appartiene alla classe delle forme dimere e oligomeriche dello stilbene.³ Questa particolare classe è caratterizzata da un anello benzofuranico. L'Anigopressina A è un dimero del resveratrolo ed è stata isolata da colture di *Anigozanthos preissii*, specie di piante erbacee appartenente al genere *Anigozanthos*, e dai rizomi della pianta *Musa Cavendish*.⁶¹

Il genere *Anigozanthos* appartiene alla famiglia delle *Hemodoraceae*, piante altamente diffuse in Australia, ed attraverso alcune ricerche effettuate sulle varie specie sono stati isolati una serie di metaboliti tra cui alcuni analoghi del resveratrolo. In particolare è stata sottoposta ad analisi fitochimiche la pianta *M. fuliginosa*. L'indagine dei fiori e dei bulbi di questa pianta ha prodotto sei nuovi composti e altrettanti composti noti quali l'anigopressina A.⁶²



Resvetrolo



R = H Anigopressina A
R = Me Anigopressina A permetilata

Figura 6.1- Resveratrolo e Anigopressina A, permetilata

L'importanza del resveratrolo in campo biologico ed il suo grande potenziale farmacologico ha favorito lo sviluppo di approcci sintetici per la produzione di questi composti, e loro analoghi, in laboratorio.

In particolare in questo lavoro di tesi si è utilizzato come farmaco l'anigopressina A permetilata per il sistema di Drug Delivery basato su nanotubi di carbonio. L'anigopressina A permetilata, forma metilata del composto naturale anigopressina A (figura 6.1), ha mostrato una intensa attività citotossica in linee cellulari di cancro epatico (HepG2).⁶³ Inoltre questo effetto citotossico si è osservato anche in alcune linee cellulari di cancro al seno (MCF7) e al cervello (SHSY5Y) e risulta mediato dall'arresto del ciclo cellulare e dal processo di apoptosi. L'arresto del ciclo cellulare alla fase G1 riscontrato in campioni di HepG2 incubate con anigopressina permetilata viene determinato dall'incremento di CDKN1B mRNA. Il gene denominato CDKN1B codifica alcune proteine in grado di inibire l'attività delle cicline, responsabili della transizione delle cellule dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare. Il processo di apoptosi invece viene determinato dall'incremento delle caspasi 3/7, enzimi coinvolti nelle cellule per attuare l'apoptosi, dopo l'incubazione delle cellule con il farmaco. Inoltre si è voluto verificare come il processo di apoptosi fosse mediato dai mitocondri. Vari studi hanno mostrato alcune evidenze riguardo a questo processo come ad esempio l'incremento dell'attività della caspase 9, enzima coinvolto nei processi di morte cellulari mediati dai mitocondri. Altri esperimenti hanno mostrato come l'anigopressina permetilata non induca la morte di cellule non cancerogene, per questo si è reputato di grande interesse analizzare la sua complessazione con i nanotubi di carbonio per un sistema di trasporto all'interno delle cellule.

La sintesi dell'anigopressina A permetilata, svolta per la prima volta nel 2012 nel Dipartimento di Chimica "Antonio Mario Tamburro", Università degli Studi della Basilicata, è stata effettuata con otto step consecutivi con una resa totale del 28 %. La sintesi innovativa è stata inoltre confermata dalla caratterizzazione del prodotto finale. La caratterizzazione si è svolta tramite analisi ¹HNMR.

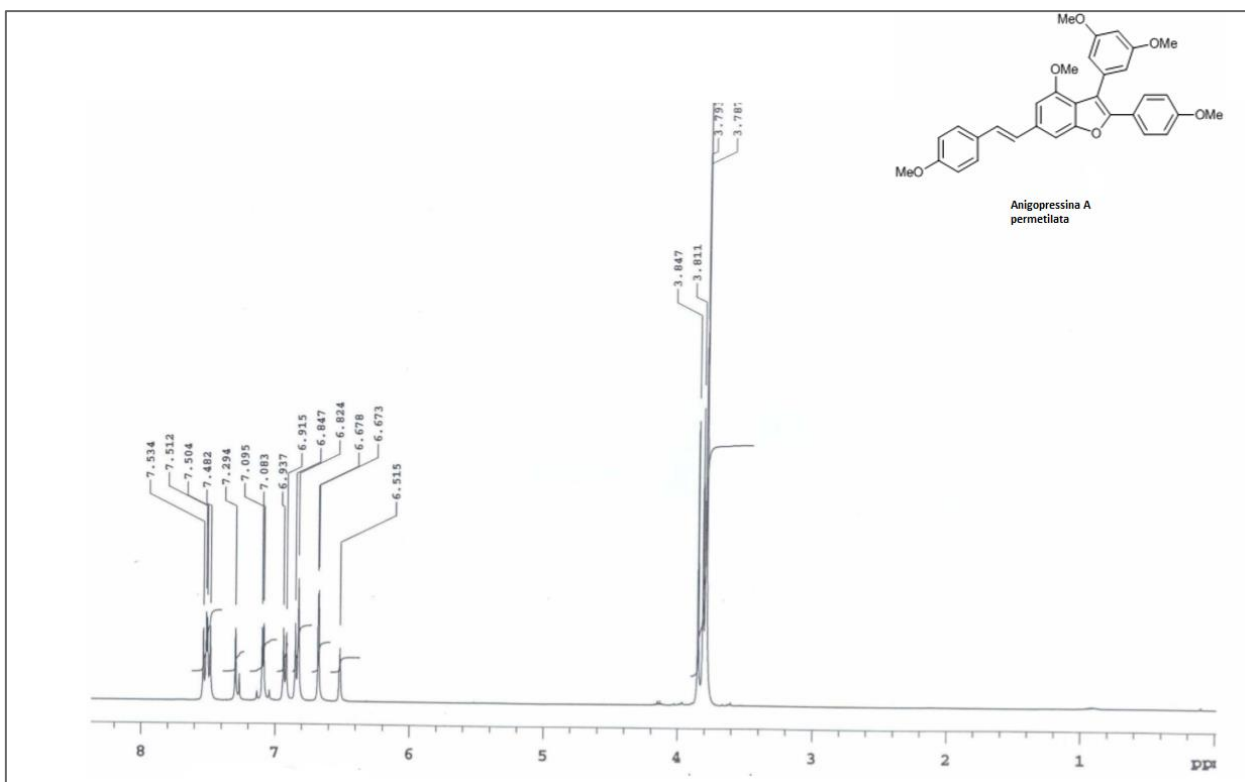


Figura 6.2- Spettro $^1\text{H NMR}$ dell'anigopressina permetilata

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 3.79$ (s, 6 H), 3.80 (s, 3 H), 3.821 (s, 3 H), 3.85 (s, 3 H), 6.52 (t, $J = 2.0$ Hz, 1 H), 6.68 (d, $J = 2.0$ Hz, 2 H), 6.83 (s, 1 H), 6.84 (d, $J = 9.2$ Hz, 2 H), 6.93 (d, $J = 8.8$ Hz, 2 H), 7.07 (d, $J = 16$ Hz, 1 H), 7.12 (d, $J = 16$ Hz, 1 H), 7.30 (s, 1 H), 7.50 (d, $J = 8.8$ Hz, 2 H), 7.53 (d, $J = 9.2$ Hz, 2 H) ppm.

7 Descrizione del lavoro

7.1 Sintesi derivato linker da acido folico

La prima parte di questo lavoro di tesi si è concentrato sulla sintesi di un selettore per il sistema di Drug Delivery basato sui CNT. In particolare si è sintetizzato una molecola linker a partire dall'acido folico. Il processo di sintesi prevedeva come prodotto finale una molecola con gruppo alchidico terminale in modo da poter, in seguito, essere attaccato sulla superficie di nanotubi di carbonio, funzionalizzati con azide, attraverso una reazione di tipo CuAAC. Questa reazione appartiene al gruppo delle reazioni di *Click*. In fase di ricerca bibliografica abbiamo intrapreso lo studio di due sintesi in particolare.^{64,65} In seguito si è svolta una sintesi che ha previsto un totale di sei step di reazione.

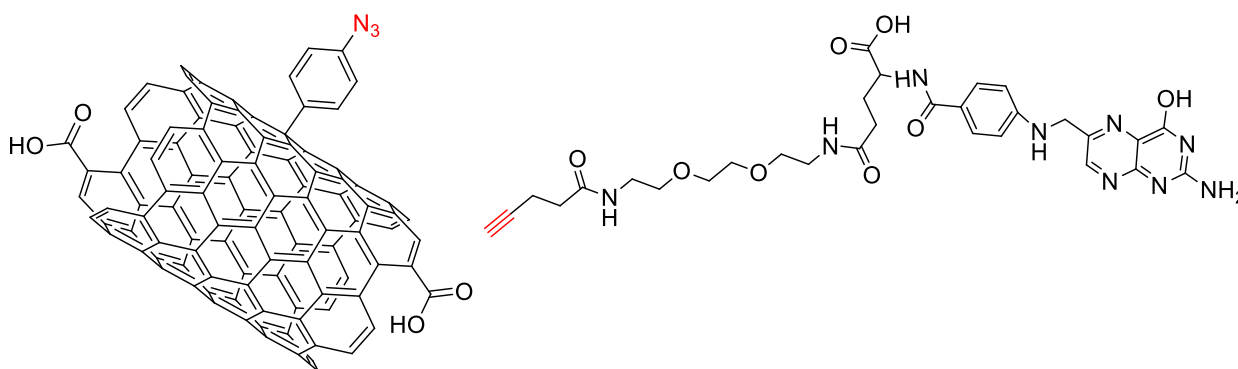


Figura 7.1.1- Nanotubo funzionalizzato con azide e derivato linker con gruppo alchidico terminale per reazione di *Click*

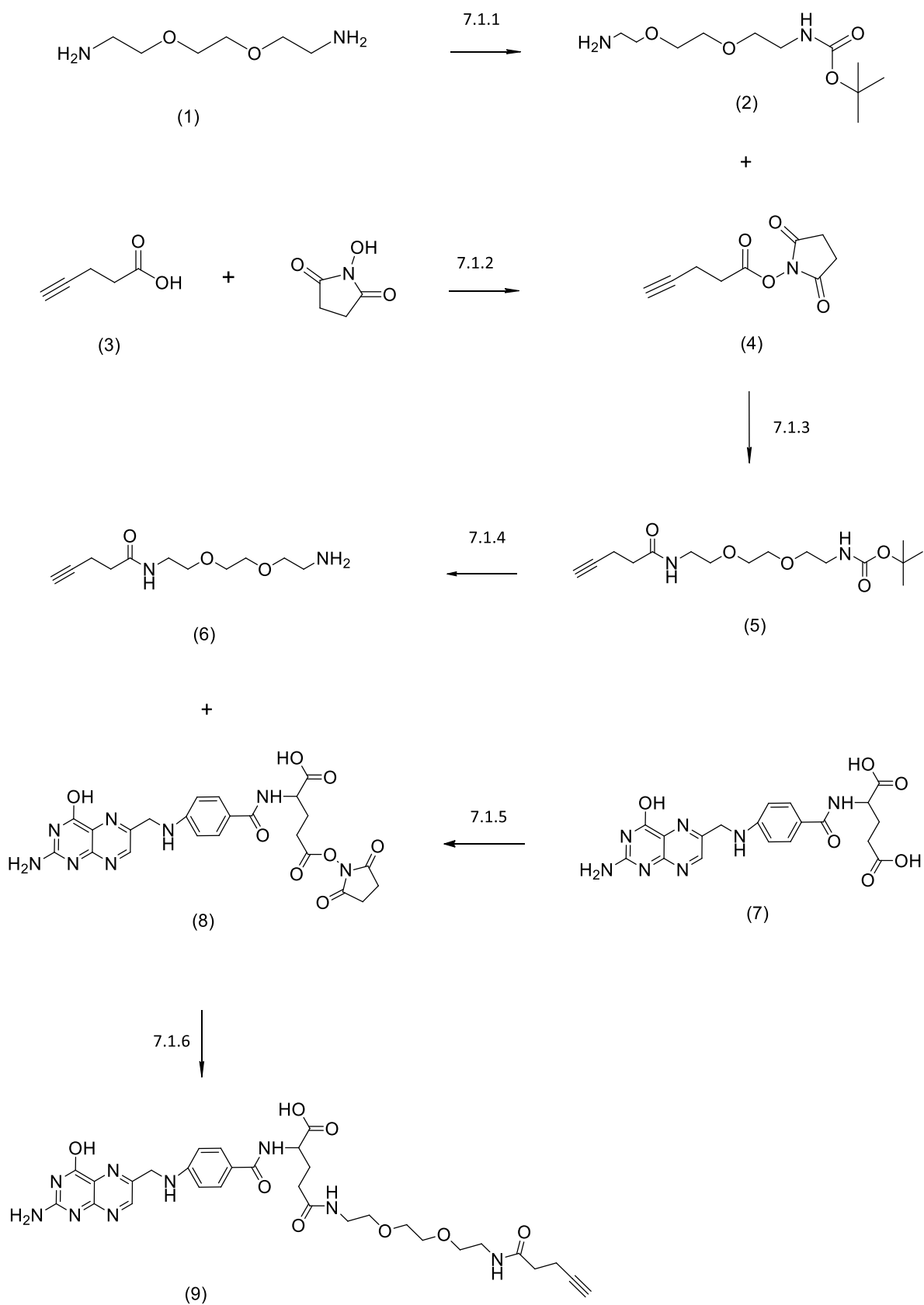
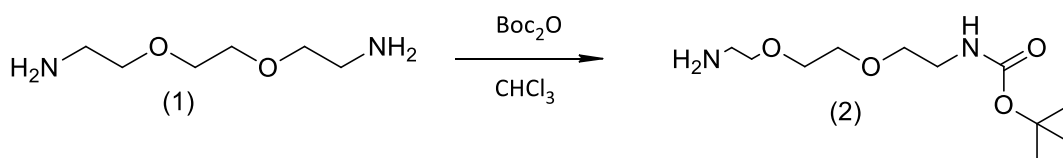


Figura 7.1.2- Schema di reazione per derivato linker da acido folico

7.1.1 Sintesi derivato PEG-BOC:



Per sintetizzare il derivato dell'acido folico che possiede il gruppo alchidico si decide di avviare la sintesi con 1,2-Bis(2-amminoetossi)etano effettuando la protezione con il gruppo BOC. La reazione avviene a temperatura ambiente sotto ambiente di azoto per 12 ore in cloroformio. Si purifica attraverso lavaggi. Per conferma della reazione avvenuta si caratterizza il prodotto tramite analisi $^1\text{HNMR}$.

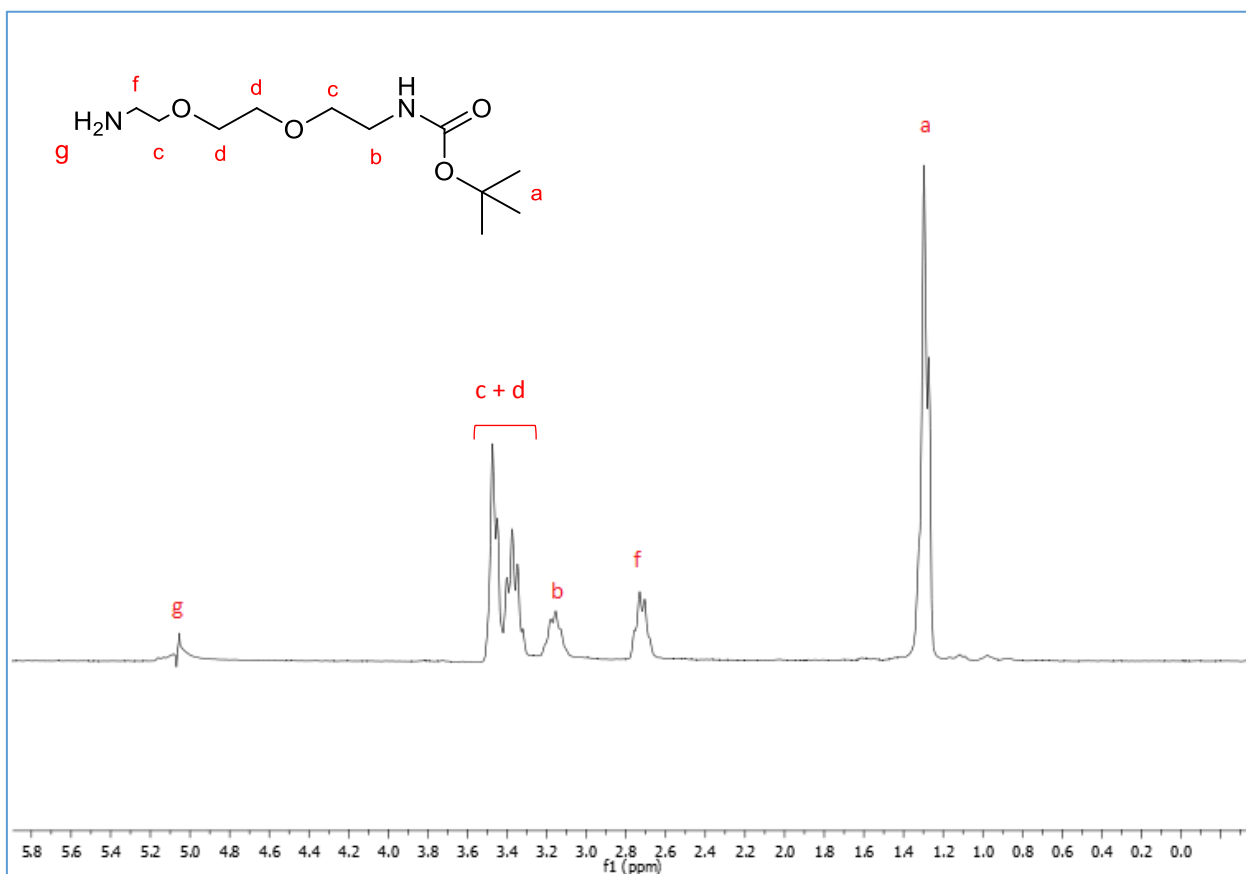
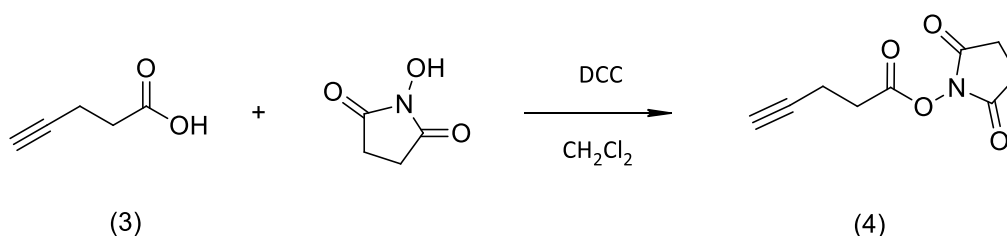


Figura 7.1.3- Spettro $^1\text{HNMR}$ del PEG-BOC

Dall'analisi $^1\text{H NMR}$ si conferma la presenza del prodotto e si può affermare la presenza del gruppo protettore ad una sola estremità, questo è confermato dalla presenza dell'ammina libera nello spettro a 5.15 ppm (picco G) e dal valore dell'integrale del picco A che integra solamente 9H. Questo ci permette di andare avanti nella sintesi, il composto 2 può legarsi alle sostanze successive mediante solo un'estremità.

7.1.2 Sintesi dell'acido pentinoico ATTIVATO



Ottenuto PEG-BOC la sintesi è proseguita con l'attivazione di un composto contenente il gruppo alchिनico terminale per la futura reazione di *Click* sui CNT. Il composto utilizzato è l'acido pentinoico. L'attivazione viene effettuata con N, N- dicicloesilcarbodiimmide e N-idrossisuccinimide e la reazione avviene sotto agitazione a temperatura ambiente per 12 ore in diclorometano. Si filtra tramite filtri per siringa in cellulosa rigenerata PORE 0.2 μm . Per conferma della reazione avvenuta si caratterizza il prodotto tramite analisi $^1\text{H NMR}$.

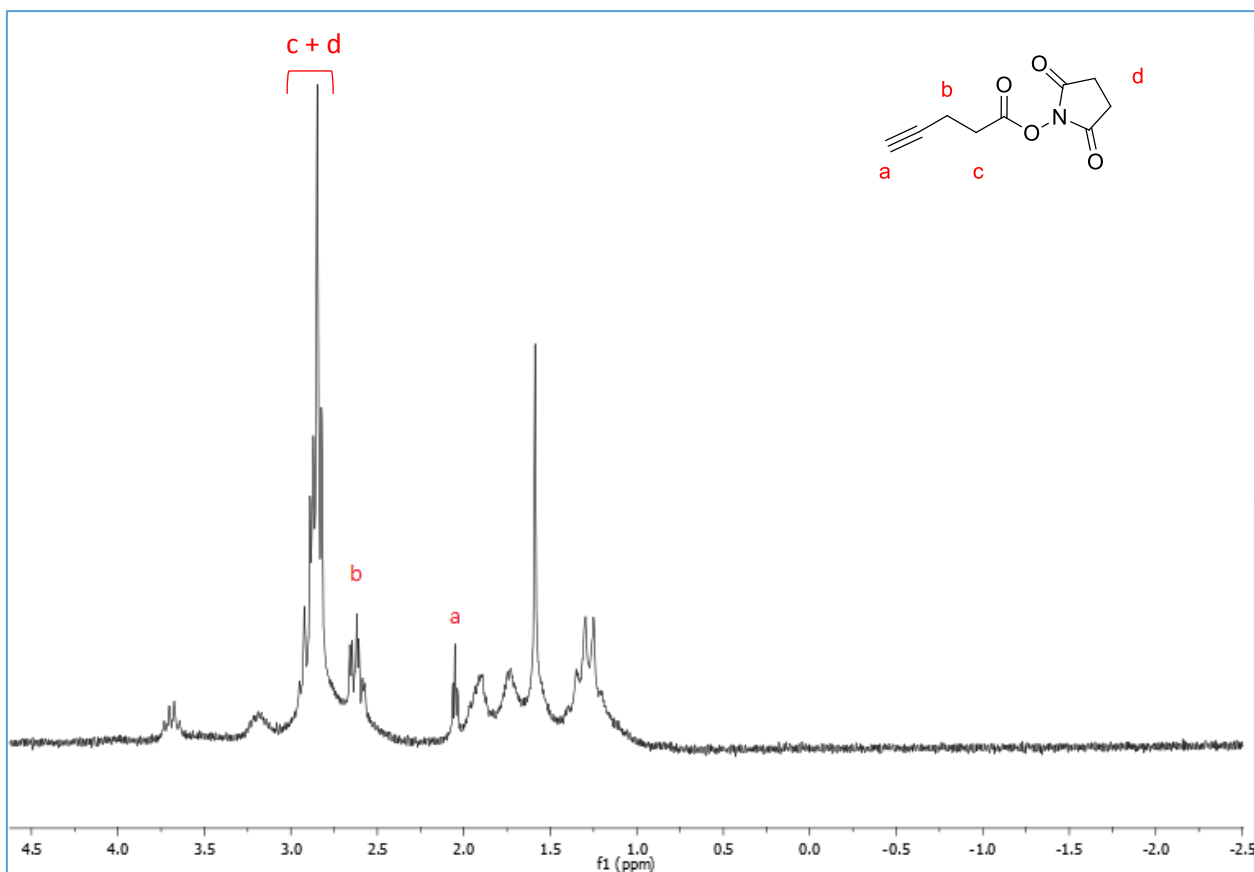
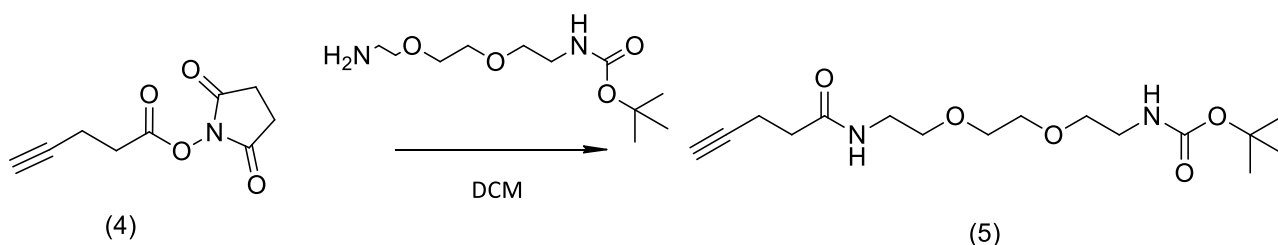


Figura 7.1.4- Spettro ¹H NMR dell'acido pentinoico attivato

Dallo spettro è possibile vedere come, oltre al prodotto, sia presente un'altra sostanza, molto probabilmente la dicicloesilurea (DCU) formata come sottoprodotto nella reazione prima descritta. Visibili anche i picchi dei solventi utilizzati. Come conferma della presenza del prodotto desiderato osserviamo come il multipletto presente a 2.82-2.91 ppm (picco C + D) comprende anche il singoletto dato dai 4H presenti sull'anello, inoltre è visibile il tripletto dell'idrogeno del triplo legame (picco A).

7.1.3 Reazione acido pentinoico ATTIVATO con PEG-AMMINA protetto



L'attivazione dell'acido pentinoico ci permette di proseguire con maggior efficienza nello step successivo della sintesi. Attivato l'acido pentinoico, si effettua la reazione con PEG-BOC. A questo stadio della sintesi si produce il linker da poter far reagire con l'acido folico per ottenere il derivato desiderato. La reazione avviene sotto agitazione a 30°C in atmosfera di azoto per 12 ore in diclorometano. Si diluisce con acetato di etile e si effettuano lavaggi con acqua milliQ, infine si filtra su celite. Il prodotto deve essere ulteriormente purificato tramite cromatografia su colonna gel di silice flash. Usando un eluente a gradiente (etere di petrolio: acetato di etile 2:1 e acetato di etile puro), si separa il prodotto e si caratterizza tramite analisi $^1\text{HNMR}$.

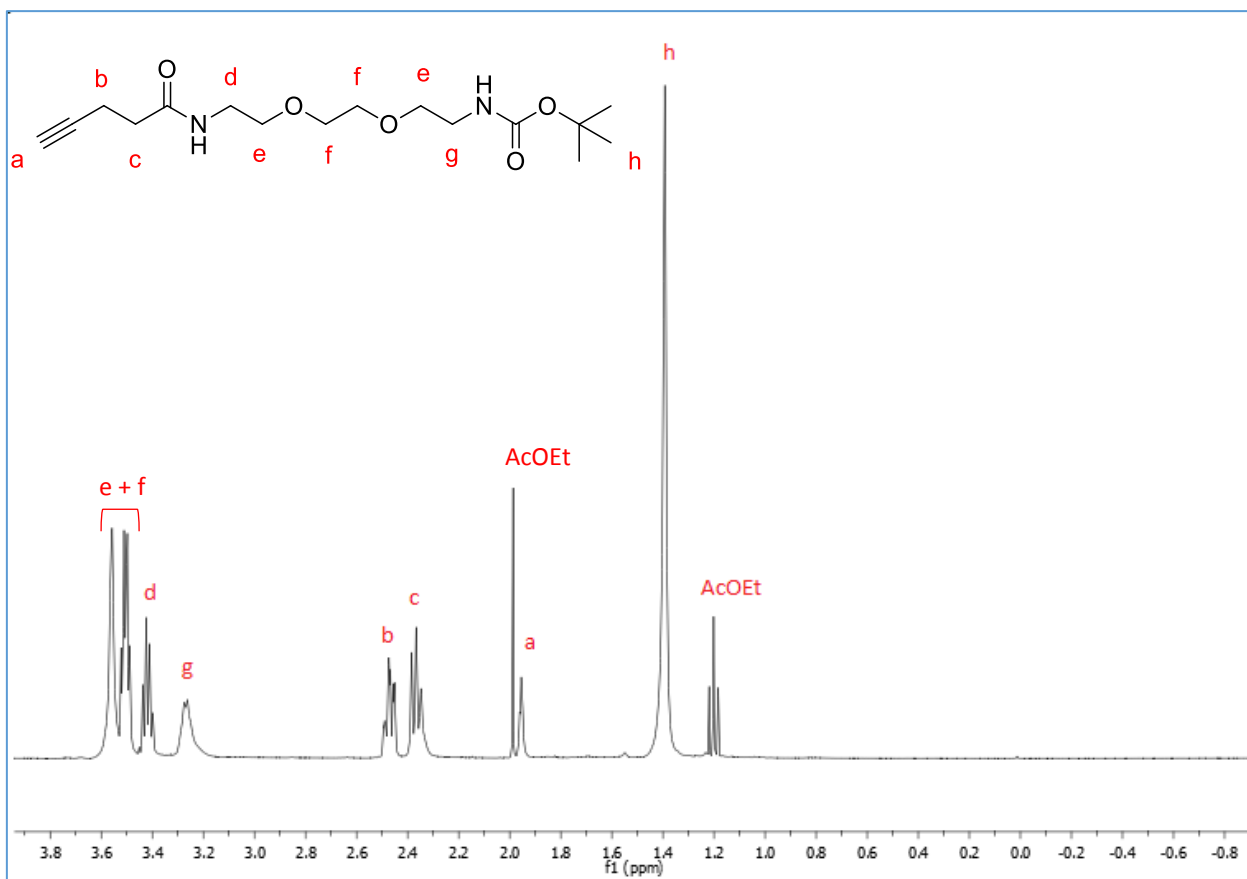
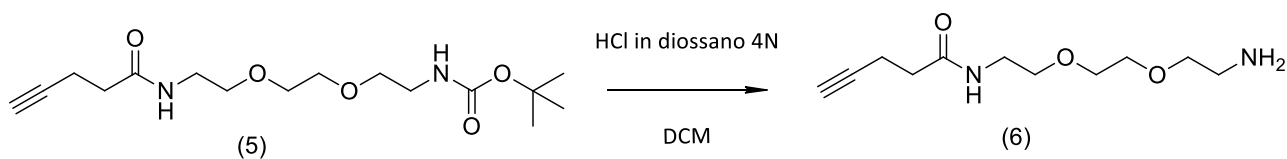


Figura 7.1.5- Spettro ^1H NMR PEG-BOC con gruppo alchिनico

Lo spettro ^1H NMR ha confermato che il prodotto ottenuto è quello atteso: sono infatti presenti segnali caratteristici quali il tripletto dell'idrogeno del triplo legame (picco A) ed inoltre è visibile il picco relativo ai tre metili del BOC che quindi è ancora intatto e presente (picco H).

7.1.4 Reazione di rimozione gruppo BOC:



Prima dell'attacco su acido folico per ottenere il derivato linker desiderato si deve effettuare la deprotezione del gruppo BOC in modo da rendere la successiva reazione possibile. La reazione avviene sotto agitazione per 12 ore in diclorometano e con aggiunta graduale di HCl in diossano 4N. Si controlla la reazione tramite TLC. Una volta che non è più presente il reagente e la reazione è avvenuta totalmente si effettua la purificazione tramite lavaggi. Per conferma della reazione avvenuta si caratterizza il prodotto tramite analisi $^1\text{HNMR}$.

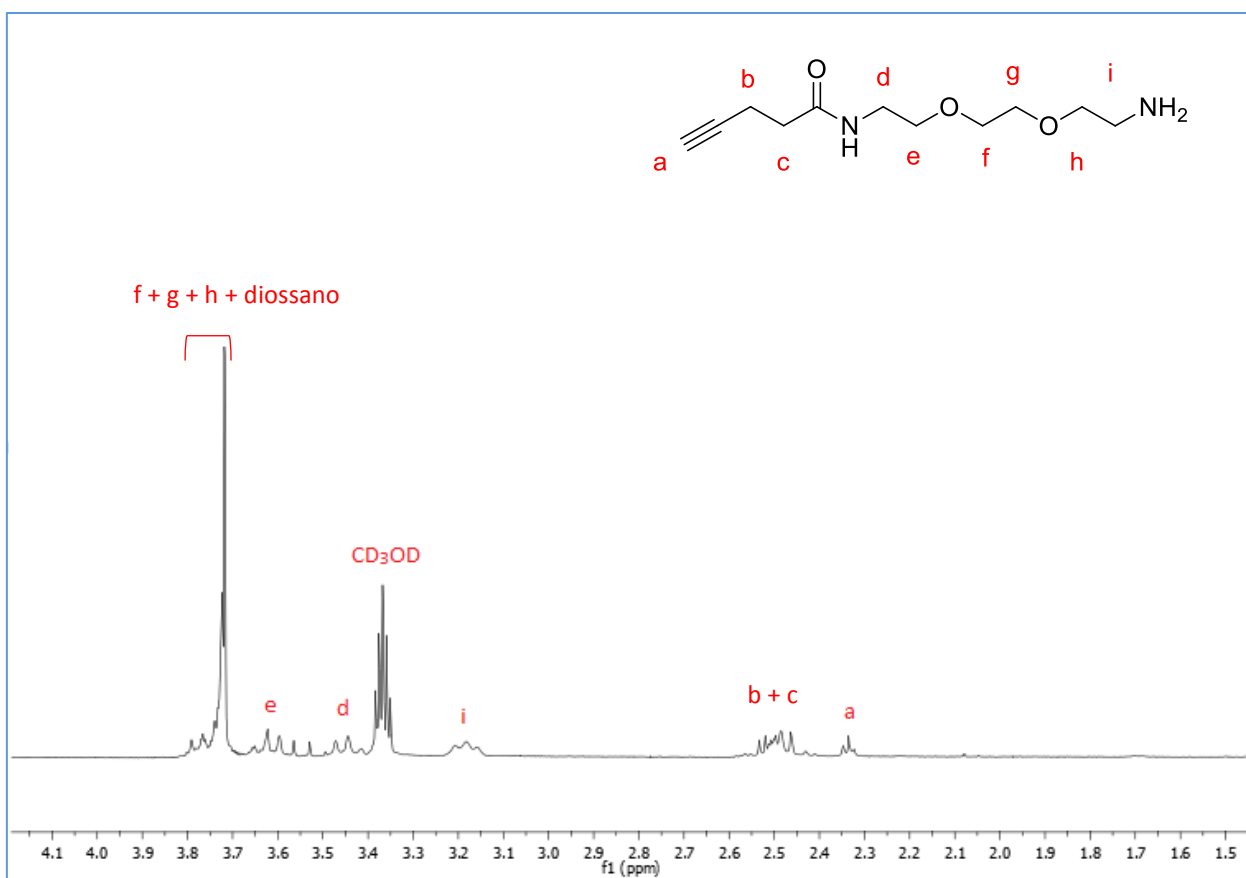
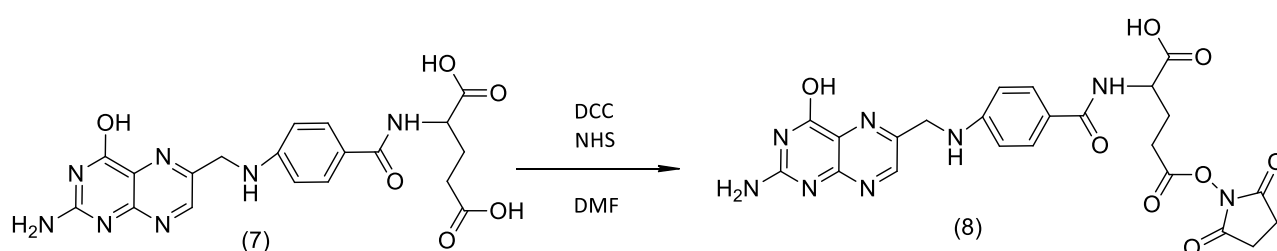


Figura 7.1.6- Spettro $^1\text{HNMR}$ del PEG-AMMINA con gruppo alchिनico

Dallo spettro ^1H NMR non è più visibile il picco del gruppo BOC. Sono visibili inoltre residui di solventi (diossano e CD_3OD). In base al risultato di questa analisi si può procedere con gli step successivi della sintesi.

7.1.5 Sintesi acido folico ATTIVATO:



Come effettuato per l'acido pentinoico, si attiva l'acido folico in vista della reazione per ottenere il derivato linker finale. L'attivazione viene effettuata con N, N- dicicloesilcarbodiimide e N-idrossisuccinimide e la reazione avviene sotto agitazione a temperatura ambiente per 12 ore in N, N-dimetil formammide dry in ambiente privo di luce. Si purifica attraverso lavaggi e filtrazioni. Per conferma della reazione avvenuta si caratterizza il prodotto tramite analisi ^1H NMR e ^{13}C NMR. Lo spettro ^1H NMR è stato studiato in modo approfondito attraverso un confronto con uno spettro ^1H NMR ritrovato in letteratura.⁶⁵ Il riferimento considerato riporta un confronto tra gli spettri dell'acido folico NON attivato e dell'acido folico attivato a 300 MHz in DMSO-d_6 .

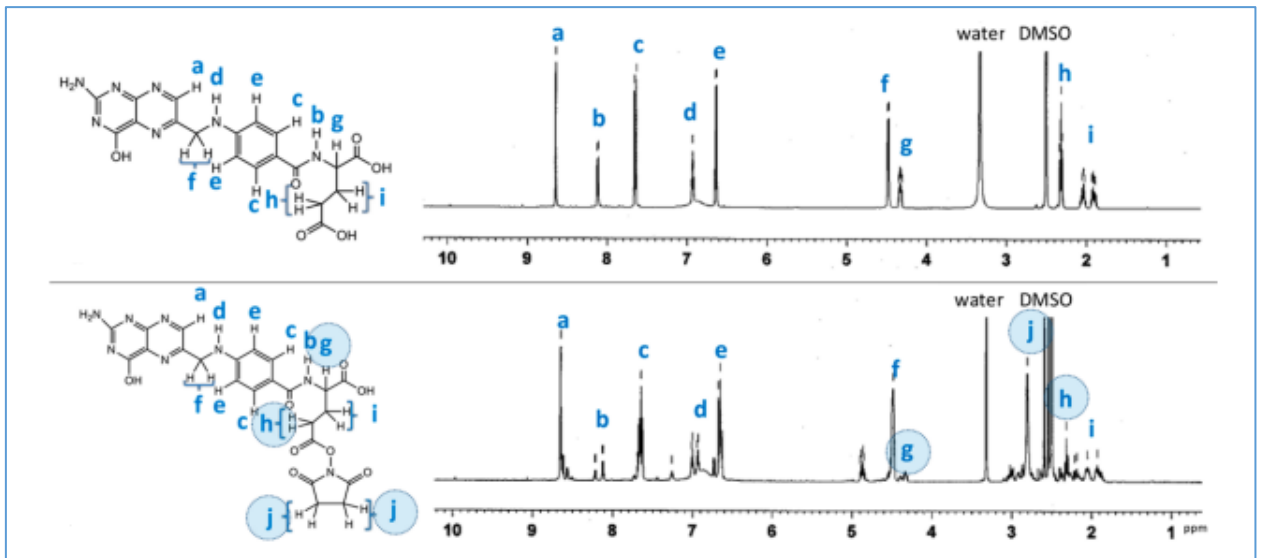


Figura 7.1.7- Spettro ^1H NMR del riferimento bibliografico di acido folico e acido folico attivato

Di seguito riportiamo prima lo spettro che abbiamo effettuato a 400 MHz dell'acido folico NON attivato.

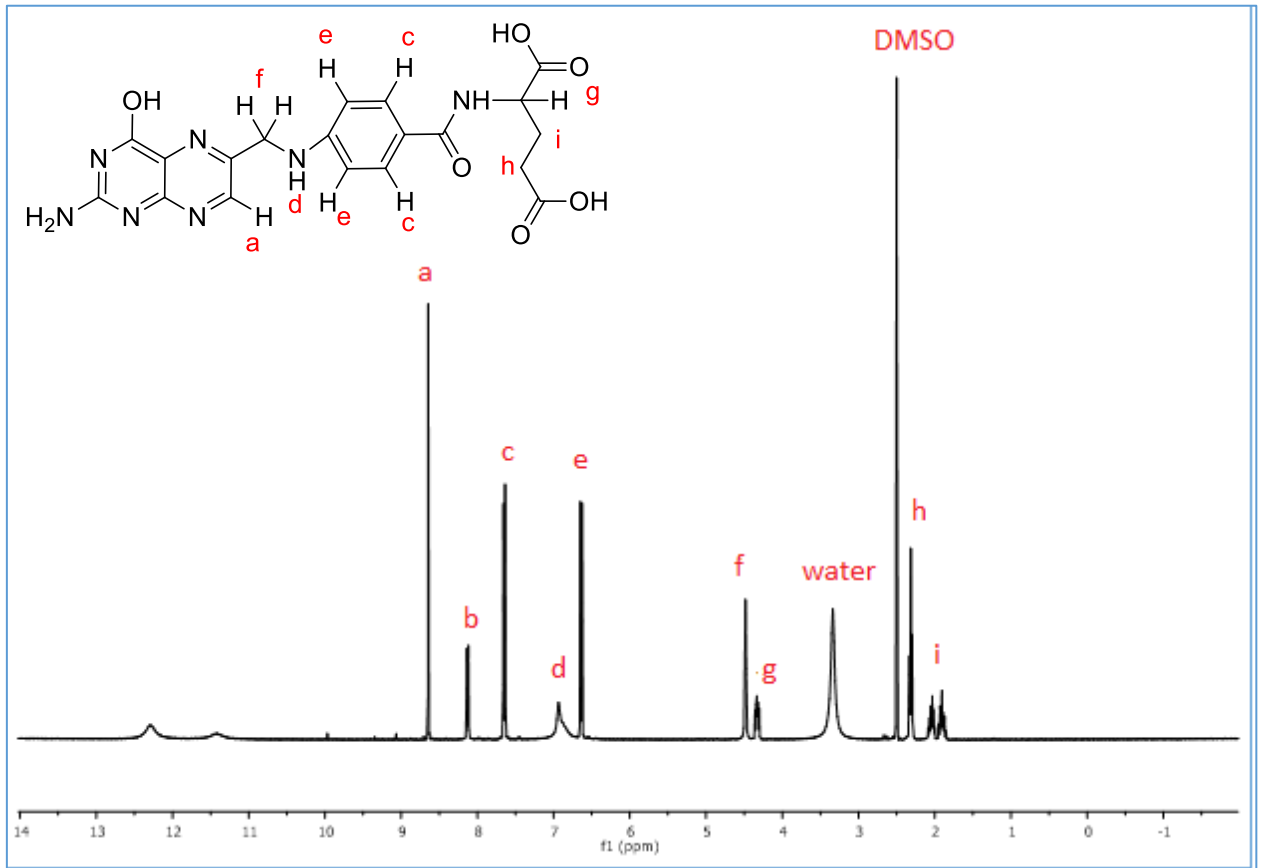


Figura 7.1.8- Spettro ¹H NMR di acido folico

Successivamente lo spettro a 400 MHz dell'acido folico attivato per effettuare un confronto con il precedente:

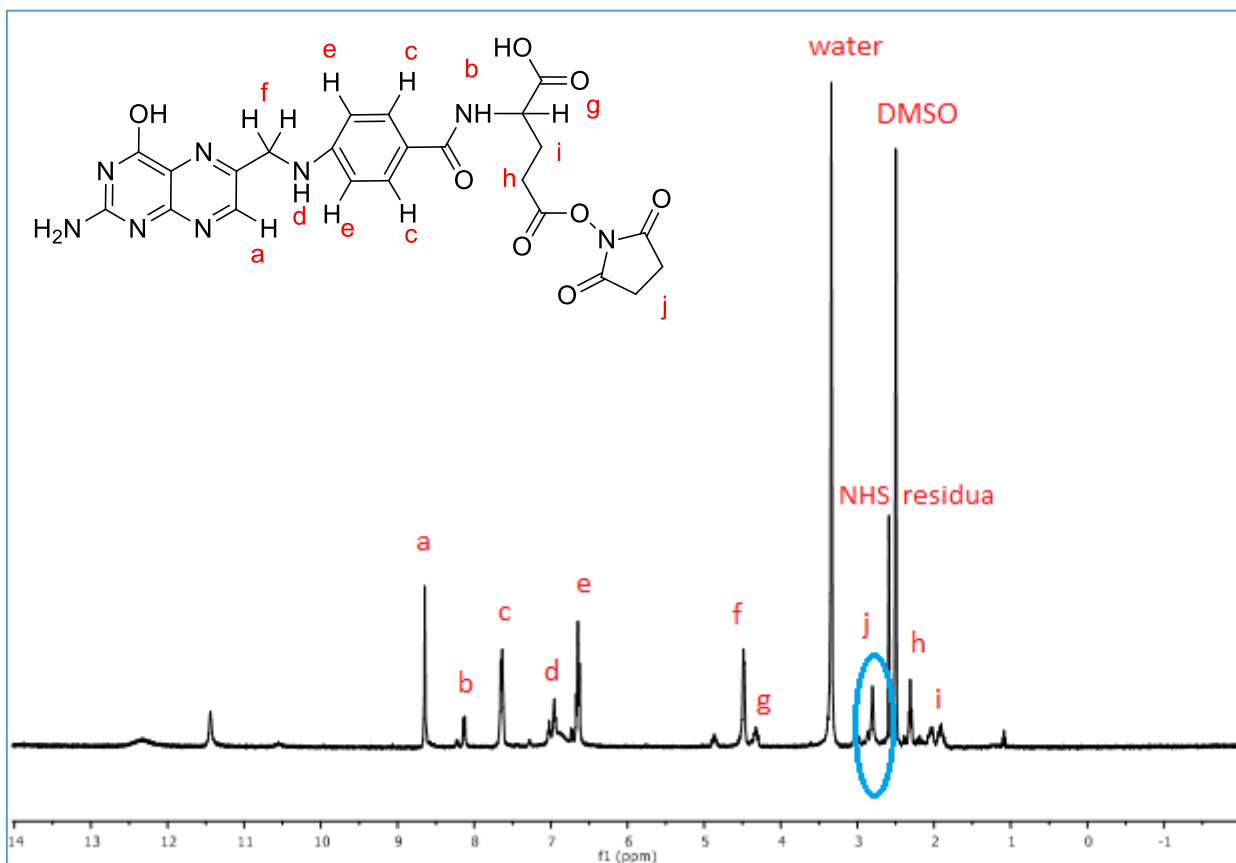


Figura 7.1.9- Spettro ¹HNMR di acido folico attivato

Possiamo vedere come, confrontando i due spettri (figura 7.1.7 e figura 7.1.8), sia presente il picco J a 2.80 ppm relativo agli atomi di idrogeno della N-idrossisuccinimide attaccata per formare l'acido folico attivato. Questo dato è fondamentale per poter affermare la presenza del prodotto.

Lo studio degli spettri conferma come nella miscela siano presenti ben tre sostanze oltre all’NHS residua, acqua e DMSO ovvero:

- isomero α acido folico attivato
- isomero γ acido folico attivato
- acido folico non reagito

Per analizzare questo abbiamo osservato come i vari segnali assegnati si scindessero in realtà in tre segnali. A conferma di questo abbiamo utilizzato lo spettro COSY per analizzare gli accoppiamenti tra gli idrogeni e il conteggio degli integrali. Consideriamo il picco **B**:

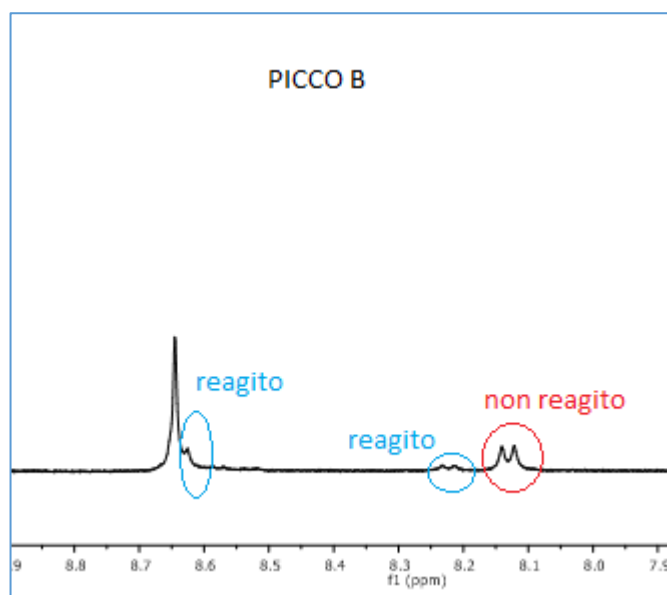


Figura 7.1.10- Ingrandimento spettro acido folico del picco B

Osserviamo come il segnale di B sia scisso in 3 segnali diversi: non reagito e reagito. Il segnale del non reagito possiamo con certezza affermare che sia quello per il diretto confronto con lo spettro dell’acido folico non reagito, picco con stessi ppm. I segnali del reagito corrispondono ai due isomeri presenti nella miscela in conseguenza all’attivazione. Questo è confermato dall’accoppiamento nello spettro COSY dei due segnali del reagito con altri picchi dello spettro.

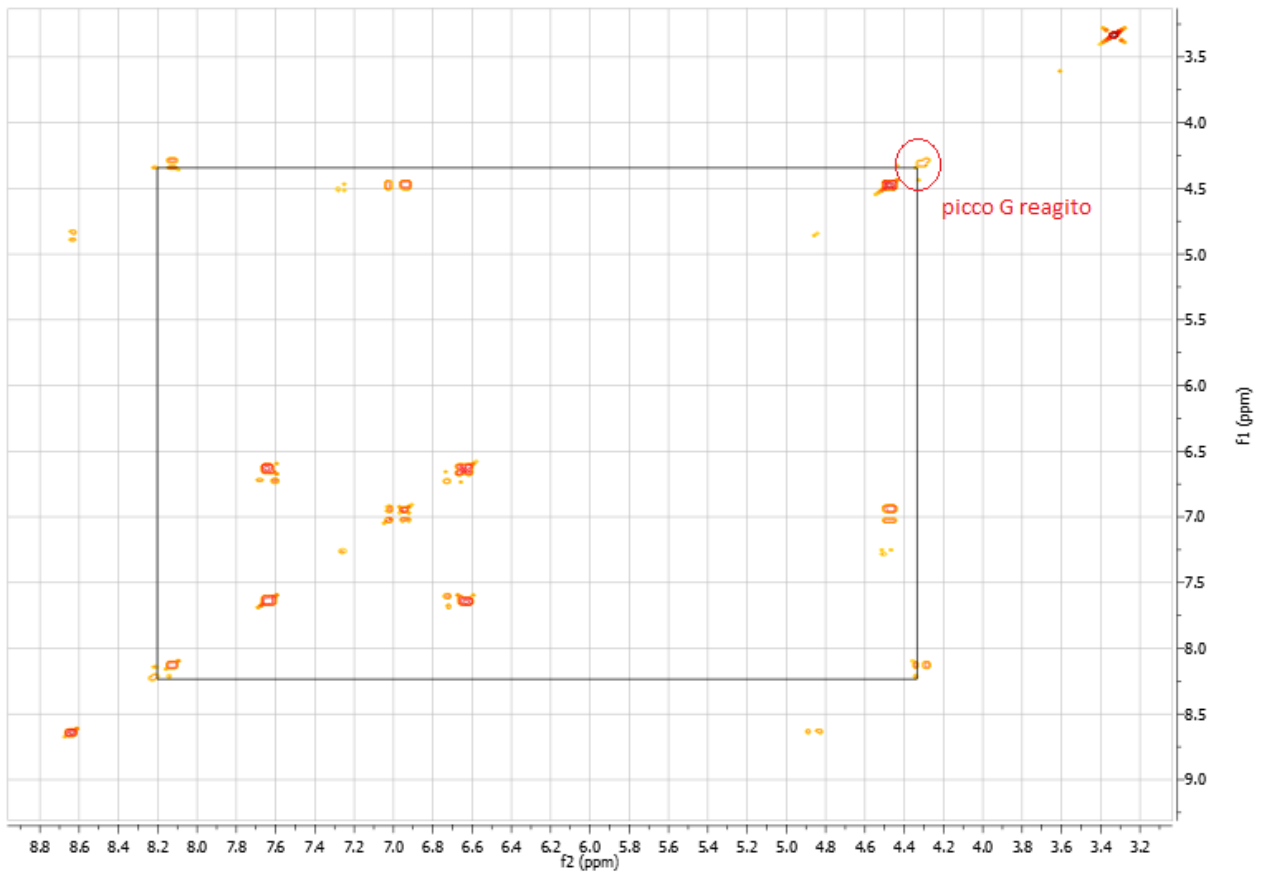


Figura 7.1.11- Spettro COSY acido folico attivato

Il picco B del reagito a 8.23 ppm accoppia con il picco G. Inoltre anche il picco **G** si scinde in tre diversi segnali:

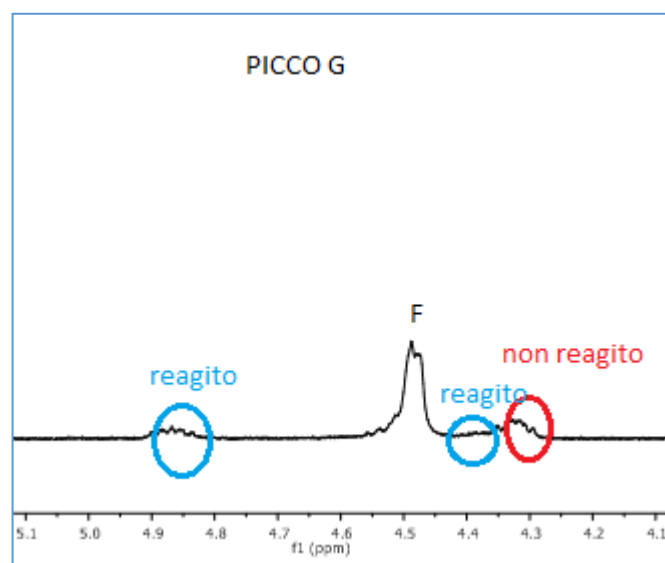


Figura 7.1.12- - Ingrandimento spettro acido folico del picco G

Anche in questo caso vediamo come il picco del non reagito sia presente alla stessa frequenza del picco dell'acido folico non reagito. Altra evidenza sono gli integrali, infatti il picco F che non risente della formazione dei due isomeri e rimane alla stessa frequenza integra 2H mentre facendo il totale degli integrali del non reagito e dei due reagiti troviamo che integra esattamente la metà di F, ovvero 1H. Consideriamo il picco D:



Figura 7.1.13- - Ingrandimento spettro acido folico del picco D

Anche in questo caso vediamo come il picco del non reagito sia presente alla stessa frequenza del picco dell'acido folico non reagito. Interessante osservare come uno dei segnali dell'acido reagito corrispondenti ad uno dei due isomeri accoppia con il picco F come si può vedere nello spettro COSY.

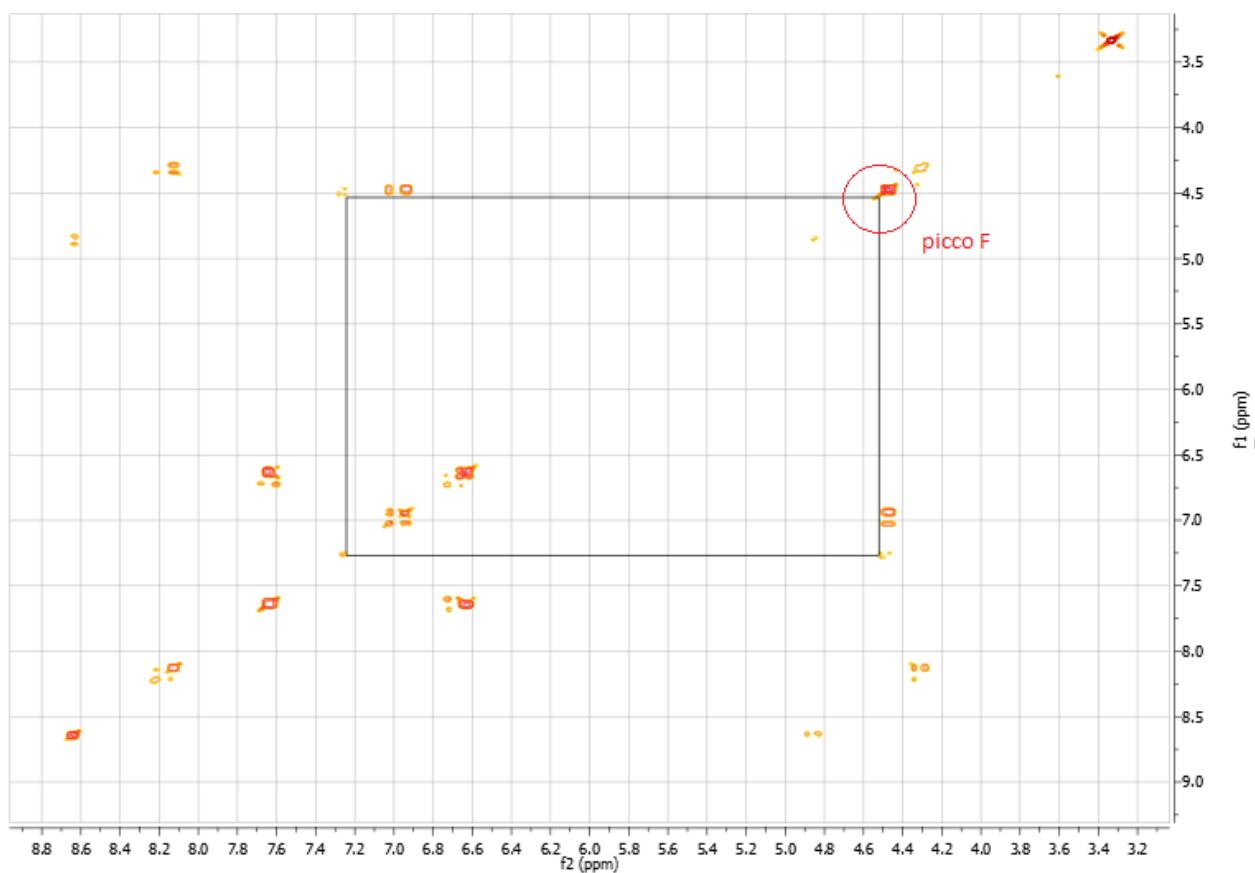


Figura 7.1.14- Spettro COSY di acido folico attivato

L'evidenza di questo studio ha sottolineato come nella miscela siano presenti i due isomeri α e γ e ancora presente l'acido folico di partenza. Il prodotto viene utilizzato per la reazione successiva.

In letteratura è riportata inoltre l'analisi dello spettro ^{13}C NMR come ulteriore evidenza della presenza del prodotto data dai picchi relativi ai carboni dell'idrosuccinimide utilizzata per l'attivazione dell'acido.

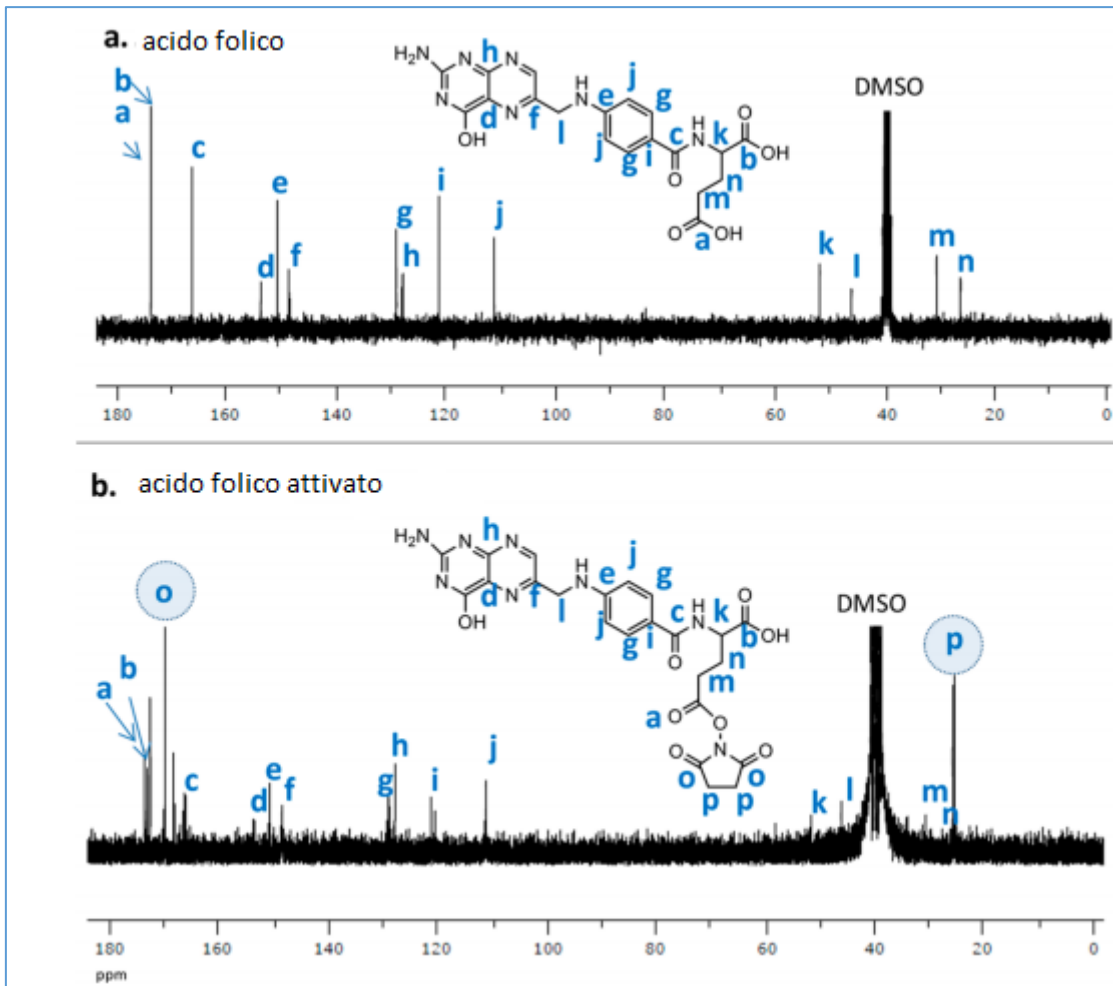


Figura 7.1.15- Spettro ^{13}C NMR del riferimento bibliografico di acido folico e di acido folico attivato

Lo spettro che abbiamo riportato mostra la presenza dell'acido folico attivato per i picchi o e p come visto nel riferimento.

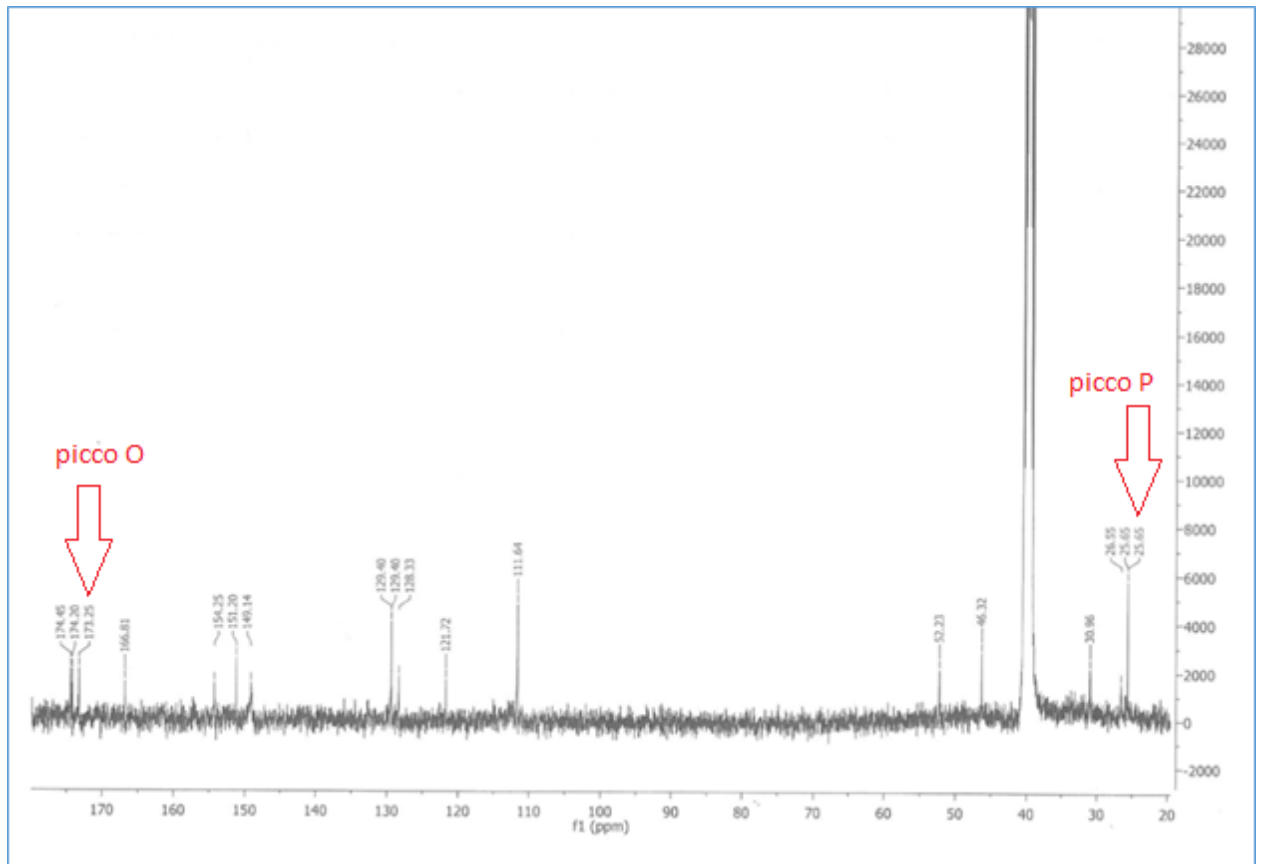
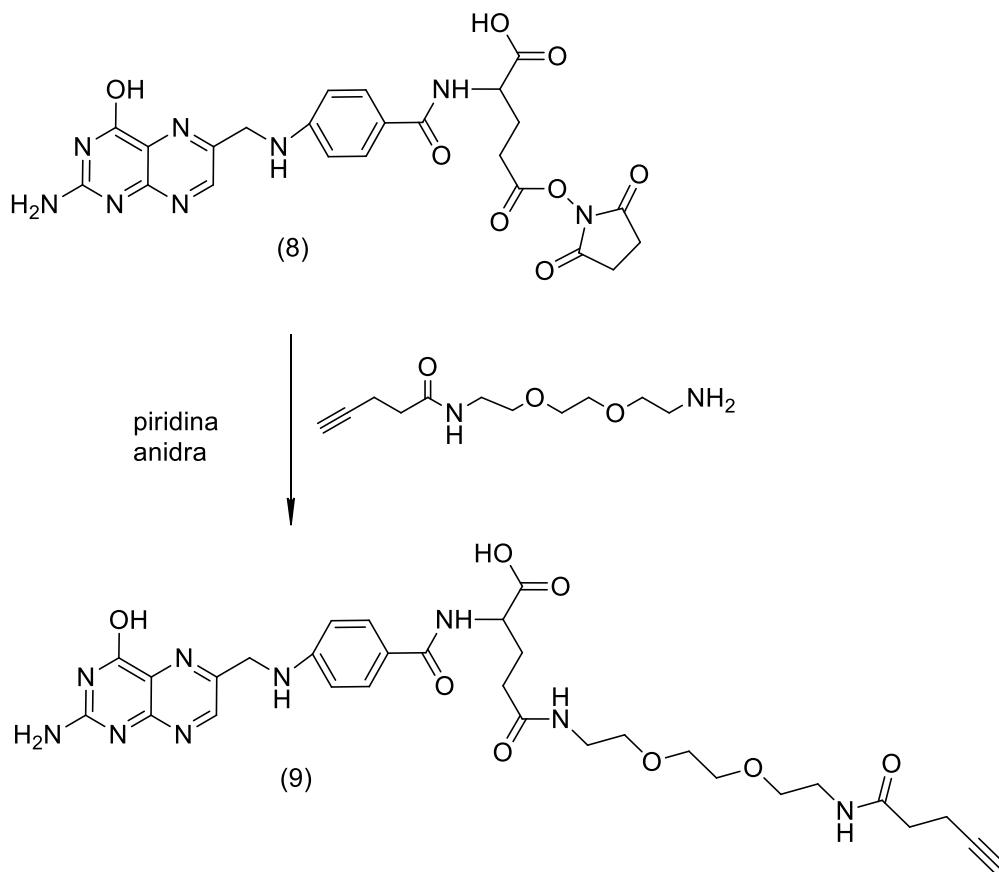


Figura 7.1.16- Spettro ^{13}C NMR di acido folico attivato

7.1.6 Sintesi derivato linker da ACIDO FOLICO



L'ultimo step della sintesi prevede la formazione dell'acido folico con gruppo alchिनico. Il gruppo alchिनico utilizzato è stato anche esso sintetizzato a partire da una serie di reazioni che ha coinvolto l'acido pentinoico e il PEG-BOC. La reazione avviene sotto agitazione a temperatura ambiente sotto azoto in ambiente privo di luce per 12 ore in piridina anidra. Si porta a secco il prodotto.

Lo scopo finale di questa parte di lavoro prevedeva l'attacco del derivato linker a partire da acido folico sulla superficie di CNT funzionalizzati con azide tramite reazione di CuAAC, tipologia *Click*. Il problema che abbiamo dovuto affrontare ancor prima, presente anche in letteratura e come

abbiamo riscontrato nell'analisi dello spettro dell'acido folico attivato, è la formazione dei due isomeri α e γ .

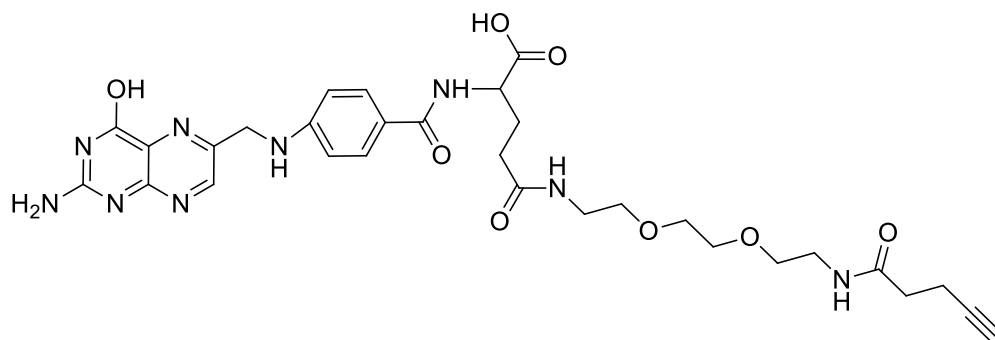


Figura 7.1.17- Isomero γ presente nella miscela

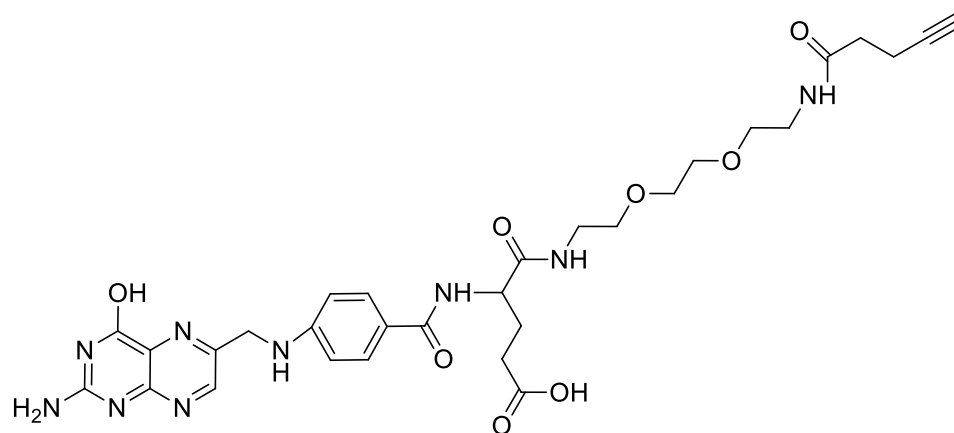


Figura 7.1.18- Isomero α presente nella miscela

In letteratura è un tema affrontato con qualche controversia. Per affrontare il problema della separazione dei due isomeri si utilizza l'analisi con cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC). L'uso di questa tecnica di separazione ha riportato però anche esiti negativi dove non è avvenuta la separazione dei due isomeri α e γ ma la tecnica è servita per purificare ulteriormente il prodotto, per togliere l'ammina con gruppo alchilico non reagita nella sintesi.⁶⁷ Ulteriori separazioni ritrovate in letteratura sono state effettuate per eliminare l'ammina con gruppo alchilico non reagita durante l'ultima sintesi attraverso una colonna DEAE Sephadex A25.⁶⁵ Altri studi invece hanno utilizzato il metodo cromatografico su colonna a scambio ionico DEAE per separare i due isomeri e successivamente purificare i due prodotti tramite analisi HPLC.⁶⁸ In questo lavoro di tesi non è stato possibile ottenere una separazione dei due isomeri, per questo abbiamo reputato superfluo riportare una qualsiasi caratterizzazione del grezzo, ma sarà studio di sviluppi futuri.

7.2 Decorazione CNT con anigopressina:

La seconda parte di questo lavoro di tesi si è concentrato sull'attacco di farmaci sulla superficie di CNT già funzionalizzati. Il farmaco utilizzato per il sistema di Drug Delivery è l'anigopressina. Il lavoro su questo farmaco è iniziato con la caratterizzazione di questo ultimo. La caratterizzazione si è basata su un'analisi spettroscopica UV-Vis, non ritrovata in letteratura. Per le varie analisi è stato necessario trovare un solvente dove l'anigopressina potesse solubilizzarsi e potesse essere adatto per la spettroscopia UV-Vis. La solubilità dell'anigopressina nei vari solventi organici, data la sua struttura con molti gruppi metili, è stata un problema fin dalle prime analisi. Infine abbiamo potuto lavorare con un solvente accettabile, ovvero isopropanolo.

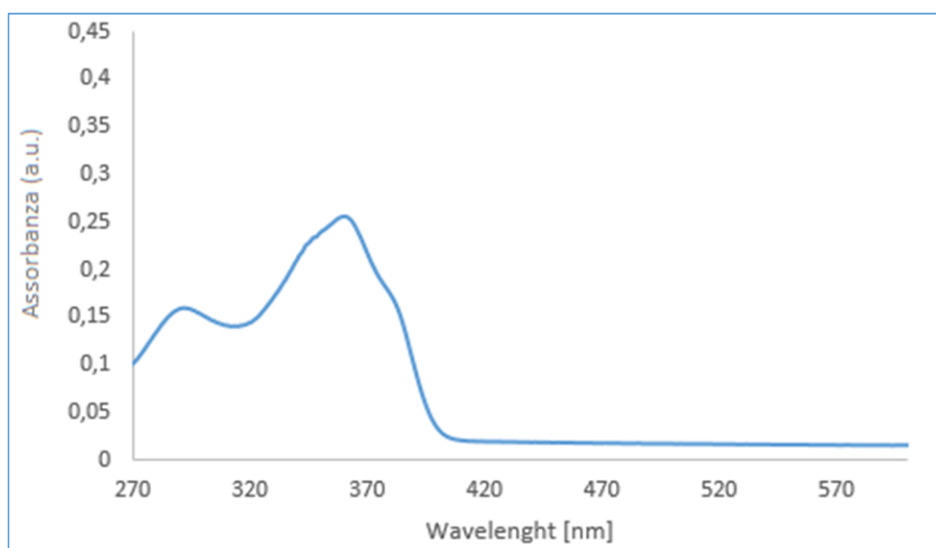
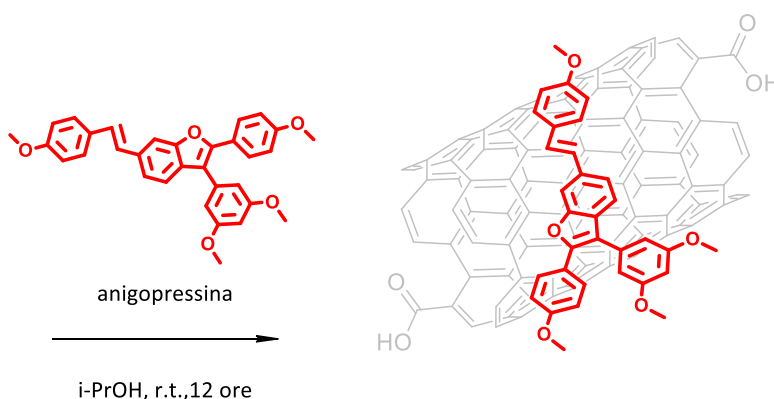
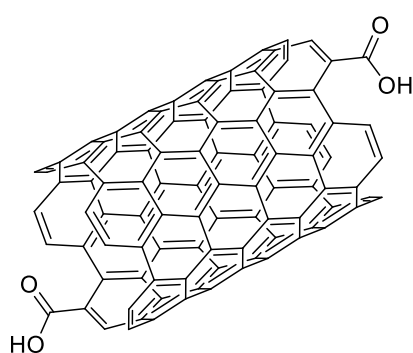


Figura 7.2.1- Spettro UV-Vis anigopressina in isopropanolo (2.5×10^{-3} mg/mL) con picchi intensi a 361 nm e 293 nm

Si è studiato il sistema farmaco-CNT in due differenti casi: 1) CNT ossidati 2) CNT ossidati con presenza di selettore biotina. Lo studio mirava inoltre a differenziare i due esperimenti mostrando come il selettore abbia un ruolo particolarmente incisivo sul carico finale del farmaco sulla superficie dei CNT.

7.2.1 Sintesi CNT ossidati con anigopressina:

La decorazione di nanotubi con farmaco prevede prima l'ossidazione in modo da poter funzionalizzare successivamente i CNT per la realizzazione di un sistema di Drug Delivery. L'ossidazione dei nanotubi comporta una riduzione della loro lunghezza e la funzionalizzazione della parete esterna con gruppi carbossilici e carbonilici. Si procede in questo caso con la funzionalizzazione da parte dell'anigopressina che avviene attraverso le interazioni di π -stacking tra la superficie aromatica dei CNT e gli anelli aromatici dell'anigopressina. La reazione viene effettuata a temperatura ambiente, in una soluzione di isopropanolo contenente una dispersione di CNT e di anigopressina, mantenendo l'agitazione per tutta la notte.



Al termine della reazione, la soluzione viene filtrata su filtri con diametro dei pori di 0.2 μm , in modo da rimuovere tutta l'anigopressina residua non attaccata sui CNT. Si effettuano lavaggi con isopropanolo, del materiale depositato sul filtro, fino a quando la concentrazione di anigopressina nelle acque di filtrazione, misurata tramite analisi UV-Vis, risulta esser costante. In realtà questa situazione non si è verificata per cui la fine dei lavaggi è stata dettata dalla costante colorazione dei lavaggi successivi in modo da non danneggiare il farmaco aderito sui nanotubi. Per calcolare la quantità di farmaco che si è legata ai CNT si è utilizzato la spettroscopia UV-Vis, costruendo inizialmente una curva di calibrazione per l'anigopressina, da cui è stato possibile misurare la quantità di farmaco presente nelle acque di filtrazione raccolte. Infine facendo la differenza tra l'anigopressina nelle acque di filtrazione e quella presente inizialmente nell'ambiente di reazione, si calcola la quantità di farmaco che realmente si è legato ai CNT.

ANIGOPRESSINA iniziale [Conc]	ANIGO presente in acque di filtrazione [Conc]	CNT (mg)
3.6 mg/10 mL	1.6 mg/50 mL	6.0

ANIGOPRESSINA complessata (mg)	% ANIGOPRESSINA complessata
2.0	56

Carico mg ANIGO/g CNT totali
290

I dati in tabella mostrano come l'anigopressina abbia reagito con i CNT in soluzione per il 56 %. La reazione tra anigopressina e CNT è avvenuta con resa accettabile, è stato poi calcolato successivamente il carico di anigopressina sul campione totale: 290 mg/g. Il campione finale contiene il 30 % di farmaco. Dopo aver quantificato l'anigopressina legata ai CNT si verifica che la reazione è effettivamente avvenuta tramite la spettroscopia UV-Vis, effettuando un paragone con lo spettro delle acque di filtrazione (anigopressina libera).

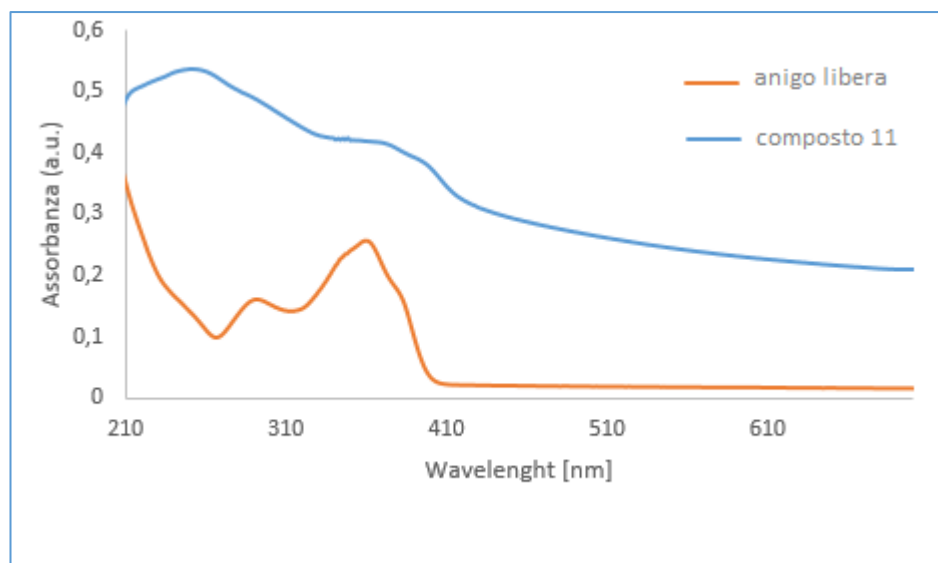


Figura 7.2.2 -Spettri UV-Vis del composto 11, ANIGO libera

(soluzioni in 80:20 tampone fosfato/isopropanolo)

Concentrazione: 0.11 mg/mL

Concentrazione: 2.5×10^{-3} mg/mL

Grazie al paragone è possibile chiarire che il picco del composto 11 appartiene effettivamente al farmaco. La caratterizzazione UV-Vis conferma l'attacco dell'anigopressina sui CNT. Ulteriore conferma è stata data dall'analisi spettrofluorimetrica effettuata sempre a paragone con le acque di filtrazione.

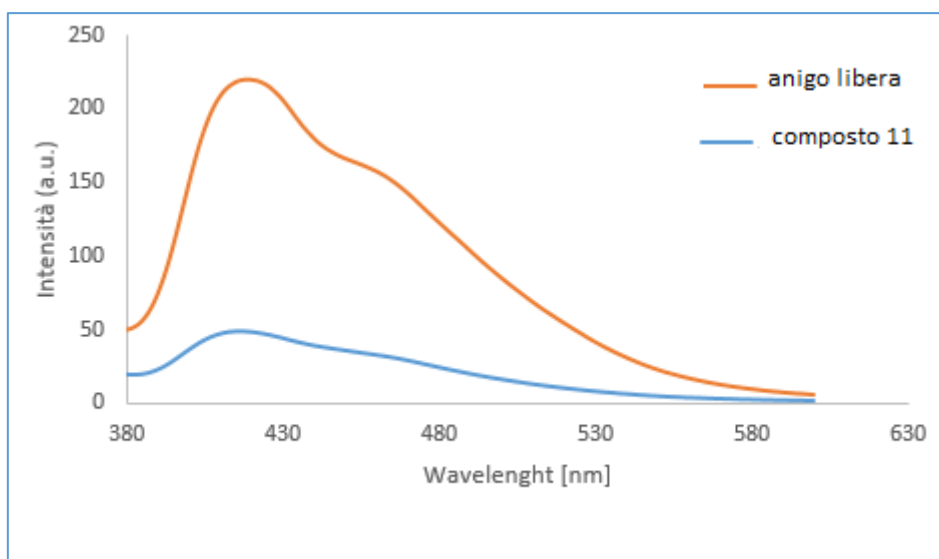


Figura 7.2.3-Spettri di fluorescenza del composto 11, ANIGO libera con stessa concentrazione di farmaco (soluzioni in 80:20 tampone fosfato/isopropanolo)

Concentrazione: 0.11 mg/mL

Concentrazione: 0.03 mg/mL

La fluorescenza dell'anigopressina libera, in soluzione acquosa, risulta essere elevata, mentre osservando la fluorescenza del composto 11 si può vedere come abbia subito una diminuzione, questo comportamento è una chiara evidenza del fatto che nanotubi e farmaco interagiscono attraverso interazioni π . Per cui l'analisi spettrofluorimetrica ci ha dato informazioni riguardo anche la tipologia di legame che avviene tra il farmaco e i CNT. La presenza di questo tipo di interazioni induce un quenching della fluorescenza già osservato anche per altre molecole aromatiche legate ai CNT con la medesima modalità, come la doxorubicina.

Lo studio è proseguito con l'analisi del rilascio di anigopressina legata ai CNT in tampone fosfato a pH 7,4 in modo da riprodurre l'ambiente cellulare così da aver dati sperimentali riguardo il rilascio del sistema Drug Delivery creato. Le analisi svolte hanno come scopo, quello di determinare la quantità di anigopressina che viene rilasciata dai CNT nel tempo. Per monitorare il rilascio del farmaco si realizza una soluzione acquosa del composto 11 che viene messa sotto agitazione a temperatura di 37°C in ambiente privo di luce per 120 ore. Durante questo tempo ogni 48 ore si filtra la soluzione su filtro in policarbonato pore 0.2 µm (Whatman d 25 mm) e si ricava la concentrazione di anigopressina rilasciata nelle acque di filtrazione mediante spettroscopia UV-Vis. Dopo ogni analisi si rinnova completamente il solvente in modo da facilitare il rilascio del farmaco.

Dopo 24 ore:

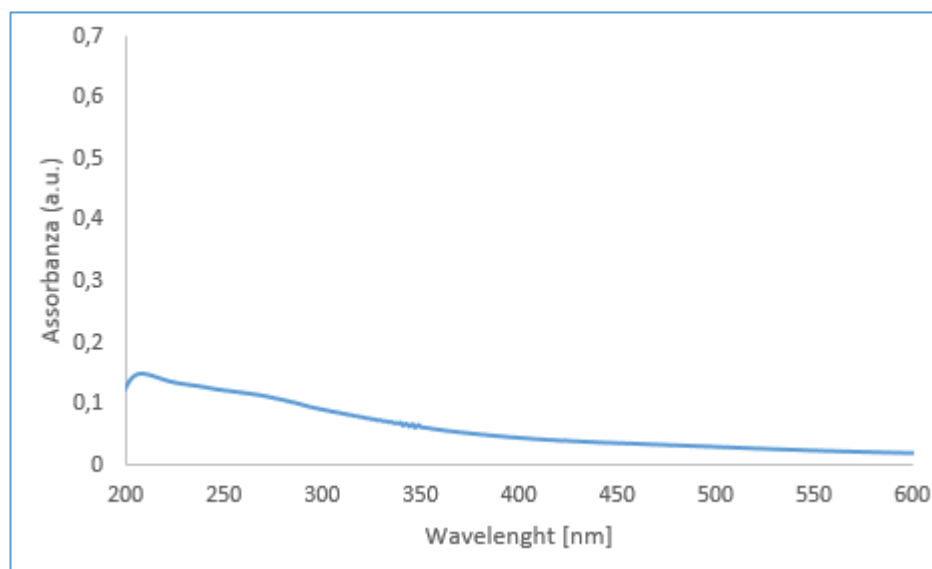


Figura 7.2.4- Spettro UV-Vis acqua di filtrazione dopo 24 ore con assenza di farmaco rilasciato

Dopo 48 ore:

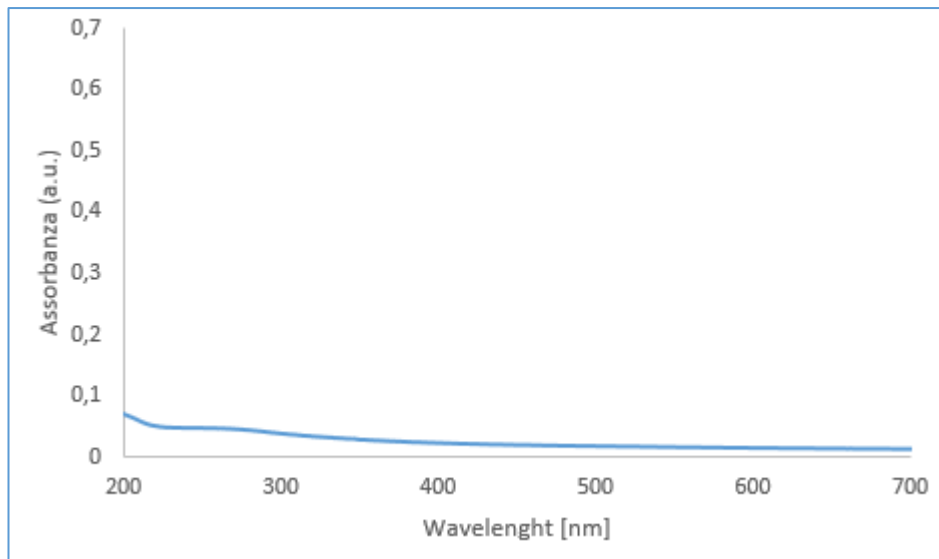
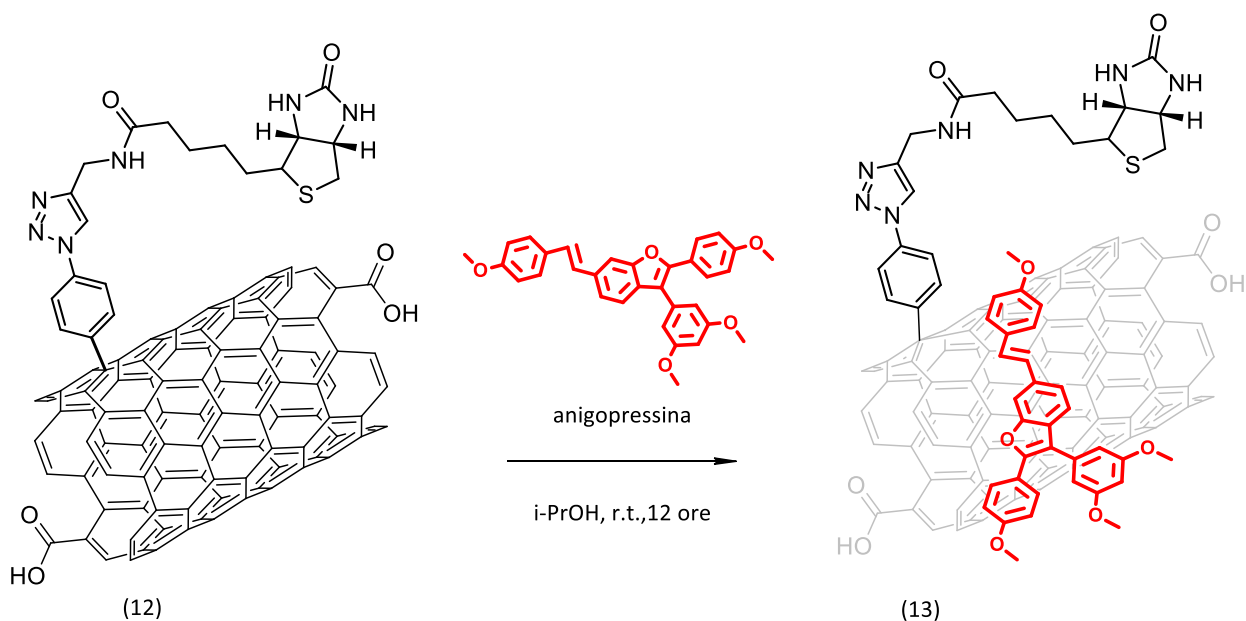


Figura 7.2.5- Spettro UV-Vis acqua di filtrazione dopo 48 ore
con assenza di farmaco rilasciato

Dopo due analisi spettroscopiche UV-Vis consecutive si vede come non si abbia nessun rilascio di farmaco nel tampone fosfato. Il motivo consiste nella scarsa solubilità dell'anigopressina nel solvente utilizzato. Sarà di particolare interesse, per sviluppi futuri, studiare il rilascio dell'anigopressina in sieri biologici, diversi da soluzioni acquose, che possano riprodurre fedelmente l'ambiente cellulare.

7.2.2 Decorazione con anigopressina di CNT ossidati con selettore biotina:



La reazione viene effettuata a temperatura ambiente, in una soluzione di isopropanolo contenente una dispersione di CNT funzionalizzati con il selettore biotina e di anigopressina, mantenendo l'agitazione per tutta la notte. Al termine della reazione, la soluzione viene filtrata su filtri con diametro dei pori di 0.2 μm , in modo da rimuovere tutta l'anigopressina residua non attaccata sui CNT. Si effettuano lavaggi con isopropanolo come nella decorazione precedente e si calcola la quantità di farmaco legata ai CNT tramite la spettroscopia UV-VIS.

ANIGOPRESSINA iniziale [Conc]	ANIGO presente in acque di filtrazione [Conc]	CNT (mg)
4 mg/7 mL	1.2 mg/50 mL	6.0

ANIGOPRESSINA complessata (mg)	% ANIGOPRESSINA complessata
2.8	70

Carico mg ANIGO/g CNT totali
396

I dati in tabella mostrano come l'anigopressina abbia reagito con i CNT in soluzione per il 70 %. La reazione tra anigopressina e CNT è avvenuta con resa accettabile, è stato poi calcolato successivamente il carico di anigopressina sul campione totale: 396 mg/g. Il campione finale contiene il 40 % di farmaco. Il carico di anigopressina è superiore nel composto 13 rispetto al composto 11. Il maggior carico del composto 13 può essere spiegato, oltre ad una lieve differenza di concentrazione, con la presenza del selettore biotina già presente sui CNT. Dopo aver quantificato l'anigopressina legata ai CNT si verifica che la reazione è effettivamente avvenuta tramite la spettroscopia UV-Vis, effettuando un paragone con lo spettro delle acque di filtrazione (anigopressina libera).

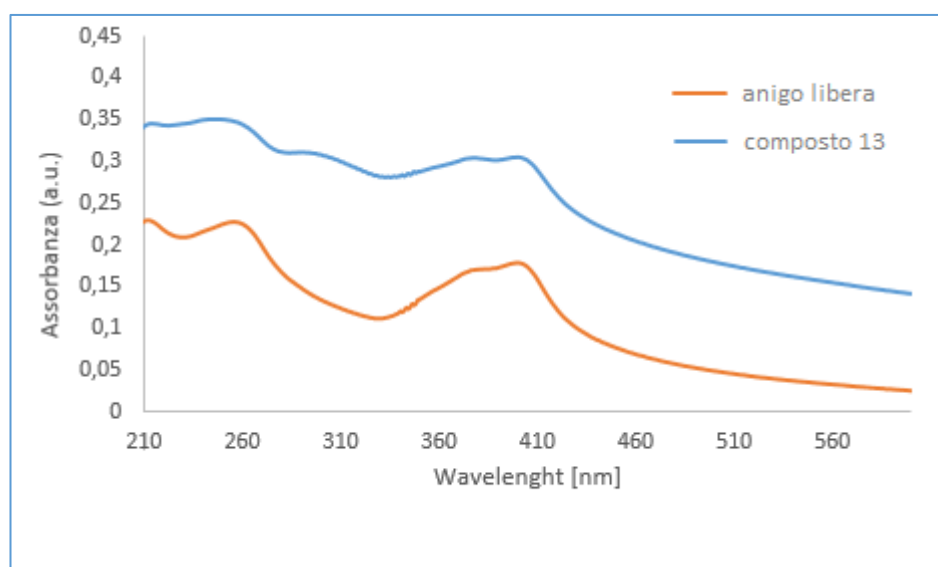


Figura 7.2.6- Spettri UV-Vis del composto 13, ANIGO libera con stessa concentrazione di farmaco (soluzioni in 80:20 tampone fosfato/isopropanolo)

Concentrazione: 0.06 mg/mL

Concentrazione: 0.02 mg/mL

Grazie al paragone è possibile chiarire che il picco del composto 13 appartiene effettivamente al farmaco. La caratterizzazione UV-Vis conferma l'attacco dell'anigopressina sui CNT. Inoltre è possibile affermare come un'ulteriore funzionalizzazione non abbia danneggiato il carico già presente sulla superficie di CNT, a conferma della funzionalizzazione multipla che può avvenire sulla superficie dei nanotubi di carbonio. Ulteriore conferma della presenza del farmaco sulla superficie dei CNT è stata data dall'analisi spettrofluorimetrica effettuata sempre a paragone con le acque di filtrazione.

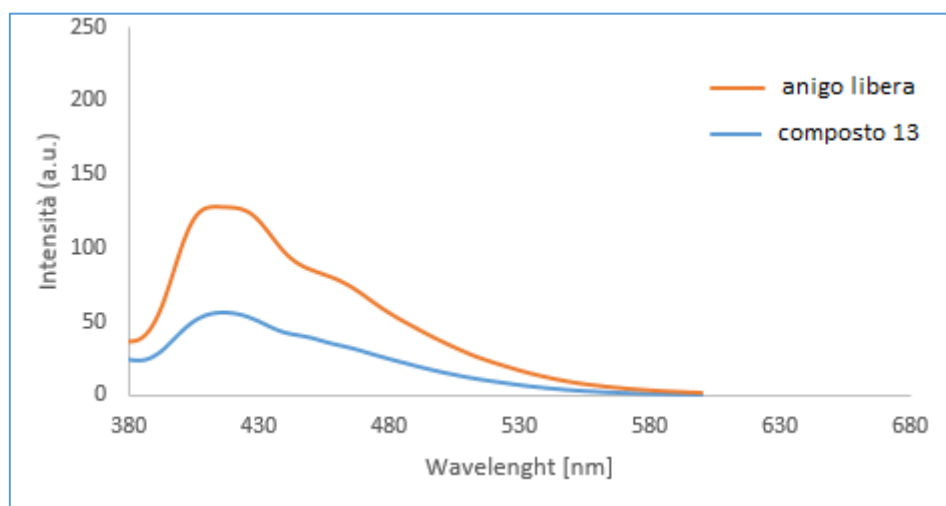


Figura 7.2.7-Spettri di fluorescenza del composto 13, ANIGO libera con stessa concentrazione di farmaco (soluzioni in 80:20 tampone fosfato/isopropanolo)

Concentrazione: 0.06 mg/mL

Concentrazione: 0.02 mg/mL

La fluorescenza dell'anigopressina libera, in soluzione acquosa, risulta essere elevata, mentre osservando la fluorescenza del composto 13 si può vedere come abbia subito una diminuzione. Anche in questo caso, questo comportamento è una chiara evidenza del fatto che nanotubi e farmaco interagiscono attraverso interazioni π . Per cui l'analisi spettrofluorimetrica ci ha dato informazioni riguardo la tipologia di legame che avviene tra il farmaco e i CNT come avveniva anche nell'analisi dei nanotubi senza il selettore biotina. La presenza di questo tipo di interazioni induce un quenching della fluorescenza.

8 Conclusioni e sviluppi futuri

In questo lavoro di tesi si è studiato un sistema di Drug Delivery basato sull'uso di nanotubi di carbonio. In particolare abbiamo analizzato un sistema costituito da: CNT come supporto per il trasporto, un selettore e un farmaco. Per il selettore ci siamo interessati all'acido folico e abbiamo sintetizzato attraverso un determinato schema di reazione un derivato linker con gruppo alchidico terminale per una conseguente reazione di *Click* sulla superficie di nanotubi. La sintesi è risultata efficace e siamo riusciti a caratterizzare tutti gli intermedi della reazione in analisi. Sviluppi futuri comprenderanno la separazione dei due isomeri α e γ del derivato linker mediante tecnica di separazione HPLC o mediante ulteriori tecniche. Successivamente alla separazione sarà di grande interesse effettuare la reazione di *Click* del derivato con gruppo alchidico sulla superficie dei nanotubi ed effettuare test in vitro riguardo la sua efficienza. Altri studi interessanti riguarderanno il confronto tra questo derivato e altri selettori fino ad ora usati, come la biotina. Si andrà a confrontare la selettività nell'internalizzazione nelle cellule tumorali di CNT.

Per il farmaco ci siamo interessati all'anigopressina e abbiamo studiato due tipologie di sistema: 1) CNT ossidati con farmaco 2) CNT ossidati con presenza di selettore biotina e farmaco. Il sistema con selettore ha mostrato una maggior efficienza a livello di carico di farmaco, il carico di 396 mg di anigopressina per g totali di campione è risultato un dato molto soddisfacente. La reazione di attacco del farmaco è risultata piuttosto semplice ed efficiente. Attraverso le analisi spettroscopiche di fluorescenza abbiamo potuto concludere come il legame tra anigopressina e superficie di nanotubi di carbonio avvenisse realmente e tramite interazioni π stacking. Successivamente si potrà studiare il sistema di rilascio in sieri che possano riprodurre fedelmente l'ambiente cellulare. Le caratteristiche di questo farmaco, specialmente la struttura, non permettono di effettuare test in soluzioni acquose a pH acidi, tipico delle cellule tumorali. Inoltre sarà di particolare interesse effettuare test di citotossicità sul sistema di trasporto creato con il farmaco anigopressina.

Sviluppi futuri potranno comprendere lo studio di un sistema costituito da CNT con, come selettore, il derivato linker dell'acido folico e con, come farmaco, l'anigopressina. Lo studio di questo sistema potrà essere messo a confronto con altri già studiati in precedenza, come per esempio il sistema di CNT che prevede l'utilizzo del farmaco doxorubicina e il selettore biotina. Ulteriormente potranno essere effettuati test di citotossicità per analizzare il grado di tossicità all'interno della cellula tumorale di questo sistema. Inoltre altri studi potranno andare a focalizzarsi sull'inserimento di un altro elemento utile all'interno di un sistema di Drug Delivery, non utilizzato in questo lavoro di tesi, ovvero la sonda fluorescente. La sonda fluorescente consente una migliore osservazione una volta che il sistema entra in cellula.

9 Parte strumentale

9.1 Reagenti e strumentazione utilizzata

I reagenti utilizzati di cui non è riportata la sintesi sono commercialmente disponibili (Aldrich, Fluka o TCI) e se non specificato, sono stati impiegati senza ulteriore purificazione. I valori di R_f sono riferiti a TLC su lastre di alluminio di gel di silice di spessore 0.25 mm (Merck F254).

Gli spettri NMR sono stati acquisiti con una strumentazione Varian Gemini 200MHz o Varian Mercury 400MHz, utilizzando vari solventi deuterati (CDCl₃, CD₃OD, DMSO-d₆). I valori di chemical shift sono espressi in δ (ppm) rispetto al riferimento tetrametilsilano (TMS). Le notazioni s, d, t, td, pt, m, bs (riferite alla molteplicità del segnale) indicano rispettivamente: singoletto, doppietto, tripletto, tripletto di doppietti, pseudotripletto, multipletto e segnale allargato (broad signal).

Gli spettri di massa ESI sono stati acquisiti con una strumentazione LCQ-Fleet Thermo Scientific Electron Spray Ionization. Se non specificato tutti gli spettri sono stati registrati con campioni aventi concentrazioni tra 10⁻⁴ e 10⁻⁵ M in HPLC grade MeOH del composto sottoposto all'analisi.

Gli spettri UV-Visibile sono stati acquisiti con una strumentazione Varian Cary 4000 Uv-vis impiegando cuvette dallo spessore di 1 cm o 1 mm.

Gli spettri di Fluorescenza sono stati registrati con uno spettrofluorimetro FP750 distribuito dalla Jasco, impiegando cuvette dello spessore di 1 cm o 1 mm.

9.2 Acronimi e formule utilizzate

CH₂Cl₂: Cloruro di metilene,

Na₂SO₄: Solfato di sodio,

DMF: N, N-dimetil formammide,

DCC: N, N- dicicloesilcarbodiimmide,

DCU: Dicicloesilurea,

NHS: N-idrossisuccinimide,

Et₂O: Etere dietilico,

i-PrOH: Isopropanolo,

AcOEt: Acetato di etile,

PEG: Glicole polietilenico,

BOC: Ter-butilossicarbonil,

DCM: Dicloro metano,

CHCl₃: Cloroformio,

HCl: Acido cloridrico,

BRINE: Soluzione satura di NaCl,

CDCl₃: Cloroformio deuterato,

DMSO: Dimetilsolfossido,

DMSO-d₆: Dimetilsolfossido deuterato

CD₃OD: Metanolo deuterato,

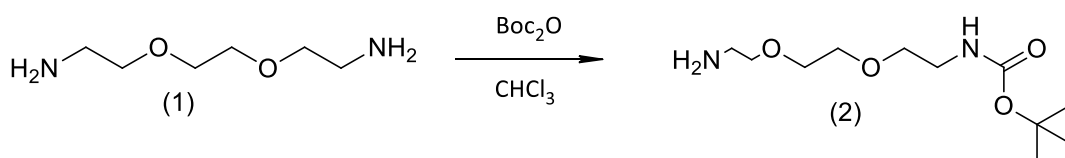
r.t.: Temperatura ambiente,

TLC: Thin Layer Chromatography,

N₂: Flusso di azoto.

9.3 Sintesi effettuate

9.3.1 Sintesi composto 2 (PEG-BOC)



1,2-Bis(2-amminoetossi)etano (4.568 mg) viene aggiunto a CHCl_3 (28 mL) e si agita ad una temperatura di 0°C . Si scioglie Boc_2O (0.704 mg) in 14 mL di CHCl_3 e gradualmente sono aggiunti alla soluzione di ammina sotto agitazione. Successivamente all'aggiunta si conduce la reazione a temperatura ambiente sotto flusso di N_2 per circa 12 ore. Il prodotto viene portato a secco. Si diluisce con CH_2Cl_2 (50 mL) e si effettuano 5 lavaggi con brine da 20 mL ciascuno. La soluzione viene anidrificata con Na_2SO_4 anidro, filtrata ed infine il campione viene essiccato ottenendo il prodotto 2 come olio incolore (0.815 mg). Resa 95 %.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3):

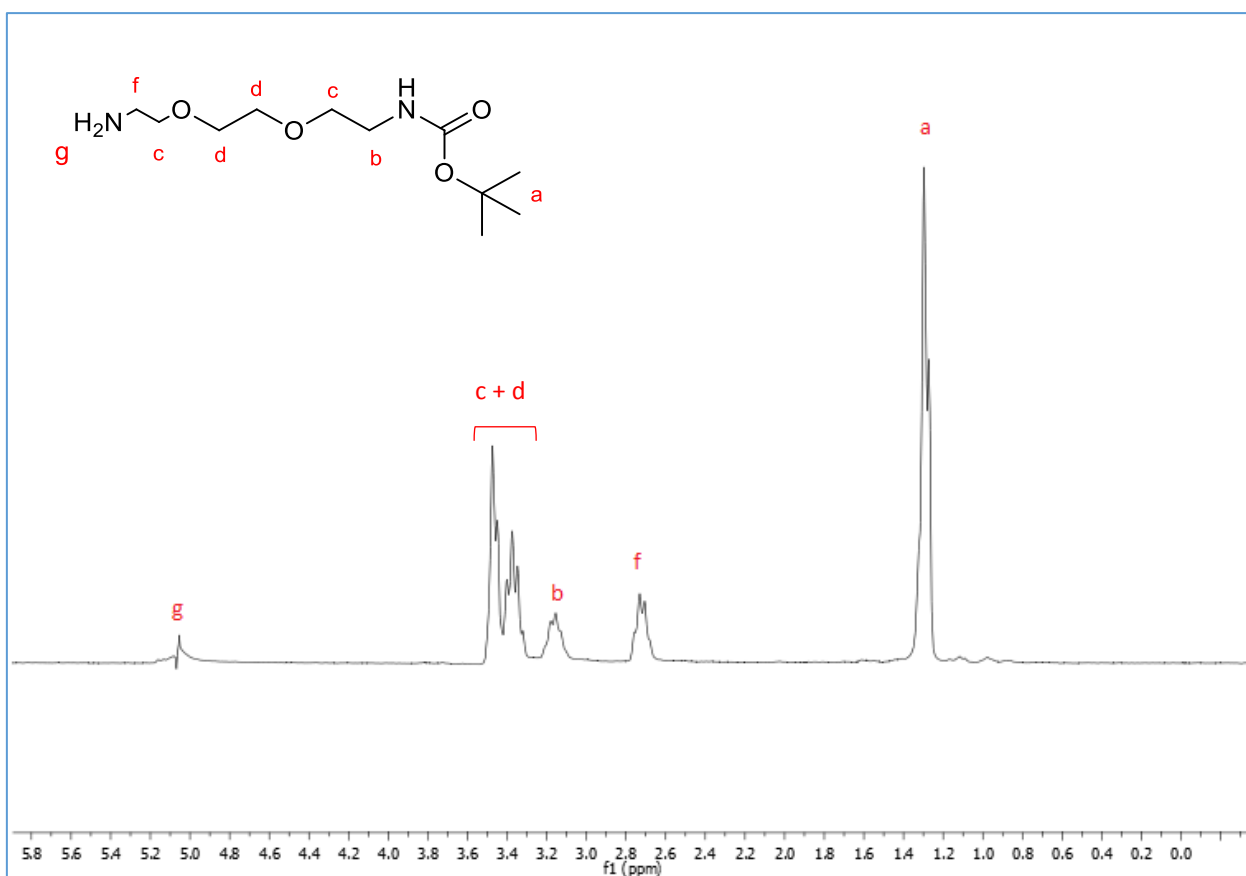
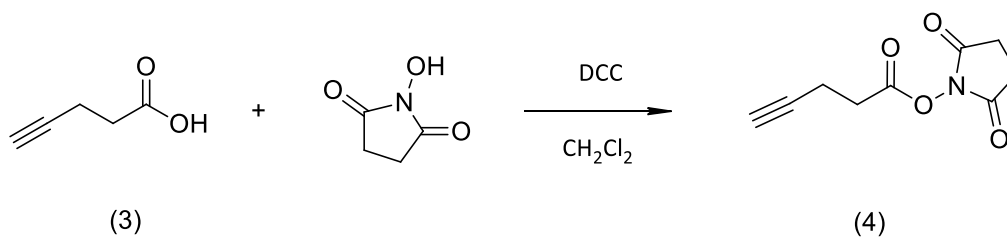


Figura 9.3.1- Spettro $^1\text{H NMR}$ di PEG-BOC

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ 1.40 (s, 9H a), 2.83 (t, $J=5$ Hz, 2H f), 3.32 (t, $J=5.4$ Hz, 2H b), 3.31-3.63 (m, $J=5.4$ Hz, 8H c + d), 5.15 (bs, 2H g) ppm.

9.3.2 Sintesi composto 4 (ACIDO PENTINOICO ATTIVATO con NHS)



Acido pentinoico (156.6 mg) viene sciolto in 10 mL di CH_2Cl_2 anidro. Successivamente sono aggiunti 685 mg di DCC e 372 mg di NHS. La miscela di reazione viene mantenuta a temperatura ambiente durante l'agitazione per circa 12 ore. Il campione viene filtrato tramite filtri per siringa pore 0,2 μm in cellulosa rigenerata. Il campione viene portato a secco per ottenere il composto 4.

$^1\text{HNMR}$ (CDCl_3):

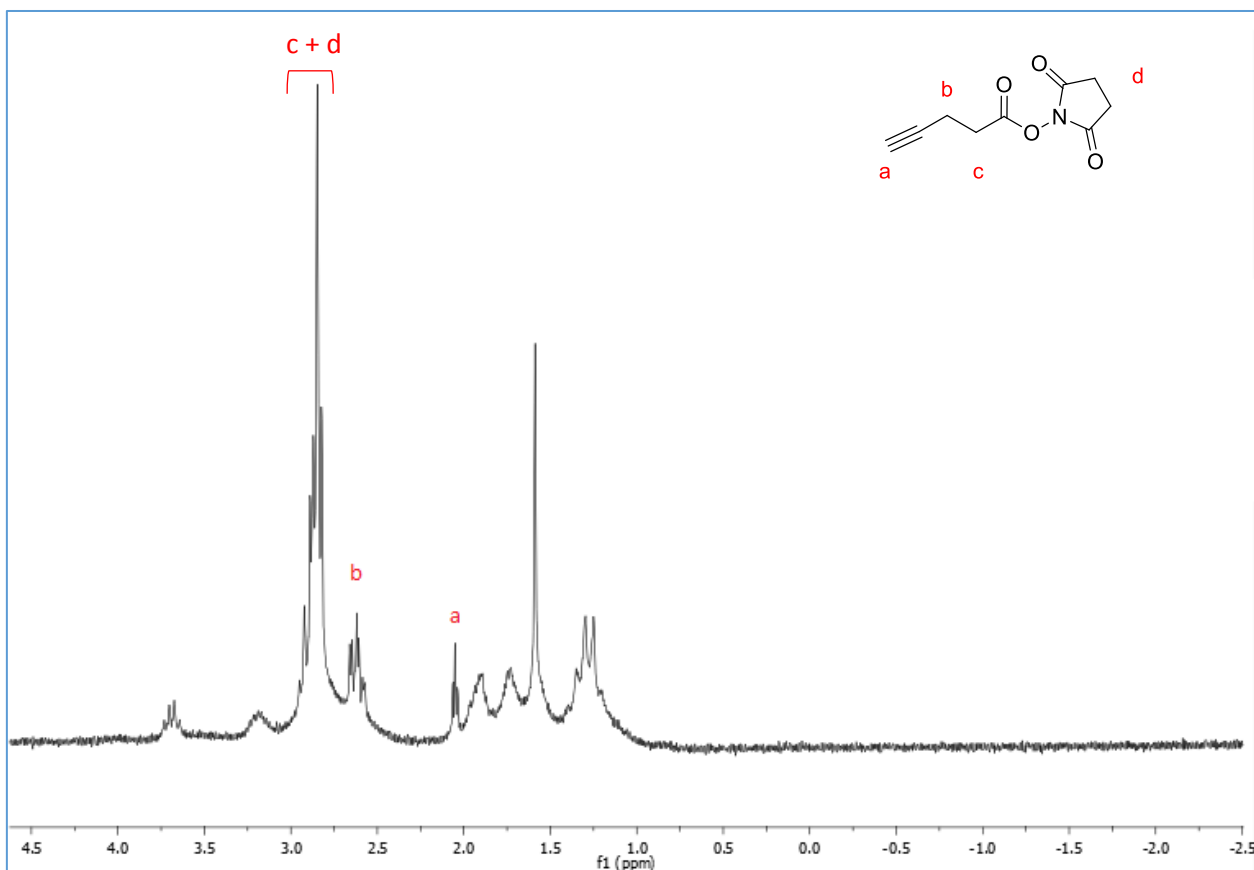
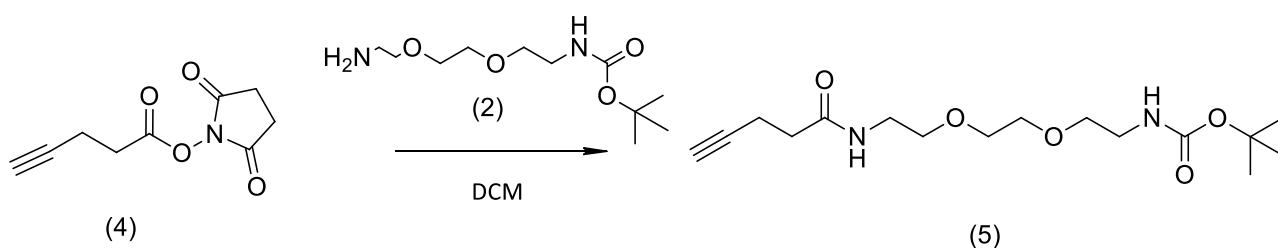


Figura 9.3.2- Spettro $^1\text{HNMR}$ di acido pentinoico attivato

$^1\text{HNMR}$ (200 MHz, DCl_3): δ 2.04 (t, $J=2.0$ Hz, 1H a), 2.63 (td, $J=2.7$ Hz, 2H b), 2.82-2.91 (m, $J=2.7$ Hz, 6H c + d) ppm.

9.3.3 Sintesi composto 5, reazione ACIDO PENTINOICO ATTIVATO con PEG-BOC



Il composto 4 viene aggiunto ad una soluzione del composto 2 (380.6 mg) disciolto in 10 mL di DCM anidro. La miscela di reazione viene messa sotto agitazione a 30°C sotto ambiente di azoto per 12 ore. Il campione viene seccato, si diluisce con AcOEt (15 ml) e si effettuano lavaggi con acqua milliQ (2X20 ml). Successivamente alla formazione di un'emulsione, si recuperano le fasi organiche e si filtra su celite. La soluzione viene anidrificata con Na_2SO_4 anidro, filtrata ed infine si evapora il solvente ottenendo il grezzo di reazione (0.416 g). L'analisi TLC rivela un'impurezza del campione appena ottenuto, dove la presenza di più macchie rivela la presenza dei reagenti ancora presenti nel campione finale. Si effettua una separazione cromatografica flash su gel di silice (diametro colonna 30 mm, $R_f = 0.1$) attraverso un gradiente di eluente. Le frazioni 1-15 sono raccolte con soluzione eluente etere di petrolio/acetato di etile (2:1) mentre le frazioni 16-60 con soluzione di acetato di etile puro. Si raccolgono un totale di 4 diverse sostanze corrispondenti a 4 diverse macchie rivelate nell'analisi TLC. Attraverso analisi $^1\text{HNMR}$ e massa ESI si identifica il composto 5 (0.2161 g).

^1H NMR (CDCl_3):

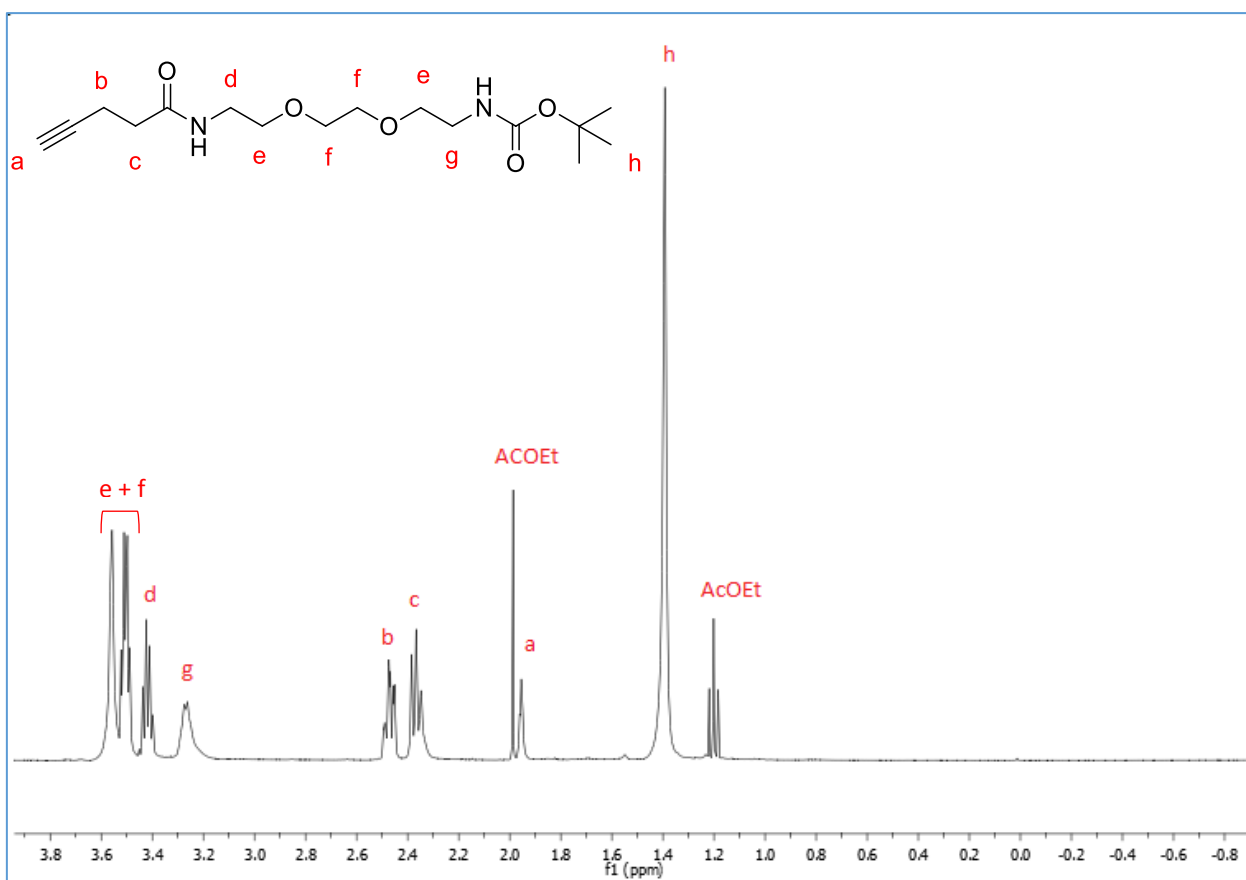
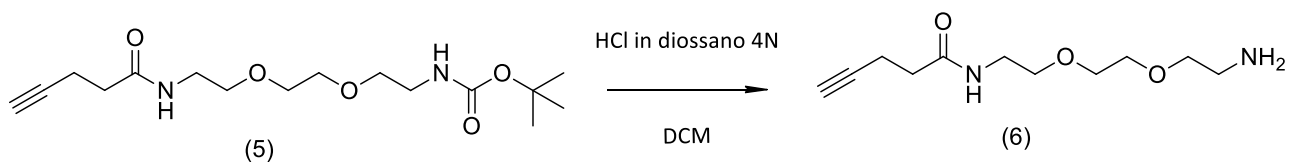


Figura 9.3.3- Spettro ^1H NMR di PEG-BOC con gruppo alchidico

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 1.39 (s, 9H h), 1.96 (t, 1H a), 2.37 (t, 2H c), 2.46 (td, 2H b), 3.27 (t, $J=5.2$ Hz, 2H g), 3.43 (t, $J=5.2$ Hz, 2H d), 3.49-3.56 (m, 8H e + f) ppm.

MASSA ESI (m/z, MeOH): 350.80 [M + Na], 367.8 [M + K].

9.3.4 Sintesi composto 6, rimozione gruppo -BOC da PEG



Il composto 5 (80.4 mg) viene disciolto in 8 mL di DCM. Successivamente si aggiungono 4 mL di HCl in diossano 4N. La miscela di reazione viene messa sotto agitazione a temperatura ambiente per 12 ore. La reazione è monitorata tramite metodo TLC. Avvenuta la reazione, il campione appare come liquido incolore con un precipitato oleoso color giallo/marrone. Il campione viene concentrato e si effettuano 6 lavaggi con Et₂O (10 mL). Il prodotto viene seccato per togliere tracce di etere.

¹HNMR (CD₃OD):

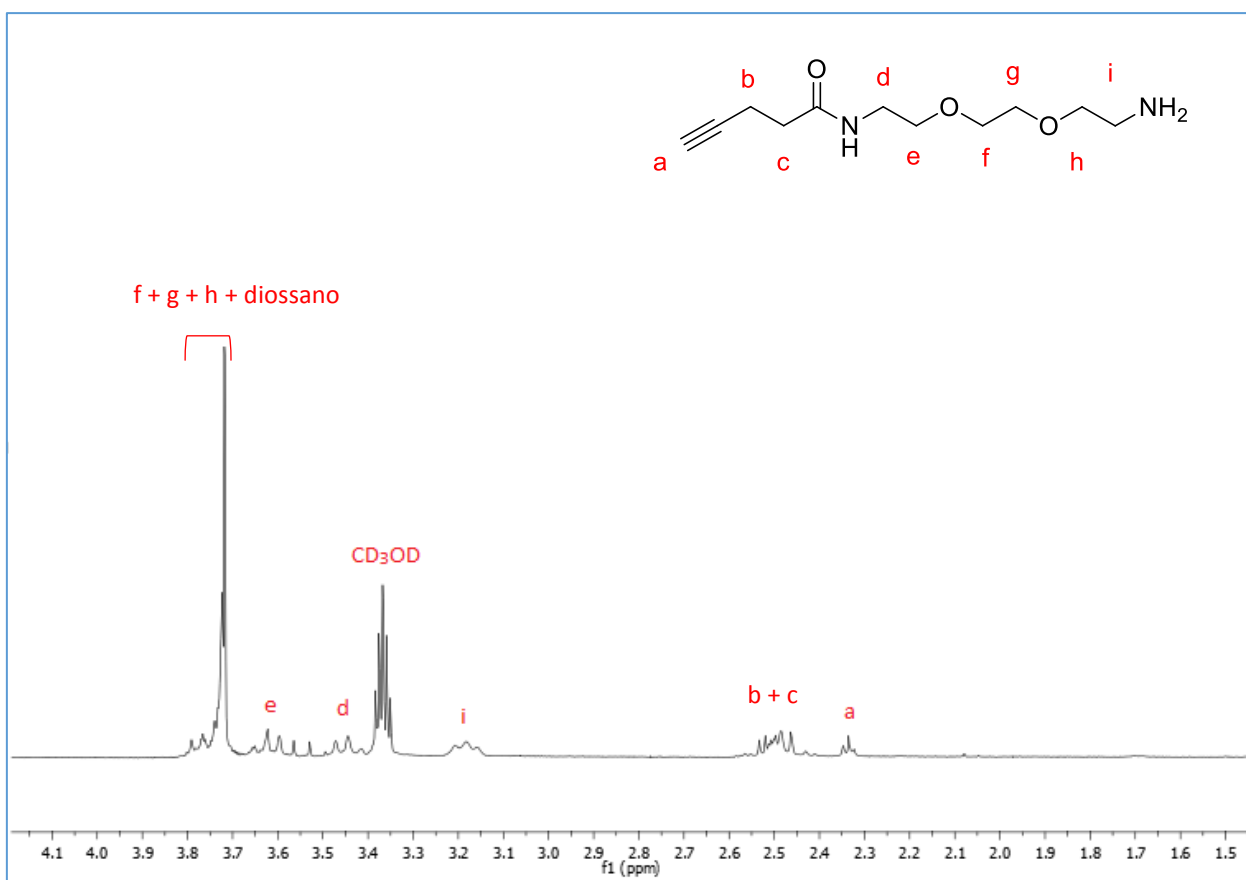
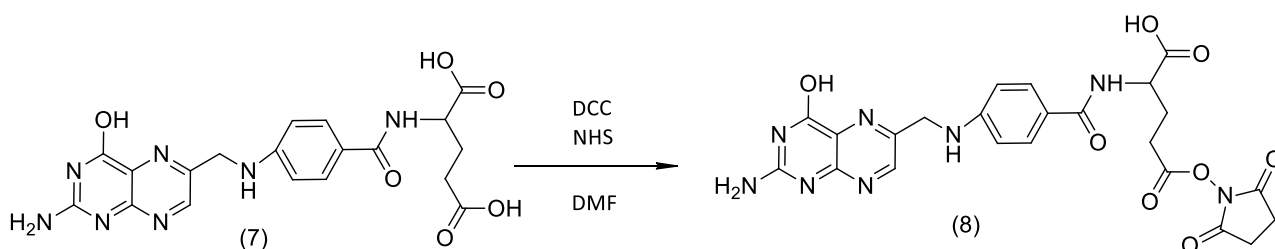


Figura 9.3.4- Spettro ¹HNMR PEG-AMMINA con gruppo alchिनico

¹HNMR (200 MHz, CD₃OD): δ 2.27 (t, J= 2.1 Hz, 1H a), 2.40-2.47 (m, J=2.4 Hz, 4H b + c), 3.12 (t, J= 3.2 Hz, 2H i), 3.38 (t, J= 5.4 Hz, 2H d), 3.56 (t, J= 5.6 Hz, 2H e), 3.66-3.73 (m, J=3.5 Hz, 6H f+ g +h) ppm.

9.3.5 Sintesi composto 8, attivazione ACIDO FOLICO con NHS



Acido folico (0.3093 g) viene sciolto in 15 mL di DMF anidra. Successivamente si aggiungono 0.0967 g di DCC e 0.0596 g di NHS. La miscela di reazione viene messa sotto agitazione al buio a temperatura ambiente per 14 ore. Il prodotto viene filtrato ottenendo un solido pastoso color arancio, possibile DCU residua. Si effettuano lavaggi con DMF (30 mL) ottenendo una soluzione arancione del filtrato. Si aggiunge 200 mL di miscela acetone/ Et_2O (30:70). Si forma un precipitato gelatinoso color giallo che viene filtrato su imbuto con setto poroso in vetro (pore 3) con liquido di filtrazione incolore. Si lava il solido con acetone (100 mL) ed esso appare gelatinoso. Si effettuano successivamente lavaggi con etere per ottenere il composto 8 come solido secco. Il prodotto viene seccato ottenendo un solido color giallo (220 mg).

^1H NMR (DMSO- d_6):

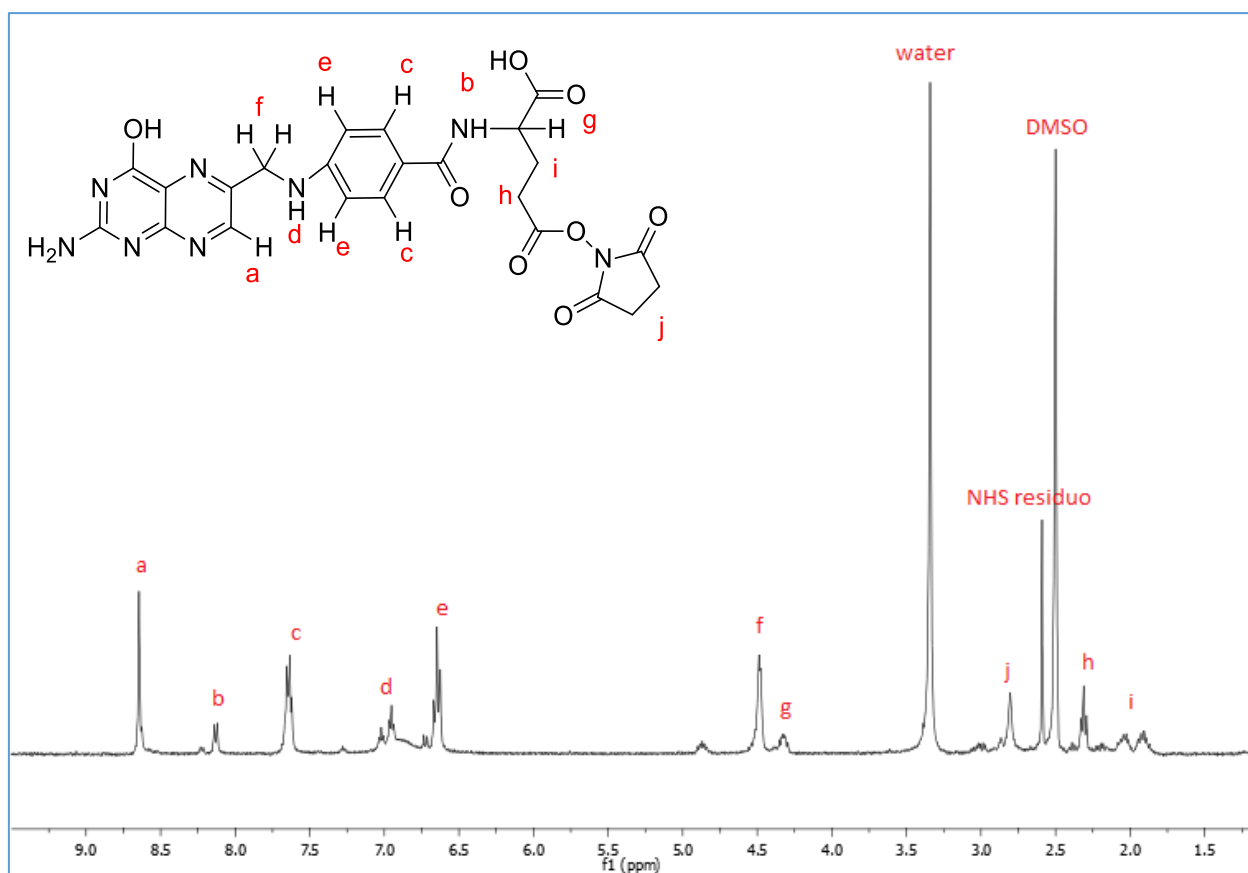


Figura 9.3.5- Spettro ^1H NMR di acido folico attivato

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 1.90-2.04 (m, 2H i), 2.31 (t, 2 H h), 2.80 (s, 4H j), 4.32 (m, 1H g), 4.47-4.48 (d, 2H f), 6.62-6.67 (pt, 2H e), 6.97 (t, 1H d), 7.63 (pt, 2H c), 8.13 (d, 1H b), 8.64 (s, 1H a) ppm.

¹³CNMR (DMSO-d₆):

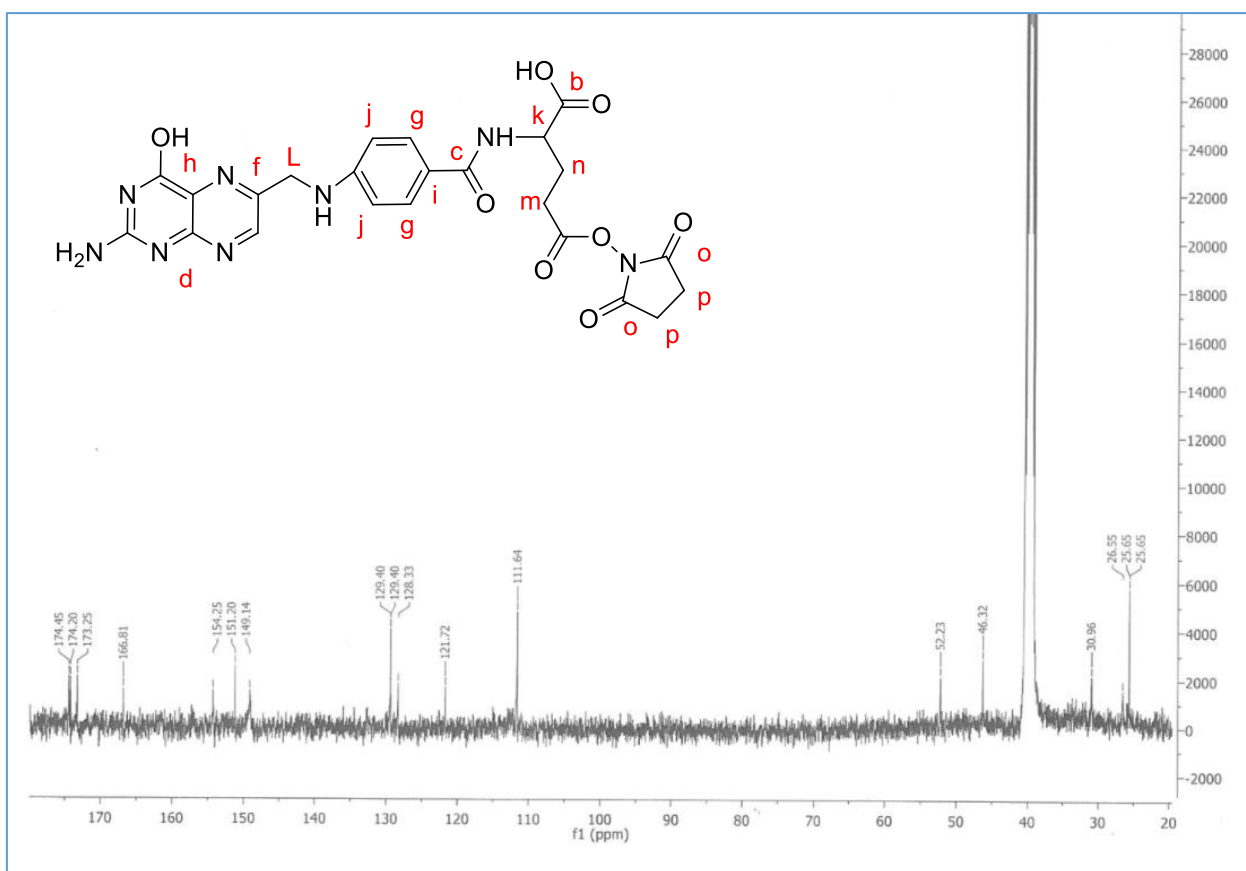
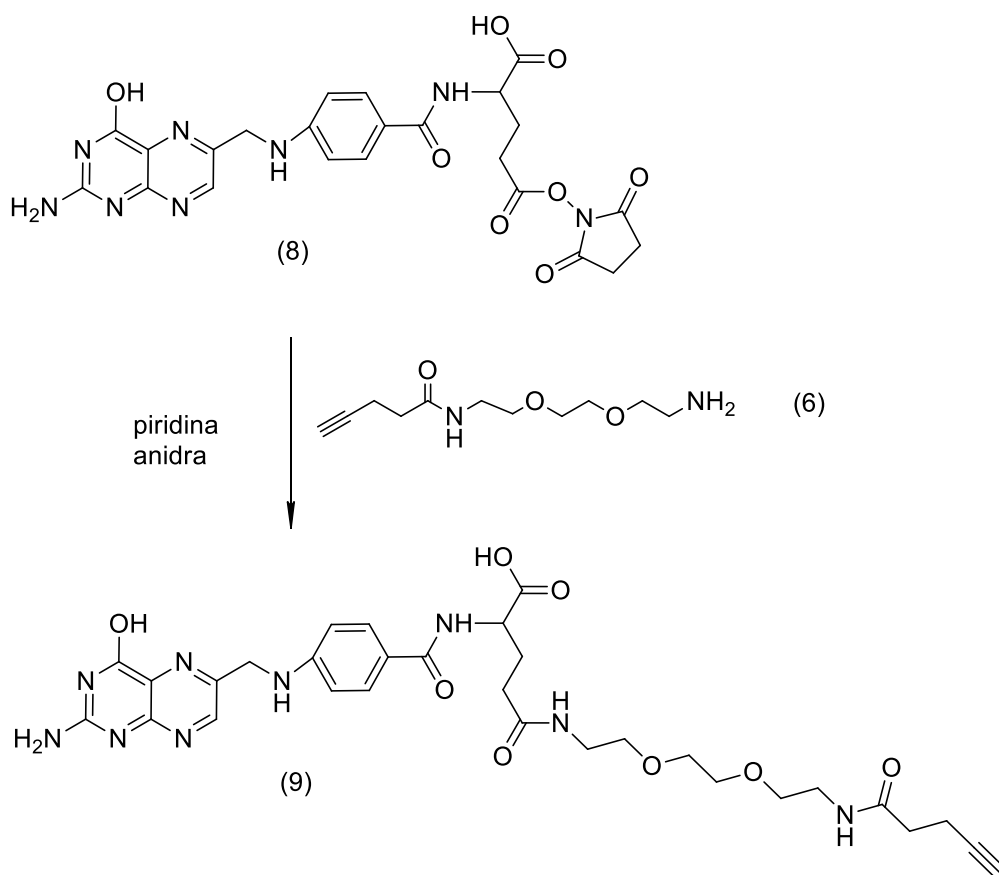


Figura 9.3.6- Spettro ¹³CNMR di acido folico attivato

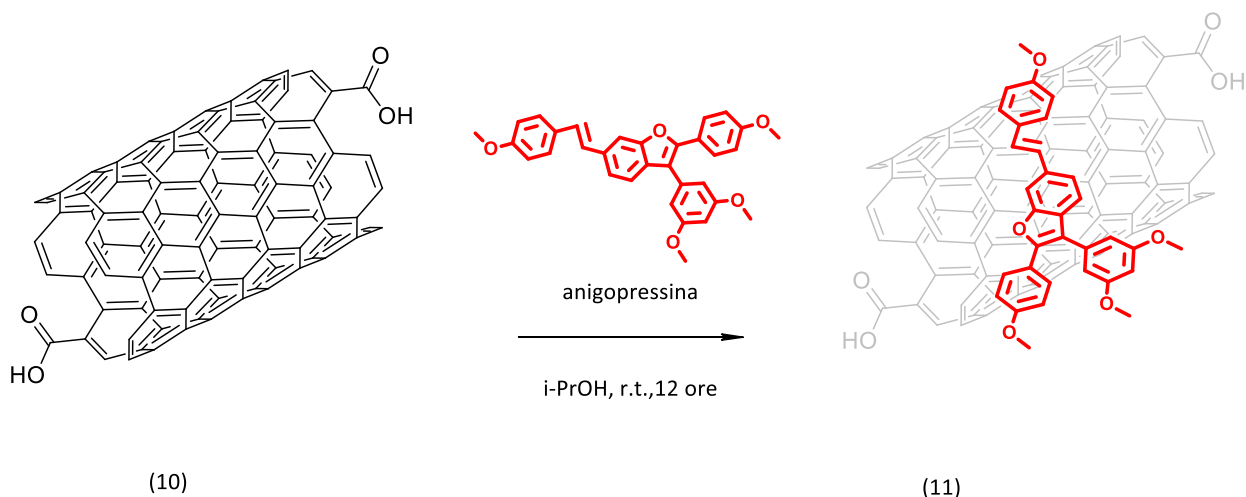
¹³CNMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ 174.45 (s, 1C a), 174.20 (s, 1C b), 173.25 (s, 2C o), 166.81 (s, 1C c), 154.25 (s, 1C d), 151.20 (s, 1C e), 149.14 (s, 1C f), 128.33 (s, 1C h), 121.72 (s, 1C i), 111.64 (d, 2C j), 52.23 (d, 1C k), 46.32 (t, 1C L), 30.96 (t, 1C m), 26.55 (t, 1C n), 25.65 (t, SC p) ppm.

9.3.6 Sintesi composto 9, reazione ACIDO FOLICO ATTIVATO con PEG-ALCHINO



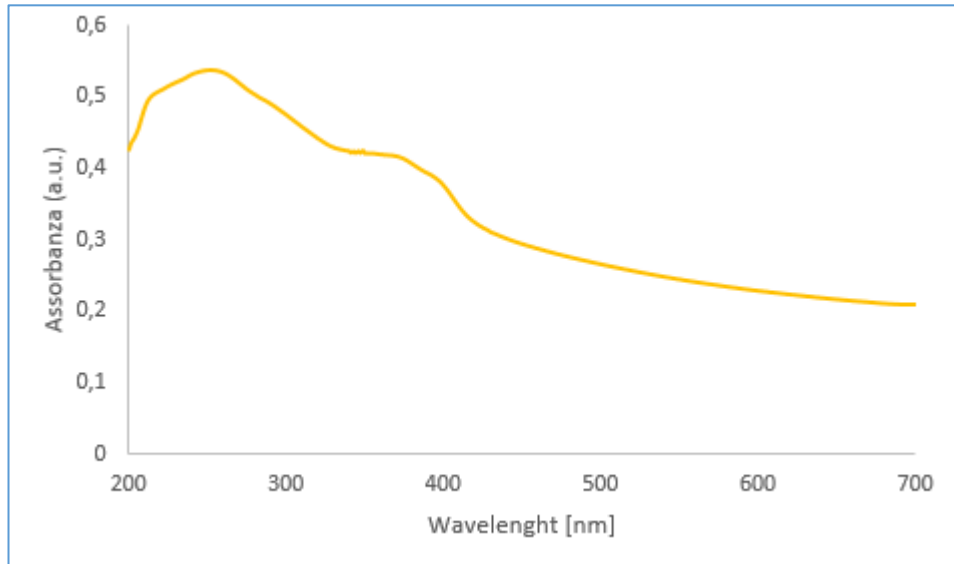
Acido folico attivato (201.15 mg) viene disciolto in 20 mL di piridina anidra. Successivamente alla miscela si aggiunge gradualmente il composto 6 disciolto in 25 mL di piridina anidra. L'aggiunta avviene molto lentamente in un arco di 30 minuti. La miscela di reazione, color arancio, viene messa sotto agitazione a temperatura ambiente in ambiente privo di luce per circa 12 ore. Il prodotto viene infine seccato tramite pompa ad olio (EDWARDS) con supporto di trappola per far evaporare tutta la piridina utilizzata in ambiente di reazione. Il prodotto viene seccato completamente in 2 ore.

9.3.7 Sintesi composto (11), decorazione con ANIGOPRESSINA di nanotubi ossidati

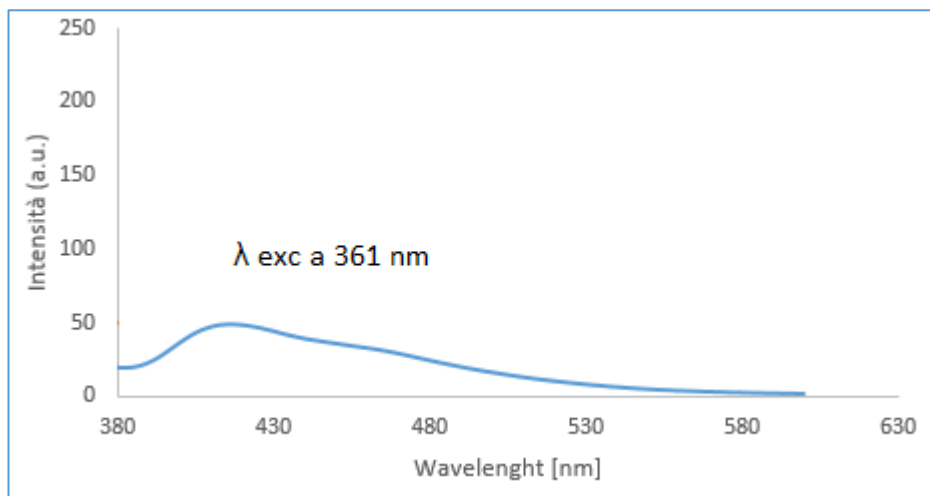


Nanotubi di carbonio ossidati (6.0 mg) sono dispersi in 10 mL di i-PrOH, la dispersione viene sonicata per 15' e successivamente si aggiunge anigopressina (3.6 mg). La miscela viene messa sotto agitazione, a temperatura ambiente per tutta la notte, in ambiente privo di luce. La reazione viene filtrata su filtri di policarbonato (Whatman, dimensioni dei pori 0.2 μm , diametro 25 mm) e lavata per 7 volte con i-PrOH per rimuovere completamente l'anigopressina non reagita. Il residuo solido sul filtro viene essiccato sotto vuoto ottenendo il composto 11 (ANIGO-caricata su CNT ossidati) come solido nero (7 mg). Il carico di anigopressina viene calcolato tramite analisi UV-VIS per differenza dalle acque di filtrazione ottenute durante i lavaggi e si ottiene un valore di 290 mg di ANIGO/g totali.

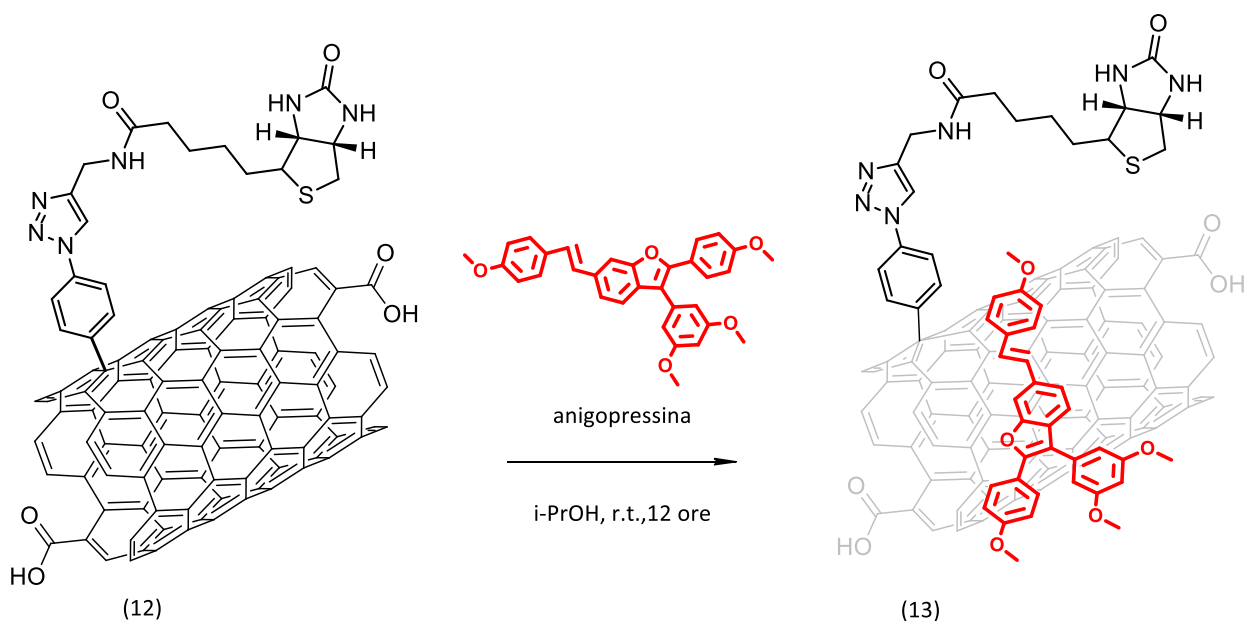
- **UV-Vis (nm, i-PrOH/tampone fosfato pH 7,4 20:80): 368**
Concentrazione: 0.11 mg/mL



- **Fluorescenza (nm, i-PrOH/tampone fosfato pH 7,4 20:80): 416**
Concentrazione: 0,11 mg/mL



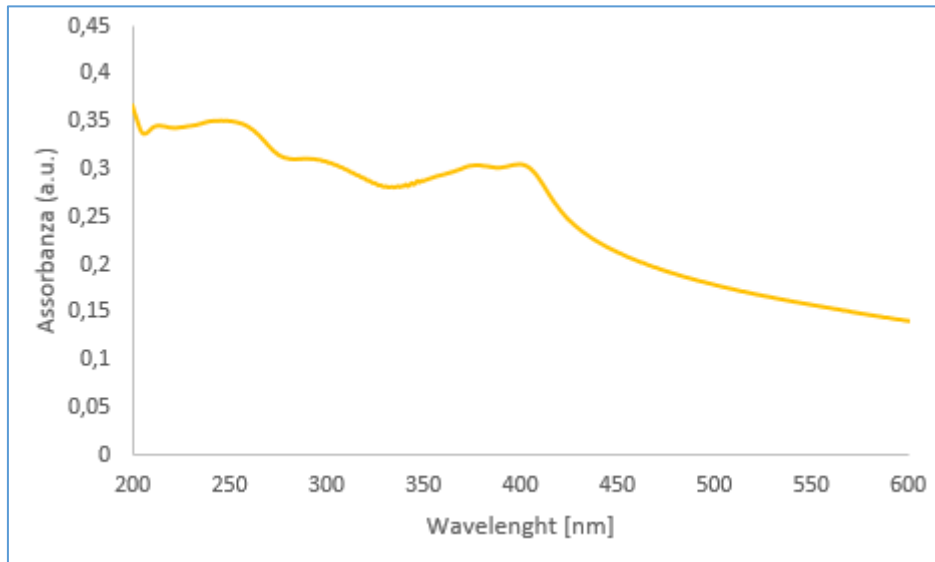
9.3.8 Sintesi composto (13), decorazione con ANIGOPRESSINA di nanotubi funzionalizzati con selettore BIOTINA



Nanotubi di carbonio funzionalizzati con biotina (6 mg) sono dispersi in 7 mL di i-PrOH, la dispersione viene sonicata per 25' e successivamente si aggiunge anigopressina (4 mg). La miscela viene messa sotto agitazione, a temperatura ambiente per tutta la notte, in ambiente privo di luce. La reazione viene filtrata su filtri di policarbonato (Whatman, dimensioni dei pori 0.2 μm , diametro 25 mm) e lavata per 7 volte con i-PrOH per rimuovere completamente l'anigopressina non reagita. Il residuo solido sul filtro viene essiccato sotto vuoto ottenendo il composto 13 (ANIGO-caricata su CNT con biotina) come solido nero (7 mg). Il carico di anigopressina viene calcolato tramite analisi UV-VIS per differenza dalle acque di filtrazione ottenute durante i lavaggi e si ottiene un valore di 396 mg ANIGO/g totali.

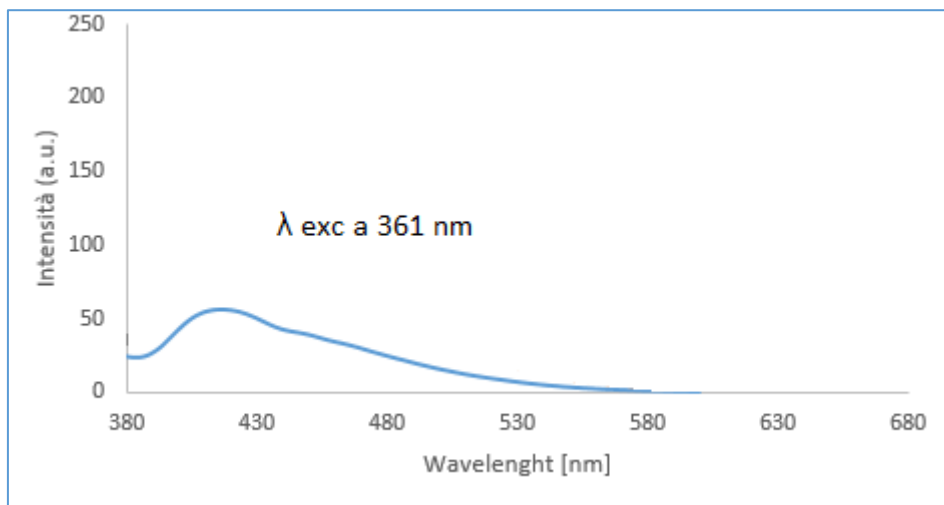
- **UV-Vis (nm, i-PrOH/tampone fosfato pH 7,4 20:80): 400**

Concentrazione: 0.06 mg/mL



- **Fluorescenza (nm, i-PrOH/tampone fosfato pH 7,4 20:80): 416**

Concentrazione: 0.06 mg/mL



10 Bibliografia

1. Kam, N. W. S.; Liu, Z.; Dai, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2006, 45, 577.
2. Kostarelos, K.; Lacerda, L.; Pastorin, G.; Wu, W.; Wieckowski, S.; Luangsivilay, J.; Godefroy, S.; Pantarotto, D.; Briand, J. P.; Muller, S.; Prato, M.; Bianco, A. *Nat. Nanotechnol.* 2007, 2, 108.
3. Chiummiento, L; Funicello; Lopardo, M.M.T.; Lupattelli, P. ; Choppin, S.; Colobert, F. *European J. Org. Chem.*, 2012, 188-192
4. Ijima, S. *Nature*, 1991, 354, 56-58.
5. Niyogi, S.; Hamon, M. A.; Hu, H.; Zhao, B.; Bhowmik, P.; Sen, R.; Itkis, M. E.; Haddon, R. C. *Acc. Chem. Res.* 2002, 35, 1105.
6. Hirsch, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2002, 41, 1853.
7. Tasis, D.; Tagmatarchis, N.; Bianco, A.; Prato, M. *Chem. Rev.* 2006, 106, 1105.
8. Prato, M; Kostarelos, K. *Acc. Chem. Res.* 2008, 41, 60-68.
9. Duncan, R. *Nat. Rev. Cancer* 2006, 6, 688–701.
10. Torchilin, V. P. *Nat. Rev. Drug Discovery* 2005, 4, 145–160.
11. Tasis, D.; Tagmatarchis, N.; Bianco, A.; Prato, M. *Chem. Rev.* 2006, 106, 1105–1136.
12. Bianco, A.; Kostarelos, K.; Partidos, C. D.; Prato, M. *Chem. Commun.* 2005, 571–577.
13. Bianco, A.; Kostarelos, K.; Prato, M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2005, 9, 674–679.
14. M. Marsh, M.; McMahon, H. T. *Science* 1999, 285, 215.
15. Silverstein, S. C.; Steinman, R. M.; Cohn, Z. A. *Annu. Rev Biochem.* 1977, 46, 669.
16. Schmid, S. L.; Carter, L. L. *J. Cell Biol.* 1990, 111, 2307.
17. Schmid, S. L.; Carter, L. L. *J. Cell Biol.* 1990, 111, 2307.
18. Kam, N. W. S.; Liu, Z.; Dai, H. *Angew. Chem. Int. Ed* 2006, 45, 577–581.
19. Pantarotto, D.; Briand, J.-P.; Prato, M.; Bianco, A. *Chem. Commun.* 2004, 16.

20. Sayes, C. M.; Liang, F.; Hudson, J. L.; Mendez, J.; Guo, W.; Beach, J. M.; Moore, V. C.; Doyle, C. D.; West, J. L.; Billups, W. E.; Ausman, K. D.; Colvin, V. L. *Toxicol. Lett.* 2006, 16, 135–142.
21. Singh, R.; Pantarotto, D.; Lacerda, L.; Pastorin, G.; Klumpp, C.; Prato, M.; Bianco, A.; Kostarelos, K. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006, 103, 3357–3362.
22. Lee, Y.; Geckeler, K. E. *Macromol. Biosci.* 2012, 12, 1060.
23. Liu, Z.; Sun, X.; Nakayama-Ratchford, N.; Dai, H. *ACS Nano* 2007, 1, 50.
24. Sharma, M.; Nikota, J.; Halappanavar, S.; Castranova, V.; Rothen, B.; Amy, R. *Arch. Toxicol.*, 2016, 90, 1605–1622.
25. Schipper, M. L.; Nakayama-Ratchford, N.; Davis, C. R.; Kam, N. W. S.; Chu, P.; Liu, Z.; Sun, X.; Dai, H.; Gambhir, S. S. *Nat. Nanotechnol.* 2008, 3, 216.
26. Al-Jamal, K. T.; Nunes, A.; Methven, L.; Ali-Boucetta, H.; Li, S.; Toma, F. M.; Herrero, M. A.; Al-Jamal, W.; ten Eikelder, H. M.; Foster, J.; others. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2012, 51, 6389.
27. Lacerda, L.; Herrero, M. A.; Venner, K.; Bianco, A.; Prato, M.; Kostarelos, K. 2008, 4, 1130–1132.
28. Kostarelos, K. *Nat. Mater.*, 2000, 9, 793–795
29. Chaban, V. V.; Prezhdo, O. V. *ACS Nano* 2011, 5, 5647–5655.
30. Panczyk, T.; Warzocha, T. P. *J. Phys. Chem. C* 2009, 113, 19155–19160.
31. Huang, H.; Yuan, Q.; Shah, J. S.; Misra, R. D. K. *Adv. Drug Delivery Rev.* 2011, 63 (14–15), 1332–1339.
32. Ji, Z.; Lin, G.; Lu, Q.; Meng, L.; Shen, X.; Dong, L.; Fu, C.; Zhang, X. *J. Colloid Interface Sci.* 2012, 365 (1), 143–149.
33. Dinan, N. M.; Atyabi, F.; Rouini, M.-R.; Amini, M.; Golabchifar, A.-A.; Dinarvand, R. *Mater. Sci. Eng., C* 2014, 39, 47–55.
34. Anbarasan, B.; Babu, S. V.; Elango, K.; Shriya, B.; Ramaprabhu, S. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2015, 15 (7), 4799–4805.
35. Ali Mohammadi, Z.; Aghamiri, S. F.; Zarrabi, A.; Talaie, M. R. *Chem. Phys. Lett.* 2015, 642, 22–28.

- 36.** Wang, Y.; Xu, Z. *RSC Adv.* 2016, 6 (1), 314–322
- 37.** Modi, C.; Patel, S.; Desai, A.; Murthy, R. S. R. *J. Appl. Pharm. Sci.* 2011, 1 (5), 103–108.
- 38.** Ali-Boucetta, H.; Al-Jamal, K. T.; McCarthy, D.; Prato, M.; Bianco, A.; Kostarelos, K. *Chem. Commun.* 2008, 459.
- 39.** Dixon, K. H.; Lanpher, B. C.; Chiu, J.; Kelley, K.; Cowan, K. H. *J. Biol. Chem.* 1994, 269, 17.
- 40.** Franklin, W. A.; Waintrub, M.; Edwards, D.; Christensen, K.; Predegrast, P.; Woods, J.; Bunn, P. A.; Kolhouse, J. F. *Int. J. Cancer* 1994, 8, 89. (b) Mantovani, L. T.; Miotti, S.; Me´nard, S.; Canevari, S.; Raspagliesi, F.; Bottini, C.; Bottero, F.; Colnaghi, M. I. *Eur. J. Cancer* 1994, 30A, 363. (c) Ross, J. F.; Chaudhuri, P. K.; Ratnam, M. *Cancer* 1994, 73, 2432.
- 41.** (a) Leamon, C. P. and Low, P. S. *J. Biol. Chem.* 1992, 267, 24966. (b) Leamon, C. P.; Low, P. S. *J. Drug Targeting* 1994, 2, 101. (c) Leamon, C. P.; Pastan, I.; Low, P. S. *J. Biol. Chem.* 1993, 268, 24847.
- 42.** Antony, A. C. *Blood* 1992, 79, 2807–2820.
- 43.** Sahu, S. K.; Mallick, S. K. *J Mater Sci: Mater Med* 2010, 21, 1587–1597.
- 44.** Lee, R. J.; Low, P. S. *J Biol Chem.* 1994, 269, 3198–204.
- 45.** Low, P. S.; Lu, Y. J. *Controlled Release* 2003, 91, 17–29.
- 46.** Consoli, G. M. L.; Granata, G.; Geraci, C. *Org. Biomol. Chem* 2011, 9, 6491–6495.
- 47.** Leamon, C. P.; Low, P. S. *J. Biol. Chem.*, 1992, 267, 24966
- 48.** Leamon, C. P.; Pastan, I.; Low, P. S. *J. Biol. Chem.*, 1993, 268, 24847
- 49.** Vlahov, I. R.; Santhapuram, H. K. R.; You, F.; Wang, Y.; Kleindl, P.J.; Hahn, S. J.; Vaughn, J. F.; Reno, D. S.; Leamon, C. P. *J. Org. Chem.*, 2010, 75, 3685.
- 50.** Sega, E. I.; Low, P. S. *Cancer Metastasis Rev.*, 2008, 27, 655.
- 51.** Citro, G.; Szczylik, C.; Ginobbi, P.; Zupi, G.; Calabretta, B.; *Br. J. Cancer*, 1994, 69, 463.
- 52.** Lu, Y.; Low, P. S. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2002, 51, 153.
- 53.** Cho, B. K.; Roy, E. J.; Patrick, T. A.; Kranz, D. M. *Bioconjugate Chem.*, 1997, 8, 338.

54. Bae, B. C.; Na, K. *Biomaterials*, 2010, 31, 6325
55. Zhang, Y.; Thomas, T. P.; Desai, A.; Zong, H.; Leroueil, P. R.; Majoros, I. J.; Jr Baker, J. R. *Bioconjugate Chem.*, 2010, 21, 489.
56. Liu, Y.; Li, K.; Pan, J.; Liu, B.; Feng, S. S. *Biomaterials*, 2010, 31, 330.
57. Kularatne, S. A.; Low, P. S.; Grobmyer, S. R.; Moudgil, B. M. *Humana Press*, 2010, 624, 249.
58. Destito, G.; Yeh, R.; Rae, C. S.; Finn, M. G.; Manchester, M. *Chem. Biol.*, 2007, 14, 1152
59. Mehra, N.; Jain, N. *Mol. Pharmaceutics* 2015, 12 (2), 630–643.
60. Zhang, X.; Meng, L.; Lu, Q.; Fei, Z.; Dyson, P. J. *Biomaterials* 2009, 30, 6041
61. Holscher, D.; Schneider, B. *Phytochemistry* 1996, 44, 471–473; b) Schneider, B. *Phytochemistry* 2003, 64, 459–462.
62. White, J. M.; Urban, S. J. *Nat. Prod.*, 2015, 78 (7), 1600–1608.
63. Convertini, P.; Tramutola, F.; Iacobazzi, V.; Lupatelli, P.; Chiummiento, L.; Infantino, V. *Chemico-Biological Interactions*, 2015, 237, 1-8.
64. Li, R.; Wu, R.; Zhao, L.; Hu, Z.; Guo, S.; Pan, X.; Zou, H. *Carbon N. Y.*, 2011, 49, 1797–1805.
65. Dhar, S.; Liu, Z.; Dai, H.; Lippard, S. J. *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 11467–11476.
66. Alexander, C. M.; Hamner, K. L.; Maye, M. M.; Dabrowiak, J. C. *Bioconjugate Chem.*, 2014, 25 (7), 1261–1271.
67. Cao, Y.; Yang, J. *Bioconjugate Chem.*, 2014, 25 (5), 873–878.
68. Wang, S.; Lee, R. J.; Mathias, C. J.; Green, M. A.; Low, P. S. *Bioconjugate Chem.*, 1996, 7, 56–62.