



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA "LA SAPIENZA"
INGEGNERIA DELLE NANOTECNOLOGIE**

Applicazioni delle nanoparticelle per la medicina

PROF. MARCO STOLLER

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA CHIMICA MATERIALI AMBIENTE

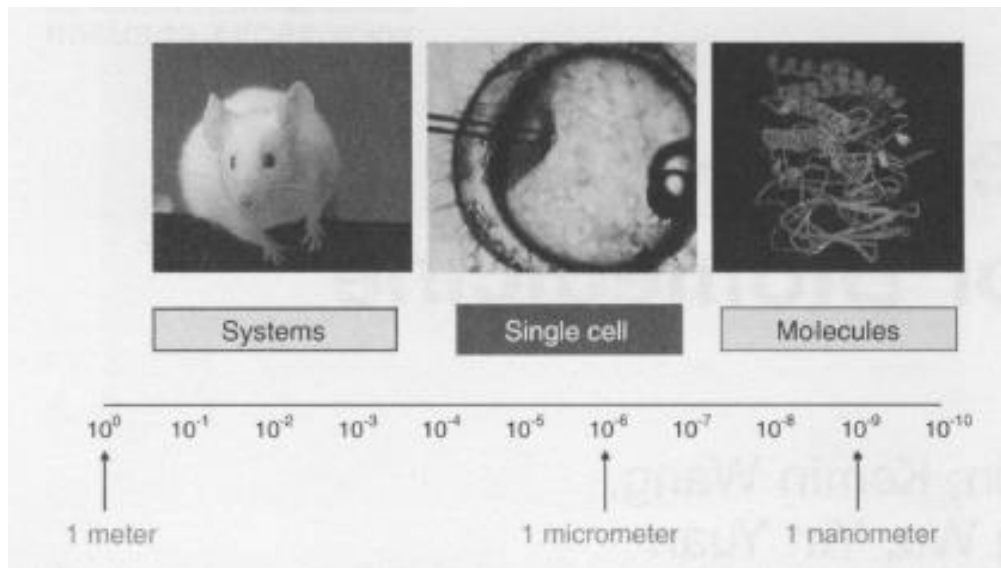
PIANO 2 - UFFICIO 204b

TEL: +390644585580

MARCO.STOLLER@UNIROMA1.IT

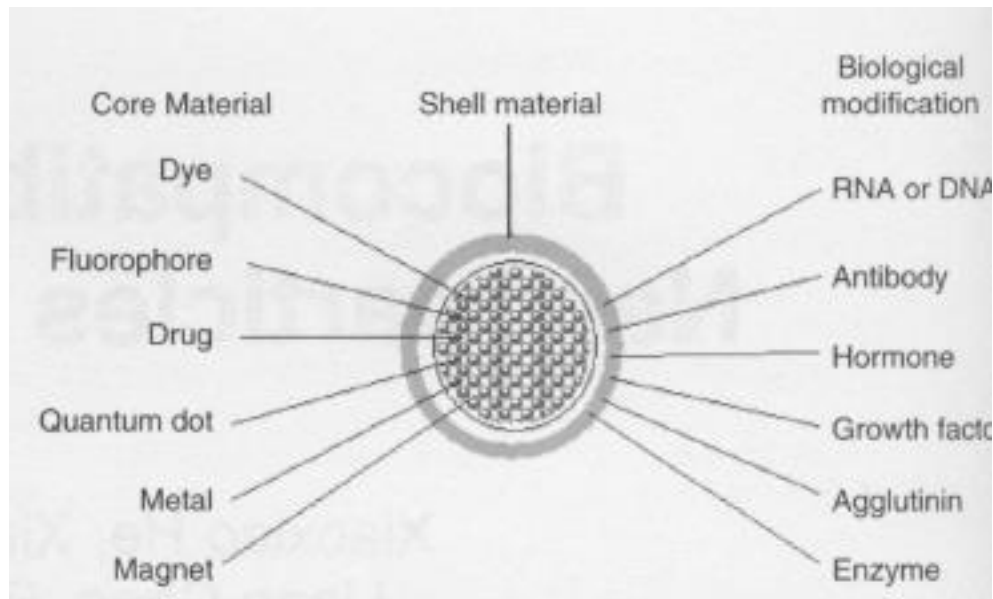
Importanza di nanoparticelle in biomedicina

- La sfida nei prossimi decenni della scienza della vita sarà: **effettuare analisi in-situ ed in vivo al livello micro**, individuare il **legame tra le molecole biologiche e la loro funzione**, ed intervenire su di esse per il miglioramento della salute dell'uomo.
- **Le nanoparticelle possono giungere ad avere dimensioni molto prossime a quelle delle biomolecole**, per cui il loro uso può essere molto importante per interagire al livello molecolare con le cellule dell'organismo umano, sia per la diagnostica che per la cura dei tumori.



Nanoparticelle core-shell

- Queste nanoparticelle hanno dimensioni tra 1 e 100 nanometri e sono costituite da: materiale anche sotto forma di nanoparticelle (**core**), una struttura esterna (**shell**) che contiene il materiale del “core” e da **biomolecole sulla superficie esterna** per rendere le particelle biocompatibili.
- Le nanoparticelle core-shell possono essere utilizzate nella biochimica analitica, nella separazione delle biomolecole, per eseguire delle immagini bio ed infine per la cura dei tumori.

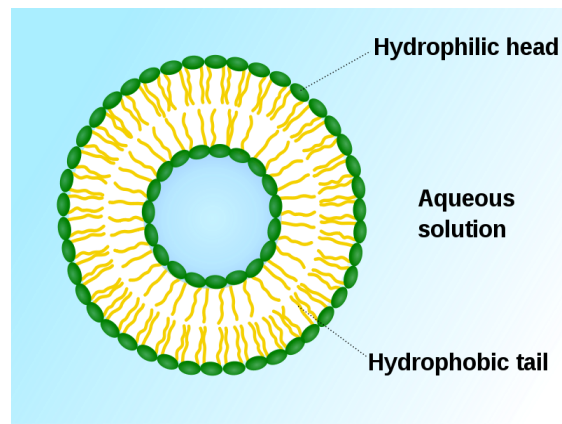


Materiali della parte interna

- Il cuore è costituito da differenti materiali, termici, luminescenti, elettronici, magnetici, ecc., sicché la funzionalità che le particelle possono svolgere spazia in un vasto campo di applicazioni della biomedicina:
 - **Coloranti fluorescenti** possono essere usati per individuare mediante la tecnica della fluorescenza numerose biomolecole e tessuti.
 - **Semiconduttori** quali CdSe, chiamati anche **quantum dots**, sono utilizzati come sensori in quanto emettono segnali in una **banda di luminescenza molto stretta** in funzione delle caratteristiche dell'ambiente esterno.
 - Se è presente la **magnetite $\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$** , le nanoparticelle possono essere utilizzate per la separazione e la concentrazione di molecole biologiche da analizzare.

Materiali della parte esterna

- La struttura esterna (shell) essa può essere costituita da materiale inorganico, organico (polimeri).
 - Il materiale inorganico più utilizzato è **l'ossido di silicio**. La superficie di silice è **resistente ai sali** presenti **nella bile** ed **alla lipasi** presente **nelle vie gastrointestinali** e può resistere a trattamenti in autoclave.
 - Quale shell organico viene spesso utilizzato il **chitosano**, il materiale costituente la parte esterna dei crostacei, in quanto esso è **molto stabile e biocompatibile**.
 - Un materiale molto utilizzato per lo shell è il **liposoma**, **una vescicola fosfolipidica**, che può avere dimensioni variabili fra i 25 nm e 1 μ m. E' normalmente costituito da uno o più doppi strati di fosfolipidi (Il fosfolipide è molecola costituita da una parte lipidica, insolubile in acqua e solubile in solventi organici, e dal radicale di un acido ortofosforico).



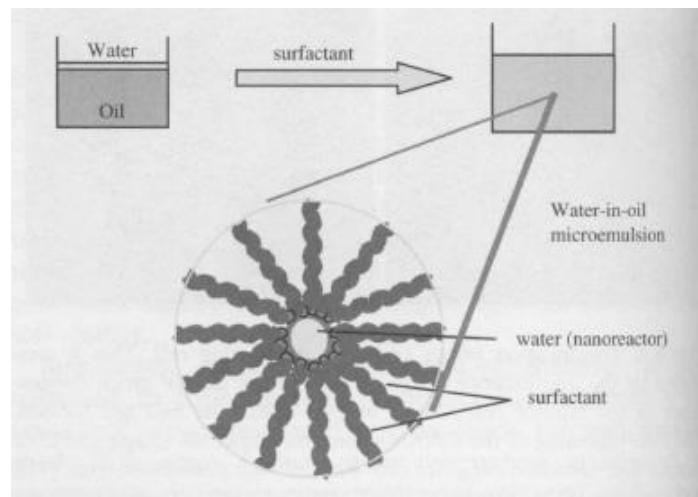
Le molecole sulla superficie esterna

- La **biocompatibilità** delle nanoparticelle, atta a garantirne la loro funzionalità, è **affidata a molecole che vengono adsorbite sulla superficie della struttura esterna**.
- **Biomolecole modificate** possono svolgere un importante ruolo nelle applicazioni biologiche. In tal senso possono esser utilizzate proteine che includono anticorpi o antigeni, enzimi, DNA o RNA.
- **La funzione che ha la sostanza posta all'esterna della nano particella è il riconoscimento** da parte **della cellula** verso cui si indirizza la nanoparticella e la tracciabilità del tessuto con cui la nano particella viene in contatto.

Materiale dello shell	Modificazione superficiale	Applicazione
SiO ₂	DNA	Separazione DNA
Chitosano	Enzimi	Purificazione di enzimi
Acido polilattico	Medicinale che elimina cellule cancerogene	Individuazione di cellule cancerogene

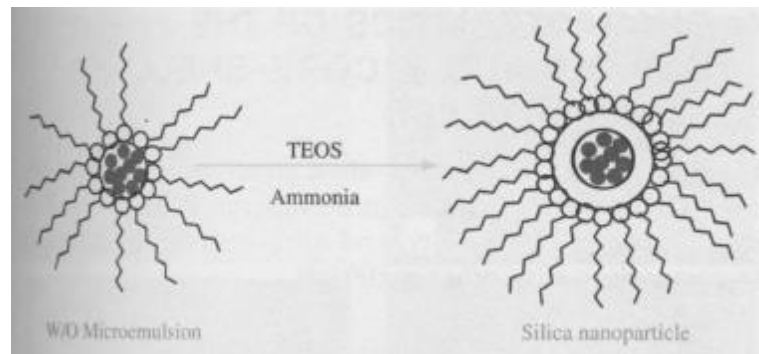
Sintesi delle nanoparticelle core-shell biocompatibili

- La nanoparticelle dovranno avere una dimensione tra 1 e 100 nm ed una distribuzione granulometrica stretta. La produzione avviene in tre fasi:
 1. Generazione mediante precipitazione della nanoparticelle presenti nel cuore
 2. Formazione dello shell per coating
 3. Modificazione biologica della superficie
- **La tecnica più adatta è in questo caso quella di microemulsione o emulsione inversa.** Le goccioline delle nanoparticelle, disperse in un sistema organico in cui sono immiscibili, contengono all'interno il materiale che deve originare le nanoparticelle del cuore.

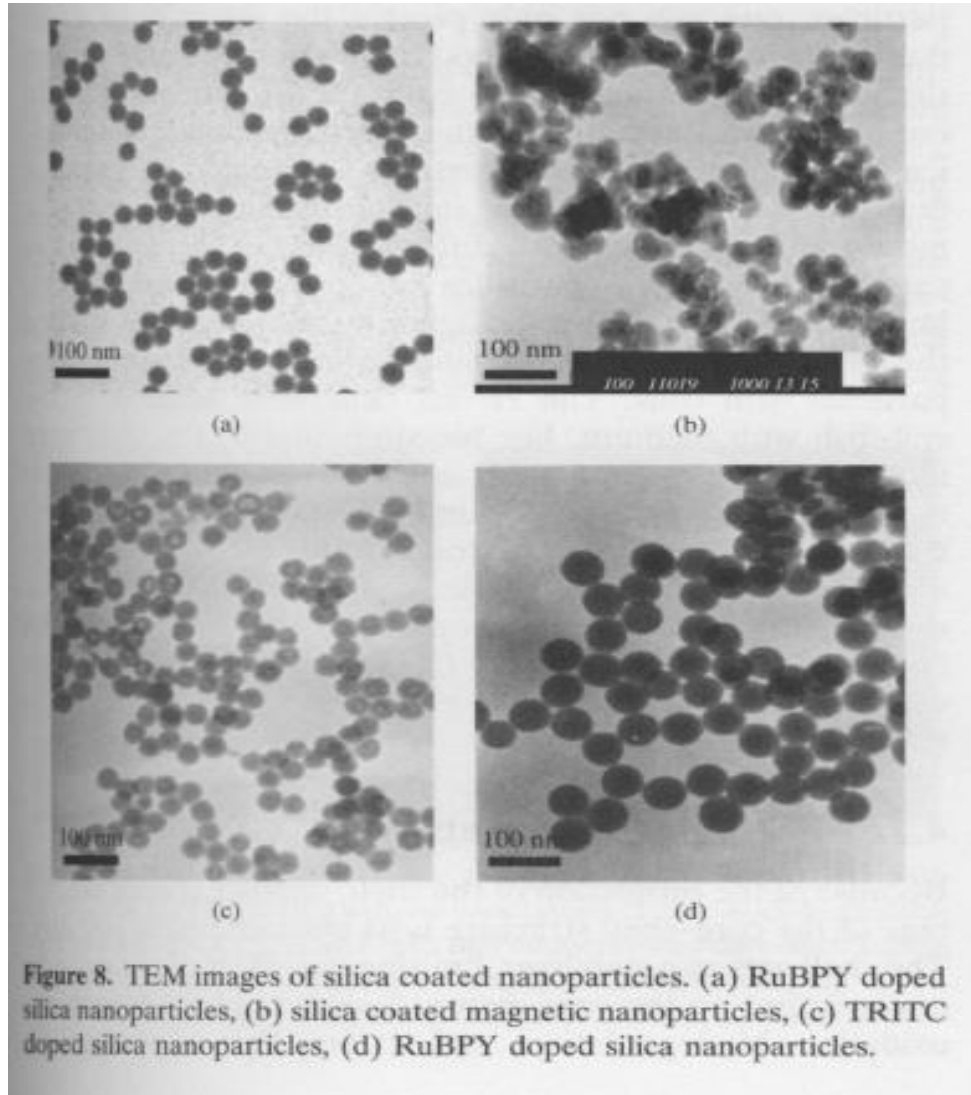


Produzione dello shell

- La **configurazione esterna (lo shell)** è **realizzato per coating** sopra le particelle precedentemente ottenute.
- **Lo shell migliora** : la stabilità chimica, la biocompatibilità e la resistenza meccanica delle particelle presenti nel cuore.
- **Si possono usare materiali inorganici ed organici**. Un tipico esempio sono le particelle che hanno un coating di ossido di silicio biocompatibile. La tecnica consiste, in questo caso, nel trattare le goccioline emulsionate con tetraetossidosilano (TEOS) che viene idrolizzato sulla superficie delle goccioline stesse, in presenza di ammoniaca come catalizzatore di idrolisi.



Esempi di nanoparticelle con ossido di silicio funzionalizzato



Le **sostanze dopanti** funzionalizzanti sono dei **coloranti** utilizzati ai fini per le loro caratteristiche fluorescenti nella diagnostica.

RuBPY Tris(2,2'-bipyridyl)dichlororuthenium(II) hexahydrate

TRITC Tetramethyl Rhodamine Iso-Thiocyanate

Procedura adottata presso Uni Roma

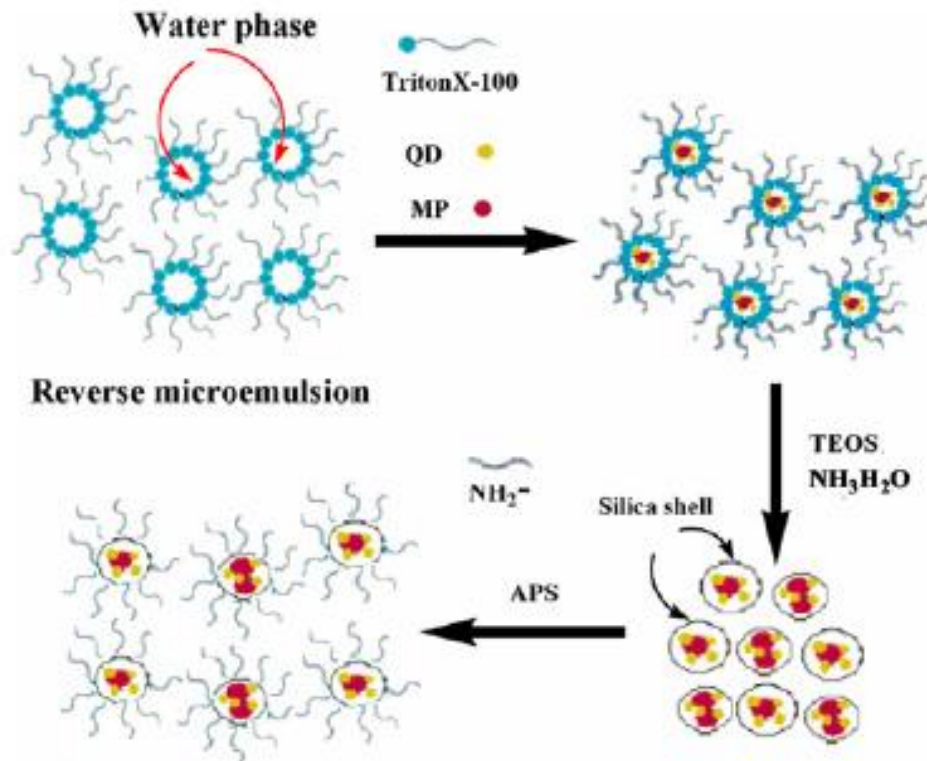
E' stata adottata la seguente procedura:

1. si fa avvenire la precipitazione tra cloruro di ferro e solfito di sodio, in presenza di ammoniaca, ottenendo idrossido di ferro, $\text{Fe}(\text{OH})_3$;
2. viene evaporata l'acqua e si ottiene l'ossido idrato e per riscaldamento la sua forma anidra;
3. calcinando a $1400\text{ }^\circ\text{C}$ si ottiene la magnetite $\text{FeO}\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$;
4. le particelle così ottenute si pongono in una soluzione acquosa agitata contenente il 3 % di silicato di sodio, ottenendo così la precipitazione dell'ossido di silicio sulle particelle di magnetite;
5. le nanoparticelle possono essere poste in stufa ad essiccare.

La modifica biologica delle nanoparticelle

- E' **fondamentale per legare le nanoparticelle alle molecole biologiche** che fanno parte delle cellule da analizzare o individuare. Ad esempio nanoparticelle di silice dopate con coloranti possono dare evidenza delle particelle a cui si legano con la loro fluorescenza e quindi possono essere utilizzati come **biosensori** (biomarkers).
- Per modificare biologicamente le nanoparticelle nei seguenti modi:
 - La modifica può essere promossa da una **sostanza chimica aggiunta durante l'operazione di sintesi**. Ad esempio la sintesi contemporanea di TEOS e AEAPS (N-(β -ammonioetile- γ -amminopropiltriectossisilano) comporta un coating del cuore con un ossido di silicio modificato con **un gruppo amminico, che favorisce la reazione con una molecola biologica (legante)**. Viene quindi creato un legame di tipo chimico tra il gruppo funzionale già fissato sulla nano particella ad una biomolecola.
 - Il secondo metodo consiste nel far **adsorbire una biomolecola sulla superficie della nano particella**, stabilendo un legame di tipo fisico. Questa tecnica può però portare al distacco della biomolecola dalla superficie della nano particella.

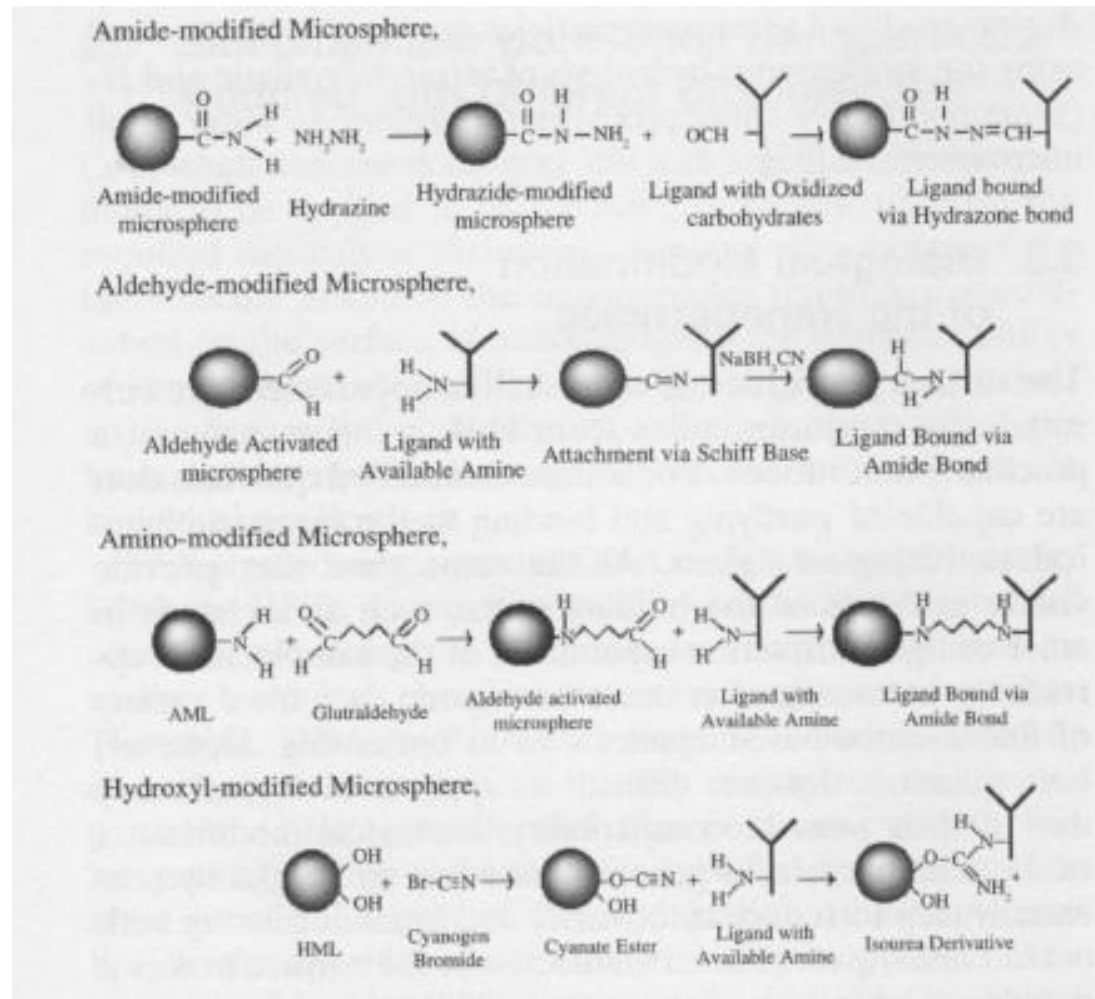
Esempio di preparazione di particelle da utilizzare per diagnostica



QD quantum dots, MP magnetic particles

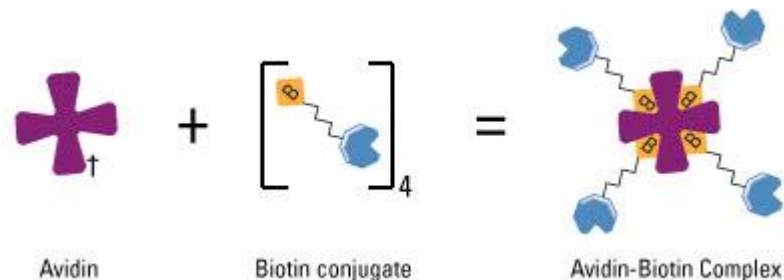
Esempi di legami chimici

- Svariate reazioni portano a legare una molecola biologica che ha un terminale in grado di reagire con un terminale presente sulla superficie esterna delle nanoparticelle, detto legante. Le coppie legante-ricettore più comuni sono: avidina-biotina, anticorpo-antigene, etc.



La coppia biotina-avidina

- La **biotina** (Vitamin H, Vitamin B7, Coenzyme R) presente in piccola quantità in ogni cellula vivente ed è molto importante per i processi biologici quale l'accrescimento cellulare.
- Per la sua piccola dimensione (244.3 Daltons), **può essere legata a molte proteine ed altre molecole senza un'alterazione dell'attività biologica**. La elevata interazione tra la biotina e una proteina che funge da legante può essere utilizzata in sistemi progettati per individuare o quantificare degli elementi biologici. Inoltre, quando la biotina è legata ad una molecola si può procedere alla purificazione di tali molecole utilizzando il legame biotina con un legante immobilizzato.
- **Il legante usato solitamente l'avidina**, una proteina presente nel bianco dell'uovo.

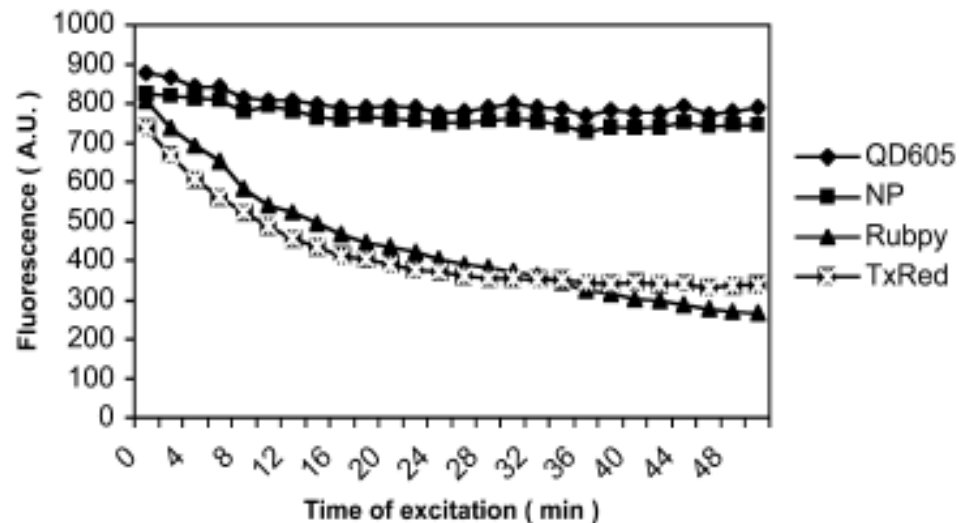


Applicazione di nanoparticelle core-shell

- Le applicazioni possono essere le più varie nel campo della biomedicina. Le più frequenti sono in campo analitico, ma vi sono anche applicazioni quale **rilascio di medicinale**, in quest'ultimo caso, però la particella composita presenta spesso una **configurazione esterna di materiale organico, tipicamente liposoma o chitosano**.
- In campo analitico una delle applicazioni più frequenti è quella riguardante la **metodica analitica basata sulla fluorescenza**. Nell'analisi tradizionale si usano delle soluzioni chimiche che attribuiscono fluorescenza all'interno o all'esterno di cellule con cui si legano, riuscendo a fornire indicazioni importanti per una diagnosi precoce. Purtroppo questi prodotti hanno delle limitazioni sia in quanto possono subire una parziale eliminazione delle loro qualità riducendo l'intensità della fluorescenza, sia perché in quantità significative possono essere tossici. **L'uso delle nanoparticelle limita l'uso di materiale fluorescente.**

Stabilità di particelle di silice dopate (biomarkers)

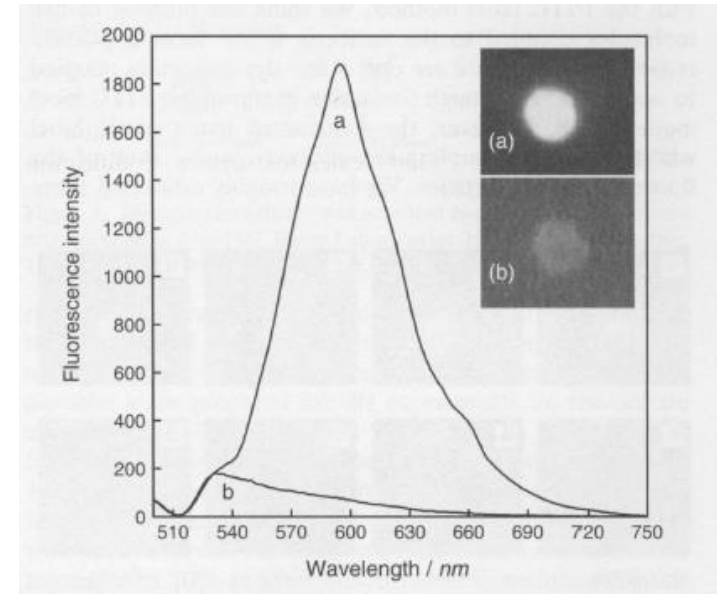
- Una nuova forma di **biomarker** è costituita da **nanoparticelle di silice** con sostanze fluorescenti quali il **RuBPY** (dye tris(22bipyridyl) dichlororuthenium (II) hexahydrate).
- Queste nanoparticelle sono **generate mediante la tecnica della microemulsione** con diametri di alcune decine di nanometri. La loro fluorescenza può essere valutata sottoponendole ad irraggiamento UV ed utilizzando uno strumento di rilevazione della fluorescenza.



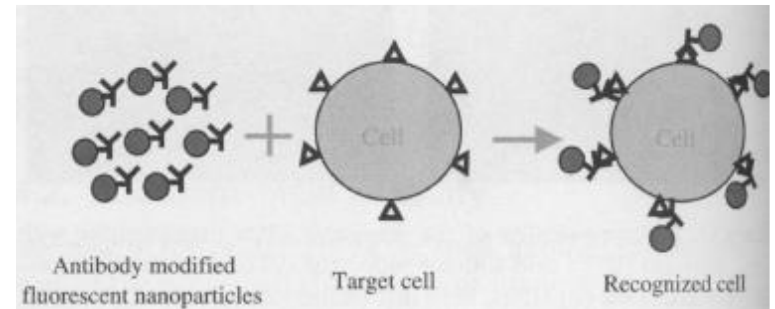
Confronto della fotostabilità delle nanoparticelle dopate biomakers (NP), quantum dots (QD605), Texas red die e RUBPY die. Fluorescenza sotto irraggiamento di una luce a 50 W at intervalli di 2 minuti.

Quantum dots usati per analisi a fluorescenza

- Le nanoparticelle con quantum dots forniscono intensità di fluorescenza molto elevata. Ad esempio nanoparticelle di CdSe ricoperte con ZnS presentano rispetto al colorante rodamina una luminescenza 20 volte più elevata e una stabilità 100 volte superiore rispetto ad agenti che riducono la fluorescenza.

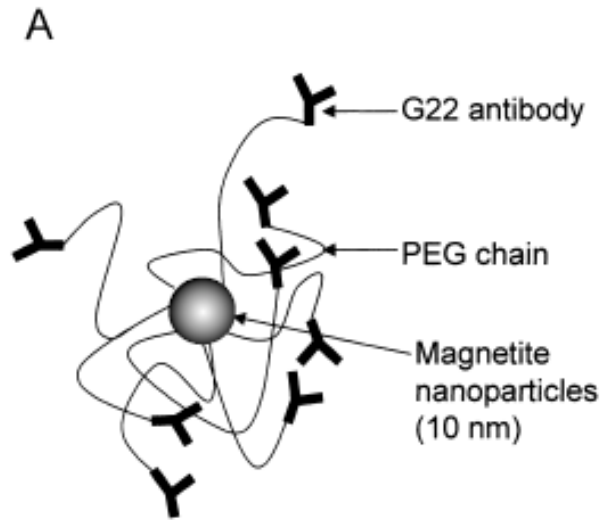


- Le nanoparticelle immerse nell'organismo individuano e si legano alle cellule da individuare attraverso i loro ricettori.



Particelle con il cuore magnetico usate per la diagnostica

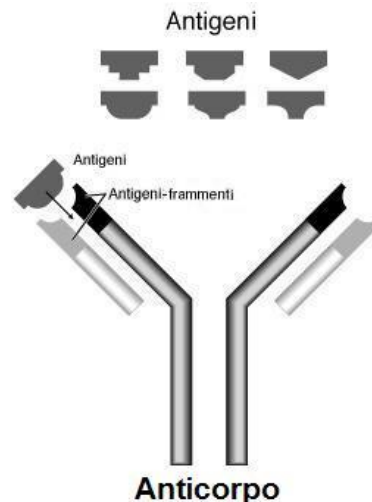
- Le particelle con il cuore magnetico possono essere **utilizzate per l'analisi delle immagini tramite risonanza magnetica (MRI) e mezzi di generazione termica per la cura dei tumori (ipertermia)**.
- Nell'uso per l'analisi delle immagini il vantaggio è la bassa concentrazione utile ad ottenere un buon contrasto.



- Gli anticorpi sono proteine a forma di Y . Essi sono utilizzati dal sistema immunitario per neutralizzare oggetti estranei quale I virus.

Anticorpi

- Un **anticorpo** (più propriamente **immunoglobulina**) è una proteina con una peculiare struttura quaternaria che le conferisce una forma a "Y". Gli anticorpi hanno la funzione, nell'ambito del sistema immunitario di neutralizzare corpi estranei come **virus e batteri**, riconoscendo ogni terminale **antigenico** legato al corpo come un bersaglio.
- Al termine dei bracci della "Y" vi è una struttura in grado di "chiudere" i segmenti del corpo da riconoscere. Ogni chiusura ha una chiave diversa, costituita dal proprio terminale antigenico; quando la "chiave" (l'antigene) è inserita, l'anticorpo si attiva (vedi <http://www.news-medical.net/health/Antibody-What-is-an-Antibody.aspx>).



Applicazione come Drug Delivery Systems - DDS

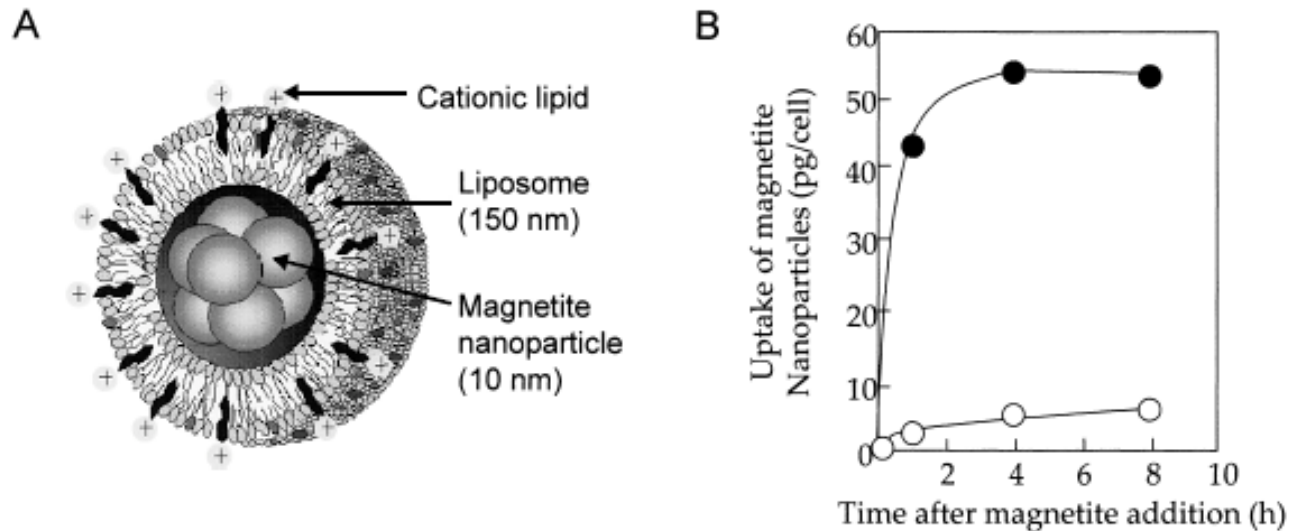
- Se le particelle contengono dei medicinali esse possono essere utilizzate per il **trasporto dei farmaci ed il loro rilascio**.
- E', infatti, possibile **guidare le particelle** verso il punto di applicazione **mediante magneti esterni**.
- Inviando microonde è possibile riscaldare il cuore magnetico delle particelle e rilasciare le sostanze.
- **La dimensione delle particelle è importante**. Solo quelle inferiori ai 100 nm non sono bloccate dai macrofagi nel fegato e possono penetrare attraverso i vasi sanguigni verso le cellule.
- Se sulla particelle si trovano dei leganti rispetto a ricettori di specifiche cellule del corpo, si può inviare il medicinale solo a quelle cellule e non ad altre, evitando anche la biodifesa del corpo.

La cura tumorale per ipertermia

- Per terapia ipertermica o **ipertermia** si intende il riscaldamento di tessuti biologici a temperature superiori a quella fisiologica. Il riscaldamento dei tessuti, realizzato attraverso campi elettromagnetici, ha oggi una larga applicazione clinica. Le onde elettromagnetiche utilizzate sono quelle comprese nell'intervallo di frequenze che va dalle microonde alle onde corte, sino alle onde lunghe. Attualmente si usa la **frequenza di 13,56 MHz**, che permette di ottenere un riscaldamento in profondità dei tessuti trattati in modo non invasivo.
- Attraverso l'uso di campi elettromagnetici a radiofrequenza, focalizzati da apposite antenne (Ipertermia transcutanea locoregionale), **l'organo bersaglio è riscaldato fino ad una temperatura vicina o superiore ai 43°C**, per circa 60 minuti.
- È stato dimostrato che **la radioterapia e la chemioterapia**, se utilizzate **in associazione con trattamenti di Ipertermia**, possono avere, a parità di dose, una **maggiore efficacia** o conservare la stessa efficacia, a dosi inferiori.

Efficacia dell'ipertermia

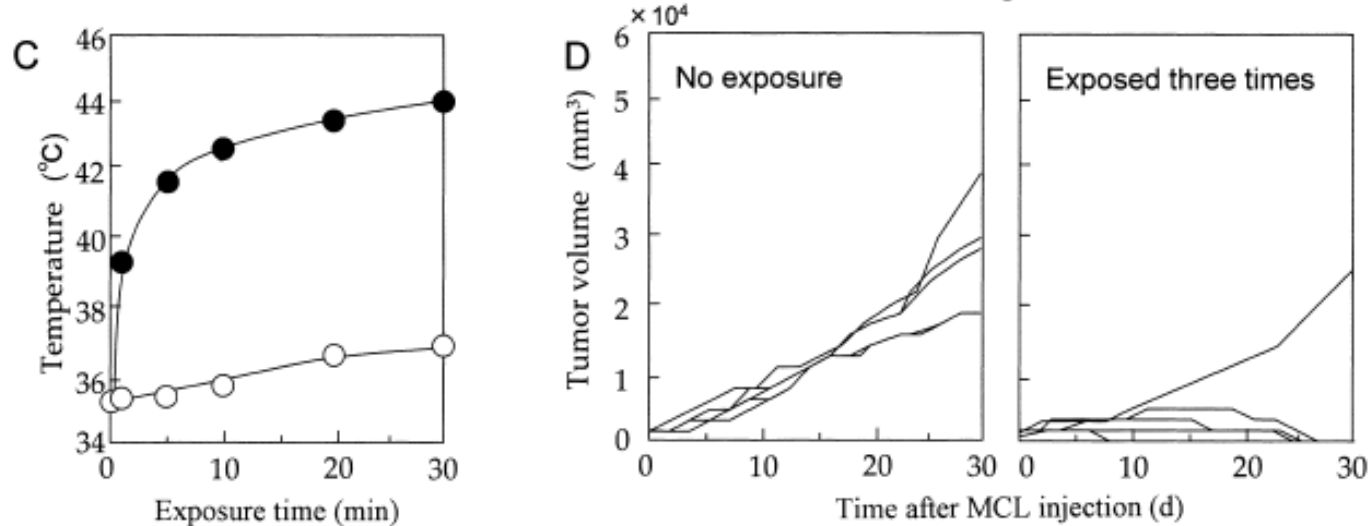
Il principale problema dei trattamenti per ipertermia è arrivare a riscaldare localmente le cellule malate senza danneggiare gli organi adiacenti. Questa possibilità è fornita dalle nanoparticelle con il cuore magnetico. Tra le caratteristiche positive vi sono la semplice dosabilità, la biocompatibilità e la loro capacità di accumulo in cellule tumorali anche tramite uso di ricettori.



Particelle core-shell caricate positivamente e **dimostrazione dell'efficacia della carica funzionale** (pallini neri), rispetto a sistemi non caricati (pallini vuoti).

Efficacia dell'ipertermia

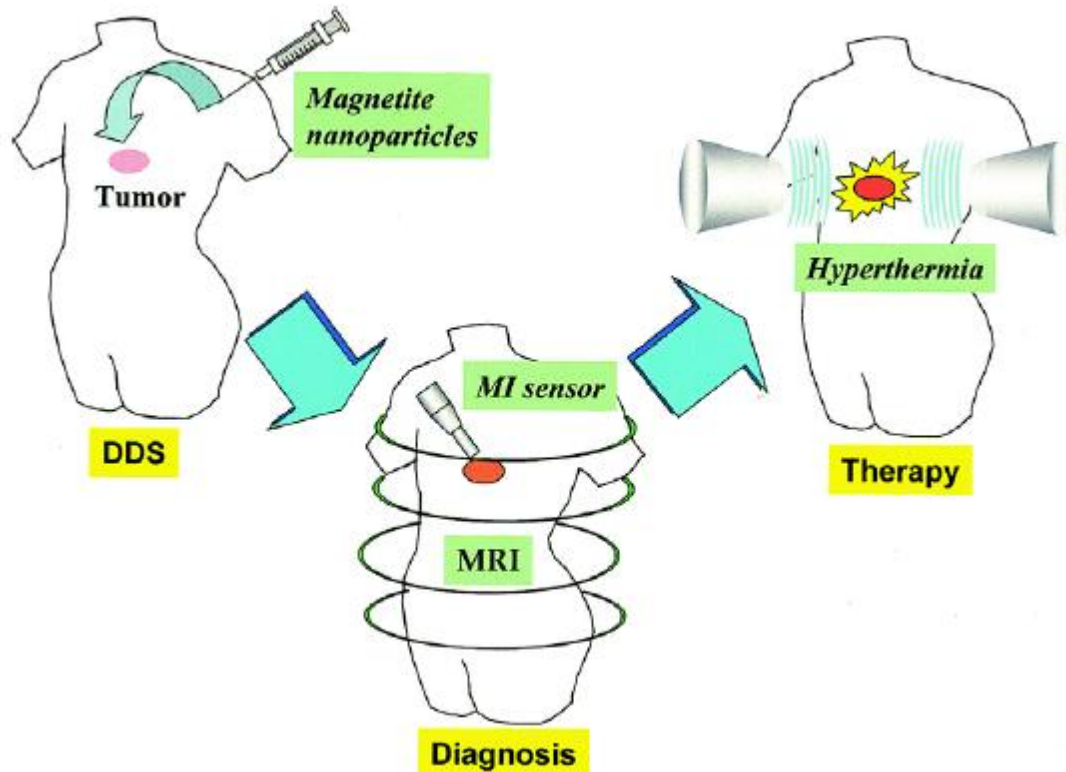
In esperimenti in vivo sul tumore di ratti le nanoparticelle magnetiche sono state sottoposte per 30 minuti ad un campo magnetico con una frequenza di 118 kHz. I grafici sottostanti dimostrano la **maggiore efficacia della chemioterapia in presenza del trattamento**.



Nel grafico C viene mostrato la maggiore capacità di aumentare la temperatura locale per nanoparticelle cariche, mentre nei grafici D, ove ciascuna linea indica un differente ratto, si mostra come il tumore continua a crescere senza il trattamento, mentre con grande probabilità (88%) si arresta in presenza del trattamento.

Procedura per il trattamento di ipertermia con NPM

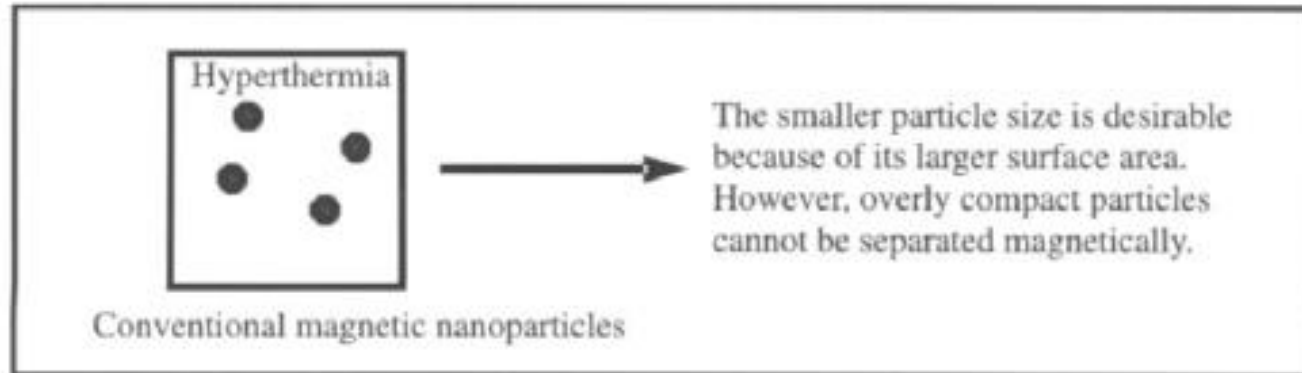
- Nanoparticelle magnetiche in liposomi vengono funzionalizzate con anticorpi.
- Viene fatta una **iniezione nelle arterie** di soluzione contenente le particelle **prodotte** (tipicamente 0.4 ml contenenti 3 mg di magnetite).
- Dopo 48 ore viene svolto il **rilevamento diagnostico** o eseguito il **trattamento di ipertermia**.



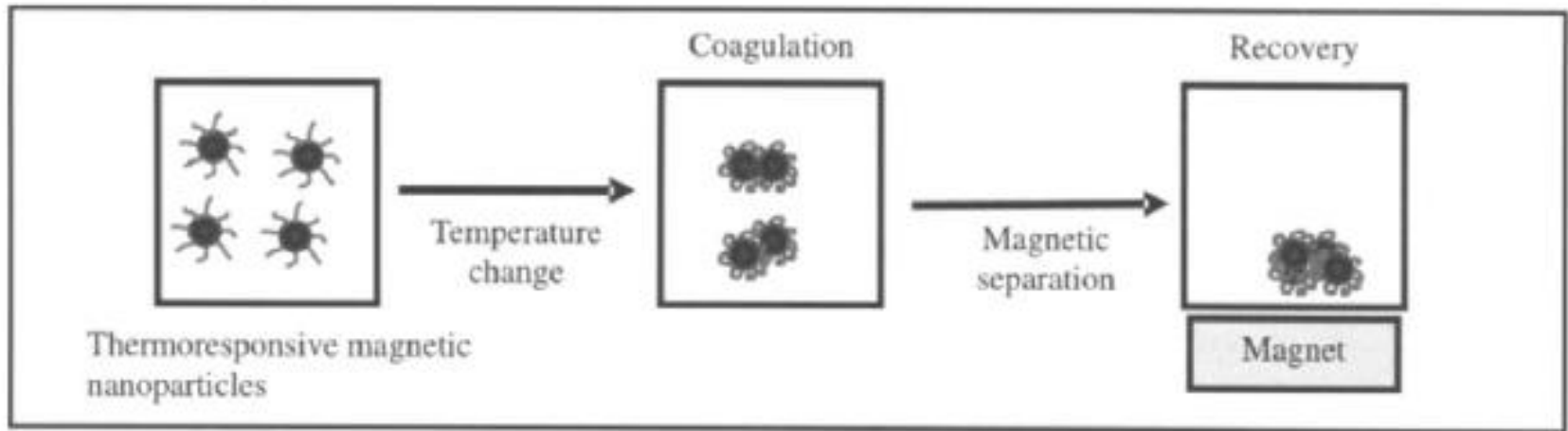
Uso delle nanoparticelle magnetiche in diagnostica

- Le particelle magnetiche possono essere utilizzate per diverse obiettivi anche nel campo della **diagnostica biomolecolare**.
- Disporre di particelle magnetiche al livello nano aumenta la loro efficacia di interazione ma la **efficacia di separazione mediante un magnete si riduce**.
- Si è quindi sviluppata una **tecnica di ricopertura di particelle magnetiche mediante polimeri che assumono delle proprietà di dispersione/aggregazione indotte da variabili ambientali quali la temperatura, campo elettrico, pH, etc.** Tra tali polimeri quelli più utilizzati sono quelli che rispondono a variazioni di temperatura, brevettati con il marchio Therma-Max (http://www.magnabeat.com/e_thermamax.html).

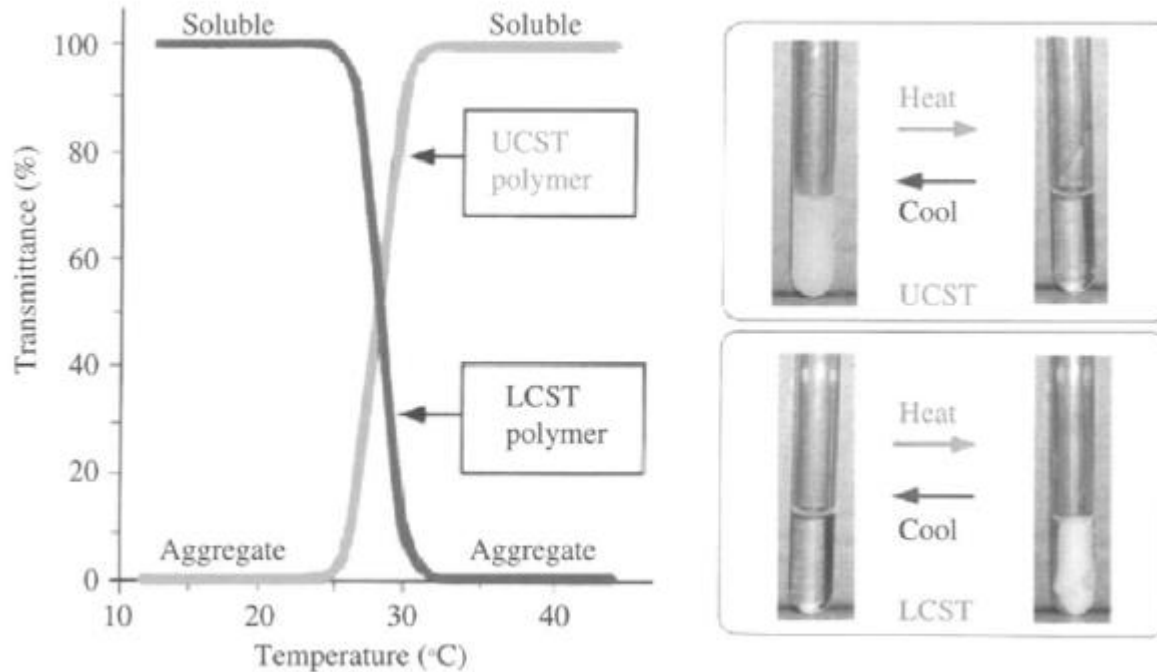
Particelle Magnetiche che rispondono a stimoli Termici



Modification by thermoresponsive polymers



Polimeri che rispondono a stimoli termici



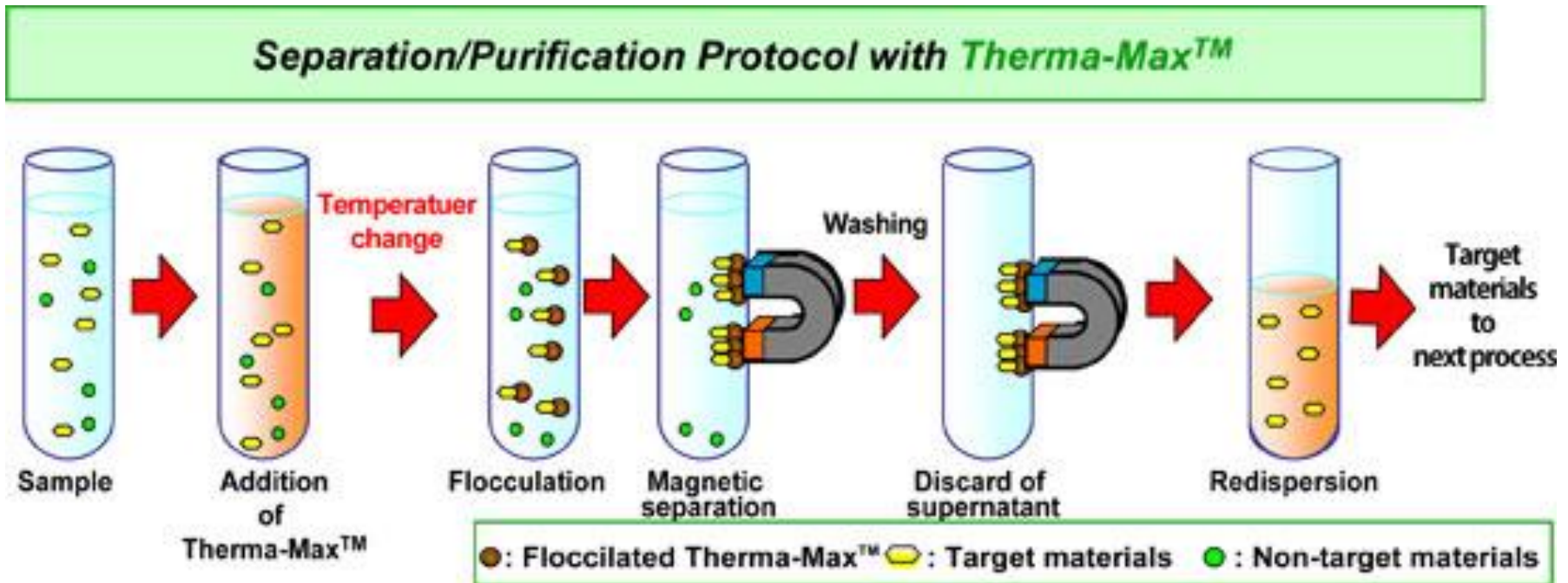
Polimeri Lower Critical Solution Temperature – **LCST**

N-isopropil acrilamide ha LCST pari a 32 °C

Polimeri Upper Critical Solution Temperature – **UCST**

Copolimeri di N-acrilo glicinammide e derivato del N-metacrilolo-N- biotinil propilen diammina con UCST variabile a secondo del rapporto monomero/polimero

Modalità operativa di Therma-Max

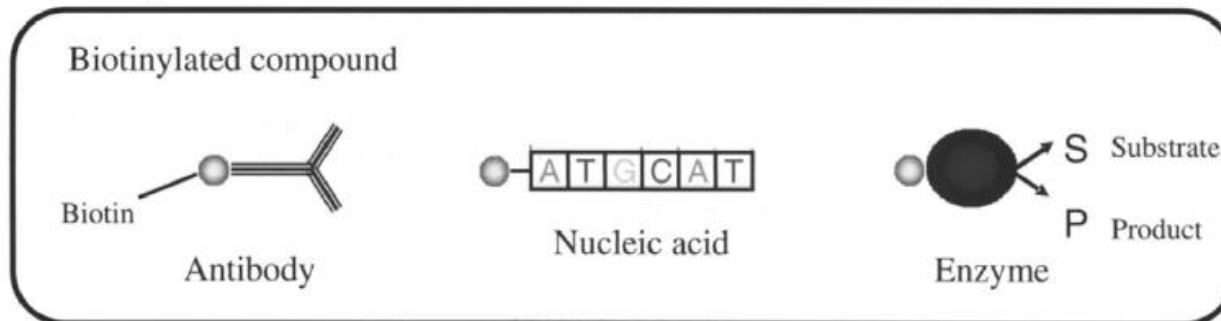
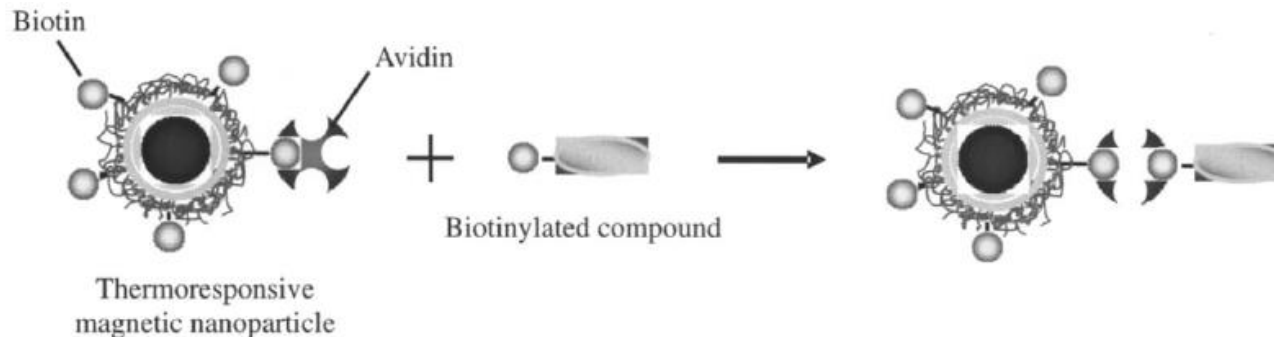


Abbassamento
temperatura

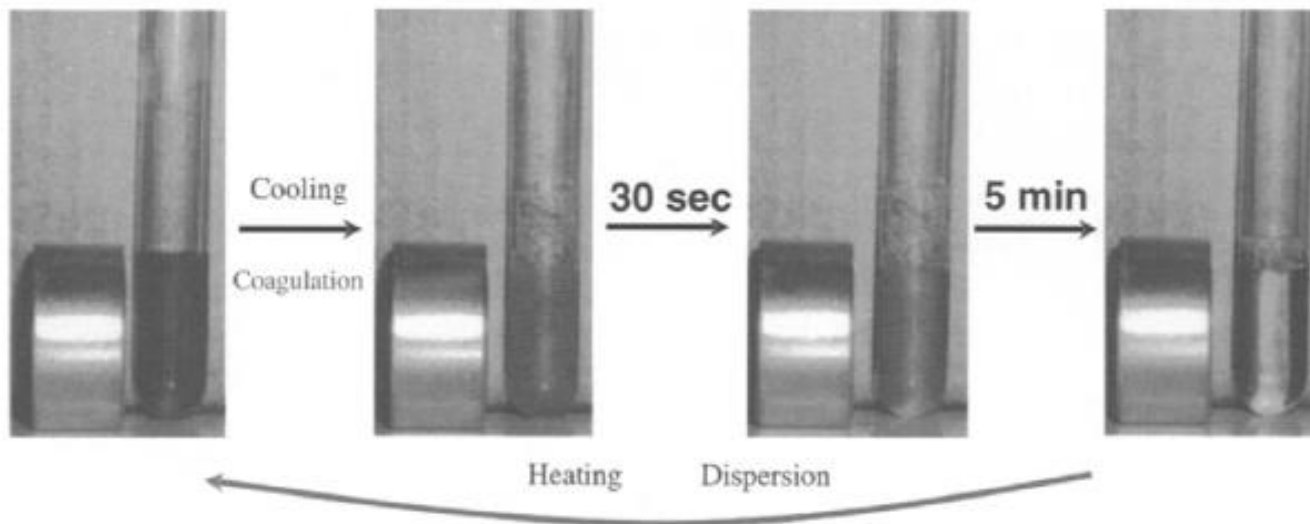
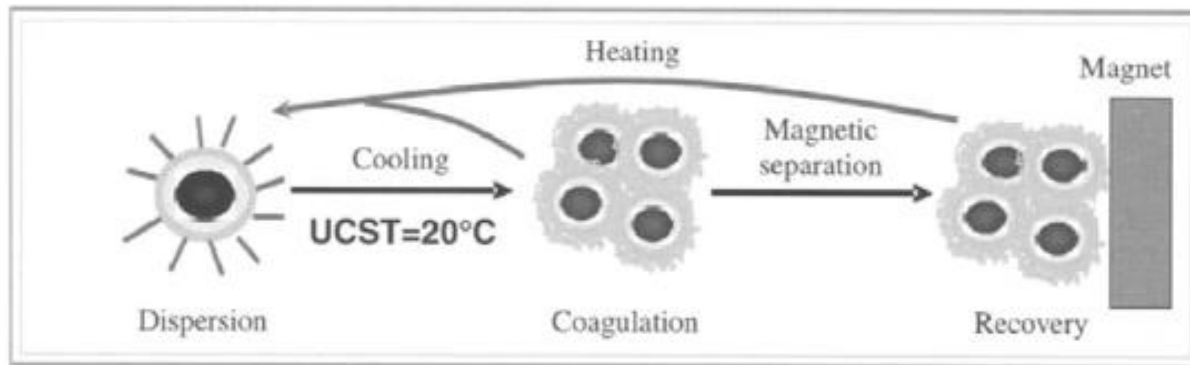
Innalzamento
temperatura

Preparazione particelle magnetiche per analisi biologiche

- Coating delle particelle magnetiche con un polialcool (destrina)
- Sintesi del copolimero del NAGAm con MBPDA un derivato della biotina, con proprietà UCST.
- **Il terminale biotinico si può legare all'avidina (glicolproteina) che ha la capacità di legarsi a sua volta a molecole biologiche con radicali biotinici, quali antigeni (Virus, batteri, etc.), proteine biotenilate e DNA .**



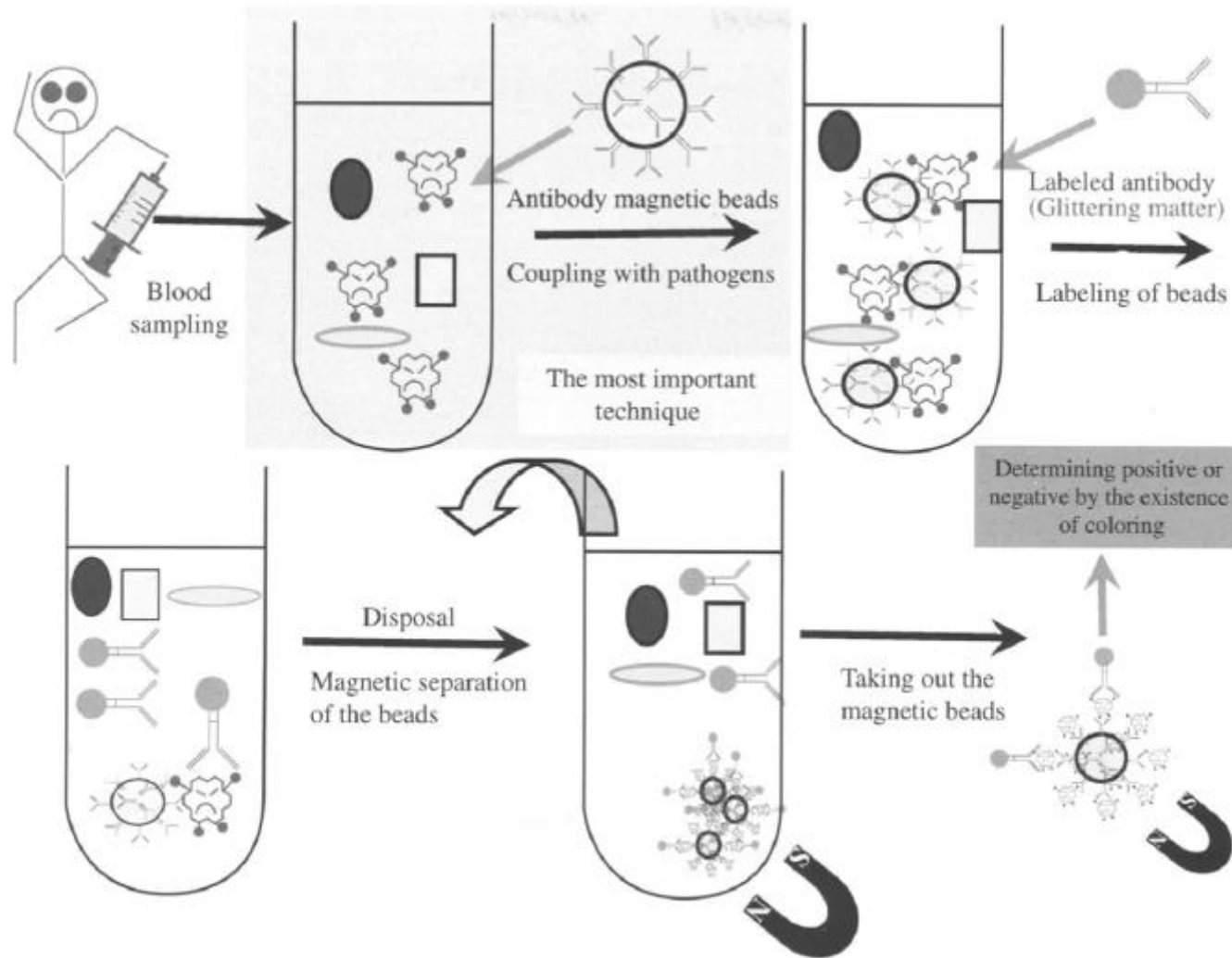
Separazione mediante un magnete delle particelle termosensibili



Applicazioni in campo diagnostico

- Le particelle magnetiche termosensibili ricoperte da un avidina o streptavidina possono svolgere un ruolo importante in analisi diagnostiche.
- Nel caso vi sia un antigene nel sangue, esso viene captato dal sistema NPM - anticorpo e successivamente sull'antigene può essere adsorbito un anticorpo con un rivelatore, ad es. luminescente, utile all'analisi. Tale preparazione adotta un sistema cosiddetto a sandwich.
- Attraverso questo metodo sono state separate efficacemente cellule di *Escherichia coli*.

Immunodiagnosi utilizzando particelle magnetiche con anticorpi immobilizzati



Campi di applicazione di nanoparticelle termosensibili

