



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale
Biologia Molecolare e Applicata (LM-6)

**SINTESI E NANOFORMULAZIONE DI UN DERIVATO FLAVONICO
CONTENENTE UN GRUPPO 4'-AMINOFENOSI PER IL TRATTAMENTO
DEL NSCLC.**

**SYNTHESIS AND NANOFORMULATION OF A FLAVONE DERIVATIVE
CONTAINING A 4'-AMINOPHENOXY GROUP FOR THE TREATMENT OF
NSCLC.**

Tesi di Laurea Magistrale di:

Maria Saccone

Relatrice Chiar.ma Prof.essa:

Giovanna Mobbili

Correlatrice:

Elena Romagnoli

Sessione Estiva Luglio 2026
Anno Accademico 2025/2026

INDICE

INTRODUZIONE	3
Capitolo I.....	7
IL CARCINOMA POLMONARE: ASPETTI BIOLOGICI, CLINICI E TERAPEUTICI	7
1.1 Aspetti generali e classificazione istologica	7
1.2 Epidemiologia e fattori di rischio	9
1.3 Patogenesi molecolare	11
1.4 Diagnosi	13
1.5 Terapie attuali	15
1.6. Limiti delle terapie attuali e razionale del lavoro	17
Capitolo II	20
DERIVATI AMINOFENOSSIFLAVONICI E IDENTIFICAZIONE DI APF-1.....	20
2.1 Razionale dello sviluppo di derivati flavonici nel NSCLC.....	20
2.2 Sviluppo della serie 4'-amminofenossi-flavonica	24
2.3 Effetti di APF1 su apoptosi, ciclo cellulare e p21	27
2.4 Considerazioni sul meccanismo d'azione	29
2.5 Razionale della nanoformulazione di APF1	31
Capitolo III.....	33
NANOMEDICINA E STRATEGIE DI DRUG DELIVERY PER IL TRATTAMENTO DEI TUMORI	33
3.1 Nanomedicina e drug delivery antitumorale.....	33
3.2 Effetto EPR e targeting tumorale.....	36
3.3 Nanoparticelle polimeriche.....	40
3.4 Micelle polimeriche.....	43
3.5 Copolimeri anfifilici per la formazione di micelle polimeriche	46
3.6 Polimero mPEG-b-p(HPMAm-Bz)	49
3.7 Ruolo delle dimensioni e della carica superficiale nella caratterizzazione delle nanoparticelle: applicazione del DLS come tecnica rapida e non invasiva.....	53

Capitolo IV	60
MATERIALI E METODI.....	60
4.1 Sintesi chimica.....	60
4.1.1 Sintesi di (2-idrossi-5-(4-nitrofenossi) acetofenone (3).....	62
4.1.2 Sintesi di (E)-1-(2-idrossi-5-(4-nitrofenossi) fenil) -3-(3-fenossifenil) prop-2-en-1-one (4)	64
4.1.3 Sintesi di 6-(4-nitrofenossi) -2-(3-fenossifenil) -4H-cromo-4-one (5)	65
4.1.4 Sintesi di 6-(4-amminofenossi)-2-(3-fenossifenil)-4H-cromo-4-one (APF1)	68
4.2 Preparazione delle micelle	71
4.3 Quantificazione del polimero e dell'APF1 incapsulato	72
4.4 Dynamic light scattering	74
4.5 Colture cellulari	75
4.6 Citotossicità nella linea cellulare A549	75
Capitolo V.....	78
DISCUSSIONE DEI RISULTATI	78
5.1 Ottimizzazione della sintesi di APF1.....	78
5.2 Formazione delle micelle e analisi di efficienza di incapsulamento	88
5.3 Analisi dimensionale e di polidispersività con DLS.....	94
Capitolo VI.....	100
CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI.....	100
BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA:	104

INTRODUZIONE

Il carcinoma polmonare rappresenta una delle principali cause di mortalità oncologica a livello mondiale e, tra le diverse forme di tumore del polmone, il carcinoma polmonare non a piccole cellule, noto come Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC, costituisce la tipologia più frequente. Nonostante i progressi ottenuti negli ultimi anni grazie all'introduzione di terapie a bersaglio molecolare e immunoterapiche, il trattamento di questa patologia rimane ancora complesso. La risposta terapeutica può infatti essere limitata dalla comparsa di resistenze, dalla tossicità sistemica dei farmaci e dalla presenza di sottogruppi di pazienti che non risultano eleggibili per specifiche terapie target. Per questo motivo, la ricerca di nuove molecole ad attività antitumorale e di strategie in grado di migliorarne il profilo farmacologico rappresenta un ambito di grande interesse.

In questo contesto si inserisce lo studio di derivati flavonici, una classe di composti caratterizzata da un ampio potenziale biologico e da una struttura chimica modulabile. I flavoni e i loro derivati sono stati ampiamente investigati per la loro capacità di interferire con diversi processi cellulari coinvolti nella proliferazione tumorale, nell'apoptosi e nella regolazione del ciclo cellulare. Tra questi composti, APF1, un derivato flavonico progettato e sintetizzato nel gruppo di ricerca in cui ho svolto questo lavoro di tesi, ha mostrato una

promettente attività citotossica nei confronti di linee cellulari di carcinoma polmonare non a piccole cellule, rendendolo un candidato interessante per ulteriori studi.

Tuttavia, come accade per molte molecole bioattive caratterizzate da una struttura fortemente aromatica e lipofila, APF1 può presentare limiti legati alla scarsa dispersione in ambiente acquoso. Questo aspetto può ridurre la biodisponibilità, ostacolare l'impiego in saggi biologici condotti in mezzo acquoso e rappresentare un potenziale limite per un futuro sviluppo applicativo. Di conseguenza, oltre alla sintesi e alla caratterizzazione del composto, risulta di particolare interesse valutare strategie di formulazione in grado di migliorarne la compatibilità con i sistemi biologici.

Negli ultimi anni, i sistemi di drug delivery su scala nanometrica hanno assunto un ruolo sempre più rilevante nello sviluppo di nuove strategie terapeutiche in ambito oncologico. Tra questi, le micelle polimeriche rappresentano una piattaforma particolarmente adatta alla veicolazione di molecole scarsamente solubili in acqua. Grazie alla loro struttura core-shell, formata dall'autoassemblaggio di copolimeri anfifilici, tali sistemi possono incorporare composti lipofili all'interno del core idrofobico, mentre la porzione idrofila esterna contribuisce alla stabilizzazione della dispersione in ambiente acquoso. Questa organizzazione consente di migliorare la veicolazione di molecole

bioattive e di ottenere formulazioni potenzialmente più idonee per applicazioni biologiche.

Lo scopo del presente lavoro di tesi è stato quindi quello di sintetizzare APF1, ottimizzando alcuni passaggi della procedura sintetica, e di valutarne la formulazione mediante micelle polimeriche come possibile sistema di delivery. In particolare, il lavoro sperimentale ha previsto la preparazione del composto attraverso una sequenza multistep, l'analisi delle condizioni di reazione e delle modifiche introdotte rispetto alla procedura di riferimento, la preparazione di micelle polimeriche vuote e caricate con APF1 e la successiva caratterizzazione delle formulazioni ottenute.

Le micelle sono state valutate in termini di efficienza di incapsulamento, drug loading, dimensioni idrodinamiche, indice di polidispersità e stabilità nel tempo, anche dopo trattamento di sterilizzazione mediante esposizione ai raggi UV. Infine, è stata analizzata l'attività citotossica di APF1 libero e incapsulato su cellule A549, una linea cellulare derivata da carcinoma polmonare non a piccole cellule umano, al fine di verificare se l'incorporazione del composto nel sistema micellare fosse in grado di preservarne l'attività biologica.

Nel complesso, questa tesi si propone di integrare due aspetti complementari: da un lato, la sintesi e l'ottimizzazione di una molecola flavonica ad attività antitumorale; dall'altro, lo sviluppo preliminare di una formulazione micellare

capace di migliorarne la dispersione in ambiente acquoso e di favorirne l'impiego in studi biologici. Tale approccio rappresenta un primo passo verso la valorizzazione di APF1 come composto di interesse per lo sviluppo di strategie terapeutiche innovative nel trattamento del NSCLC.

Capitolo I

IL CARCINOMA POLMONARE: ASPETTI BIOLOGICI, CLINICI E TERAPEUTICI

1.1 Aspetti generali e classificazione istologica

Il carcinoma polmonare è una neoplasia maligna che si sviluppa a partire dalle cellule epiteliali dell'apparato respiratorio ed è caratterizzato da un'elevata eterogeneità sia dal punto di vista istologico sia molecolare. Rappresenta una delle principali cause di mortalità oncologica a livello mondiale e costituisce tuttora una delle maggiori sfide in ambito oncologico, nonostante i progressi ottenuti negli ultimi anni nella diagnosi e nel trattamento [1,2].

Dal punto di vista istologico, il carcinoma polmonare viene classificato principalmente in due categorie: carcinoma polmonare a piccole cellule (*Small Cell Lung Cancer*, SCLC) e carcinoma polmonare non a piccole cellule (*Non-Small Cell Lung Cancer*, NSCLC) [3].

Il SCLC rappresenta circa il 15% dei tumori polmonari ed è caratterizzato da una crescita particolarmente rapida, elevata aggressività biologica e precoce capacità metastatica. È fortemente associato al consumo di tabacco e origina prevalentemente dalle cellule neuroendocrine dell'epitelio bronchiale [3].

Il NSCLC costituisce invece circa l'85% dei casi e comprende principalmente tre sottotipi istologici: adenocarcinoma, carcinoma a cellule squamose e

carcinoma a grandi cellule [3]. L'adenocarcinoma rappresenta la forma più frequente e tende a svilupparsi nelle regioni periferiche del polmone; il carcinoma squamoso è generalmente associato al tabagismo e origina prevalentemente dalle vie aeree centrali, mentre il carcinoma a grandi cellule rappresenta una forma meno comune caratterizzata da elevata eterogeneità morfologica [3].

Negli ultimi anni la classificazione istologica del carcinoma polmonare è stata progressivamente integrata dalla caratterizzazione molecolare della neoplasia, fondamentale per identificare specifiche alterazioni genetiche responsabili della crescita tumorale e per selezionare strategie terapeutiche personalizzate [4].

1.2 Epidemiologia e fattori di rischio

Il carcinoma polmonare rappresenta una delle principali cause di morte per tumore a livello globale. Secondo le stime del progetto GLOBOCAN, nel 2022 sono stati registrati oltre due milioni di nuovi casi e circa 1,8 milioni di decessi correlati alla malattia, rendendo il tumore polmonare la principale causa di mortalità oncologica nel mondo [5].

Anche in Italia il carcinoma polmonare rappresenta una delle neoplasie più rilevanti dal punto di vista epidemiologico. Secondo il rapporto "I numeri del cancro in Italia", nel 2024 sono state stimate circa 44.000 nuove diagnosi, con una maggiore incidenza nel sesso maschile, sebbene negli ultimi anni sia stato osservato un aumento dei casi nella popolazione femminile [6].

Il principale fattore di rischio per lo sviluppo del carcinoma polmonare è rappresentato dal fumo di sigaretta, responsabile della maggior parte dei casi diagnosticati. Il rischio aumenta in relazione al numero di sigarette consumate, alla durata dell'esposizione e all'età di inizio del consumo. Anche il fumo passivo rappresenta un importante fattore di rischio riconosciuto [7].

Oltre al tabagismo, numerosi fattori ambientali e occupazionali contribuiscono allo sviluppo della malattia.

Tra questi assumono particolare rilevanza l'esposizione ad amianto, radon, arsenico, cromo, nichel e altri composti chimici cancerogeni. Tali esposizioni

interessano soprattutto lavoratori impiegati in determinati settori industriali, tra cui edilizia, metallurgia, raffinerie e industria mineraria [8].

L'inquinamento atmosferico rappresenta inoltre un ulteriore fattore di rischio, in particolare per quanto riguarda l'esposizione prolungata al particolato fine (PM_{2.5}), classificato dall'International Agency for Research on Cancer (IARC) come cancerogeno per l'uomo [8].

Sebbene il carcinoma polmonare sia fortemente associato a fattori ambientali, una quota significativa di pazienti, soprattutto tra i non fumatori, presenta alterazioni genetiche responsabili dell'attivazione aberrante di vie di segnalazione coinvolte nella proliferazione cellulare. Queste alterazioni rappresentano oggi importanti bersagli per lo sviluppo di terapie molecolari mirate [4].

1.3 Patogenesi molecolare

Il carcinoma polmonare è caratterizzato da una complessa evoluzione molecolare determinata dall'accumulo progressivo di alterazioni genetiche ed epigenetiche che compromettono i normali meccanismi di regolazione cellulare [9].

Secondo il concetto degli *hallmarks of cancer*, la trasformazione neoplastica deriva dall'acquisizione progressiva di caratteristiche quali capacità proliferativa incontrollata, resistenza all'apoptosi, capacità di indurre angiogenesi, invasività e instabilità genomica [9].

Nel carcinoma polmonare tali caratteristiche sono frequentemente associate ad alterazioni dei geni coinvolti nel controllo del ciclo cellulare, nei meccanismi di riparazione del DNA e nelle vie di segnalazione responsabili della crescita cellulare. Tra i principali geni coinvolti nella patogenesi del NSCLC sono presenti il gene oncosoppressore TP53, frequentemente mutato, e alterazioni di RB1, CDKN2A, KRAS, EGFR, BRAF, oltre a riarrangiamenti cromosomici riguardanti ALK, ROS1 e RET [4,10].

Le mutazioni del recettore del fattore di crescita epidermico (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) rappresentano una delle alterazioni molecolari più rilevanti nel NSCLC, in particolare negli adenocarcinomi polmonari. L'attivazione costitutiva del recettore conseguente a tali mutazioni determina la

stimolazione persistente di vie intracellulari coinvolte nella proliferazione e nella sopravvivenza cellulare, contribuendo alla progressione tumorale [11].

La scoperta di queste alterazioni molecolari ha modificato profondamente l'approccio terapeutico al carcinoma polmonare, permettendo lo sviluppo di farmaci diretti contro specifici bersagli biologici. Tuttavia, la notevole eterogeneità molecolare della malattia rappresenta ancora un importante limite alla possibilità di ottenere risposte terapeutiche efficaci e durature nella totalità dei pazienti [4,10].

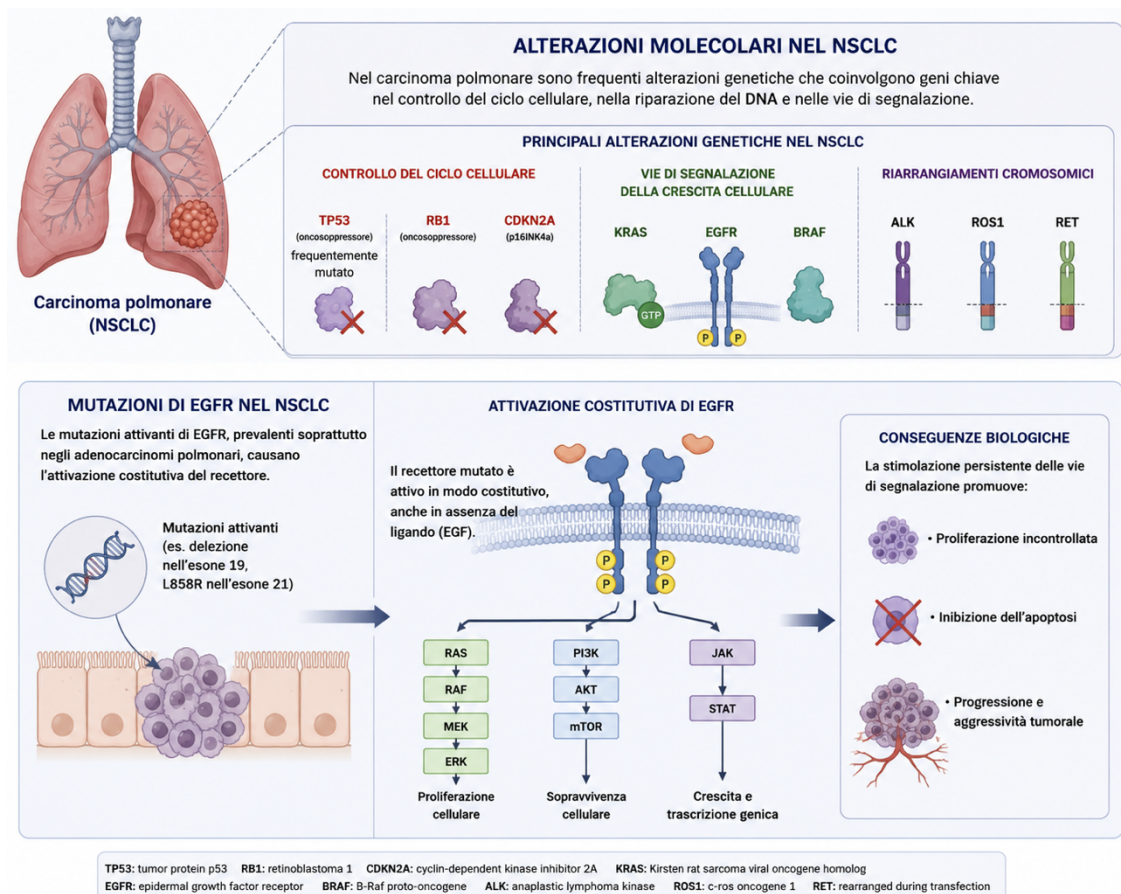


Figura 1. Alterazioni molecolari nel NSCLC

1.4 Diagnosi

Nelle fasi iniziali il carcinoma polmonare è frequentemente asintomatico e, per questo motivo, può essere diagnosticato casualmente durante indagini radiologiche effettuate per altre motivazioni cliniche. Quando presenti, i sintomi sono spesso aspecifici e comprendono tosse persistente, dispnea, dolore toracico, emottisi, raucedine, perdita di peso e astenia [12].

L'iter diagnostico prevede generalmente l'esecuzione di una radiografia del torace come primo esame di approfondimento, seguita da metodiche di imaging più accurate, quali la tomografia computerizzata (TC), utilizzata per definire dimensioni, caratteristiche e localizzazione della lesione, e la tomografia a emissione di positroni (PET), utile nella valutazione dell'estensione della malattia e dell'eventuale presenza di metastasi [12,13].

La diagnosi definitiva richiede tuttavia la conferma istologica mediante biopsia, che permette non solo di identificare il sottotipo tumorale, ma anche di effettuare analisi molecolari necessarie per la selezione del trattamento più appropriato [13].

Negli ultimi anni, la caratterizzazione molecolare del tumore è diventata una componente fondamentale della gestione clinica del NSCLC. L'identificazione delle specifiche alterazioni genetiche, quali mutazioni di EGFR, KRAS, BRAF

o riarrangiamenti di ALK, ROS1 e RET, consente infatti di individuare pazienti candidabili a trattamenti farmacologici mirati [14].

Lo sviluppo della medicina di precisione ha quindi modificato il paradigma terapeutico del carcinoma polmonare, passando da un approccio basato prevalentemente sulle caratteristiche istologiche della neoplasia a strategie fondate anche sul profilo molecolare individuale del tumore [14].

1.5 Terapie attuali

L'approccio terapeutico al carcinoma polmonare dipende principalmente dallo stadio della malattia, dal sottotipo istologico, dalle condizioni generali del paziente e dalle caratteristiche molecolari del tumore. La definizione di un trattamento personalizzato richiede pertanto una valutazione multidisciplinare che integri aspetti clinici, patologici e molecolari [13,15].

Nei pazienti con malattia localizzata, la chirurgia rappresenta il trattamento potenzialmente curativo di riferimento. L'intervento chirurgico può essere associato a trattamenti sistemici o radioterapici in fase neoadiuvante, con l'obiettivo di ridurre la massa tumorale prima dell'intervento, oppure in fase adiuvante, al fine di eliminare eventuali cellule tumorali residue e ridurre il rischio di recidiva [15].

Nei pazienti con malattia localmente avanzata o metastatica, la terapia sistemica rappresenta il principale approccio terapeutico. La chemioterapia citotossica, basata principalmente sull'impiego di combinazioni contenenti derivati del platino, ha rappresentato per molti anni il trattamento standard del NSCLC avanzato [16]. Tuttavia, la sua efficacia è limitata dalla comparsa di resistenze e dalla tossicità associata alla scarsa selettività nei confronti delle cellule tumorali.

Negli ultimi anni, l'introduzione dell'immunoterapia ha profondamente modificato il trattamento del carcinoma polmonare avanzato. Gli anticorpi monoclonali diretti contro i checkpoint immunitari, quali PD-1 e PD-L1, sono infatti in grado di riattivare la risposta immunitaria antitumorale e hanno dimostrato un significativo beneficio clinico in specifici gruppi di pazienti [17].

Parallelamente, la caratterizzazione molecolare del NSCLC ha permesso lo sviluppo delle terapie a bersaglio molecolare, rivolte contro specifiche alterazioni genetiche responsabili della crescita tumorale. Tra i principali bersagli terapeutici rientra il recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR), appartenente alla famiglia dei recettori tirosin-chinasici ErbB.

Le mutazioni attivanti di EGFR, presenti soprattutto negli adenocarcinomi polmonari, determinano un'attivazione costitutiva del segnale proliferativo intracellulare attraverso vie quali MAPK e PI3K/AKT. Tale caratteristica ha permesso lo sviluppo di inibitori tirosin-chinasici (Tyrosine Kinase Inhibitors, TKI), tra cui gefitinib, erlotinib e osimertinib, che hanno migliorato significativamente la prognosi dei pazienti con tumori EGFR-mutati [11,18].

Oltre a EGFR, numerosi altri bersagli molecolari sono stati identificati nel NSCLC, tra cui ALK, ROS1, RET, MET, BRAF e KRAS, consentendo lo sviluppo di trattamenti sempre più personalizzati [14].

1.6. Limiti delle terapie attuali e razionale del lavoro

Nonostante i notevoli progressi ottenuti negli ultimi anni, il trattamento del carcinoma polmonare presenta ancora numerose limitazioni. La chirurgia è applicabile esclusivamente ai pazienti con malattia localizzata, mentre nei pazienti con tumore avanzato la terapia sistemica rimane spesso associata a una risposta incompleta e alla progressione della malattia [15].

La chemioterapia convenzionale, pur mantenendo un ruolo importante nella pratica clinica, presenta una limitata selettività nei confronti delle cellule tumorali, determinando frequentemente effetti tossici a carico dei tessuti sani caratterizzati da elevata proliferazione cellulare [16].

Anche le terapie a bersaglio molecolare, sebbene abbiano rappresentato una svolta nel trattamento del NSCLC, presentano importanti criticità. Innanzitutto, la loro efficacia è limitata ai pazienti portatori della specifica alterazione molecolare bersaglio. Inoltre, nonostante le elevate percentuali di risposta iniziale, la maggior parte dei pazienti sviluppa nel tempo fenomeni di resistenza acquisita che determinano la progressione della malattia [19]. Nel caso degli inibitori di EGFR, ad esempio, la resistenza può essere determinata dall'insorgenza di nuove alterazioni genetiche, come la mutazione T790M, responsabile della perdita di efficacia degli inibitori di prima e seconda

generazione, oppure dalla comparsa di ulteriori meccanismi di adattamento cellulare, tra cui l'attivazione di vie di segnalazione alternative [19,20].

Un ulteriore limite è rappresentato dalla marcata eterogeneità biologica del carcinoma polmonare: differenti popolazioni cellulari presenti nello stesso tumore possono infatti possedere caratteristiche molecolari diverse e rispondere in maniera differente al trattamento farmacologico [21].

Alla luce di queste problematiche, l'identificazione di nuove molecole antitumorali caratterizzate da meccanismi d'azione innovativi rappresenta ancora oggi un obiettivo prioritario della ricerca farmacologica. In tale contesto, gli approcci di drug discovery basati su metodiche computazionali, quali lo screening virtuale, rappresentano strumenti sempre più utilizzati per l'identificazione di nuovi candidati farmacologici [22].

Un ultimo aspetto rilevante nell'ambito dello sviluppo di nuovi agenti antitumorali riguarda la possibilità di migliorarne le proprietà farmacologiche mediante approcci di drug delivery. L'efficacia clinica di molte molecole bioattive è infatti spesso limitata da problematiche quali scarsa solubilità, ridotta biodisponibilità e limitata selettività nei confronti delle cellule tumorali. Per superare tali limitazioni, negli ultimi anni è cresciuto notevolmente l'interesse verso lo sviluppo di sistemi nanostrutturati in grado di ottimizzare il

profilo farmacocinetico dei farmaci e di aumentarne l'accumulo selettivo nel tessuto tumorale.

Capitolo II

DERIVATI AMINOFENOSSIFLAVONICI E IDENTIFICAZIONE DI APF-1

2.1 Razionale dello sviluppo di derivati flavonici nel NSCLC

Il trattamento del carcinoma polmonare non a piccole cellule (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC) rappresenta ancora oggi una sfida rilevante in ambito oncologico. Nonostante i progressi ottenuti con la chemioterapia, l'immunoterapia e le terapie a bersaglio molecolare, l'efficacia dei trattamenti disponibili può essere limitata da fenomeni di resistenza farmacologica, tossicità sistemica e scarsa selettività nei confronti delle cellule tumorali. Per tale motivo, l'identificazione di nuove molecole antitumorali caratterizzate da elevata efficacia e da un favorevole profilo di selettività rappresenta un obiettivo prioritario della ricerca in chimica farmaceutica.

Un parametro comunemente utilizzato negli studi preliminari di attività citotossica per stimare la selettività di un composto è il Selectivity Index (SI). In ambito antitumorale, tale indice viene generalmente calcolato come rapporto tra la concentrazione inibente il 50% della vitalità cellulare in una linea non tumorale e la corrispondente IC_{50} determinata in una linea tumorale:

$$SI = IC_{50} \text{ cellule non tumorali} / IC_{50} \text{ cellule tumorali.}$$

Un valore elevato di SI indica che il composto esercita un effetto citotossico maggiore sulle cellule tumorali rispetto alle cellule non tumorali, suggerendo quindi una migliore finestra di selettività. Al contrario, valori di SI inferiori o prossimi a 1 indicano una citotossicità non selettiva, poiché la concentrazione efficace sulle cellule tumorali è simile o superiore a quella tossica per le cellule sane. In letteratura non esiste una soglia univoca universalmente accettata [23, 24, 25, 26]

Alcuni studi considerano già valori superiori a 1 come indicativi di una preferenziale attività verso cellule tumorali, mentre valori superiori a 2 o 3 sono spesso interpretati come indice di una selettività più marcata. Valori molto elevati, ad esempio superiori a 10, possono quindi essere considerati particolarmente promettenti nelle fasi iniziali di screening, pur richiedendo ulteriori conferme mediante studi meccanicistici e modelli biologici più complessi.

Tra gli scaffold molecolari di maggiore interesse per lo sviluppo di nuovi agenti antitumorali rientra il nucleo flavonico. I flavoni sono composti eterociclici caratterizzati da una struttura planare costituita da due anelli aromatici, indicati come A e B, collegati attraverso un anello eterociclico centrale C. Tale impalcatura rappresenta una piattaforma chimica versatile, facilmente

modificabile mediante l'introduzione di diversi sostituenti, e per questo motivo è ampiamente utilizzata nella progettazione di molecole ad attività biologica.

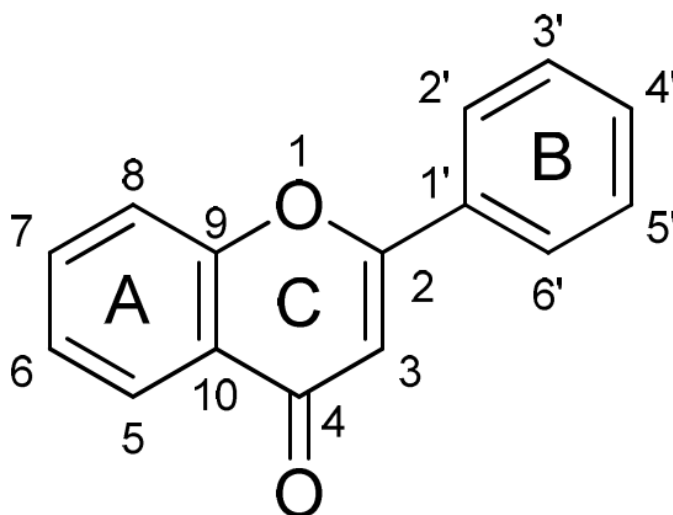


Figura 2. Struttura generale del nucleo flavonico

Le molecole con nucleo flavonico sono state studiate per le loro numerose proprietà farmacologiche, incluse attività antiossidanti, antinfiammatorie [27, 28, 29, 30] e antiproliferative. In ambito oncologico, diversi derivati flavonici hanno mostrato la capacità di interferire con processi cellulari fondamentali, quali proliferazione, apoptosi, progressione del ciclo cellulare e trasduzione del segnale[31,32,33].

In particolare, i flavoni ammino-funzionalizzati rappresentano una classe di composti di interesse per la possibile attività selettiva nei confronti di alcune linee tumorali [34, 35, 36].

La molecola studiata in questa tesi è il 6-(4-amminofenossi)-2-(3-fenossifenil)-4H-cromen-4-one, denominata APF-1 e deriva da una linea di ricerca sviluppata dal gruppo presso cui è stato svolto il presente lavoro. Tale linea di ricerca ha avuto origine da uno studio finalizzato all'identificazione di nuovi scaffold flavonici potenzialmente in grado di interagire con il dominio tirosin-chinasico di EGFR, un recettore di rilevante interesse biologico. È stata individuata *in silico* una serie di composti a struttura flavonica, progettati come potenziali inibitori tirosin-chinasici selettivi verso forme mutate di EGFR associate a resistenza terapeutica, quali T790M e C797S [37].

Nell'ambito di questa serie, APF1 ha mostrato un interessante profilo biologico in termini di attività citotossica nei confronti di cellule di NSCLC, pur non presentando un'inibizione di EGFR sufficientemente marcata da giustificare da sola l'effetto osservato sulle cellule tumorali.

Questa evidenza ha suggerito che l'attività biologica di APF-1 potesse non essere principalmente riconducibile all'inibizione diretta del dominio tirosin-chinasico di EGFR, ma potesse dipendere da meccanismi cellulari differenti o aggiuntivi. Di conseguenza, APF-1 è stato considerato non tanto come un classico inibitore di EGFR, quanto piuttosto come un derivato flavonico dotato di un interessante profilo citotossico, meritevole di ulteriori approfondimenti strutturali e biologici.

2.2 Sviluppo della serie 4'-amminofenossi-flavonica

Sulla base dei risultati ottenuti nello studio precedente, APF-1 è stato selezionato come struttura di riferimento per lo sviluppo di una nuova serie di derivati flavonici ammino-funzionalizzati [38]. La progettazione della serie ha preso in considerazione due elementi strutturali principali: la posizione del gruppo 4'-amminofenossi sull'anello A del nucleo flavonico e la presenza o assenza di una porzione fenossi sull'anello B.

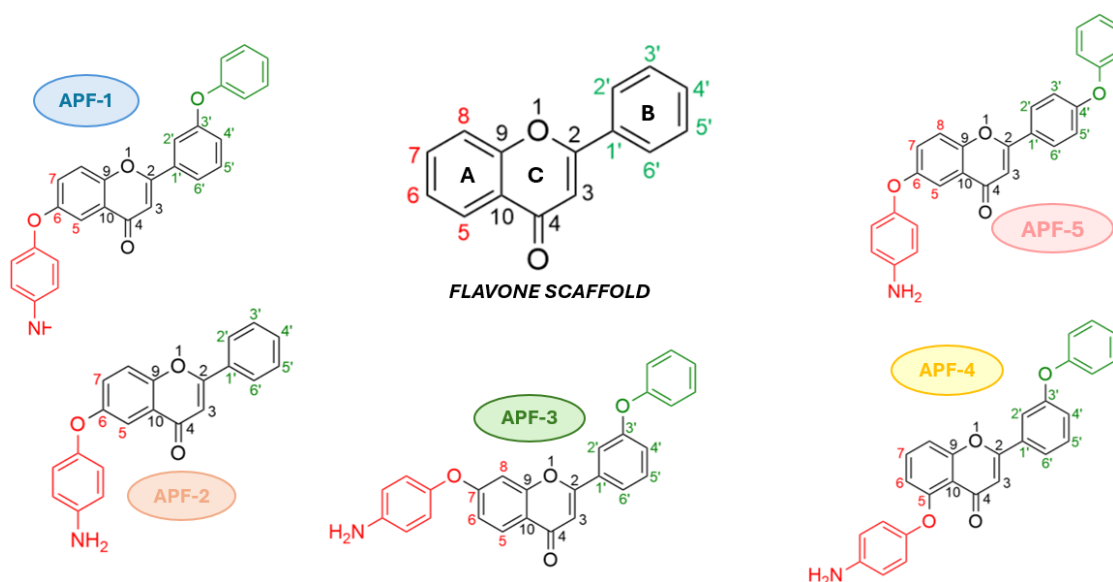


Figura 3. Struttura dello scaffold flavonico e derivati aminoflavonici sintetizzati

Questo approccio ha consentito di ottenere informazioni preliminari sulle relazioni struttura-attività della classe, evidenziando come specifiche modifiche dello scaffold possano influenzare in modo significativo la citotossicità e la selettività dei composti.

Tra i composti sintetizzati, APF-1 è emerso come il derivato più promettente, mostrando un marcato effetto citotossico e un favorevole profilo di selettività nei confronti delle cellule tumorali. Gli studi condotti sulle linee cellulari di NSCLC A549 e H1975 hanno evidenziato un'attività antiproliferativa già a basse concentrazioni micromolari, con valori di IC_{50} compresi tra 2 e 4 μM . Inoltre, il composto ha mostrato un indice di selettività superiore a 10, calcolato come rapporto tra la IC_{50} determinata nei fibroblasti dermici umani (HDF) e quella ottenuta nelle linee cellulari tumorali. L'efficacia di APF-1 è stata confermata anche in altri modelli tumorali, quali MCF-7 di carcinoma mammario e HepG2 di carcinoma epatico, nei quali il composto ha mantenuto un'attività significativa a basse concentrazioni micromolari. In queste linee cellulari, i valori di IC_{50} e gli indici di selettività sono risultati comparabili a quelli della doxorubicina, utilizzata come farmaco antitumorale di riferimento, come riportato nella Tabella 1.

Cmpd	MCF7 (breast cancer)		HepG (hepato cellular carcinoma)		A549 (NSCLC, high-expressing wt EGFR)		H1975 (NSCLC, EGFR L858R/T790M)		HDF (human dermal fibroblasts)
APF-1	2.1 $\pm$ 3	SI= 29.5	4.6 $\pm$ 1	SI= 13.5	4.2 $\pm$ 0.4	SI= 14.8	2.3 $\pm$ 0.2	SI= 27	62 $\pm$ 6
APF-2	42 $\pm$ 5		15.8 $\pm$ 1		22 $\pm$ 3		50 $\pm$ 5		>160
APF-3	61 $\pm$ 3		10 $\pm$ 2		33 $\pm$ 2		40 $\pm$ 4		80 $\pm$ 3
APF-4	>160		44 $\pm$ 6		32 $\pm$ 5		>160		>160
APF-5	21 $\pm$ 3		>160		7 $\pm$ 3		10 $\pm$ 5		55 $\pm$ 2
Doxorubicin	1.5 $\pm$ 0.2	SI= 9.3	0.8 $\pm$ 0.3	SI= 17.5	0.8 $\pm$ 0.2	SI= 17.5	2.5 $\pm$ 0.4	SI= 5.6	14 $\pm$ 4

Tabella 1. Profilo di tossicità dei derivati APF in cellule tumorali (MCF-7, HepG2, A549, H1975) e non tumorali (HDF): valori di IC_{50} (μM) e indici di selettività, in comparazione con la doxorubicina.

Tali risultati suggeriscono che la combinazione tra il gruppo 4'-amminofenossi in posizione 6 dell'anello A e la porzione fenossi in posizione 3' dell'anello B rappresenti un elemento strutturale rilevante per l'attività biologica osservata.

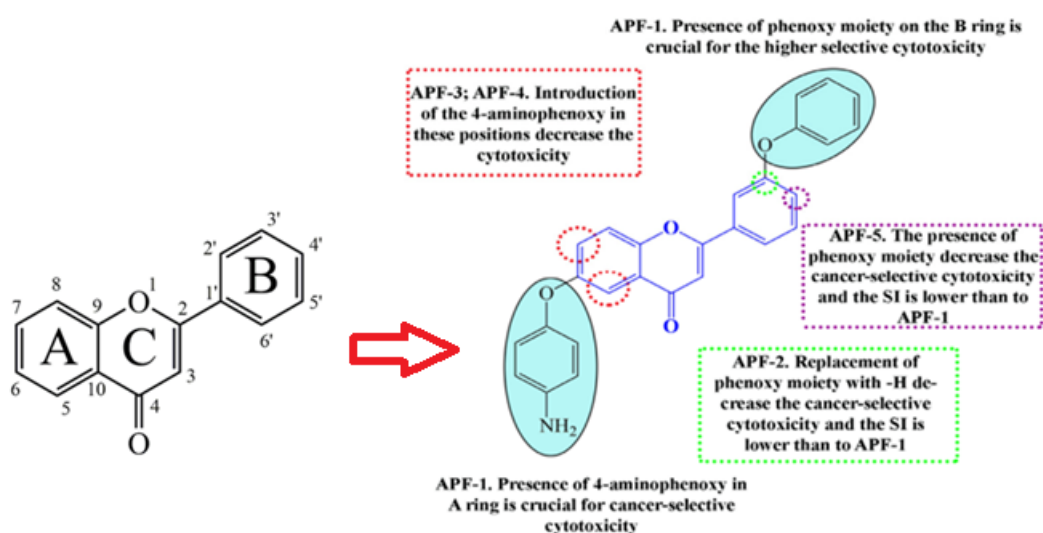


Figura 4. Struttura generale dello scaffold flavonico e struttura chimica di APF-1.

2.3 Effetti di APF1 su apoptosi, ciclo cellulare e p21

Dopo l'identificazione di APF1 come derivato più promettente della serie, sono stati condotti ulteriori studi volti ad approfondirne gli effetti cellulari nelle linee NSCLC A549 e H1975 e nei fibroblasti non tumorali HDF. In particolare, è stata valutata la capacità della molecola di indurre apoptosi e di interferire con la progressione del ciclo cellulare.

I risultati hanno evidenziato che APF1 induce un aumento dell'apoptosi nelle cellule tumorali, con un effetto più marcato alle concentrazioni più elevate e associato a una riduzione della popolazione cellulare vitale. Tale effetto è risultato particolarmente evidente nelle cellule H1975 e A549, mentre nei fibroblasti HDF la vitalità cellulare è rimasta elevata e l'induzione di apoptosi è risultata meno significativa. Questo comportamento conferma la maggiore sensibilità delle cellule tumorali rispetto alle cellule non maligne e supporta il profilo selettivo della molecola.

L'analisi del ciclo cellulare ha inoltre mostrato che APF1 altera la distribuzione delle cellule NSCLC nelle diverse fasi del ciclo, inducendo un accumulo prevalente in fase G2/M, accompagnato da una riduzione delle popolazioni in G0/G1 e S. Tale effetto è stato osservato sia nelle cellule H1975 sia nelle cellule A549, mentre nelle cellule HDF non sono state rilevate modificazioni rilevanti della progressione del ciclo cellulare.

Infine, l'aumento dell'espressione della proteina p21^{WAF1/CIP1} osservato dopo trattamento con APF1 nelle cellule tumorali risulta coerente con l'arresto del ciclo cellulare in fase G2/M. Nel complesso, questi dati suggeriscono che l'attività antiproliferativa di APF1 sia associata all'induzione di apoptosi e al blocco della progressione del ciclo cellulare, almeno in parte mediato dall'aumento dell'espressione di p21.

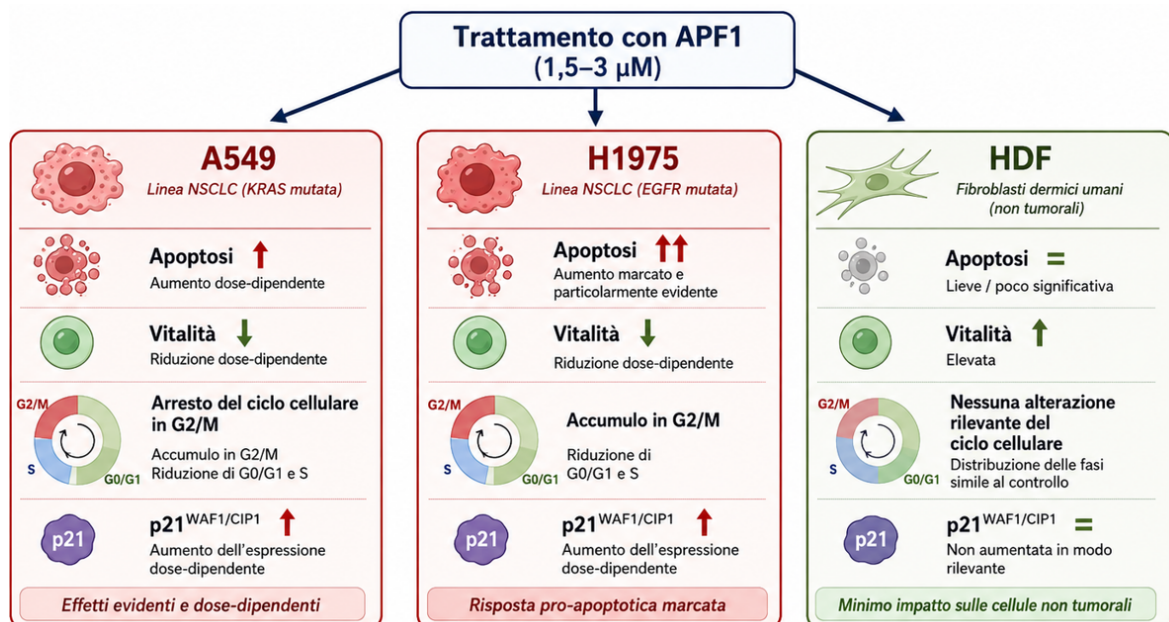


Figura 5. Effetti cellulari di APF1 nelle cellule NSCLC

2.4 Considerazioni sul meccanismo d'azione

Sebbene APF1 derivi da un percorso di progettazione razionale originariamente orientato all'identificazione di potenziali inibitori tirosin-chinasici di EGFR, i risultati sperimentali disponibili indicano che l'attività antiproliferativa osservata nelle cellule di NSCLC non sembra essere principalmente attribuibile all'inibizione diretta di tale recettore. Questo dato suggerisce il possibile coinvolgimento di meccanismi molecolari alternativi, la cui identificazione rappresenta un aspetto di particolare interesse per la comprensione del profilo biologico della molecola.

La capacità di APF1 di risultare attiva sia in cellule NSCLC caratterizzate da mutazioni di EGFR sia in cellule prive di tali alterazioni supporta l'ipotesi che la sua attività possa dipendere da pathway cellulari differenti o più ampi rispetto alla sola inibizione di EGFR. Inoltre, l'induzione di apoptosi, l'arresto del ciclo cellulare in G2/M e l'aumento dell'espressione di p21 indicano che la molecola è in grado di interferire con processi cellulari fondamentali per la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule tumorali.

Studi preliminari attualmente in corso suggeriscono il possibile coinvolgimento di ulteriori pathway molecolari nella risposta cellulare ad APF1. Tuttavia, tali dati non vengono discussi nel presente elaborato in quanto oggetto di approfondimenti ancora in corso e di tutela della proprietà intellettuale.

L'identificazione definitiva del meccanismo d'azione di APF1 rappresenta pertanto un obiettivo rilevante per gli sviluppi futuri di questa linea di ricerca. La comprensione dei bersagli molecolari coinvolti potrà infatti contribuire a definire meglio il potenziale terapeutico del composto, a individuare eventuali biomarcatori di sensibilità e a guidare la progettazione di nuovi analoghi strutturalmente ottimizzati.

2.5 Razionale della nanoformulazione di APF1

Oltre alla caratterizzazione chimica e biologica, un aspetto fondamentale nello sviluppo di una nuova molecola antitumorale riguarda la possibilità di migliorarne le proprietà biofarmaceutiche. Molti composti flavonici e flavonoidici, pur mostrando interessanti attività biologiche in vitro, presentano infatti limitazioni legate alla scarsa solubilità in ambiente acquoso, alla ridotta biodisponibilità e alla possibile difficoltà di raggiungere concentrazioni efficaci nel sito tumorale.

APF1 presenta una struttura aromatica estesa e una lipofilia significativa, come indicato dal valore sperimentale di LogP pari a circa 3,2. Tali caratteristiche possono favorire l'interazione con membrane biologiche, ma possono anche rappresentare un limite dal punto di vista formulativo, in particolare per quanto riguarda la dispersione in mezzi acquosi e la somministrazione in sistemi biologici complessi.

In questo contesto, lo sviluppo di una nanoformulazione rappresenta una strategia razionale per migliorare il profilo tecnologico e potenzialmente farmacologico della molecola. I sistemi nanostrutturati, in particolare le nanoparticelle polimeriche e le micelle polimeriche, possono infatti aumentare la dispersibilità di composti idrofobici, proteggerli dalla degradazione, modularne il rilascio e favorirne l'accumulo nel tessuto tumorale.

La formulazione di APF1 in un nanosistema polimerico potrebbe quindi contribuire a superare alcune delle limitazioni associate alla somministrazione della molecola libera, migliorandone la stabilità e il comportamento in ambiente biologico. Inoltre, l'impiego di polimeri anfifilici permette di ottenere sistemi capaci di incorporare composti lipofili all'interno di un core idrofobico, mantenendo al tempo stesso una superficie idrofila compatibile con la dispersione in ambiente acquoso.

Per tali ragioni, il presente lavoro di tesi comprende, oltre alla sintesi e alla caratterizzazione di APF1, anche studi preliminari di nanoformulazione mediante sistemi polimerici. Tale approccio si inserisce nel più ampio ambito della nanomedicina oncologica e mira a valutare la possibilità di sviluppare una piattaforma di delivery in grado di migliorare le potenzialità applicative di APF1 nel trattamento del NSCLC.

Capitolo III

NANOMEDICINA E STRATEGIE DI DRUG DELIVERY PER IL TRATTAMENTO DEI TUMORI

3.1 Nanomedicina e drug delivery antitumorale

La nanomedicina rappresenta un settore interdisciplinare che integra i principi della nanotecnologia con le scienze biomediche al fine di sviluppare nuove strategie per la diagnosi, la prevenzione e il trattamento delle patologie. Tra le sue principali applicazioni rientra la progettazione di sistemi nanostrutturati per il drug delivery, capaci di migliorare l'efficacia terapeutica dei farmaci convenzionali, ottimizzandone la biodistribuzione e riducendone la tossicità sistemica [41, 40].

In ambito oncologico, la chemioterapia convenzionale è spesso limitata dalla scarsa selettività nei confronti delle cellule tumorali. Dopo la somministrazione sistemica, infatti, i farmaci antineoplastici si distribuiscono in maniera non specifica nei diversi distretti dell'organismo, determinando l'esposizione anche dei tessuti sani e causando numerosi effetti avversi dose-dipendenti. Inoltre, molte molecole ad attività antitumorale presentano una limitata solubilità in ambiente acquoso, una ridotta stabilità metabolica e una rapida eliminazione dall'organismo, fattori che ne compromettono l'efficacia terapeutica [39]

Per superare tali limitazioni sono stati sviluppati sistemi di drug delivery su scala nanometrica, progettati per trasportare il principio attivo fino al sito patologico, proteggerlo dalla degradazione e rilasciarlo in maniera controllata. I nanosistemi comprendono strutture con dimensioni generalmente comprese tra 1 e 100 nm; tuttavia, in ambito farmaceutico il termine viene comunemente esteso anche a particelle con dimensioni inferiori a circa 1000 nm, purché mantengano le proprietà tipiche dei materiali nanostrutturati [40].

Le ridotte dimensioni e l'elevato rapporto superficie/volume conferiscono ai nanosistemi proprietà peculiari che consentono di modificare favorevolmente il comportamento farmacocinetico dei principi attivi. In particolare, l'incapsulamento del farmaco all'interno di nanocarrier permette di migliorarne la solubilità, proteggerlo dalla degradazione enzimatica, prolungarne l'emivita plasmatica e favorirne l'accumulo nel tessuto tumorale. Parallelamente, la possibilità di modulare la composizione, le dimensioni e le proprietà superficiali delle nanoparticelle consente di progettare sistemi di rilascio controllato, in grado di aumentare la concentrazione del farmaco nel sito bersaglio riducendone l'esposizione ai tessuti sani [42].

Un ulteriore vantaggio dei nanosistemi è rappresentato dalla loro capacità di interagire con cellule e compartimenti intracellulari. Le nanoparticelle possono infatti essere internalizzate mediante differenti meccanismi di endocitosi,

favorendo il trasporto intracellulare del principio attivo e aumentando la concentrazione del farmaco all'interno delle cellule neoplastiche. Tali caratteristiche rendono la nanomedicina una delle strategie più promettenti per il trattamento dei tumori solidi, compreso il carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC), nel quale il miglioramento della selettività terapeutica rappresenta ancora oggi una delle principali sfide cliniche [39, 42].

Tra i numerosi sistemi nanostrutturati sviluppati negli ultimi decenni, le nanoparticelle polimeriche hanno assunto un ruolo di particolare interesse grazie alla loro elevata biocompatibilità, alla possibilità di modulare il rilascio del farmaco e alla capacità di veicolare efficacemente molecole scarsamente solubili. Queste caratteristiche le rendono piattaforme estremamente versatili per la formulazione di nuovi agenti antitumorali e per il miglioramento delle loro proprietà farmacologiche.

3.2 Effetto EPR e targeting tumorale

Lo sviluppo di sistemi nanostrutturati per il drug delivery antitumorale si basa sulla possibilità di sfruttare le peculiari caratteristiche fisiopatologiche del microambiente tumorale. A differenza dei tessuti sani, infatti, i tumori solidi presentano una vascolarizzazione altamente disorganizzata, generata da un'intensa attività angiogenica necessaria a sostenere la rapida proliferazione cellulare. I vasi neoformati sono caratterizzati da un'architettura irregolare, con ampie fenestrazioni endoteliali, membrane basali discontinue e una ridotta copertura da parte dei periciti, determinando un'elevata permeabilità vascolare [43, 44].

Contemporaneamente, il sistema linfatico intratumorale risulta scarsamente sviluppato o funzionalmente inefficiente, compromettendo la rimozione di macromolecole e nanoparticelle dal tessuto neoplastico. La combinazione tra aumentata permeabilità vascolare e ridotto drenaggio linfatico determina il cosiddetto Enhanced Permeability and Retention (EPR) effect, un fenomeno fisiopatologico che favorisce l'accumulo passivo di macromolecole e sistemi nanostrutturati nel sito tumorale [43].

L'effetto EPR rappresenta uno dei principali meccanismi attraverso cui le nanoparticelle possono aumentare la concentrazione locale del farmaco all'interno del tumore. Dopo la somministrazione sistemica, infatti, i

nanocarrier sono in grado di extravasare attraverso le fenestrazioni della vascolarizzazione tumorale e di permanere nel tessuto neoplastico grazie all'inefficiente drenaggio linfatico. Tale accumulo determina un aumento della concentrazione del principio attivo nel sito patologico, contribuendo a migliorare l'efficacia terapeutica e a ridurre l'esposizione dei tessuti sani agli agenti citotossici [39, 45].

L'entità dell'accumulo tumorale dipende strettamente dalle caratteristiche fisico-chimiche del nanosistema. Tra queste, le dimensioni rappresentano uno dei parametri più rilevanti. Nanoparticelle con diametro compreso tra circa 50 e 200 nm mostrano generalmente il miglior compromesso tra tempo di permanenza in circolo, capacità di extravasazione e ridotta eliminazione attraverso la filtrazione renale o la captazione da parte del sistema fagocitario mononucleato. Anche la carica superficiale, la morfologia e il rivestimento superficiale influenzano significativamente il comportamento biologico delle nanoparticelle, determinandone la biodistribuzione e l'interazione con le proteine plasmatiche [46].

Nonostante il ruolo fondamentale dell'effetto EPR nello sviluppo della nanomedicina oncologica, studi recenti hanno evidenziato come questo fenomeno sia caratterizzato da un'elevata variabilità tra differenti tipi di tumore e persino tra pazienti affetti dalla stessa neoplasia. L'eterogeneità della

vascolarizzazione tumorale, l'elevata pressione interstiziale e la presenza di una matrice extracellulare particolarmente densa possono infatti limitare la penetrazione delle nanoparticelle all'interno del tumore, riducendone l'efficacia terapeutica [45, 44].

Per tale motivo, la moderna progettazione dei nanosistemi non si limita più a sfruttare esclusivamente il targeting passivo mediato dall'effetto EPR, ma integra anche strategie di targeting attivo, ottenute mediante la funzionalizzazione della superficie delle nanoparticelle con ligandi, anticorpi o peptidi capaci di riconoscere selettivamente recettori sovraespressi dalle cellule tumorali. L'associazione tra targeting passivo e targeting attivo rappresenta oggi una delle strategie più promettenti per incrementare la selettività delle terapie antitumorali e migliorare l'efficacia clinica dei sistemi di drug delivery nanostrutturati.

Tra i diversi nanocarrier sviluppati a questo scopo, le nanoparticelle polimeriche hanno suscitato un particolare interesse grazie alla possibilità di modulare con precisione dimensioni, proprietà superficiali e cinetica di rilascio del farmaco, caratteristiche che le rendono sistemi estremamente versatili per la veicolazione di molecole antitumorali.

Effetto EPR e targeting tumorale

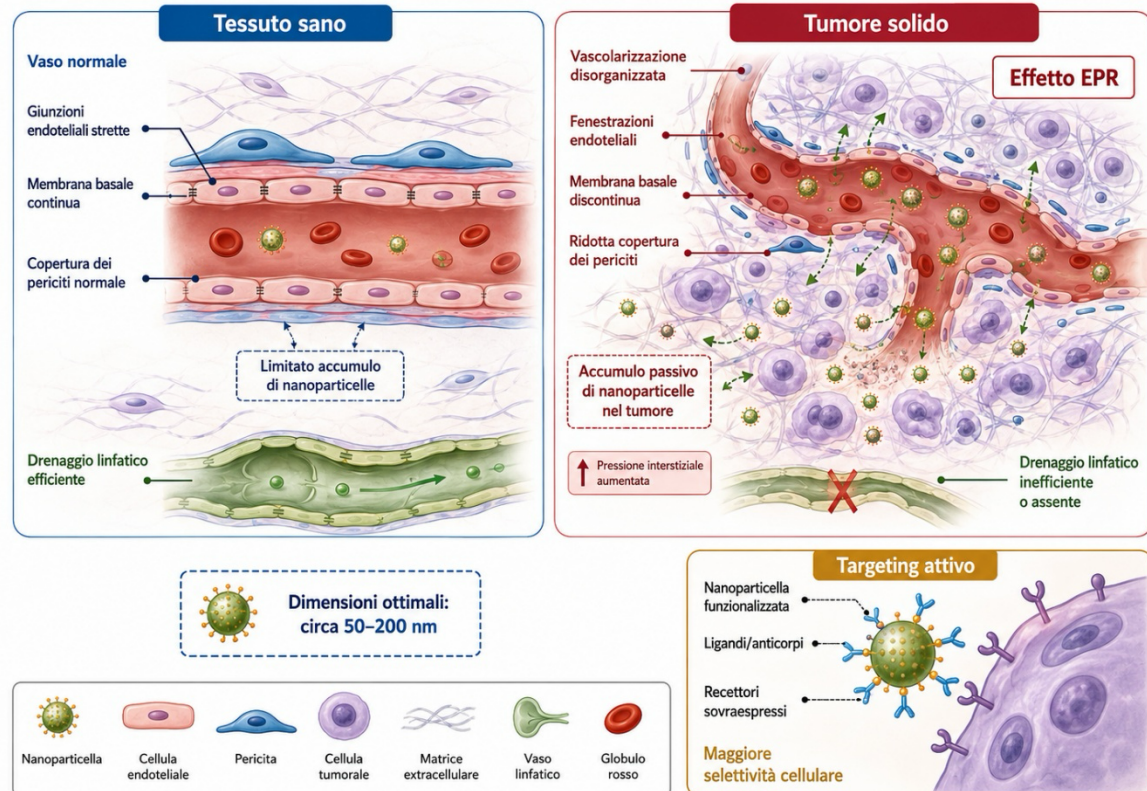


Figura 6. Rappresentazione schematica dell'effetto EPR nel microambiente tumorale

3.3 Nanoparticelle polimeriche

Tra i diversi nanosistemi sviluppati per il *drug delivery* antitumorale, le nanoparticelle polimeriche rappresentano una delle piattaforme più promettenti grazie alla loro versatilità, biocompatibilità e capacità di modulare il rilascio dei principi attivi. L'impiego di materiali polimerici biodegradabili consente infatti di progettare sistemi in grado di migliorare la stabilità dei farmaci, aumentarne la biodisponibilità e favorirne l'accumulo nel tessuto tumorale, riducendo al contempo gli effetti collaterali associati alle formulazioni convenzionali [46, 47].

Le nanoparticelle polimeriche sono generalmente definite come sistemi colloidali con dimensioni comprese tra circa 10 e 1000 nm; tuttavia, le formulazioni destinate alla somministrazione sistemica presentano nella maggior parte dei casi dimensioni inferiori a 200 nm, considerate più favorevoli per prolungare il tempo di permanenza in circolo e favorire l'accumulo passivo nel tessuto tumorale mediante l'effetto EPR (*Enhanced Permeability and Retention*) [39, 46].

Dal punto di vista strutturale, questi nanosistemi possono essere distinti in nanosfere e nanocapsule. Nelle nanosfere il principio attivo risulta disperso o adsorbito all'interno della matrice polimerica, mentre nelle nanocapsule è confinato in un nucleo centrale circondato da un involucro polimerico, che

agisce da barriera diffusiva e consente un controllo più accurato della cinetica di rilascio [47].

La scelta del materiale polimerico rappresenta un aspetto fondamentale nella progettazione della formulazione, poiché influenza stabilità colloidale, biodegradabilità, capacità di incapsulamento e profilo di rilascio del farmaco. I polimeri più utilizzati comprendono sia materiali naturali, come chitosano, alginato e gelatina, sia polimeri sintetici biodegradabili, tra cui acido polilattico (PLA), poli (acido lattico-co-glicolico) (PLGA), policaprolattone (PCL) e polietilenglicole (PEG). Questi ultimi sono ampiamente impiegati per la loro biocompatibilità, degradabilità controllata e possibilità di modulazione delle proprietà chimico-fisiche attraverso opportune strategie di sintesi [48].

Le caratteristiche strutturali delle nanoparticelle, quali dimensione, composizione, carica superficiale e idrofobicità, influenzano l'interazione con le proteine plasmatiche, la biodistribuzione e i meccanismi di internalizzazione cellulare. Inoltre, la funzionalizzazione della superficie con molecole biologicamente attive, come anticorpi, peptidi o ligandi specifici, permette di sviluppare sistemi di targeting attivo in grado di riconoscere recettori sovraespressi dalle cellule tumorali, incrementando la selettività del trattamento [49].

Il principio attivo può essere incorporato nelle nanoparticelle mediante diverse strategie, tra cui incapsulamento, adsorbimento superficiale o legame covalente. La modalità di incorporazione condiziona direttamente il profilo di rilascio, che può avvenire attraverso diffusione, erosione della matrice o degradazione idrolitica del polimero. Questa versatilità consente di ottenere formulazioni a rilascio graduale e prolungato, migliorando l'efficacia terapeutica e limitando le fluttuazioni delle concentrazioni plasmatiche del farmaco [48].

Grazie a tali proprietà, le nanoparticelle polimeriche trovano numerose applicazioni in ambito oncologico, in particolare per la veicolazione di molecole caratterizzate da elevata idrofobicità, scarsa stabilità in ambiente fisiologico o ridotta biodisponibilità.

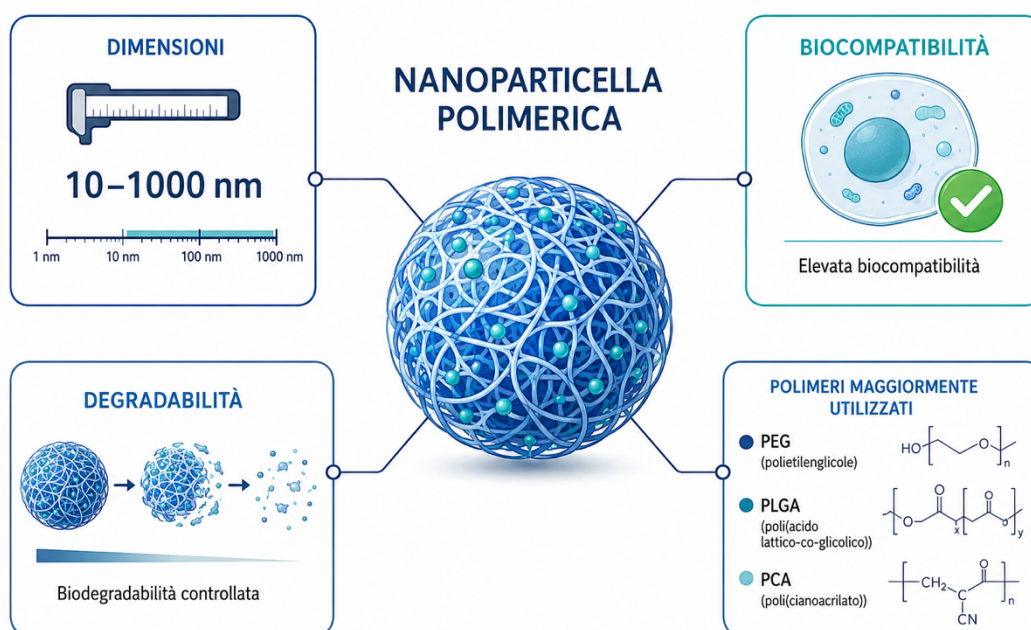


Figura 7. Caratteristiche principali di una nanoparticella polimerica

3.4 Micelle polimeriche

Nell'ambito dei sistemi polimerici per il *drug delivery*, le micelle polimeriche occupano un ruolo di particolare interesse per la veicolazione di farmaci scarsamente solubili in acqua. Questi nanosistemi sono in grado di aumentare la solubilità apparente di molecole idrofobiche, proteggerle in ambiente fisiologico e prolungarne il tempo di permanenza in circolo, caratteristiche particolarmente vantaggiose nel trattamento delle patologie oncologiche [50, 53].

Le micelle polimeriche si formano mediante l'autoassemblaggio spontaneo di copolimeri anfifilici in ambiente acquoso. Quando la concentrazione del copolimero supera un valore soglia, definito concentrazione micellare critica (*Critical Micelle Concentration*, CMC), le porzioni idrofobiche tendono ad aggregarsi per ridurre il contatto con l'acqua, mentre le catene idrofile si orientano verso il mezzo acquoso circostante. Ne derivano strutture generalmente sferiche caratterizzate da un nucleo interno idrofobico (*core*) e da un guscio esterno idrofilo (*shell*) [51].

Il *core* idrofobico costituisce il principale compartimento per l'incorporazione di farmaci lipofili, mentre lo *shell* idrofilo, spesso formato da catene di PEG, conferisce stabilità colloidale alla formulazione e riduce l'adsorbimento delle proteine plasmatiche. Questo effetto limita il riconoscimento da parte del

sistema fagocitario mononucleato, favorendo una maggiore permanenza in circolo e aumentando la probabilità di accumulo nel tessuto tumorale attraverso l'effetto EPR [53].

L'efficienza di incapsulamento e la stabilità delle micelle dipendono da diversi fattori, tra cui la natura chimica del copolimero, il peso molecolare dei blocchi, il rapporto tra frazione idrofila e idrofobica e le proprietà chimico-fisiche del farmaco. In particolare, l'affinità tra il principio attivo e il nucleo micellare rappresenta un elemento determinante per ottenere formulazioni con adeguato *drug loading*, buona stabilità durante la circolazione sistemica e rilascio controllato del composto [52].

Il rilascio del farmaco può avvenire per diffusione dal nucleo micellare, per dissociazione della micella o in seguito alla degradazione del polimero. Negli ultimi anni sono state inoltre sviluppate micelle polimeriche *stimuli-responsive*, progettate per rilasciare il principio attivo in risposta a specifiche caratteristiche del microambiente tumorale, quali variazioni di pH, presenza di enzimi, specie reattive dell'ossigeno o gradienti redox intracellulari. Tali sistemi mirano a limitare il rilascio prematuro durante la circolazione sistemica e ad aumentare la selettività del trattamento [53].

Per queste ragioni, le micelle polimeriche rappresentano una piattaforma particolarmente adatta alla formulazione di molecole idrofobiche ad attività

antitumorale. Tale aspetto risulta rilevante anche per composti appartenenti alla classe dei flavonoidi, spesso caratterizzati da ridotta solubilità in ambiente acquoso e limitata biodisponibilità, fattori che possono ostacolare l'applicazione terapeutica.

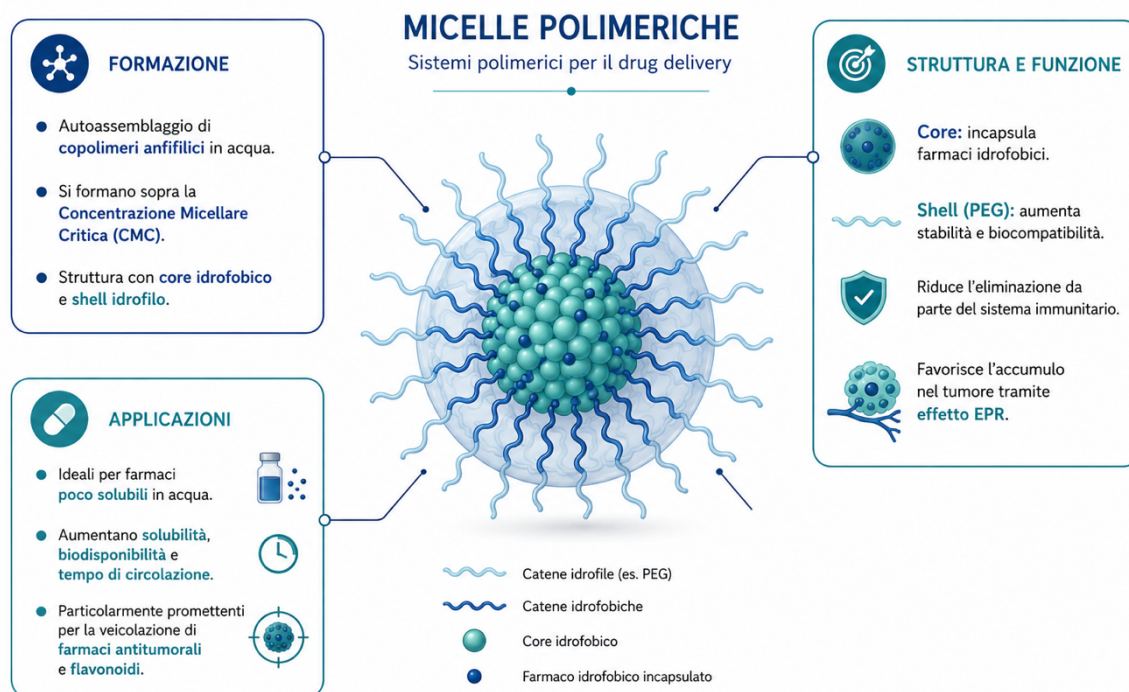


Figura 8. Principali caratteristiche delle micelle polimeriche

3.5 Copolimeri anfifilici per la formazione di micelle polimeriche

I copolimeri anfifilici costituiscono gli elementi strutturali fondamentali delle micelle polimeriche. Essi sono caratterizzati dalla presenza, all'interno della stessa macromolecola, di segmenti idrofili e idrofobici, la cui organizzazione determina la formazione della struttura core-shell tipica delle micelle [55].

La natura chimica dei blocchi polimerici influenza direttamente le proprietà del nanosistema. Il blocco idrofobico è responsabile della formazione del nucleo micellare e svolge un ruolo centrale nell'incorporazione dei farmaci lipofili. Tra i polimeri idrofobici maggiormente utilizzati figurano il PLA, il PLGA e il PCL, tutti caratterizzati da buona biocompatibilità e biodegradabilità. La loro degradazione avviene principalmente per idrolisi dei legami esterei, con formazione di metaboliti eliminabili dall'organismo [48].

Il blocco idrofilo, invece, contribuisce alla stabilità colloidale e influenza il comportamento biologico della micella. Il PEG è il polimero idrofilo più impiegato, grazie alla sua elevata idrofilia, biocompatibilità e capacità di formare uno strato idratato superficiale. Tale strato riduce l'interazione con le proteine plasmatiche e il riconoscimento da parte del sistema fagocitario mononucleato, conferendo al nanosistema il cosiddetto "stealth effect" e favorendo un più prolungato tempo di circolazione [56, 49].

Le proprietà delle micelle possono essere modulate variando il peso molecolare dei blocchi e il rapporto tra componente idrofila e idrofobica. Un aumento della frazione idrofobica può favorire l'incorporazione di farmaci lipofili e rallentare il rilascio del principio attivo; al contrario, una componente idrofila eccessiva può migliorare la stabilità colloidale ma ridurre l'efficienza di incapsulamento. La scelta del rapporto ottimale tra i due blocchi rappresenta quindi un parametro cruciale nella progettazione della formulazione [52].

Anche il peso molecolare complessivo del copolimero incide sulla stabilità del sistema. Copolimeri a peso molecolare più elevato tendono generalmente a formare micelle più stabili, caratterizzate da una CMC più bassa e da una maggiore resistenza alla dissociazione in seguito alla diluizione nel torrente ematico. Questo aspetto è particolarmente importante per le applicazioni in vivo, poiché contribuisce a preservare l'integrità del nanosistema durante la circolazione sistemica e a ridurre il rilascio prematuro del farmaco [51].

Nel complesso, la possibilità di modulare composizione chimica, peso molecolare e architettura macromolecolare rende i copolimeri anfifilici materiali estremamente versatili per la progettazione di micelle polimeriche destinate al trasporto di agenti antitumorali. La loro capacità di migliorare la solubilità e la biodisponibilità di molecole scarsamente idrosolubili li rende

particolarmente interessanti per la formulazione di composti flavonoidici ad attività biologica.

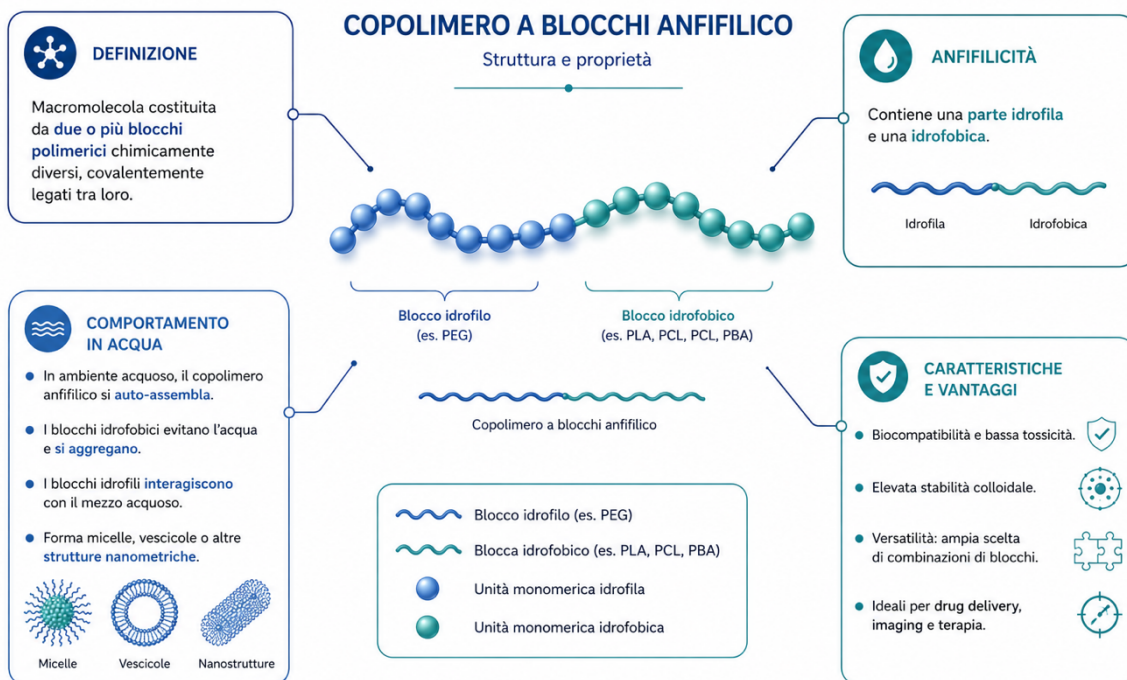


Figura 9. Struttura e proprietà di un copolimero a blocchi anfifilico

3.6 Polimero mPEG-b-p(HPMAm-Bz)

Nel presente lavoro è stato utilizzato il copolimero a blocchi mPEG-b-p(HPMAm-Bz), un sistema anfifilico progettato per la formazione di micelle polimeriche destinate alla veicolazione di farmaci idrofobici. Questo polimero è costituito da un blocco idrofilo di metossipoli(etilenglicole) (mPEG) e da un blocco idrofobico formato da poli[N-(2-benzoilossipropil) metacrilammide], indicato come p(HPMAm-Bz).

Il blocco p(HPMAm-Bz) deriva dalla modifica del monomero N-(2-idrossipropil) metacrilammide (HPMAm) mediante introduzione di gruppi benzoilici sul gruppo ossidrilico laterale. Tale funzionalizzazione può essere ottenuta attraverso reazione con cloruro di benzoile e consente di aumentare il carattere idrofobico e aromatico del polimero. La presenza di gruppi aromatici nel blocco idrofobico favorisce l'interazione con farmaci contenenti anelli aromatici, attraverso interazioni non covalenti di tipo π - π stacking. Queste interazioni possono contribuire ad aumentare la capacità di carico della micella e a migliorare la ritenzione del principio attivo all'interno del nucleo micellare.

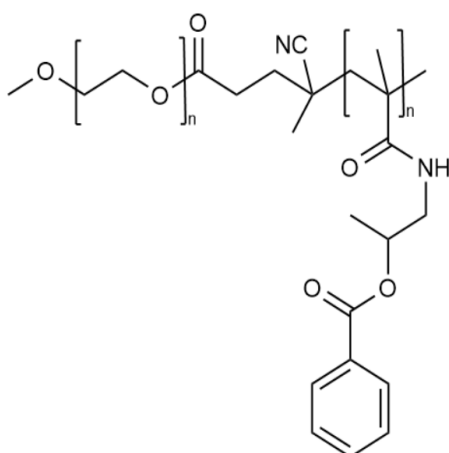


Figura 8 - Polimero mPeg-b-p(HPMAm-Bz)

In ambiente acquoso, il copolimero mPEG-b-p(HPMAm-Bz) è in grado di autoassemblarsi formando micelle polimeriche, quando vengono superate specifiche condizioni di concentrazione e temperatura, rispettivamente indicate come concentrazione micellare critica

(*critical micelle concentration*, CMC) e temperatura micellare critica (*critical micelle temperature*, CMT). In queste condizioni, il blocco idrofobico p(HPMAm-Bz) tende a costituire il nucleo interno della micella, nel quale può essere incorporato il farmaco, mentre il blocco idrofilo mPEG forma il guscio esterno, contribuendo alla stabilizzazione della nanostruttura in ambiente acquoso.

A differenza di altri sistemi micellari termoresponsivi basati su polimeri con comportamento LCST, (Lower Critical Solution Temperature, il copolimero mPEG-b-p(HPMAm-Bz) non è un polimero sensibile alla temperatura. La formazione delle micelle è dovuta principalmente al carattere anfifilico del copolimero, determinato dalla presenza del blocco idrofilo mPEG e del blocco idrofobico p(HPMAm-Bz). Il blocco mPEG svolge un ruolo fondamentale nel comportamento biologico delle micelle. Le catene di PEG formano infatti uno

strato idratato e flessibile sulla superficie del nanosistema, capace di ridurre l'adsorbimento di proteine plasmatiche, quali immunoglobuline, proteine del complemento e altre opsonine. Questo effetto, noto come "stealth effect", limita il riconoscimento da parte del sistema fagocitario mononucleato e può contribuire a prolungare il tempo di circolazione sistemica della formulazione. Inoltre, la presenza del PEG può migliorare la stabilità colloidale delle micelle e ridurre le interazioni aspecifiche con componenti biologiche. Un ulteriore aspetto di interesse del copolimero mPEG-b-p(HPMAm-Bz) è legato alla presenza, nel blocco idrofobico, di gruppi laterali benzoilati contenenti legami esterei potenzialmente idrolizzabili. L'idrolisi di tali legami può determinare la progressiva conversione del blocco p(HPMAm-Bz) nel più idrofilo p(HPMAm), con conseguente aumento della polarità del blocco originariamente core-forming. Questo processo può contribuire alla destabilizzazione della micella, favorendone la dissociazione ed il rilascio del farmaco. Inoltre, il p(HPMAm) è considerato un polimero biocompatibile e, quando caratterizzato da peso molecolare inferiore alla soglia di filtrazione renale, può essere eliminato più facilmente dall'organismo. Studi riportati in letteratura hanno evidenziato che copolimeri di tipo mPEG-b-p(HPMAm-Bz) sono in grado di formare micelle polimeriche caratterizzate da buona stabilità colloidale, elevata capacità di carico e buona citocompatibilità

dei materiali polimerici impiegati. In particolare, l'introduzione di gruppi aromatici nel blocco idrofobico può favorire interazioni di tipo π - π stacking con farmaci aromatici, contribuendo ad aumentare la stabilità delle micelle e la ritenzione del principio attivo nel nucleo [58].

Inoltre, studi successivi hanno evidenziato come le dimensioni delle micelle mPEG-b-p(HPMA-Bz) possano essere modulate in funzione dei parametri di formulazione e di processo, confermando l'interesse di questo sistema come piattaforma per il drug delivery di composti idrofobici [59].

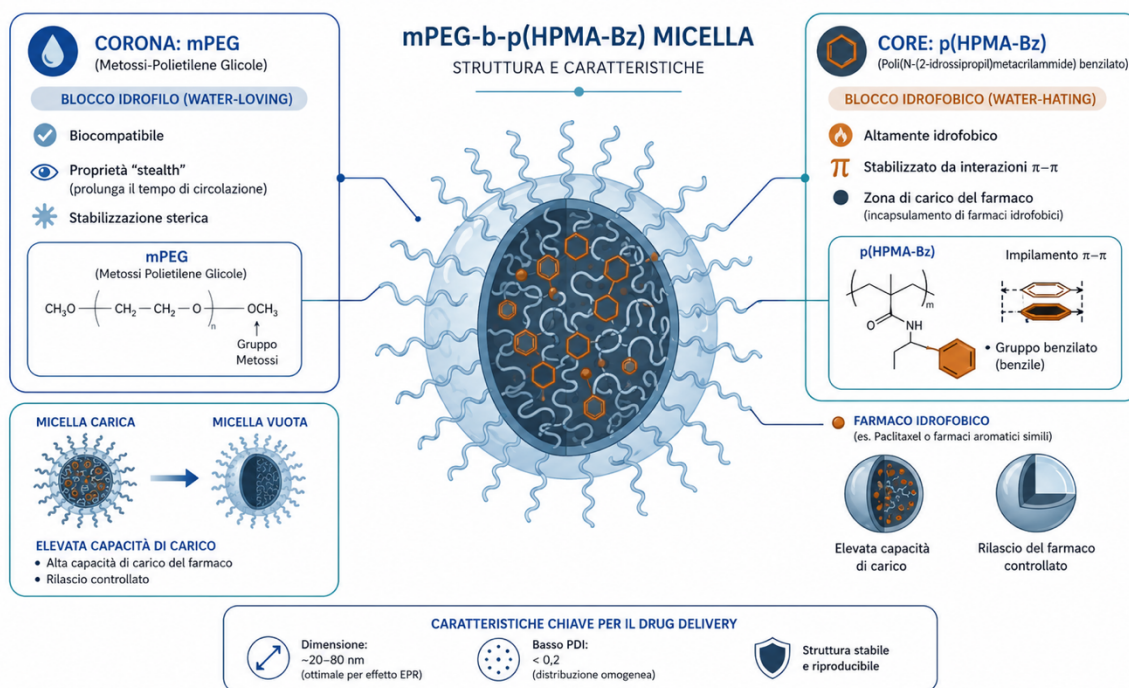


Figura 9. Micella mPEG-b-(HPMA-Bz)

3.7 Ruolo delle dimensioni e della carica superficiale nella caratterizzazione delle nanoparticelle: applicazione del DLS come tecnica rapida e non invasiva

Nonostante i numerosi vantaggi associati alle dimensioni nanometriche, le nanoparticelle possono presentare un maggiore rischio di aggregazione durante lo stoccaggio e il trasporto [47]. Di conseguenza, è importante formulare sistemi nanoparticellari di dimensioni ridotte, garantendo al contempo un'adeguata stabilità colloidale. Inoltre, le dimensioni e la carica superficiale rappresentano fattori determinanti per diversi effetti biologici delle nanoparticelle, tra cui l'assorbimento cellulare, la tossicità, la dissoluzione e il profilo di rilascio delle molecole veicolate.

Considerata l'importanza della dimensione nella definizione e nella caratterizzazione di questi sistemi, l'Unione Europea ha introdotto criteri specifici per la definizione di nanomateriale. La Raccomandazione 2011/696/UE individua l'intervallo dimensionale compreso tra 1 e 100 nm come riferimento per la classificazione dei nanomateriali, in accordo con la definizione dell'Organizzazione internazionale per la standardizzazione, secondo cui un nanomateriale è un materiale che presenta almeno una dimensione esterna, oppure una struttura interna o superficiale, nell'intervallo nanometrico. La stessa Raccomandazione sottolinea inoltre l'importanza della

distribuzione dimensionale basata sul numero di particelle, considerando nanomateriale un sistema in cui almeno il 50% delle particelle, nella distribuzione numerica, presenti una o più dimensioni esterne comprese tra 1 e 100 nm [57].

Attualmente, tra i metodi più rapidi e utilizzati di routine per determinare le dimensioni delle particelle disperse in un mezzo liquido rientra il Dynamic Light Scattering (DLS), una tecnica basata sulla diffusione della luce [47]. Rispetto ad altre tecniche di caratterizzazione, quali microscopia elettronica a trasmissione (TEM), microscopia elettronica a scansione (SEM), microscopia a forza atomica (AFM) o tecniche basate sulla diffrazione dei raggi X, il DLS presenta il vantaggio di essere più rapido, relativamente semplice da utilizzare, non distruttivo e generalmente meno costoso. Per questo motivo viene ampiamente impiegato come tecnica preliminare e di routine per valutare le dimensioni medie, la distribuzione dimensionale e l'eventuale tendenza all'aggregazione di sistemi nanoparticellari in dispersione.

La diffusione dinamica della luce è utilizzata per misurare le dimensioni di particelle sub-microniche disperse in un liquido. La tecnica si basa sull'analisi del moto browniano, ossia il movimento casuale delle particelle dovuto agli urti continui con le molecole del solvente circostante, e lo correla alla dimensione delle particelle stesse. In generale, particelle di dimensioni maggiori si

muovono più lentamente, mentre particelle più piccole presentano un moto browniano più rapido. La velocità di tale movimento è descritta dal coefficiente di diffusione traslazionale (D), a partire dal quale è possibile calcolare il diametro idrodinamico della particella mediante l'equazione di Stokes-Einstein:

$$dH = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

dove dH rappresenta il diametro idrodinamico, k la costante di Boltzmann, T la temperatura assoluta, η la viscosità del mezzo e D il coefficiente di diffusione traslazionale. Il valore ottenuto viene definito diametro idrodinamico poiché non corrisponde esclusivamente alla dimensione fisica della particella, ma tiene conto anche del suo comportamento diffusivo nel mezzo di dispersione e dell'eventuale strato di solvatazione associato alla superficie. Pertanto, nel DLS si misura la velocità con cui le particelle diffondono in soluzione a causa del moto browniano, ricavando da essa una stima della loro dimensione media [60]. Il modo in cui le nanoparticelle disperse interagiscono con la luce dipende strettamente dalle loro dimensioni rispetto alla lunghezza d'onda (λ) del laser utilizzato per l'analisi.

Quando la luce colpisce le particelle in sospensione, queste diffondono il segnale luminoso; l'intensità della luce diffusa aumenta fortemente

all'aumentare delle dimensioni particellari, risultando proporzionale, nel regime di Rayleigh, alla sesta potenza del raggio. Per particelle molto più piccole della lunghezza d'onda del laser prevale la diffusione di Rayleigh, mentre per particelle di dimensioni maggiori il fenomeno viene descritto più adeguatamente dalla teoria di Mie. In entrambi i casi, l'analisi delle fluttuazioni temporali dell'intensità della luce diffusa consente di ricavare informazioni sul movimento delle particelle e, quindi, sulle loro dimensioni [57].

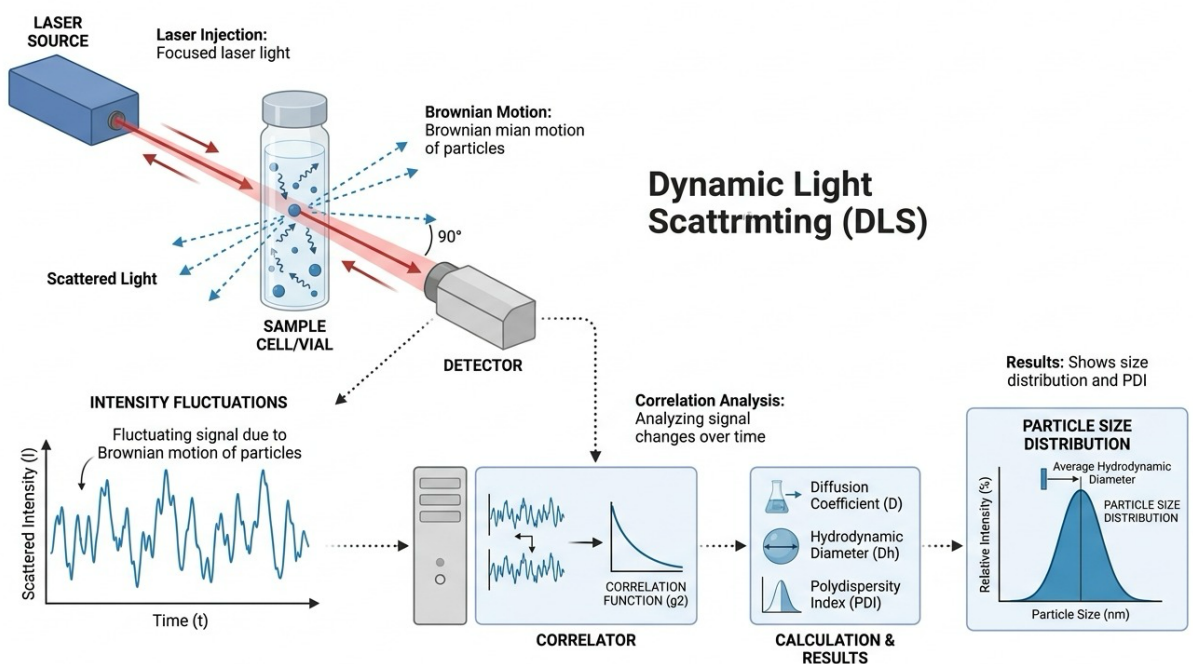


Figura 10 - Funzionamento DLS (FigureLabs.Ai generated)

Prima di procedere con l'analisi, i campioni devono essere adeguatamente preparati, preferibilmente limpidi, omogenei e privi di particelle macroscopiche o contaminanti che potrebbero interferire con la misura.

Le dispersioni vengono generalmente trasferite in cuvette trasparenti, in plastica o in vetro, idonee a consentire il passaggio del laser e la rilevazione, da parte dei detector, delle fluttuazioni dell'intensità della luce diffusa [57].

Una corretta preparazione del campione è particolarmente importante poiché la presenza di polvere, aggregati o particelle di dimensioni maggiori può influenzare significativamente il risultato dell'analisi.

Oltre ai parametri dimensionali, la caratterizzazione delle nanoparticelle comprende spesso anche la determinazione del potenziale zeta, un parametro correlato alla carica superficiale e alla stabilità colloidale della dispersione. Il potenziale zeta può essere definito come il potenziale elettrico misurato in corrispondenza del piano di scorrimento, cioè della superficie ideale che separa lo strato di liquido e ioni che si muove insieme alla nanoparticella dal resto del mezzo disperdente.

Tale misura può essere frequentemente eseguita con lo stesso strumento utilizzato per il DLS, ma si basa su un principio differente, noto come Electrophoretic Light Scattering (ELS). In questo caso, le particelle disperse vengono sottoposte a un campo elettrico e la loro mobilità elettroforetica viene misurata e convertita in potenziale zeta.

Potenziale zeta (ζ) di una nanoparticella

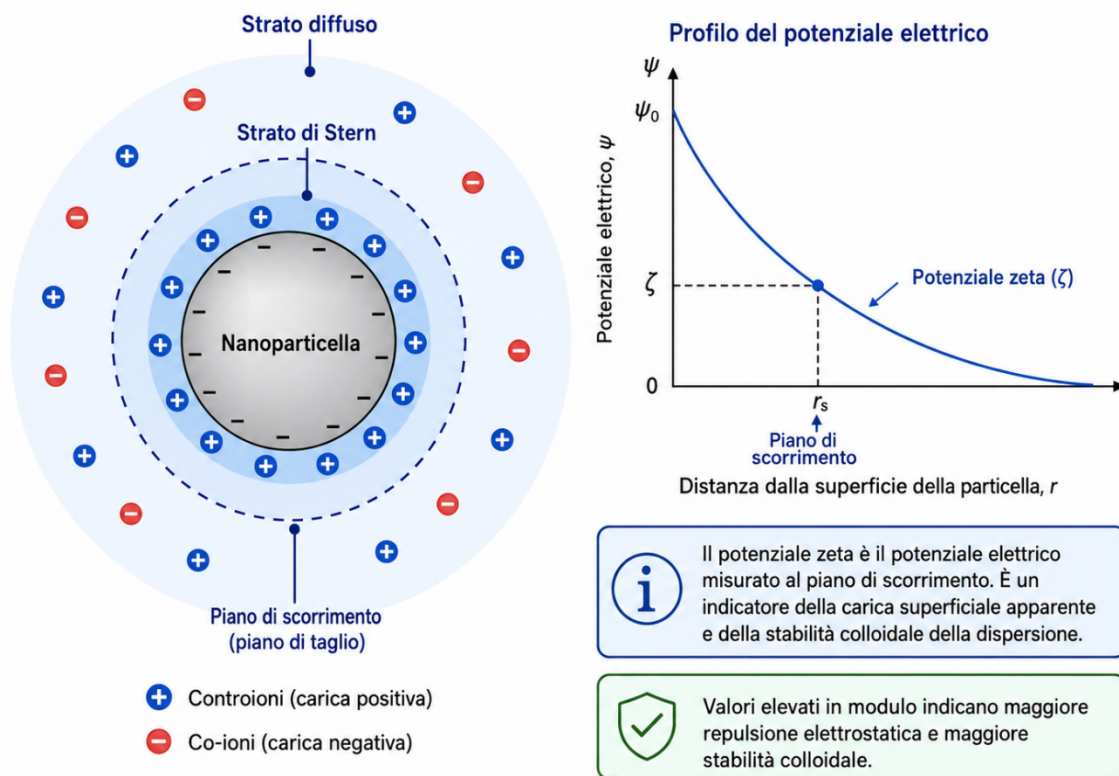


Figura 11. Rappresentazione schematica del potenziale zeta di una nanoparticella in dispersione acquosa

Questo valore è influenzato sia dalla composizione superficiale della particella sia dal mezzo in cui essa è dispersa. L'analisi del potenziale zeta può quindi fornire informazioni utili sulla stabilità della dispersione, sull'eventuale adsorbimento di molecole cariche sulla superficie della nanoparticella o, in alcuni casi, sull'associazione tra nanoparticella e molecola veicolata [47].

La carica superficiale rappresenta un ulteriore fattore critico per il successo terapeutico di una nanoformulazione. In generale, superfici neutre o leggermente negative possono favorire una maggiore permanenza nel circolo

sanguigno, riducendo l'interazione non specifica con proteine plasmatiche, cellule del sangue e cellule endoteliali. Una superficie idrofila e poco carica può inoltre contribuire a limitare il fenomeno dell'opsonizzazione, cioè l'adsorbimento di proteine plasmatiche sulla superficie della particella, e la successiva rimozione da parte dei macrofagi. L'aumento del tempo di permanenza nel torrente circolatorio può favorire il transito ripetuto delle nanoparticelle in prossimità della vascolarizzazione tumorale, spesso più permeabile, incrementando la probabilità di accumulo nel tessuto bersaglio [46].

Nonostante la sua praticità, il DLS presenta alcuni limiti. La tecnica fornisce infatti una misura indiretta del diametro idrodinamico e non permette di osservare direttamente la morfologia delle particelle. Inoltre, il segnale risulta fortemente influenzato dalla presenza di particelle di dimensioni maggiori o di aggregati, che possono dominare la diffusione della luce anche se presenti in piccole quantità. Per questo motivo, i risultati ottenuti mediante DLS devono essere interpretati con attenzione, soprattutto nel caso di campioni polidispersi, e possono essere integrati con tecniche complementari, quali TEM, SEM, AFM o diffrazione dei raggi X, che consentono di ottenere informazioni più dirette sulla forma, sulla morfologia e, in alcuni casi, sull'organizzazione strutturale delle nanoparticelle.

Capitolo IV

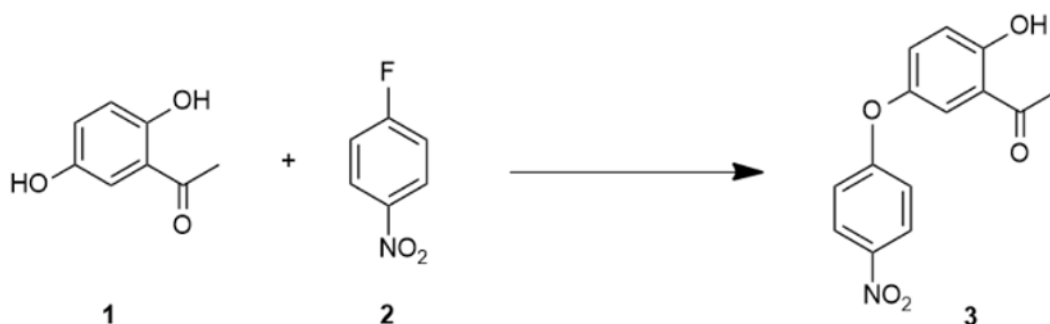
MATERIALI E METODI

4.1 Sintesi chimica

Tutti i composti utilizzati per la sintesi di APF1 sono stati acquistati da Sigma Aldrich Co. (Stenheim, Germania) o BLD Pharmatech GmbH (Reinbek, Germania) e utilizzati senza ulteriore purificazione. Tutti i solventi erano di purezza analitica e sono stati essiccati prima dell'uso. La cromatografia su strato sottile (TLC) è stata eseguita su lastre di alluminio pre-rivestite con gel di silice 60 F254 (Merck). La cromatografia su colonna è stata eseguita utilizzando gel di silice 60 (SiO₂, 230–400 mesh). Le analisi di spettrometria di massa ad alta risoluzione (HRMS) ESI e cromatografia liquida ad alta prestazione-spettrometria di massa (HPLC-MS) sono state eseguite su un sistema Waters Acquity H-Class Plus con uno spettrometro di massa Waters Xevo G2-XF QToF come rivelatore. L'analisi spettrometrica di massa è stata condotta per tutti i composti sia in modalità di ionizzazione positiva sia in modalità di ionizzazione negativa. Gli spettri NMR ¹H e ¹³C sono stati registrati su spettrometri Bruker Ascend 600 avance NEO. Gli spostamenti chimici (δ) sono riportati in ppm rispetto al TMS e le costanti di accoppiamento (J) in Hz. Il polimero metossi poli(etilenglicole)-b-(N-(2-benzoilossipropil)-metacrilammide (mPEG-b-p(HPMAm-Bz)) è stato gentilmente fornito dall'Università di Utrecht (Paesi

Bassi). I campioni micellari sono stati preparati utilizzando acqua ultrapura Milli-Q.

4.1.1 Sintesi di (2-idrossi-5-(4-nitrofenossi) acetofenone (3)



L'intero procedimento è stato svolto in atmosfera di argon. Il 2,5-diidrossiacetofenone (3,04 g, 20,0 mmol) è stato aggiunto a una soluzione di tert-butoossido di potassio (4,94 g, 44,0 mmol, 2,2 eq) in DMSO (20 mL). Dopo 30 minuti di agitazione, sono stati aggiunti 4-fluoronitrobenzene (2,82 g, 20,0 mmol, 1 eq) e 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-ossile (TEMPO, 0,31 g, 2,00 mmol, 0,1 eq), impiegato come scavenger radicalico per ottimizzare la resa. La reazione è stata mantenuta in agitazione a 16–18 °C, al riparo dalla luce mediante copertura con stagnola, per 4h.

La miscela di reazione è stata quindi lavorata mediante aggiunta di acqua (40 mL) e HCl 3 M (70 mL), fino al raggiungimento di pH 3. Successivamente, la fase acquosa è stata estratta con acetato di etile (3 × 100 mL). Il grezzo ottenuto è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice, utilizzando come eluente una miscela cicloesano/acetato di etile (90:10), per ottenere il prodotto desiderato come solido bianco (3,65 g, resa 70%). ¹H NMR (DMSO-d₆, 400

MHz): · 2.69 (s, 3H), 7.08 (d, J =9.0 Hz, 1H), 7,14 (ddd, J =9.4 Hz, J =3.4 Hz, J =2.1 Hz, 2H), 7.43 (dd, J =9.0 Hz, J =3.0 Hz, 1H), 7.83 (d, J =3.0 Hz, 1H), 8.25 (ddd, J =9.4 Hz, J =3.4 Hz, J =2.1 Hz, 2H), 12.21 (s, OH). ¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz): · 28.7, 117.1, 120.0, 122.0, 123.3, 126.6, 129.5, 142.5, 145.9, 158.4, 163.9, 203.5. Massa calcolata per C₁₄H₁₁NO₅: 273.06372 Da. HRMS: m/z =272.06 [M - H]⁻

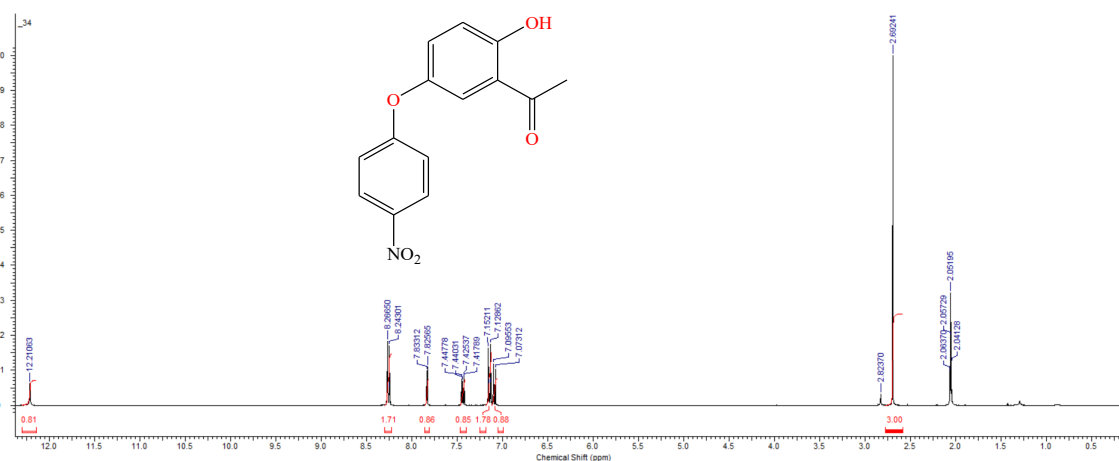


Figura 10. Spettro ¹H NMR del composto 3 (400 MHz, Acetone-d₆)

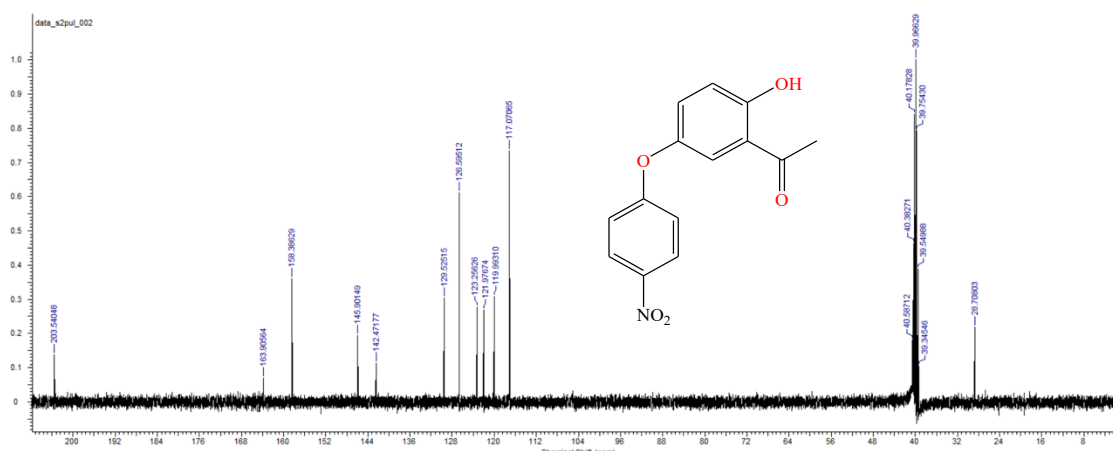
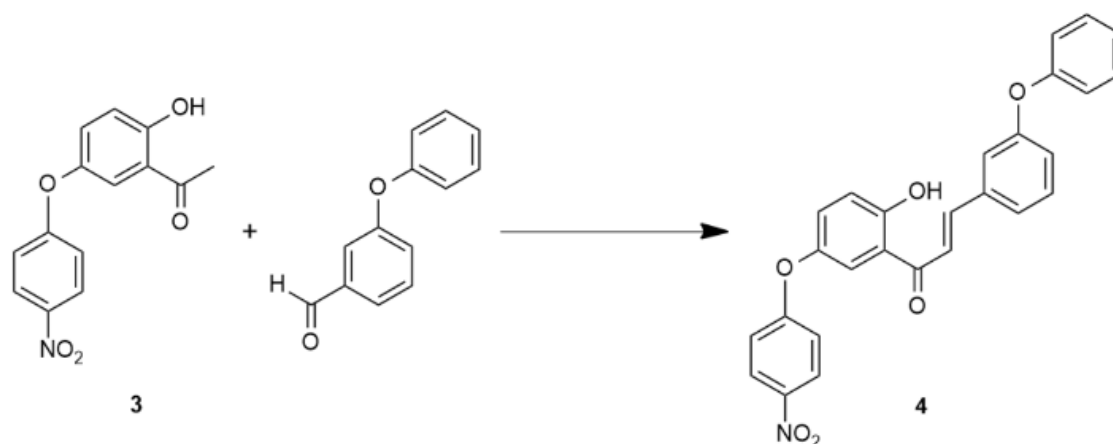


Figura 11. Spettro ¹³C NMR del composto 3 (100 MHz, DMSO-d₆)

4.1.2 Sintesi di (E)-1-(2-idrossi-5-(4-nitrofenossi) fenil) -3-(3-fenossifenil) prop-2-en-1-one (4)



Al 2-idrossi-5-(4-nitrofenossi) acetofenone (1,20 g, 4,4 mmol) disciolto in metanolo (40 mL) è stato aggiunto idrossido di potassio (0,99 g, 17,6 mmol, 4 eq) e 3-fenossibenzaldeide (0,87 g, 4,4 mmol, 1 eq). La reazione è stata mantenuta in agitazione a 50 °C per 48 h.

La miscela di reazione è stata quindi lavorata a freddo, in bagno di ghiaccio, mediante aggiunta di acqua (30 mL) e HCl 5%, fino al raggiungimento di pH 5. Successivamente, la miscela è stata estratta con acetato di etile (3 × 100 mL). Le fasi organiche combinate sono state lavate con brine, anidificate su Na₂SO₄ anidro e concentrate a pressione ridotta. Il residuo grezzo è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice, utilizzando come eluente una miscela

cicloesano/acetato di etile (95:5), per ottenere il prodotto desiderato come solido giallo (1,69 g, 3,74 mmol, resa 85%).

^1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz): 7.01(dd, $J=0.8$, $J=8.6$, 2H), 7.06 (dd, $J=8.2$, $J=2.0$, 1 H), 7.09-7.16 (m, 4H), 7.36-7.42 (m, 2H), 7.45 (dd, $J=8.6$, $J=2.7$, 2H), 7.65-7.73 (m, 2H), 7.84 (d, $J=15.7$, 1 H), 8.03 (d, $J=15.7$, 1 H), 8.18 (d, $J=2.7$, 1 H), 8.21-8.27 (m, 2H), 12.40 (s, OH). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz): δ 116.9, 118.7, 119.8, 120.1, 121.7, 122.0, 123.2, 123.3, 123.9, 125.4, 126.6, 129.9, 130.4, 131.0, 137.0, 142.4, 145.0, 146.0, 157.1, 157.3, 159.8, 164.1, 193.2.

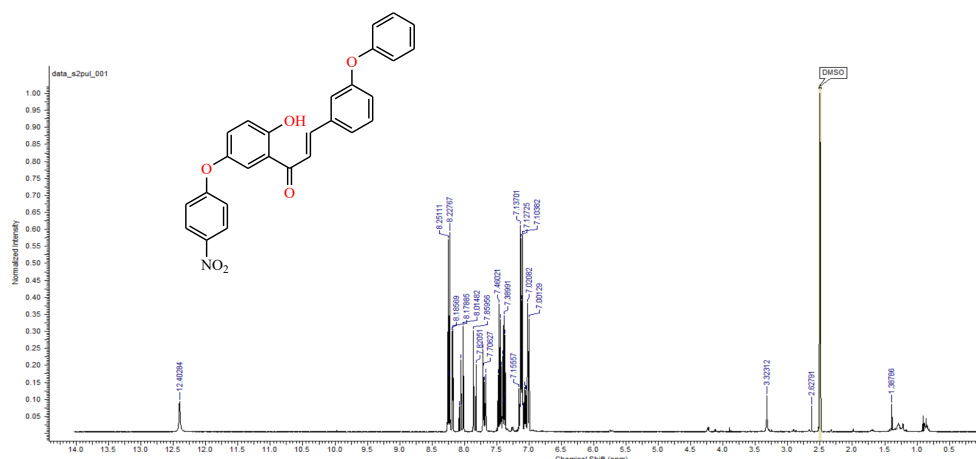


Figura 12. Spettro ^1H NMR del composto 4 (400 MHz, DMSO- d_6)

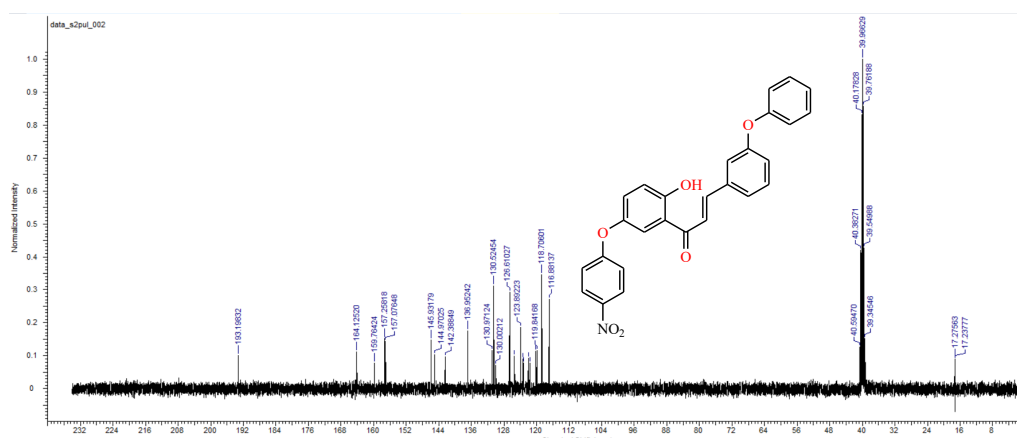
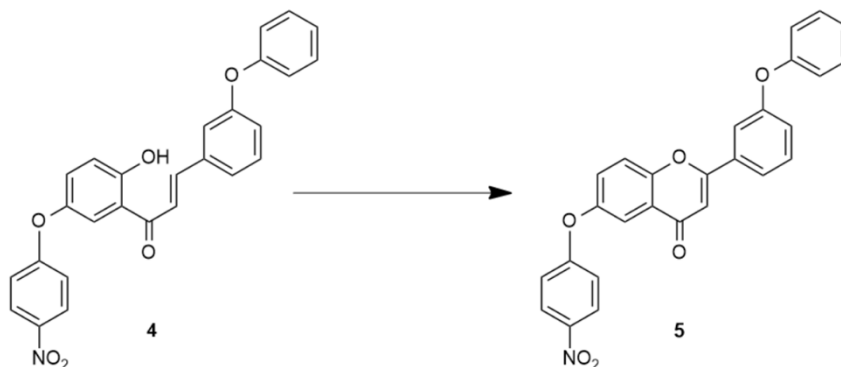


Figura 13. Spettro ^{13}C NMR del composto 4 (100 MHz, DMSO- d_6)

4.1.3 Sintesi di 6-(4-nitrofenossi) -2-(3-fenossifenil) -4H-cromo-4-one (5)



Il composto 4 (1,00 g, 2,21 mmol), disciolto in DMSO anidro (6,1 mL), è stato trattato con iodio (I_2 , 0,062 g, 0,245 mmol). La reazione è stata mantenuta a 130 °C per 6 h sotto agitazione. Successivamente, è stata aggiunta una soluzione acquosa di tiosolfato di sodio ($Na_2S_2O_3$) per rimuovere i residui di iodio. Il prodotto è stato estratto con EtOAc; le fasi organiche combinate sono state lavate con brine, anidificate su Na_2SO_4 anidro, filtrate ed evaporate a pressione ridotta. Il residuo grezzo è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice, utilizzando come eluente una miscela cicloesano/ EtOAc (70:30) ottenendo il prodotto puro 5 come solido bianco (0,81 g, resa 80%).

1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 7.06 (d, $J=7.8$, 2H), 7.07 (s, 1H), 7.13–7.24 (m, 4H), 7.40 (dd, $J=8.6$, $J=7.8$, 2H), 7.53–7.59 (m, 1H), 7.61 (d, $J=3.1$, 1H), 7.67 (dd, $J=9.0$, $J=3.1$, 1H), 7.78–7.81 (m, 1H), 7.86–7.93 (m, 2H), 8.21–8.28

(m, 2H). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz): δ 106.9, 114.3, 116.7, 118.1, 118.7, 121.5, 121.6, 121.7, 123.9, 124.6, 126.2, 127.1, 130.2, 130.9, 133.0, 142.8, 151.8, 152.7, 156.3, 157.2, 162.0, 162.2, 176.5. Massa calcolata: $\text{C}_{27}\text{H}_{17}\text{NO}_6$, 451,10559 Da. HRMS: $m/z = 452.11 [\text{M} + \text{H}]^+$, $474.10 [\text{M} + \text{Na}]^+$.

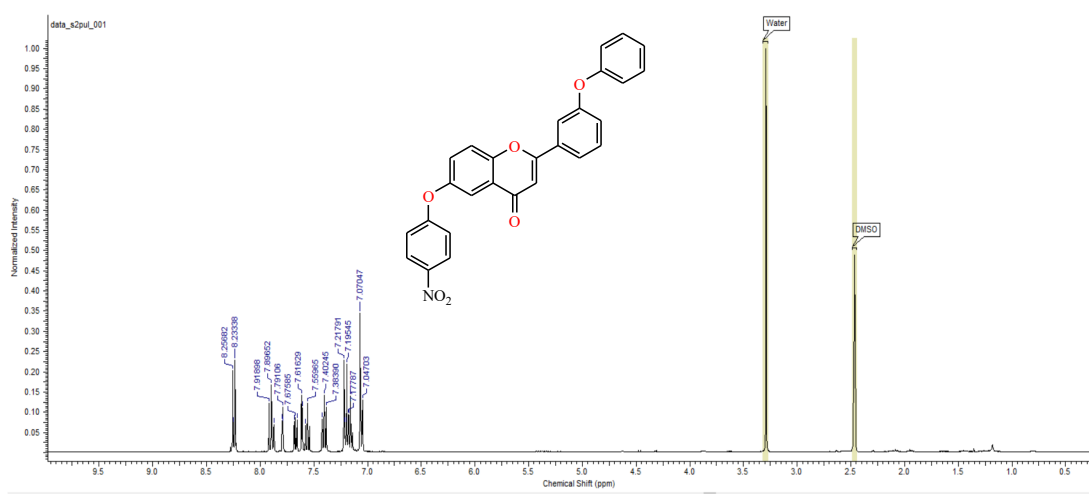


Figura 14. Spettro ^1H NMR del composto 5 (400 MHz, DMSO- d_6)

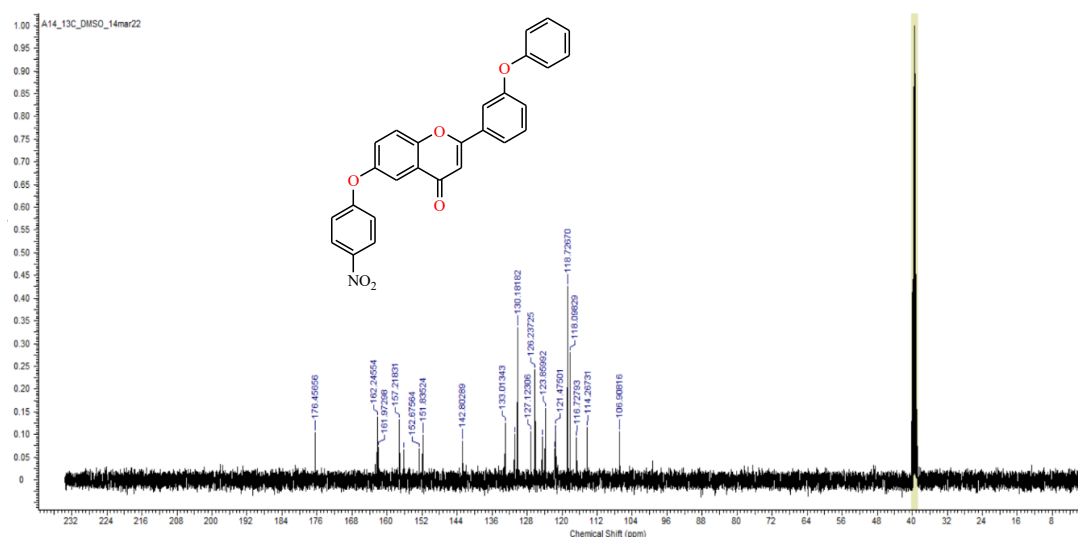
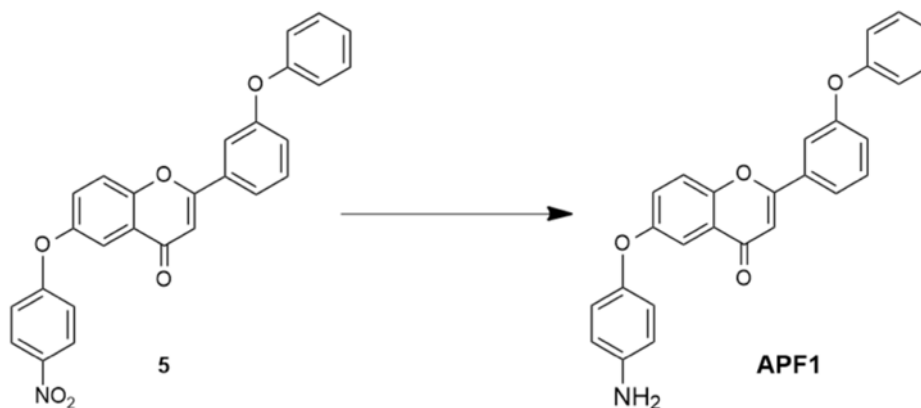


Figura 15. Spettro ^{13}C NMR del composto 5 (100 MHz, DMSO- d_6)

4.1.4 Sintesi di 6-(4-amminofenossi)-2-(3-fenossifenil)-4H-cromo-4-one (APF1)



Al composto 5 (600 mg, 1,33 mmol), disciolto in diclorometano (6 mL), sono stati aggiunti acido acetico glaciale (500 μ L, 524 mg, 8,73 mmol) e zinco metallico (400 mg, 6,12 mmol), suddiviso in quattro porzioni. Le aggiunte di zinco sono state effettuate a intervalli di 5 minuti l'una dall'altra. La reazione è stata mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente, circa 20 °C, per 2 h, al riparo dalla luce mediante copertura con un foglio di alluminio.

Al termine della reazione, la miscela è stata filtrata su carta per eliminare i residui di zinco. Il filtrato è stato quindi lavorato ed estratto con acetato di etile (3×30 mL). Le fasi organiche combinate sono state lavate con brine, anidificate su Na_2SO_4 anidro, filtrate ed evaporate a pressione ridotta. Il residuo grezzo è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice, utilizzando come eluente una miscela cicloesano/acetato di etile (60:40), per ottenere il prodotto desiderato come solido giallo (450 mg, resa 90%).

^1H NMR (600 MHz, DMSO-d_6): δ 5.10 (s, 2H), 6.61 – 6.66 (m, 2H), 6.81 – 6.87 (m, 2H), 7.03 (s, 1H), 7.06 – 7.12 (m, 2H), 7.16 – 7.22 (m, 3H), 7.40 – 7.46 (m, 2H), 7.48 (dd, $J = 9.1, 3.1$ Hz, 1H), 7.58 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.77 – 7.81 (m, 2H), 7.86 – 7.91 (m, 1H). ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO-d_6): δ 106.6, 108.1, 115.0, 116.7, 118.8, 120.6, 121.4, 121.5, 121.6, 123.9, 124.0, 124.2, 130.2, 130.9, 133.2, 144.8, 146.2, 150.8, 156.3, 156.8, 157.2, 161.6, 176.7. Massa calcolata: $\text{C}_{27}\text{H}_{19}\text{NO}_4$, 421,13141 Da. HRMS: $m/z = 422.13780$ [$\text{M} + \text{H}$]

$^+$.

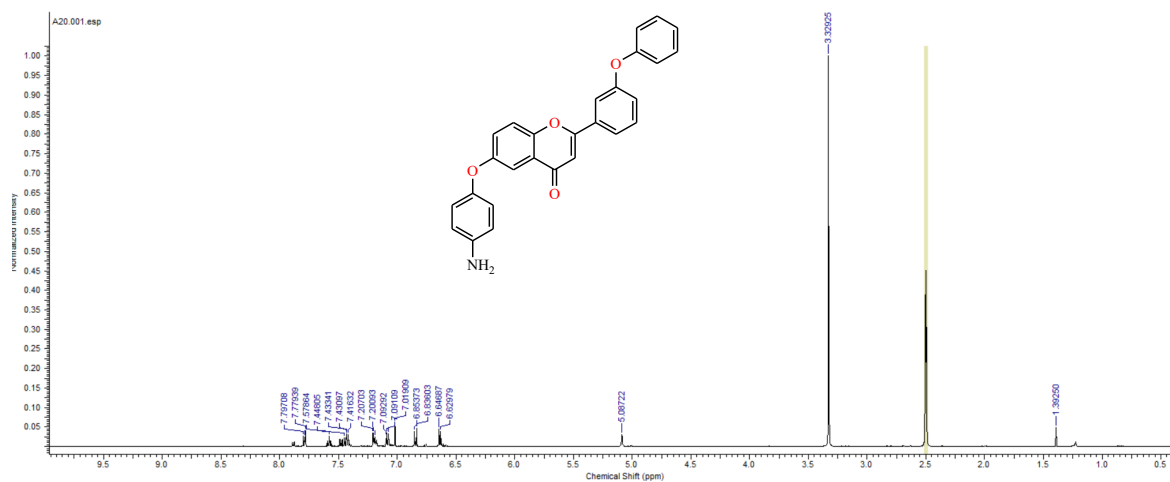


Figura 16. Spettro ¹H NMR del composto APF1 (400 MHz, DMSO-d₆)

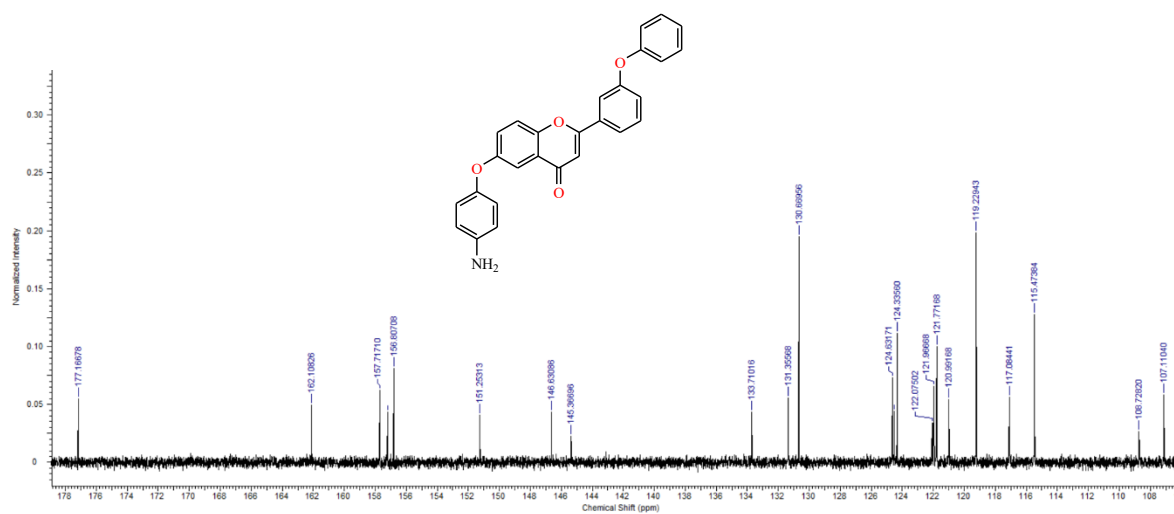


Figura 17. Spettro ¹³C NMR del composto APF1 (500 MHz, DMSO-d₆)

4.2 Preparazione delle micelle

Le micelle vuote e quelle contenenti APF1, di due diverse concentrazioni, sono state preparate come segue. Per le micelle vuote, il polimero è stato disciolto in THF a una concentrazione di 10 mg/ml. Per le micelle contenenti APF1, il polimero e l'APF1 sono stati disciolti in THF a concentrazioni rispettivamente di 11 mg/ml, 11 mg/ml e 55 mg/ml. Successivamente, un volume di 1 ml della soluzione polimerica è stato miscelato con 100 μ l di soluzione di APF1. Nel primo lotto, le concentrazioni di polimero e APF1 erano rispettivamente di 10 mg/ml e 1 mg/ml, mentre nel secondo lotto erano di 10 mg/ml e 5 mg/ml. Infine, 1 ml di ciascuna soluzione (polimero, polimero + APF1 1 mg/ml e polimero + APF1 5 mg/ml) è stato aggiunto goccia a goccia a 1 ml di acqua milli-Q sotto agitazione rapida a temperatura ambiente. Le miscele sono lasciate in agitazione per 24 ore a temperatura ambiente per consentire l'evaporazione del THF. Il volume delle dispersioni micellari risultanti è stato portato a 1 ml aggiungendo da 150 a 250 μ l di acqua Milli-Q e quindi filtrato con un filtro a siringa in acetato di cellulosa (CA) da 0,45 μ m (guardare marca) per rimuovere l'APF1 non incapsulato e gli aggregati.

4.3 Quantificazione del polimero e dell'APF1 incapsulato

La concentrazione del polimero e di APF1 nelle dispersioni micellari filtrate è stata determinata mediante analisi spettrofotometrica utilizzando uno spettrofotometro BioTek Synergy HT MicroPlate Reader (Winooski, Vermont, USA) dopo la lisi delle nanoparticelle con acetonitrile (ACN). In dettaglio: 10 μ l di dispersione micellare sono stati aggiunti a 390 μ l di ACN e successivamente 200 μ l sono stati trasferiti in micropiastre UV-STAR® a 96 pozzetti con fondo trasparente (Greiner Bio-One, Germania) per la misurazione dell'assorbanza. Le misurazioni per ciascuna preparazione micellare sono state eseguite in triplicato e ogni campione è stato testato almeno tre volte per garantirne la riproducibilità. La curva di calibrazione per APF1 è stata validata preparando una prima soluzione madre a una concentrazione di 1 mg/ml in ACN e successivamente diluita a 0,15 mg/ml, 0,075 mg/ml e poi a 0,05 mg/ml, da cui sono state effettuate diluizioni seriali. L'intervallo di concentrazione di APF1 utilizzato per la curva di calibrazione va da 0,15 a 0 mg/ml e le assorbanze sono state misurate a $\lambda = 275$ e 300 nm utilizzando ACN come bianco. Il valore di R^2 pari a 0,999, ottenuto per entrambe le calibrazioni, suggerisce una forte relazione lineare. Le concentrazioni di APF1 in ciascun lotto micellare sono state calcolate a partire dalla curva di calibrazione ottenuta a 300 nm.

La curva di calibrazione per la quantificazione del polimero è stata stabilita preparando una prima soluzione madre a 1 mg/ml in ACN e successivamente diluita a 0,75 mg/ml, da cui sono state effettuate diluizioni seriali. La concentrazione del polimero utilizzata per la curva di calibrazione varia da 0,75 a 0 mg/ml e le assorbanze sono state misurate a $\lambda = 275$ nm utilizzando ACN come bianco. Anche in questo caso si osserva una forte relazione lineare con un R^2 di 0,999. In tutti i casi, ogni concentrazione è stata replicata tre volte e la media dei valori ottenuti rappresenta l'assorbanza finale utilizzata per la curva di calibrazione. Le concentrazioni del polimero in ciascuna dispersione micellare sono state calcolate come segue:

$$\begin{aligned}
 A_{\text{totale}} &= A_{\text{polimero}} + A_{\text{APF1}} \\
 A_{\text{totale}} &= (\epsilon * b * C)_{\text{polimero}} + (\epsilon * b * C)_{\text{APF1}} \\
 C_{\text{polimero}} &= [A_{\text{totale}} - (\epsilon * b_{\text{APF1}} * C_{\text{APF1}})] / (\epsilon * b_{\text{polimero}})
 \end{aligned}$$

dove A_{totale} è l'assorbanza del campione misurata a $\lambda = 275$ nm; $\epsilon * b$ è il coefficiente di estinzione di massa corrispondente alla pendenza della curva di calibrazione di APF1 misurata a $\lambda = 275$ nm; C è la concentrazione di APF1 calcolata a $\lambda = 300$ nm e $\epsilon * b_o$ è il coefficiente di estinzione di massa corrispondente alla pendenza della curva di calibrazione del polimero misurata a $\lambda = 275$ nm.

Il carico di farmaco (DL %) e l'efficienza di incapsulamento (EE %) sono stati calcolati come segue:

$$DL \% = (quantità\ di\ APF1\ trovata / quantità\ iniziale\ di\ APF1\ aggiunta) * 100$$

$$EE \% = (quantità\ di\ APF1\ trovata / (quantità\ di\ APF1\ trovata + quantità\ di\ polimero)) * 100$$

4.4 Dynamic light scattering

Il diametro basato sull'intensità (Z.-average) e l'indice di polidispersione (PDI) sono stati misurati mediante dynamic light scattering (DLS) utilizzando un Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments GmbH, Marie-Curie-Straße 4/1, 71083 Herrenberg, Germania). Le misurazioni sono state effettuate a 25°C con un angolo fisso di 173 ° in acqua milliQ. I dati riportati rappresentano la media di almeno tre diverse autocorrelazioni effettuate per ciascun campione. I campioni sono stati analizzati dopo diluizione 100x con acqua milliQ.

4.5 Colture cellulari

La linea cellulare di carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC) umano A549 (CCL-185™) è stata ottenuta dall'American Type Culture Collection (ATCC). Le cellule sono state coltivate in terreno DMEM completo (SIAL-DMEM-HPXA) supplementato con 10% di siero fetale bovino (FBS), 2 mM di L-glutamina, 100 U/mL di penicillina e 100 µg/mL di streptomicina e mantenute di routine in fiasche da 75 cm² in un incubatore cellulare a 37 °C, 5% di CO₂ e 95% di umidità relativa. Le colture cellulari sono state staccate mediante tripsinizzazione con tripsina allo 0,5% in PBS contenente EDTA allo 0,025%. Tutti i reagenti per la coltura cellulare sono stati forniti da SIAL (Roma, Italia).

4.6 Citotossicità nella linea cellulare A549

Per il saggio cellulare, il terreno di coltura utilizzato in ogni fase e per le diluizioni è il DMEM completo (SIAL-DMEM-HPXA) supplementato con il 10% di siero fetale bovino (FBS), 2 mM di L-glutamina, 100 U/ml di penicillina e 100 µg/ml di streptomicina. Le cellule A549 sono state seminate in piastre a 96 pozzetti a una densità di 8×10^4 cellule/pozzetto per raggiungere una confluenza del 50% dopo 24 ore. Successivamente, il terreno di coltura è stato rimosso e sostituito con 0,2 ml di nuovo terreno contenente concentrazioni

crescenti di APF1, APF1 incapsulato in micelle (0,1-100 μ M) e micelle vuote. Nel dettaglio: per le micelle caricate e vuote (preparate in acqua Milli-Q), le soluzioni stock sono state preparate diluendo i lotti di campioni con il terreno di coltura utilizzando un opportuno fattore di diluizione (almeno 10 volte) per raggiungere una concentrazione di 100 μ M di APF1. Successivamente, sono state effettuate diluizioni successive con lo stesso terreno di coltura. I pozzetti per il controllo negativo sono stati trattati con il solo terreno di coltura. Per l'APF1 libero, sono state preparate due diverse soluzioni madri di 10 mM e 2 mM in DMSO. Ciascuna soluzione madre è stata diluita 100 volte con il terreno di coltura per raggiungere una concentrazione rispettivamente di 100 e 20 μ M. Successivamente, sono state preparate diluizioni successive con il terreno di coltura contenente l'1% di DMSO. I pozzetti per il controllo negativo sono stati trattati con il terreno di coltura + 1% di DMSO. Dopo 6 o 24 ore, il terreno di coltura di ciascun pozzetto è stato sostituito con 0,2 ml di terreno fresco. Dopo un totale di 72 ore dal trattamento, il terreno di coltura è stato rimosso da ciascun pozzetto e sono stati aggiunti 0,2 ml di soluzione di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difenil tetrazolio bromuro (MTT) a 2 mg/ml. Dopo un'incubazione di 2 ore e 30 minuti a 37 °C, la soluzione di MTT è stata rimossa da ciascun pozzetto e sono stati aggiunti 0,15 ml di DMSO. L'assorbanza è stata misurata a $\lambda = 570$ nm utilizzando uno spettrofotometro BioTek Synergy HT

MicroPlate Reader (Winooski, Vermont, USA) dopo agitazione per 20 secondi. La densità ottica nel gruppo di controllo (cellule non trattate) è stata considerata come vitalità al 100%. La vitalità cellulare relativa (%) è stata calcolata come $(OD_{570} \text{ dei pozzetti trattati} / OD_{570} \text{ dei pozzetti non trattati}) * 100$. Sono state quindi generate curve dose-dipendenti per gli studi di citotossicità. La concentrazione inibitoria al 50% (IC₅₀) è stata determinata mediante analisi di regressione non lineare con un modello a tre parametri utilizzando GraphPad Prism 8 (San Diego, CA, USA). Ogni esperimento è stato eseguito almeno tre volte in triplicato. I dati sono presentati come medie $\pm$ deviazione standard (DS). Il confronto statistico delle differenze tra i gruppi di dati è stato effettuato mediante analisi della varianza a due vie (ANOVA) utilizzando GraphPad Prism 8 (San Diego, CA, USA). Valori di $p < 0,05$ sono stati considerati statisticamente significativi e valori di $p < 0,01$ altamente significativi.

Capitolo V

DISCUSSIONE DEI RISULTATI

5.1 Ottimizzazione della sintesi di APF1

La sintesi del composto oggetto di studio è stata impostata a partire dalla procedura riportata in letteratura dal gruppo di ricerca in cui ho svolto la mia tesi [38] per la preparazione del 6-(4-amminofenossi)-2-(3-fenossifenil)-4H-cromen-4-one. La strategia sintetica prevede una sequenza multistep nella quale il nucleo flavonico viene costruito a partire da un intermedio acetofenonico opportunamente funzionalizzato, seguito da condensazione aldolica con il corrispondente benzaldeide, ciclizzazione ossidativa e, infine, riduzione selettiva del gruppo nitro ad ammina.

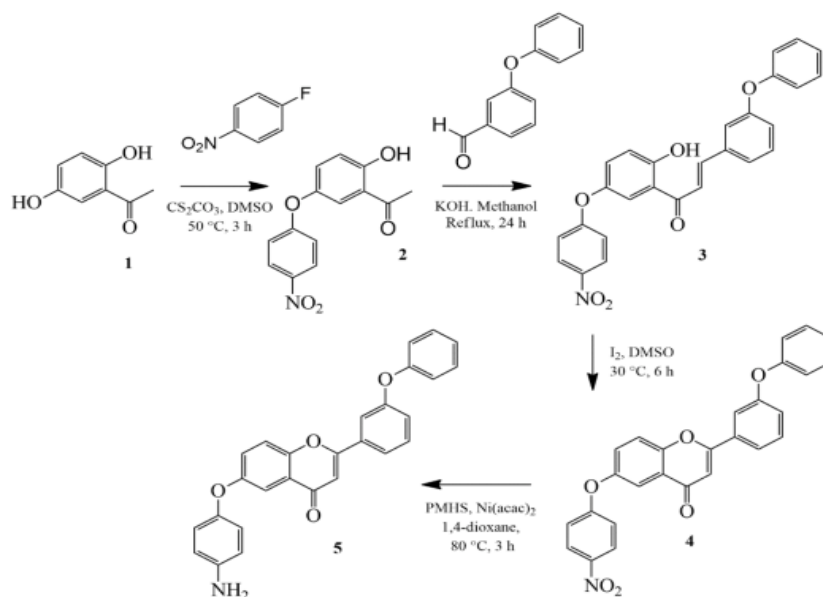


Figura 18. Schema sintesi APF1

Nell'articolo di riferimento, il primo passaggio consiste nell'O-arilazione del 2,5-diidrossiacetofenone con 4-fluoronitrobenzene, in presenza di carbonato di cesio in DMSO, a 50 °C per 24 h, per ottenere il 2-idrossi-5-(4-nitrofenossi) acetofenone con resa del 70%. La reazione è una sostituzione nucleofila aromatica sul 4-fluoronitrobenzene; la presenza del gruppo nitro in posizione para rispetto al fluoro rende l'anello aromatico fortemente elettron-povero e facilita l'attacco del fenossido, con formazione di un intermedio di Meisenheimer e successiva eliminazione dello ione fluoruro. La formazione del legame aril-O-arile dipende dalla generazione di una specie fenossidica sufficientemente nucleofila e dalla sua capacità di reagire selettivamente con il 4-fluoronitrobenzene.

Questo primo step rappresenta un passaggio chiave dell'intera sintesi, poiché introduce sull'anello aromatico il gruppo 4-nitrofenossi, che verrà poi convertito nel corrispondente gruppo 4-amminofenossi nel composto finale. Tuttavia, la trasformazione non è banale dal punto di vista regioselettivo, in quanto il 2,5-diidrossiacetofenone presenta due gruppi fenolici potenzialmente reattivi: un gruppo ossidrilico in posizione orto rispetto al gruppo acetile e un secondo gruppo ossidrilico in posizione meta. La formazione selettiva dell'etere arilico in posizione 5, con mantenimento libero dell'OH orto rispetto all'acetile, è essenziale per il corretto proseguimento della sequenza sintetica,

poiché tale gruppo ossidrilico è necessario nei successivi passaggi di condensazione e ciclizzazione verso il nucleo flavonico.

Nel caso del 2,5-diidrossiacetofenone, la regioselettività della reazione è influenzata dal diverso comportamento dei due gruppi fenolici, che non dipende esclusivamente dalla loro acidità relativa, ma dal bilancio tra acidità, accessibilità e nucleofilicità delle specie generate. L'OH in posizione orto rispetto al gruppo acetile può instaurare un legame a idrogeno intramolecolare con l'ossigeno carbonilico; questa interazione contribuisce a stabilizzare la forma neutra del substrato e può favorire anche la stabilizzazione della corrispondente base coniugata, eventualmente attraverso interazioni con il carbonile e/o con il controione metallico. Tuttavia, una maggiore facilità di deprotonazione non implica necessariamente una maggiore reattività nella successiva O-arilazione. Al contrario, il fenossido orto-acetilico, proprio perché stabilizzato da interazioni intramolecolari, può risultare meno disponibile come nucleofilo nei confronti dell'aril fluoruro.

Il gruppo ossidrilico in posizione meta rispetto all'acetile, invece, non è coinvolto nello stesso tipo di interazione intramolecolare con il carbonile e può quindi generare una specie fenossidica più accessibile e maggiormente disponibile per l'attacco nucleofilo al 4-fluoronitrobenzene. La selettività osservata può quindi essere razionalizzata considerando che l'OH orto-acetilico

risulta, in un certo senso, “protetto” o disattivato da interazioni intramolecolari, mentre l’OH in posizione 5 è più libero e viene preferenzialmente coinvolto nella formazione dell’etere arilico desiderato.

Nella procedura modificata è stato impiegato tert-butossido di potassio in quantità leggermente superiore a due equivalenti. Tale scelta è connessa alla necessità di favorire la formazione di una concentrazione adeguata di specie fenossidiche reattive in un sistema bifunzionale. L’impiego di una quantità di base superiore allo stechiometrico consente quindi di spostare gli equilibri acido-base verso la formazione del fenossido nucleofilo responsabile dell’attacco al 4-fluoronitrobenzene, accelerando la trasformazione. In questo contesto, la regioselettività della reazione non deriva semplicemente dalla deprotonazione preferenziale di uno dei due gruppi ossidrilici, ma dal diverso compromesso tra stabilità dell’anione e nucleofilicità effettiva. La scelta della base rappresenta un elemento cruciale nell’ottimizzazione del primo passaggio. Rispetto al carbonato di cesio utilizzato nella procedura di riferimento, il tert-butossido di potassio garantisce una deprotonazione più efficiente dei gruppi fenolici e consente di ridurre sensibilmente il tempo di reazione, operando a temperatura prossima a quella ambiente. Tuttavia, la maggiore basicità di t-BuOK può favorire anche processi collaterali, quali enolizzazione della funzione acetilica, ossidazione dei fenoli o formazione di specie radicaliche,

con conseguente comparsa di materiali scuri e catramosi. Tali “pecie nere” possono essere attribuite alla formazione di miscele complesse di prodotti di degradazione, ossidazione o oligomerizzazione, probabilmente favorite dalla presenza di ossigeno, luce e condizioni fortemente basiche. Per questo motivo, la reazione è stata condotta in atmosfera di argon, al riparo dalla luce e in presenza di TEMPO, utilizzato come scavenger radicalico. L’aggiunta di TEMPO ha verosimilmente contribuito a limitare la propagazione di processi radicalici indesiderati, rendendo la miscela di reazione più pulita e facilitando l’isolamento del prodotto desiderato.

Rispetto alla procedura riportata in letteratura, le condizioni adottate nel presente lavoro possono essere considerate più vantaggiose anche in termini di sostenibilità operativa. Infatti, pur mantenendo una resa isolata pari al 70%, sovrapponibile a quella descritta per la procedura originale, la reazione è stata condotta in tempi sensibilmente più brevi, 4 h anziché 24 h, e a temperatura prossima a quella ambiente, senza necessità di riscaldamento a 50 °C. Tali aspetti comportano una riduzione del consumo energetico e rendono il processo più pratico ed efficiente dal punto di vista sperimentale.

Dopo l’ottenimento dell’intermedio 2-idrossi-5-(4-nitrofenossi) acetofenone, la sintesi è proseguita secondo la strategia riportata in [38].

Il secondo passaggio prevede una condensazione aldolica di tipo Claisen-Schmidt tra l'acetofenone funzionalizzato e il 3-fenossibenzaldeide, in presenza di idrossido di potassio in metanolo. Tale reazione consente di introdurre il secondo frammento aromatico necessario alla costruzione del derivato flavonico finale, portando alla formazione della corrispondente calcone nitrofenossilata.

Dal punto di vista meccanicistico, la trasformazione procede attraverso la deprotonazione del gruppo metilico in α al carbonile dell'acetofenone, con formazione dell'enolato corrispondente. Quest'ultimo attacca il carbonile aldeidico del 3-fenossibenzaldeide, generando un intermedio β -idrossicarbonilico che, nelle condizioni basiche di reazione, va incontro a disidratazione. Il prodotto finale di questo passaggio è quindi un sistema α , β -insaturo carbonilico, stabilizzato dalla coniugazione estesa con entrambi gli anelli aromatici. La formazione preferenziale dell'isomero E è coerente con la maggiore stabilità geometrica della calcone, nella quale i due sistemi aromatici risultano più distanziati e le repulsioni steriche sono ridotte.

Questo intermedio rappresenta un punto nodale della sintesi, poiché contiene già tutti gli elementi strutturali principali del composto finale: il nucleo aromatico derivante dal 2,5-diidrossiacetofenone, il gruppo 4-nitrofenossi introdotto nel primo passaggio e il sostituito 3-fenossifenilico derivante

dall'aldeide. Inoltre, il mantenimento del gruppo ossidrilico in orto rispetto al carbonile, ottenuto grazie alla selettività del primo step, è fondamentale per permettere la successiva ciclizzazione ossidativa verso il sistema flavonico.

Il terzo passaggio consiste infatti nella conversione della calcone nel corrispondente flavone mediante ciclizzazione ossidativa in presenza di iodio in DMSO. Nella procedura descritta in letteratura, la calcone viene trattata con I_2 in DMSO a 130 °C per 6 h, ottenendo il nitroflavone corrispondente con resa del 78%. Questa trasformazione permette la formazione dell'anello cromen-4-onico caratteristico dei flavoni e rappresenta il passaggio in cui viene effettivamente costruito il nucleo eterociclico finale.

Dal punto di vista chimico, la reazione è una ciclizzazione ossidativa intramolecolare. Il gruppo ossidrilico in orto rispetto al carbonile svolge un ruolo essenziale, poiché può partecipare all'attacco intramolecolare sul sistema α , β -insaturo della calcone, favorendo la chiusura dell'anello. Lo iodio, in combinazione con il DMSO, agisce da sistema ossidante/promotore della ciclizzazione, consentendo la conversione dell'intermedio calconico nel corrispondente flavone. La necessità di mantenere libero l'OH orto nel primo passaggio trova quindi piena giustificazione proprio in questo step: se tale gruppo fosse stato arilato, la ciclizzazione verso il nucleo flavonico non avrebbe potuto avvenire correttamente.

L'intermedio così ottenuto è il nitroderivato flavonico, che costituisce il precursore diretto del composto finale amminico. Nell'articolo di riferimento, la riduzione del gruppo nitro viene effettuata utilizzando $\text{Ni}(\text{acac})_2$ e polimetilidrosilossano, PMHS, in diossano a 80 °C per 12 h, fornendo il composto amminico finale con resa del 72%. Nel presente lavoro, invece, questo passaggio è stato modificato impiegando zinco metallico in presenza di acido acetico glaciale, in diclorometano, a temperatura ambiente e al riparo dalla luce.

In particolare, il nitroflavone è stato disciolto in diclorometano e trattato con acido acetico glaciale e zinco metallico, aggiunto in quattro porzioni successive a intervalli di 5 minuti. La scelta di suddividere l'aggiunta dello zinco è utile per rendere più controllato il decorso della reazione, evitando un'eccessiva concentrazione iniziale del riducente e favorendo una riduzione progressiva del gruppo nitro. La reazione è stata condotta a circa 20 °C per 2 h, quindi in condizioni sensibilmente più blande rispetto alla procedura riportata in letteratura.

La riduzione con Zn/AcOH rappresenta una metodica classica per la conversione di gruppi nitro aromatici in ammine aromatiche. In ambiente acido, lo zinco agisce da riducente trasferendo elettroni al gruppo nitro, mentre l'acido acetico fornisce protoni necessari per la progressiva trasformazione del gruppo

–NO₂ attraverso intermedi parzialmente ridotti, come nitroso e idrossilammina, fino alla formazione dell'ammina aromatica. La presenza di un acido debole come l'acido acetico consente di mantenere condizioni sufficientemente protonanti per favorire la riduzione, ma non drasticamente acide, limitando il rischio di degradazione del nucleo flavonico o dei legami aril-etere presenti nella molecola.

Rispetto alla procedura originale, la modifica introdotta presenta diversi aspetti migliorativi. Innanzitutto, la reazione avviene a temperatura ambiente, senza necessità di riscaldamento a 80 °C, e in un tempo molto più breve, 2 h invece di 12 h. Inoltre, la resa isolata del prodotto finale è risultata pari al 90%, superiore a quella riportata nell'articolo per la riduzione con Ni(acac)₂/PMHS. Questi dati indicano che, nelle condizioni adottate, il sistema Zn/AcOH è risultato più efficiente sia dal punto di vista della conversione sia da quello dell'isolamento del prodotto.

Un ulteriore vantaggio riguarda la semplicità operativa. L'impiego di zinco metallico e acido acetico evita l'utilizzo di un catalizzatore metallico di nichel e del PMHS, rendendo il sistema riducente più semplice da gestire. Al termine della reazione, i residui solidi di zinco possono essere rimossi mediante semplice filtrazione, e il prodotto può essere isolato dopo estrazione e

purificazione cromatografica. La procedura risulta quindi più rapida, meno energivora e più facilmente applicabile su scala preparativa.

È tuttavia opportuno discutere anche alcuni limiti della modifica. Lo zinco viene impiegato in eccesso rispetto al substrato e genera residui inorganici che devono essere correttamente rimossi e smaltiti. Inoltre, il diclorometano non è un solvente ideale dal punto di vista della sostenibilità. Pertanto, anche in questo caso, più che definire la procedura pienamente “green”, è più corretto affermare che essa risulta migliorata sotto il profilo dell’efficienza operativa, della rapidità e del consumo energetico rispetto alla metodica di partenza.

Nel complesso, la modifica del passaggio di riduzione rappresenta uno degli aspetti più rilevanti dell’ottimizzazione sintetica. La sostituzione del sistema $\text{Ni}(\text{acac})_2/\text{PMHS}$ con Zn/AcOH ha consentito di ottenere il composto amminico finale in condizioni più blande, con tempi di reazione ridotti e con una resa superiore. Questo risultato è particolarmente significativo perché il passaggio finale della sintesi incide direttamente sulla disponibilità del composto target per le successive fasi di caratterizzazione e valutazione biologica.

5.2 Formazione delle micelle e analisi di efficienza di incapsulamento

La molecola APF1, pur presentando un'interessante attività biologica, è caratterizzata da una struttura fortemente aromatica e da una marcata lipofilia, aspetti che possono limitarne la dispersione in ambiente acquoso e, di conseguenza, la biodisponibilità e l'impiego in saggi biologici condotti in mezzo acquoso. Per questo motivo, dopo la sintesi e la caratterizzazione del composto, è stata valutata la possibilità di veicolare APF1 mediante un sistema di drug delivery basato su micelle polimeriche.

Le micelle polimeriche rappresentano una strategia particolarmente adatta per il trasporto di molecole scarsamente solubili in acqua, poiché sono costituite da copolimeri anfifilici in grado di autoassemblarsi spontaneamente in ambiente acquoso. Durante l'autoassemblaggio, le porzioni idrofobiche del polimero tendono a organizzarsi nella regione interna della micella, formando un core capace di ospitare molecole lipofile, mentre le catene idrofile, generalmente a base di polietilenglicole, si dispongono verso l'esterno, contribuendo alla stabilizzazione colloidale del sistema in acqua.

Nel presente lavoro è stato scelto il copolimero a blocchi mPEG-b-p(HPMA-Bz), costituito da un blocco idrofilo di metossi-polietilenglicole e da un blocco più idrofobico di poli[N-(2-idrossipropil)metacrilammide] funzionalizzato con gruppi benzilici. La scelta di questo polimero è stata guidata dalla natura

strutturale di APF1, che presenta diversi anelli aromatici e quindi potrebbe interagire favorevolmente con il core benzilico della micella. In particolare, la presenza di gruppi aromatici nel blocco idrofobico del polimero può favorire interazioni non covalenti con APF1, tra cui interazioni idrofobiche e possibili interazioni π - π stacking tra i sistemi aromatici del farmaco e i gruppi benzilici del polimero. Queste interazioni possono contribuire a migliorare l'incorporazione del composto nel core micellare e a stabilizzare la formulazione.

Le micelle sono state preparate mediante nanoprecipitazione, una tecnica basata sul rapido cambiamento di solubilità del copolimero quando una soluzione organica contenente il polimero, eventualmente associato al farmaco, viene introdotta in una fase acquosa. In queste condizioni, il blocco idrofobico tende ad aggregarsi formando il core della micella, mentre il blocco PEGilato rimane esposto verso l'ambiente acquoso, stabilizzando la nanoparticella.

Per la preparazione delle micelle, sia il polimero sia APF1 sono stati disciolti in un solvente organico miscibile con l'acqua, nel presente caso THF. A partire da queste soluzioni sono state preparate sia micelle vuote, contenenti solo il polimero, sia micelle caricate con APF1. La formazione delle micelle è stata ottenuta mediante gocciolamento lento e controllato della soluzione organica in acqua, mantenuta sotto agitazione medio-elevata. La velocità di aggiunta

rappresenta un parametro importante, poiché può influenzare il processo di autoassemblaggio e, di conseguenza, le dimensioni finali delle micelle. Un'aggiunta troppo rapida può infatti favorire una precipitazione meno controllata del polimero e portare alla formazione di aggregati più eterogenei, mentre un gocciolamento graduale consente una dispersione più uniforme del solvente organico nella fase acquosa.

Al termine della nanoprecipitazione, le sospensioni micellari sono state mantenute in agitazione per almeno 24 h, al fine di favorire l'evaporazione del THF residuo e stabilizzare il sistema colloidale. La corretta formazione delle micelle è stata successivamente valutata mediante analisi DLS, utile per determinare le dimensioni idrodinamiche delle particelle e la distribuzione dimensionale del sistema.

Seguendo il protocollo descritto nella sezione Materiali e Metodi, sono state effettuate due preparazioni micellari caricate con APF1, variando il rapporto farmaco/polimero. In particolare, sono state utilizzate rispettivamente quantità nominali di 1 mg e 5 mg di APF1 in presenza di 10 mg di polimero. Sono state inoltre preparate micelle vuote, prive di farmaco, utilizzate come controllo per valutare il contributo del solo polimero nelle successive analisi spettrofotometriche.

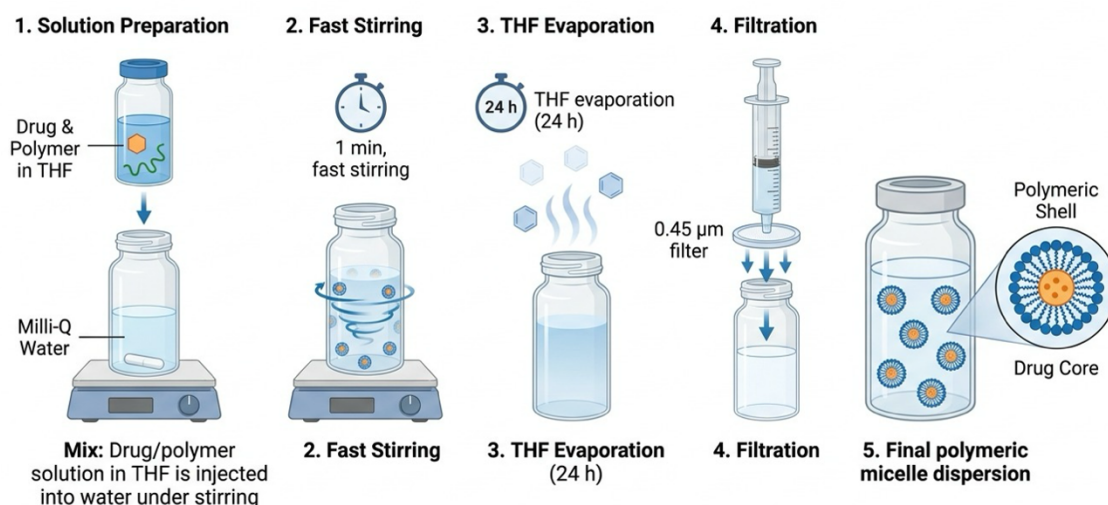


Figura 19. Protocollo preparazione micelle (FigureLabs.Ai generated)

Dopo la preparazione, le micelle sono state analizzate mediante spettrofotometria UV-Vis per determinare la concentrazione di APF1 effettivamente incorporata nel sistema e valutare l'efficienza di incapsulamento. Le misure sono state condotte a due lunghezze d'onda: 300 nm, corrispondente al massimo di assorbimento di APF1, e 275 nm, dove assorbono sia il polimero sia il composto. Poiché a 275 nm è presente una sovrapposizione tra il contributo del polimero e quello di APF1, la concentrazione del polimero è stata calcolata sottraendo il contributo dell'assorbanza del farmaco secondo la formula riportata nella sezione Materiali e Metodi.

Le micelle vuote hanno mostrato un'assorbanza a 300 nm pari a 0,018, confermando che il contributo del polimero a questa lunghezza d'onda è

trascurabile. A 275 nm, invece, è stata misurata un'assorbanza di $0,298 \pm 0,014$, corrispondente a una concentrazione di polimero pari a $8,9 \pm 0,2$ mg/mL.

Le micelle preparate utilizzando 1 mg/mL di APF1 hanno mostrato un'assorbanza a 300 nm pari a $0,547 \pm 0,001$ e un'assorbanza a 275 nm pari a $1,052 \pm 0,009$. Da questi valori è stata ricavata una concentrazione di farmaco pari a $0,88 \pm 0,002$ mg/mL e una concentrazione di polimero pari a $7,4 \pm 0,2$ mg/mL. In questo caso, la quantità di APF1 incorporata risulta molto vicina alla quantità inizialmente utilizzata nella preparazione, indicando un'elevata capacità del sistema micellare di inglobare il composto alle condizioni sperimentali adottate.

Diversamente, le micelle preparate utilizzando 5 mg/mL di APF1 hanno mostrato un'assorbanza a 300 nm pari a $0,371 \pm 0,016$ e un'assorbanza a 275 nm pari a $0,844 \pm 0,030$. L'elaborazione dei dati ha fornito una concentrazione di farmaco pari a $0,59 \pm 0,03$ mg/mL e una concentrazione di polimero pari a $10,2 \pm 0,4$ mg/mL. Nonostante la quantità nominale di APF1 impiegata fosse superiore, la concentrazione finale di farmaco incorporato è risultata inferiore rispetto alla formulazione preparata con 1 mg/mL. Questo risultato suggerisce che concentrazioni troppo elevate di farmaco possono interferire con il processo di autoassemblaggio del copolimero, favorendo la formazione di aggregati meno stabili o più eterogenei. Alla luce di questi risultati, la

formulazione preparata con 1 mg/mL di APF1 appare più efficiente, poiché consente di ottenere una concentrazione di farmaco incapsulato prossima a quella teorica, mantenendo al tempo stesso una buona concentrazione di polimero nel sistema micellare.

	EE%	DL%
Micelle 1 mg /ml	88	10.6
Micelle 5 mg /ml	12	6

Tabella 2. Risultati efficienza di incapsulamento e drug loading

La Tabella 2 riporta i valori di efficienza di incapsulamento, EE%, e di drug loading, DL%, calcolati a partire dai dati ottenuti mediante spettrofotometria UV-Vis. L'EE% rappresenta la percentuale di APF1 effettivamente incorporata nelle micelle rispetto alla quantità iniziale di farmaco utilizzata, mentre il DL% indica la percentuale di farmaco presente nella formulazione rispetto alla quantità totale di farmaco e polimero. I risultati mostrano che le micelle preparate con 1 mg/mL di APF1 presentano un'elevata efficienza di incapsulamento, pari all'88%, e un DL del 10,6%. Al contrario, l'aumento della quantità iniziale di APF1 a 5 mg/mL determina una netta riduzione dell'EE%, pari al 12%, e un DL del 6%, indicando che il sistema micellare non è in grado di incorporare efficacemente l'eccesso di farmaco.

5.3 Analisi dimensionale e di polidispersività con DLS

Le analisi condotte mediante Dynamic Light Scattering (DLS) hanno permesso di valutare la stabilità dimensionale delle micelle polimeriche nel tempo, attraverso la determinazione del diametro idrodinamico medio e dell'indice di polidispersità (PDI). Le misurazioni sono state effettuate in diverse condizioni: al tempo iniziale, dopo 72 ore, dopo 144 ore, corrispondenti a 6 giorni, e infine dopo trattamento di sterilizzazione mediante esposizione ai raggi UV. Quest'ultimo trattamento è stato considerato in quanto, trattandosi di preparazioni micellari disperse in acqua, risulta necessario limitare il rischio di contaminazione batterica prima dell'impiego nei saggi cellulari.

Le micelle vuote al tempo iniziale mostrano un diametro medio pari a $78,7 \pm 0,7$ nm, associato a un PDI di $0,101 \pm 0,009$, indicando la presenza di una popolazione omogenea e ben definita. Tali valori non subiscono variazioni rilevanti nel tempo: dopo 72 ore il diametro medio risulta pari a $75,3 \pm 0,6$ nm, mentre dopo 144 ore si osserva un valore di $78,4 \pm 0,9$ nm, con PDI rispettivamente pari a $0,101 \pm 0,021$ e $0,114 \pm 0,016$. Anche in seguito alla sterilizzazione UV, le micelle vuote mantengono dimensioni comparabili, pari a $75,8 \pm 1,2$ nm, e un PDI di $0,115 \pm 0,013$, confermando una buona stabilità del sistema e l'assenza di fenomeni evidenti di aggregazione.

Le micelle caricate con 1 mg/mL di farmaco presentano, al tempo iniziale, un diametro medio di $77,1 \pm 0,4$ nm e un PDI di $0,12 \pm 0,04$. Questi valori risultano molto simili a quelli osservati per le micelle vuote, suggerendo che l'incorporazione del farmaco non determini alterazioni significative della struttura micellare. Dopo 72 e 144 ore si osserva una lieve riduzione delle dimensioni, con valori rispettivamente pari a $75,6 \pm 1,1$ nm e $74,7 \pm 1,1$ nm, accompagnata da una diminuzione del PDI fino a $0,09 \pm 0,01$ a 144 ore. Anche dopo trattamento UV, la formulazione mantiene un diametro medio stabile, pari a $76,5 \pm 1,4$ nm, con un PDI di $0,09 \pm 0,02$. Un comportamento analogo si osserva per le micelle caricate con 5 mg/mL di farmaco, che al tempo iniziale mostrano dimensioni leggermente inferiori rispetto alle altre formulazioni, pari a $66,7 \pm 0,6$ nm, e un PDI molto basso, pari a $0,054 \pm 0,007$. Tale distribuzione dimensionale particolarmente stretta suggerisce la formazione di un sistema micellare uniforme e ben organizzato. La riduzione del diametro medio e del PDI rispetto alle micelle vuote potrebbe indicare che una maggiore quantità di farmaco incorporato contribuisca a una maggiore compattazione della struttura micellare. Anche in questo caso, la stabilità nel tempo risulta elevata: dopo 72 ore il diametro medio è pari a $66,5 \pm 0,2$ nm, mentre dopo 144 ore risulta pari a $65,7 \pm 0,4$ nm. Dopo sterilizzazione UV si osservano valori ancora

comparabili, pari a $67,3 \pm 1,1$ nm, con un PDI di $0,04 \pm 0,02$, il più basso tra quelli registrati per le formulazioni analizzate.

	t0 h		t72 h		t144 h		Dopo sterilizzazione UV	
	Size	PDI	Size	PDI	Size	PDI	Size	PDI
Micelle vuote	78.7 ± 0.7	0.101 ± 0.009	75.3 ± 0.6	0.101 ± 0.021	78.4 ± 0.9	0.114 ± 0.016	75.8 ± 1.2	0.115 ± 0.013
1 mg/ml	77.1 ± 0.4	0.12 ± 0.04	75.6 ± 1.1	0.083 ± 0.003	74.7 ± 1.1	0.09 ± 0.01	76.5 ± 1.4	0.09 ± 0.02
5 mg/ml	66.7 ± 0.6	0.054 ± 0.007	66.5 ± 0.2	0.043 ± 0.008	65.7 ± 0.4	0.05 ± 0.01	67.3 ± 1.1	0.04 ± 0.02

Tabella 4 - Risultati analisi DLS

Nel complesso, i dati ottenuti mediante DLS dimostrano che tutte le formulazioni micellari presentano una buona stabilità colloidale per almeno 144 ore, senza evidenti fenomeni di aggregazione o variazioni dimensionali significative. Inoltre, il trattamento di sterilizzazione UV non sembra compromettere le caratteristiche dimensionali e di polidispersità dei sistemi preparati. Questi risultati indicano che le micelle sviluppate possiedono proprietà favorevoli per applicazioni di drug delivery, in quanto presentano dimensioni inferiori a 100 nm, una distribuzione dimensionale omogenea e una buona stabilità nel tempo. Tali caratteristiche risultano particolarmente rilevanti in ambito oncologico, poiché possono favorire la permanenza del sistema in dispersione acquosa e, potenzialmente, l'accumulo nei tessuti tumorali attraverso meccanismi di permeabilità e ritenzione aumentata.

5.4 Analisi di citotossicità cellulare

Per valutare l'attività biologica di APF1, sia in forma libera sia incapsulato all'interno delle micelle polimeriche, è stata utilizzata la linea cellulare A549, derivata da carcinoma polmonare non a piccole cellule umano, comunemente impiegata come modello in vitro per lo studio di nuovi composti ad attività antitumorale nei confronti del NSCLC.

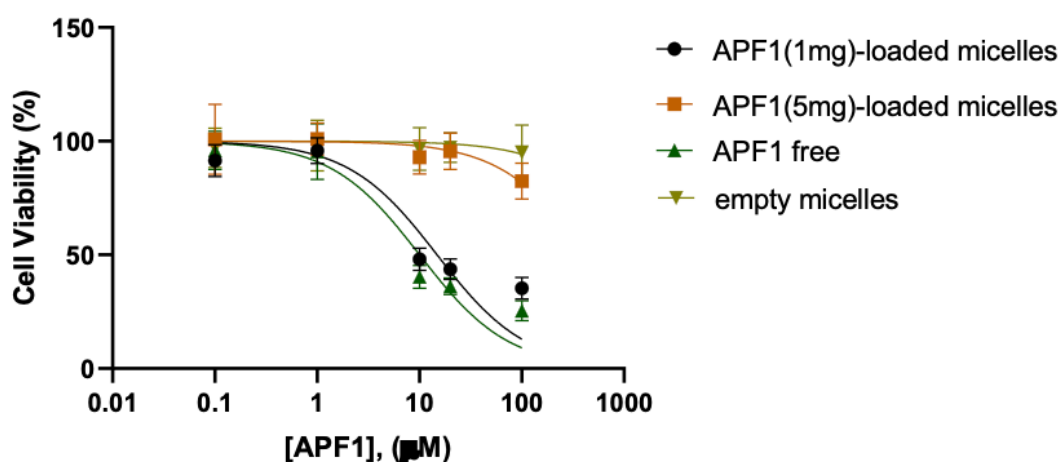


Figura 10 - Curva dose-risposta vitalità cellulare

I risultati ottenuti mediante saggio MTT hanno evidenziato che le micelle vuote, alle concentrazioni testate, non inducono effetti citotossici significativi sulla linea cellulare A549. Questo dato conferma la buona biocompatibilità del carrier polimerico e suggerisce che l'eventuale attività biologica osservata nelle formulazioni caricate sia attribuibile principalmente alla presenza del composto attivo.

APF1 libero ha mostrato un'attività citotossica dose-dipendente, evidenziata da una curva dose-risposta ben definita, con un valore di IC_{50} pari a $10,2 \pm 2,8 \mu M$. Tale parametro indica la concentrazione di composto necessaria per ridurre del 50% la vitalità cellulare rispetto al controllo non trattato. Un profilo analogo è stato osservato per le micelle caricate con 1 mg/mL di APF1: in questo caso, la curva dose-risposta risulta quasi sovrapponibile a quella del farmaco libero e il valore di IC_{50} è pari a $15,2 \pm 3,2 \mu M$. Sebbene leggermente superiore rispetto ad APF1 libero, questo valore suggerisce che l'incapsulamento all'interno delle micelle non comprometta in modo significativo l'attività citotossica del composto.

Al contrario, le micelle caricate con 5 mg/mL di APF1 hanno mostrato un comportamento nettamente diverso. La curva dose-risposta risulta infatti simile a quella osservata per le micelle vuote e il valore di IC_{50} è superiore a $150 \mu M$, indicando una marcata riduzione dell'efficacia citotossica della formulazione. Questo risultato appare coerente con i dati di incapsulamento, poiché la bassa efficienza di caricamento ottenuta per questa formulazione determina una ridotta quantità di farmaco effettivamente disponibile per interagire con le cellule, rendendo il sistema meno efficace.

Nel complesso, i dati di citotossicità individuano la formulazione contenente 1 mg/mL di APF1 come la più promettente, in quanto combina una buona

efficienza di incapsulamento con un'attività citotossica paragonabile a quella del farmaco libero. Le micelle polimeriche si confermano quindi un sistema di delivery potenzialmente adatto alla veicolazione di APF1, capace di preservarne l'attività biologica e, al tempo stesso, di mantenere una buona biocompatibilità del carrier.

Capitolo VI

CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI

Il presente lavoro di tesi ha avuto come obiettivo la sintesi, l'ottimizzazione e la nanoformulazione di APF1, un derivato flavonico contenente un gruppo 4'-amminofenossi, precedentemente individuato come molecola di interesse per il trattamento del carcinoma polmonare non a piccole cellule. Il lavoro si inserisce in un contesto di ricerca volto allo sviluppo di nuove molecole bioattive e di strategie di drug delivery capaci di migliorarne il profilo applicativo, in particolare nel caso di composti caratterizzati da scarsa solubilità o limitata dispersione in ambiente acquoso. Nella prima parte del lavoro sperimentale è stata affrontata la sintesi di APF1 attraverso una sequenza multistep, a partire da una procedura già riportata in letteratura. Alcuni passaggi sono stati modificati con l'obiettivo di rendere la procedura più efficiente e più facilmente applicabile in laboratorio. In particolare, l'ottimizzazione dello step di O-arilazione ha consentito di ottenere l'intermedio chiave in condizioni sperimentali più favorevoli, mentre la modifica dello step finale di riduzione del gruppo nitro ad ammina ha permesso di lavorare in condizioni più blande e con maggiore semplicità operativa. Nel complesso, queste modifiche hanno confermato la possibilità di ottenere APF1 in modo efficiente, garantendo la

disponibilità del composto per le successive fasi di formulazione e valutazione biologica.

Parallelamente alla sintesi, è stata valutata la possibilità di veicolare APF1 mediante micelle polimeriche, con l'obiettivo di migliorarne la dispersione in ambiente acquoso. La scelta del copolimero anfifilico mPEG-b-p(HPMA-Bz) è stata guidata dalle caratteristiche strutturali del composto, fortemente aromatico e lipofilo, e dalla possibile interazione tra APF1 e il core benzilico della micella. Le formulazioni ottenute mediante nanoprecipitazione hanno mostrato caratteristiche favorevoli in termini di dimensioni, polidispersità e stabilità colloidale.

Tra le condizioni analizzate, la formulazione preparata con 1 mg/mL di APF1 è risultata la più promettente, poiché ha mostrato una buona efficienza di incapsulamento, dimensioni inferiori a 100 nm, basso indice di polidispersità e stabilità nel tempo, anche dopo trattamento UV. Inoltre, nei saggi MTT condotti su cellule A549, questa formulazione ha mantenuto un'attività citotossica comparabile a quella del composto libero, suggerendo che l'incapsulamento non comprometta in modo significativo l'attività biologica di APF1. Al contrario, la formulazione preparata con 5 mg/mL di APF1 ha evidenziato una minore efficienza di incapsulamento e una ridotta attività citotossica, indicando

che un aumento della quantità iniziale di farmaco non corrisponde necessariamente a un maggiore caricamento efficace del sistema micellare.

Nel complesso, i risultati ottenuti indicano che le micelle polimeriche a base di mPEG-b-p(HPMA-Bz) possono rappresentare una piattaforma promettente per la veicolazione di APF1, permettendo di migliorarne la compatibilità con l'ambiente acquoso e di preservarne l'attività biologica. Tuttavia, i dati raccolti hanno carattere preliminare e richiedono ulteriori approfondimenti.

Gli sviluppi futuri dovranno innanzitutto riguardare l'ottimizzazione della formulazione, valutando quantità intermedie di APF1 tra 1 e 5 mg/mL, al fine di individuare il miglior rapporto farmaco/polimero. Tale approccio potrebbe consentire di aumentare il carico di farmaco senza compromettere l'efficienza di incapsulamento, la stabilità colloidale e l'attività biologica della formulazione. Sarà inoltre necessario ampliare la caratterizzazione chimico-fisica del sistema, includendo la determinazione del potenziale zeta, l'analisi morfologica mediante tecniche microscopiche, la stabilità in mezzi biologicamente rilevanti e lo studio del profilo di rilascio di APF1 dalle micelle. Dal punto di vista biologico, sarà importante estendere i saggi di citotossicità ad altre linee cellulari di NSCLC e a cellule non tumorali, per valutare in modo più completo l'efficacia e la selettività del composto libero e della formulazione micellare. Infine, saggi di uptake cellulare e localizzazione intracellulare

potranno chiarire il ruolo delle micelle nella veicolazione del composto all'interno delle cellule tumorali.

In conclusione, questo lavoro ha permesso di integrare la sintesi di una molecola flavonica ad attività antitumorale con lo sviluppo preliminare di un sistema micellare per la sua veicolazione. I risultati ottenuti costituiscono una base utile per future indagini finalizzate all'ottimizzazione della formulazione e alla valorizzazione di APF1 come potenziale candidato per applicazioni antitumorali nel trattamento del carcinoma polmonare non a piccole cellule.

BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA:

- [1] World Health Organization. WHO Classification of Tumours: Thoracic Tumours. 5th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2021.
- [2] R. S. Herbst, D. Morgensztern, e C. Boshoff, «The biology and management of non-small cell lung cancer», 24 gennaio 2018, Nature Publishing Group. doi: 10.1038/nature25183.
- [3] M. S. Tsao, A. G. Nicholson, J. J. Maleszewski, A. Marx, e W. D. Travis, «Introduction to 2021 WHO Classification of Thoracic Tumors», 1 gennaio 2022, Elsevier Inc. doi: 10.1016/j.jtho.2021.09.017.
- [4] J. R. Molina et al., «Non- Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Treatment, and Survivorship», 2008. [Online]. Disponibile su: www.mayoclinicproceedings.com.
- [5] F. Bray et al., «Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries», CA Cancer J Clin, vol. 74, fasc. 3, pp. 229–263, mag. 2024, doi: 10.3322/caac.21834.
- [6] «I AIOM, AIRTUM, Fondazione AIOM. I numeri del cancro in Italia 2024»

- [7] U. Department of Health e H. Services, «The Health Consequences of Smoking - 50 Years of Progress: A Report of the Surgeon General». [Online]. Disponibile su: www.cdc.gov/tobacco
- [8] Outdoor air pollution. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, 2016.
- [9] Hanahan D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer discovery*, 12(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- [10] Skoulidis, F., & Heymach, J. V. (2019). Co-occurring genomic alterations in non-small-cell lung cancer biology and therapy. *Nature reviews. Cancer*, 19(9), 495–509. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0179-8>
- [11] Lynch, T. J., Bell, D. W., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, R. A., Brannigan, B. W., Harris, P. L., Haserlat, S. M., Supko, J. G., Haluska, F. G., Louis, D. N., Christiani, D. C., Settleman, J., & Haber, D. A. (2004). Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *The New England*

journal of medicine, 350(21), 2129–2139.

<https://doi.org/10.1056/NEJMoa040938>

[12] Riely, G. J., Wood, D. E., Ettinger, D. S., Aisner, D. L., Akerley, W., Bauman, J. R., Bharat, A., Bruno, D. S., Chang, J. Y., Chirieac, L. R., DeCamp, M., Desai, A. P., Dilling, T. J., Dowell, J., Durm, G. A., Gettinger, S., Grotz, T. E., Gubens, M. A., Juloori, A., Lackner, R. P., ... Hang, L. (2024). Non-Small Cell Lung Cancer, Version 4.2024, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN, 22(4), 249–274. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2204.0023>

[13] Planchard, D., Popat, S., Kerr, K., Novello, S., Smit, E. F., Faivre-Finn, C., Mok, T. S., Reck, M., Van Schil, P. E., Hellmann, M. D., & Peters, S. (2019). Correction to: "Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up". Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology, 30(5), 863–870. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy474>

[14] Hirsch, F. R., Scagliotti, G. V., Mulshine, J. L., Kwon, R., Curran, W. J., Jr, Wu, Y. L., & Paz-Ares, L. (2017). Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. *Lancet* (London, England), 389(10066), 299–311.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30958-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30958-8)

[15] Zer, A., Ahn, M. J., Barlesi, F., Bubendorf, L., De Ruyscher, D., Garrido, P., Gautschi, O., Hendriks, L. E., Jänne, P. A., Kerr, K. M., Masciaux, C., Mitsudomi, T., Peters, S., Rolfo, C., Sacher, A., Senan, S., Ugalde, P., Leigh, N. B., & ESMO Guidelines Committee. Electronic address: clinicalguidelines@esmo.org (2025). Early and locally advanced non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 36(11), 1245–1262.
<https://doi.org/10.1016/j.annonc.2025.08.003>

[16] Schiller, J. H., Harrington, D., Belani, C. P., Langer, C., Sandler, A., Krook, J., Zhu, J., Johnson, D. H., & Eastern Cooperative Oncology Group (2002). Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *The New England journal of medicine*, 346(2), 92–98.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa011954>

[17] Reck, M., Rodríguez-Abreu, D., Robinson, A. G., Hui, R., Csőszi, T., Fülöp, A., Gottfried, M., Peled, N., Tafreshi, A., Cuffe, S., O'Brien, M., Rao, S., Hotta, K., Leiby, M. A., Lubiniecki, G. M., Shentu, Y., Rangwala, R., Brahmer, J. R., & KEYNOTE-024 Investigators (2016). Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. The New England journal of medicine, 375(19), 1823–1833. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1606774>

[18] Mok, T. S., Wu, Y. L., Thongprasert, S., Yang, C. H., Chu, D. T., Saijo, N., Sunpaweravong, P., Han, B., Margono, B., Ichinose, Y., Nishiwaki, Y., Ohe, Y., Yang, J. J., Chewaskulyong, B., Jiang, H., Duffield, E. L., Watkins, C. L., Armour, A. A., & Fukuoka, M. (2009). Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. The New England journal of medicine, 361(10), 947–957. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0810699>

[19] Leonetti, A., Sharma, S., Minari, R., Perego, P., Giovannetti, E., & Tiseo, M. (2019). Resistance mechanisms to osimertinib in EGFR-mutated non-small cell lung cancer. British journal of cancer, 121(9), 725–737. <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0573-8>

[20] Kobayashi, S., Boggon, T. J., Dayaram, T., Jänne, P. A., Kocher, O., Meyerson, M., Johnson, B. E., Eck, M. J., Tenen, D. G., & Halmos, B. (2005). EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. The New England journal of medicine, 352(8), 786–792. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa044238>

[21] Jamal-Hanjani, M., Wilson, G. A., McGranahan, N., Birkbak, N. J., Watkins, T. B. K., Veeriah, S., Shafi, S., Johnson, D. H., Mitter, R., Rosenthal, R., Salm, M., Horswell, S., Escudero, M., Matthews, N., Rowan, A., Chambers, T., Moore, D. A., Turajlic, S., Xu, H., Lee, S. M., ... TRACERx Consortium (2017). Tracking the Evolution of Non-Small-Cell Lung Cancer. The New England journal of medicine, 376(22), 2109–2121. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1616288>

[22] Sliwoski, G., Kothiwale, S., Meiler, J., & Lowe, E. W., Jr (2013). Computational methods in drug discovery. Pharmacological reviews, 66(1), 334–395. <https://doi.org/10.1124/pr.112.007336>

[23] Badisa, RB, Ayuk-Takem, LT, Ikediobi, CO, & Walker, EH (2006). Attività antitumorale selettiva dell'acido licamichauxioico-B puro in linee cellulari in coltura. *Pharmaceutical Biology*, 44 (2), 141–145.
<https://doi.org/10.1080/13880200600592301>

[24] Tronina, T., Bartmańska, A., Popłoński, J., Rychlicka, M., Sordon, S., Filip-Psurska, B., Milczarek, M., Wietrzyk, J., & Huszcza, E. (2023). Prenylated Flavonoids with Selective Toxicity against Human Cancers. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(8), 7408.
<https://doi.org/10.3390/ijms24087408>

[25] Zaremba-Czogalla, M., Jaromin, A., Sidoryk, K., Zagórska, A., Cybulski, M., & Gubernator, J. (2020). Evaluation of the In Vitro Cytotoxic Activity of Caffeic Acid Derivatives and Liposomal Formulation against Pancreatic Cancer Cell Lines. *Materials*, 13(24), 5813.
<https://doi.org/10.3390/ma13245813>

[26] Mahmood, M. A., Abd, A. H., & Kadhim, E. J. (2024). Assessing the cytotoxicity of phenolic and terpene fractions extracted from Iraqi *Prunus arabica* against AMJ13 and SK-GT-4 human cancer cell lines. *F1000Research*, 12, 433.

<https://doi.org/10.12688/f1000research.131336.3>

[27] [27] Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*, 5, e47.

<https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>

[28] Ullah, A., Munir, S., Badshah, S. L., Khan, N., Ghani, L., Poulson, B. G., Emwas, A. H., & Jaremko, M. (2020). Important Flavonoids and Their Role as a Therapeutic Agent. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(22), 5243.

<https://doi.org/10.3390/molecules25225243>

[29] Al-Khayri, J. M., Sahana, G. R., Nagella, P., Joseph, B. V., Alessa, F. M., & Al-Mssallem, M. Q. (2022). Flavonoids as Potential Anti-Inflammatory Molecules: A Review. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(9), 2901.

<https://doi.org/10.3390/molecules27092901>

- [30] Chagas, M. D. S. S., Behrens, M. D., Moragas-Tellis, C. J., Penedo, G. X. M., Silva, A. R., & Gonçalves-de-Albuquerque, C. F. (2022). Flavonols and Flavones as Potential anti-Inflammatory, Antioxidant, and Antibacterial Compounds. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2022, 9966750. <https://doi.org/10.1155/2022/9966750>
- [31] Kopustinskiene, D. M., Jakstas, V., Savickas, A., & Bernatoniene, J. (2020). Flavonoids as Anticancer Agents. *Nutrients*, 12(2), 457. <https://doi.org/10.3390/nu12020457>
- [32] Abotaleb, M., Samuel, S. M., Varghese, E., Varghese, S., Kubatka, P., Liskova, A., & Büsselberg, D. (2018). Flavonoids in Cancer and Apoptosis. *Cancers*, 11(1), 28. <https://doi.org/10.3390/cancers11010028>
- [33] Jeong, S. H., Kim, H. H., Ha, S. E., Park, M. Y., Bhosale, P. B., Abusaliya, A., Park, K. I., Heo, J. D., Kim, H. W., & Kim, G. S. (2022). Flavones: Six Selected Flavones and Their Related Signaling Pathways That Induce Apoptosis in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(18), 10965. <https://doi.org/10.3390/ijms231810965>

- [34] Akama, T., Shida, Y., Sugaya, T., Ishida, H., Gomi, K., & Kasai, M. (1996). Novel 5-aminoflavone derivatives as specific antitumor agents in breast cancer. *Journal of medicinal chemistry*, 39(18), 3461–3469.
<https://doi.org/10.1021/jm950938g>
- [35] Kuffel, M. J., Schroeder, J. C., Pobst, L. J., Naylor, S., Reid, J. M., Kaufmann, S. H., & Ames, M. M. (2002). Activation of the antitumor agent aminoflavone (NSC 686288) is mediated by induction of tumor cell cytochrome P450 1A1/1A2. *Molecular pharmacology*, 62(1), 143–153.
<https://doi.org/10.1124/mol.62.1.143>
- [36] Loaiza-Pérez, A. I., Kenney, S., Boswell, J., Hollingshead, M., Alley, M. C., Hose, C., ... & Sausville, E. A. (2004). Aryl hydrocarbon receptor activation of an antitumor aminoflavone: basis of selective toxicity for MCF-7 breast tumor cells. *Molecular cancer therapeutics*, 3(6), 715-725.
- [37] Cristina, M., Emiliano, L., Leonardo, S., Giulia, S., Roberta, G., Adolfo, A., Marta, S. S., Paola, S., Samuele, R., Pierluigi, S., Massimo, M., & Giovanna, M. (2022). Identification of a novel nitroflavone-based scaffold for designing mutant-selective EGFR tyrosine kinase inhibitors targeting T790M

and C797S resistance in advanced NSCLC. *Bioorganic chemistry*, 129, 106219. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2022.106219>

[38] Mobbili, G., Romaldi, B., Sabbatini, G., Amici, A., Marcaccio, M., Galeazzi, R., Laudadio, E., Armeni, T., & Minnelli, C. (2023). Identification of Flavone Derivative Displaying a 4'-Aminophenoxy Moiety as Potential Selective Anticancer Agent in NSCLC Tumor Cells. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 28(7), 3239. <https://doi.org/10.3390/molecules28073239>

[39] Cho, K., Wang, X., Nie, S., Chen, Z. G., & Shin, D. M. (2008). Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 14(5), 1310–1316. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1441>

[40] Farokhzad, O. C., & Langer, R. (2009). Impact of nanotechnology on drug delivery. *ACS nano*, 3(1), 16–20. <https://doi.org/10.1021/nn900002m>

[41] Ferrari M. (2005). Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nature reviews. Cancer*, 5(3), 161–171. <https://doi.org/10.1038/nrc1566>

- [42] Shi, J., Kantoff, P. W., Wooster, R., & Farokhzad, O. C. (2017). Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. *Nature reviews. Cancer*, 17(1), 20–37. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.108>
- [43] Matsumura, Y., & Maeda, H. (1986). A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer research*, 46(12 Pt 1), 6387–6392.
- [44] Fang, J., Nakamura, H., & Maeda, H. (2011). The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Advanced drug delivery reviews*, 63(3), 136–151. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.04.009>
- [45] Danhier, F., Feron, O., & Préat, V. (2010). To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 148(2), 135–146. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.08.027>

[46] Wu J. (2021). The Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect: The Significance of the Concept and Methods to Enhance Its Application. *Journal of personalized medicine*, 11(8), 771.
<https://doi.org/10.3390/jpm11080771>

[47] Mohanraj, V. J., & Chen, Y. (2007). Nanoparticles - A review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5(1), 561–573.
<https://doi.org/10.4314/tjpr.v5i1.14634>

[48] Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J. M., Coco, R., Le Breton, A., & Préat, V. (2012). PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 161(2), 505–522.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.01.043>

[49] Alexis, F., Pridgen, E., Molnar, L. K., & Farokhzad, O. C. (2008). Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Molecular pharmaceutics*, 5(4), 505–515.
<https://doi.org/10.1021/mp800051m>

[50] Kataoka, K., Harada, A., & Nagasaki, Y. (2001). Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. *Advanced drug delivery reviews*, 47(1), 113–131.
[https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(00\)00124-1](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(00)00124-1)

[51] Torchilin V. P. (2007). Micellar nanocarriers: pharmaceutical perspectives. *Pharmaceutical research*, 24(1), 1–16.
<https://doi.org/10.1007/s11095-006-9132-0>

[52] Gaucher, G., Dufresne, M. H., Sant, V. P., Kang, N., Maysinger, D., & Leroux, J. C. (2005). Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 109(1-3), 169–188.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.09.034>

[53] Cabral, H., & Kataoka, K. (2014). Progress of drug-loaded polymeric micelles into clinical studies. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 190, 465–476.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.06.042>

[54] Oerlemans, C., Bult, W., Bos, M., Storm, G., Nijsen, J. F., & Hennink, W. E. (2010). Polymeric micelles in anticancer therapy: targeting, imaging and triggered release. *Pharmaceutical research*, 27(12), 2569–2589. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0233-4>

[55] Discher, D. E., & Eisenberg, A. (2002). Polymer vesicles. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5583), 967–973. <https://doi.org/10.1126/science.1074972>

[56] Gref, R., Minamitake, Y., Peracchia, M. T., Trubetskoy, V., Torchilin, V., & Langer, R. (1994). Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science (New York, N.Y.)*, 263(5153), 1600–1603. <https://doi.org/10.1126/science.8128245>

[57] Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential—what they are and Burris, H. Shortcomings of current therapies for non-small-cell lung cancer: unmet medical needs. *Oncogene* 28 (Suppl 1), S4–S13 (2009). <https://doi.org/10.1038/onc.2009.196>

[58] Shi, Y., van Steenberg, M. J., Teunissen, E. A., Novo, L., Gradmann, S., Baldus, M., van Nostrum, C. F., & Hennink, W. E. (2013). Π - π stacking increases the stability and loading capacity of thermosensitive polymeric micelles for chemotherapeutic drugs. *Biomacromolecules*, 14(6), 1826–1837. <https://doi.org/10.1021/bm400234c>

[59] Bagheri, M., Bresseleers, J., Varela-Moreira, A., Sandre, O., Meeuwissen, S. A., Schiffelers, R. M., Metselaar, J. M., van Nostrum, C. F., van Hest, J. C. M., & Hennink, W. E. (2018). Effect of Formulation and Processing Parameters on the Size of mPEG- b-p(HPMA-Bz) Polymeric Micelles. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 34(50), 15495–15506. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b03576>

[60] (2005). Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes.