



PROTEINE COME “CAVALLI DI TROIA” PER IL TRASPORTO DI NANOPARTICELLE MOLECOLARI

Le nanoparticelle molecolari (NpM), come fullereni e carborani, sono sistemi ben definiti con proprietà teranostiche avanzate ma limitate da scarsa solubilità e stabilità in ambiente fisiologico. L'utilizzo di proteine come “cavalli di Troia” ne migliora la biodisponibilità, il targeting e le proprietà farmacocinetiche e farmacodinamiche, offrendo una strategia promettente per applicazioni biomediche avanzate.

Le nanoparticelle molecolari (NpM) costituiscono una classe di nanomateriali che si distinguono dalle nanoparticelle tradizionali per una caratteristica fondamentale: sono entità molecolari ben definite, dotate di struttura e formula chimica precise, analogamente alle molecole discrete [1]. Le NpM risultano particolarmente interessanti poiché presentano proprietà altamente riproducibili, consentono uno studio e una progettazione a livello molecolare, possono essere funzionalizzate in modo controllato e combinano le caratteristiche tipiche delle molecole (definizione strutturale) con quelle delle nanoparticelle (dimensioni e proprietà chimico-fisiche peculiari).

Tra queste, fullereni e carborani rappresentano esempi paradigmatici [1], grazie alla loro architettura a gabbia e alle loro proprietà intrinseche, che trovano applicazione in nanomedicina e teranostica. In particolare, la possibilità di incorporare o coordinare elementi del blocco d e f, come nei fullereni metalloendoredrici e nei metallocarborani, amplia significativamente il loro spettro applicativo. Tali sistemi possono essere impiegati nella generazione di specie reattive dell'ossigeno per terapie fotodinamiche e sonodinamiche, nella conversione di radiazione elettromagnetica in calore per applicazioni termoterapiche, nonché in radioterapia, chemioterapia e terapie avanzate anticancro, come la

terapia a cattura neutronica [1]. Parallelamente, queste NpM presentano anche proprietà intrinseche di imaging multimodale: possono mostrare segnali Raman intensi, fluorescenza o effetti fotoacustici, e fungere da agenti di contrasto per tecniche quali tomografia computerizzata, risonanza magnetica, PET e SPECT [1].

Nonostante questo notevole potenziale, il loro utilizzo è limitato da problematiche rilevanti, tra cui la scarsa solubilità in ambiente acquoso, la tendenza all'aggregazione, la dipendenza delle loro proprietà dal microambiente fisiologico, l'assorbimento cellulare aspecifico e proprietà farmacocinetiche non ottimali. Diversi sistemi di rilascio sono stati sviluppati per veicolare le NpM in ambiente fisiologico, ma presentano ancora importanti limitazioni, tra cui:

- i) procedure sintetiche complesse;
- ii) eterogeneità in dimensioni, forma e proprietà superficiali;
- iii) potenziale tossicità;
- iv) stabilità limitata;
- v) elevati costi di produzione
- vi) bassa specificità e penetrazione tissutale;
- vii) immunogenicità.

In questo contesto, l'utilizzo di proteine come vettori supramolecolari emerge come una strategia innovativa ed efficace [2-7]. Questo approccio, noto come paradigma del “cavallo di Troia”, sfrutta la

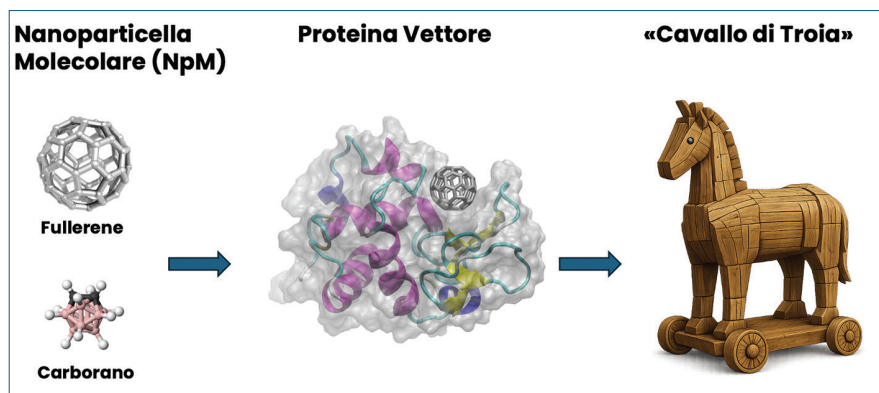


Fig. 1 - Proteine come “Cavalli di Troia” per il Trasporto di Nanoparticelle Molecolari

capacità naturale delle proteine di trasportare molecole esogene in ambiente fisiologico, mantenendo la propria identità biologica (Fig. 1).

Proteine come vettori supramolecolari: principi generali

Le proteine rappresentano vettori ideali per il trasporto supramolecolare di NpM grazie alla loro biocompatibilità, solubilità e versatilità strutturale. Agendo come “cavalli di Troia”, migliorano la solubilità e la biodisponibilità delle NpM [2-7], le proteggono dalla degradazione e dal riconoscimento immunitario e ne modulano l'assorbimento cellulare, favorendone l'accumulo nei tessuti bersaglio [2-7]. Un aspetto chiave è che l'incorporazione della NpM avviene tramite interazioni non covalenti [2-7], preservando sia la struttura della proteina sia quella della nanoparticella. Ciò evita modifiche chimiche invasive che potrebbero alterare le proprietà

intrinseche delle NpM (ad esempio le proprietà elettroniche dei fullereni) e consente di mantenere l'identità biologica della proteina. L'interazione supramolecolare tra proteine e NpM è governata da tre principi fondamentali [2-7]: complementarità geometrica, complementarità chimica e pre-organizzazione strutturale.

Le proteine possiedono tasche e cavità in grado di ospitare NpM di diverse dimensioni e forme;

la varietà degli amminoacidi consente l'instaurarsi di molteplici interazioni non covalenti (legami a idrogeno, interazioni elettrostatiche, idrofobiche e π - π); infine, l'elevato grado di pre-organizzazione strutturale riduce il costo entropico del legame, favorendo la formazione del complesso.

Interazioni tra proteine e NpM

I fullereni, costituiti da gabbie carboniose, interagiscono con le proteine principalmente tramite interazioni idrofobiche e di π - π con residui aromatici, oltre a possibili interazioni catione- π e anione- π [2-5, 8]. Nei fullereni metalloendoredici il trasferimento elettronico intramolecolare dagli atomi metallici incapsulati alla gabbia induce una distribuzione di carica sulla superficie del fullerene, modificando significativamente le modalità di interazione con le proteine [9]. In questi sistemi, le interazioni elettrostatiche, trascurabili nei fullereni C_{60} e C_{70} , diventa-

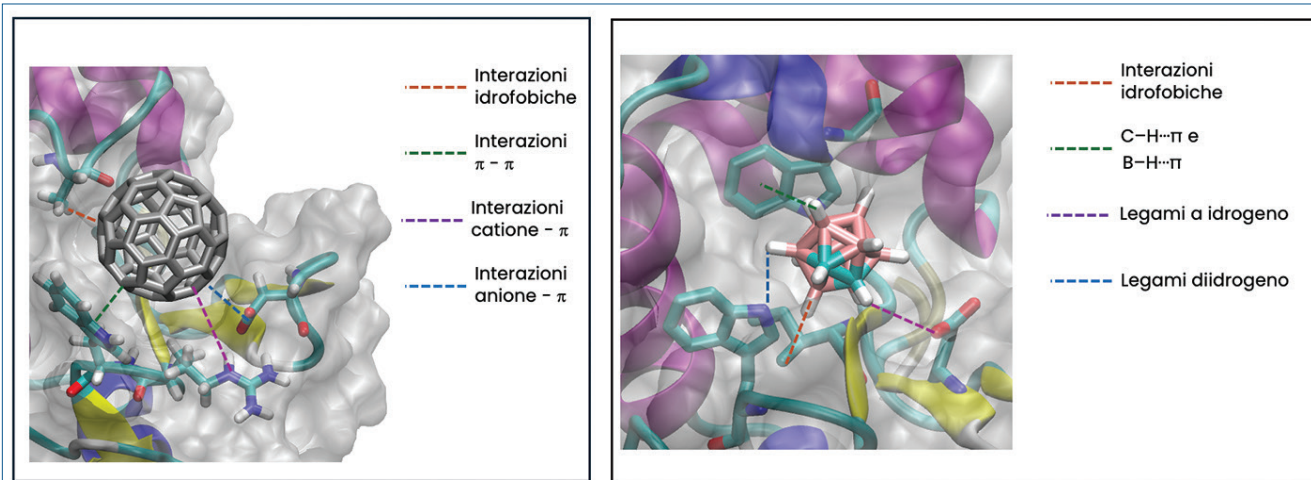


Fig. 2 - Interazioni proteine-NpM

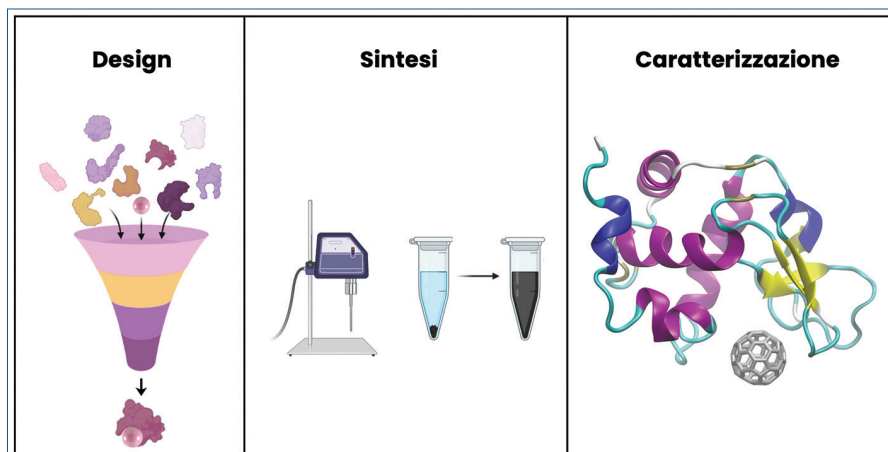


Fig. 3 - Design, sintesi e caratterizzazione dei complessi proteina-NpM

no rilevanti [9]. Nei derivati funzionalizzati dei fullereni, la modificazione chimica della gabbia tende a ridurre le interazioni π - π e idrofobiche, aumentando il contributo di legami a idrogeno e interazioni elettrostatiche, quali i ponti salini [10].

I carborani, grazie alla loro struttura poliedrica compatta e pseudo-sferica, si adattano efficacemente a piccole cavità proteiche idrofobiche [6, 7]. Essi interagiscono inoltre con residui aromatici tramite interazioni C-H $\cdots\pi$ e B-H $\cdots\pi$ [6, 7]. Oltre ai legami a idrogeno classici mediati dai protoni acidi dei gruppi C-H, i carborani possono formare legami di idrogeno, in cui gli idrogeni idridici dei gruppi B-H interagiscono con donatori di legame a idrogeno presenti nelle proteine, ampliando ulteriormente il loro repertorio di interazioni [6, 7] (Fig. 2).

Design, sintesi e caratterizzazione dei complessi proteina-NpM

L'identificazione della proteina più adatta al trasporto di una NpM rappresenta una sfida complessa. In questo contesto, il *reverse docking* costituisce uno strumento efficace per analizzare database proteici e selezionare i candidati più promettenti. Il *docking* molecolare consente di stimare l'affinità di legame e di prevedere le modalità di interazione, permettendo una progettazione razionale dei complessi proteina-NpM. È inoltre possibile sottoporre a screening virtuale database proteici per individuare proteine in grado di riconoscere una specifica NpM [3, 6, 11].

Una volta identificata la proteina trasportatrice, la sintesi degli addotti proteina-NpM viene generalmente

condotta mediante un approccio eterofasico assistito da ultrasuoni, al fine di superare l'insolubilità in acqua di fullereni e carborani [2-5, 7]. In tale sistema, le NpM sono utilizzate in forma solida, mentre le proteine sono disciolte in soluzione acquosa tamponata. L'ultrasonificazione consente una dispersione transiente delle NpM in unità monomolecolari, che possono essere catturate dalle proteine. Una volta cessato lo stimolo, le NpM rimangono confinate all'interno della protei-

na, formando addotti durevoli [2-5, 7]. La miscela viene quindi purificata mediante centrifugazione per rimuovere eventuali aggregati insolubili.

La caratterizzazione dei complessi proteina-NpM si basa su tecniche standard per lo studio delle interazioni proteina-ligando, tra cui cristallografia a raggi X, risonanza magnetica nucleare (NMR), spettrometria di massa, microscopia AFM e TEM, scattering dinamico della luce (DLS), elettroforesi e spettroscopie ottiche (UV-Vis, fluorescenza, dicroismo circolare) [2-5, 7] (Fig. 3).

Stabilità e solubilità

L'incorporazione delle NpM nelle proteine consente la loro dispersione in ambiente acquoso in forma monomolecolare, prevenendo l'aggregazione. Le proteine forniscono inoltre protezione sterica, aumentando la stabilità del sistema in condizioni fisiologiche.

Internalizzazione cellulare e targeting

Le NpM trasportate da proteine mantengono l'identità biologica del vettore, evitando la formazione di corone proteiche e consentendo un controllo più preciso dell'assorbimento cellulare. Proteine come albumina, transferrina e ferritina, i cui recettori sono sovra-espressi in cellule tumorali, possono favorire un indirizzamento selettivo. La proteina vettore può inoltre influenzare la localizzazione subcellulare della NpM.

Proprietà farmacocinetiche e farmacodinamiche

Le proprietà ADMET delle NpM possono essere modulate tramite la scelta della proteina ospite. Proteine con lunga emivita prolungano il tempo di circolazione,



mentre altre favoriscono una eliminazione più rapida. Inoltre, alcune proteine possono mediare il trasporto attraverso barriere fisiologiche, come la barriera emato-encefalica.

Traslabilità clinica

L'approccio del "cavallo di Troia" presenta vantaggi rilevanti, tra cui l'assenza di modifiche chimiche invasive, la conservazione della struttura proteica e la possibilità di sfruttare il tropismo naturale delle proteine. Le metodologie di preparazione sono compatibili con protocolli GMP, rendendo questa strategia promettente per la traslazione clinica e la medicina personalizzata (Fig. 4).

Conclusioni

L'utilizzo di proteine come "cavalli di Troia" per il trasporto di nanoparticelle molecolari rappresenta una strategia innovativa per superare le principali limitazioni delle NpM in ambito biomedico. In particolare, fullereni e carborani traggono notevoli

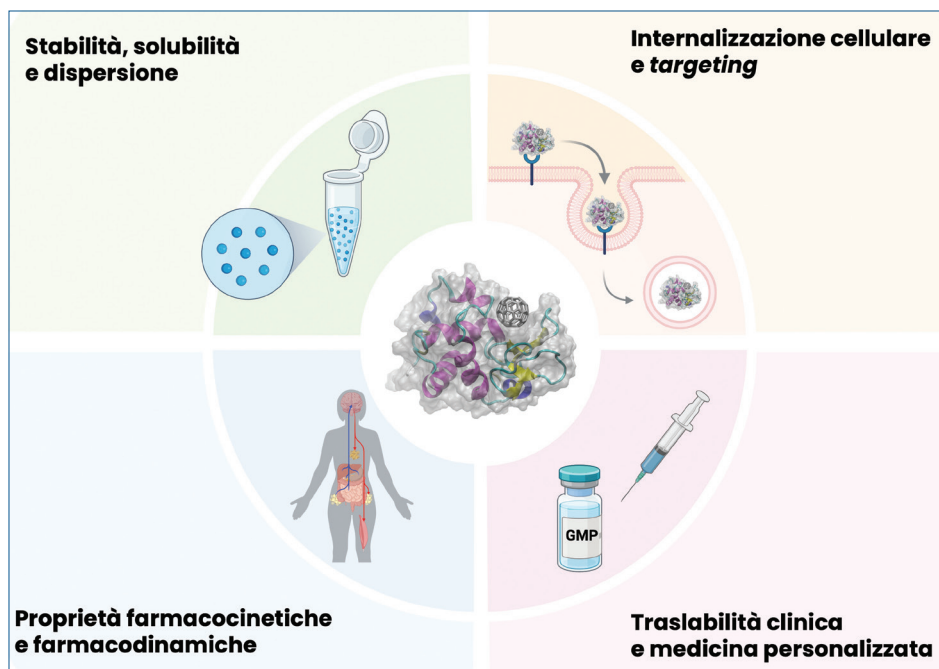


Fig. 4 - Vantaggi dell'approccio "cavallo di Troia" proteico per la dispersione di NpM

benefici da questo approccio, che ne migliora solubilità, stabilità, *targeting* e proprietà farmacocinetiche e farmacodinamiche.

La combinazione di chimica supramolecolare e biologia molecolare apre la strada allo sviluppo di piattaforme teranostiche avanzate, con importanti prospettive nella medicina di precisione.

BIBLIOGRAFIA

- [1] M. Di Giosia, F. Zerbetto *et al.*, *Acc. Mater. Res.*, 2021, **2**, 594.
- [2] M. Calvaresi, F. Arnesano *et al.*, *ACS Nano*, 2014, **8**, 1871.
- [3] M. Di Giosia, P.H.H. Bomans *et al.*, *Nanoscale*, 2018, **10**, 9908.
- [4] A. Soldà, A. Cantelli *et al.*, *J. Mater. Chem. B*, 2017, **5**, 6608.
- [5] M. Di Giosia, A. Soldà *et al.*, *Adv. Funct. Mater.*, 2021, **31**, 2101527.
- [6] T.D. Marforio, E.J. Mattioli *et al.*, *Nanomaterials*, 2023, **13**, 1770.
- [7] T.D. Marforio, A. Carboni *et al.*, *J. Colloid Interface Sci.*, 2026, **708**, 139798.
- [8] M. Calvaresi, A. Bottoni *et al.*, *J. Phys. Chem. C*, 2015, **119**, 28077.
- [9] F. Bologna, E.J. Mattioli *et al.*, *ACS Omega*, 2018, **3**, 13782.
- [10] K. Malarz, J. Korzuch *et al.*, *Int. J. Nanomedicine*, 2023, **18**, 1709.
- [11] M. Calvaresi, F. Zerbetto, *ACS Nano*, 2010, **4**, 2283.

Proteins as "Trojan Horses" for the Delivery of Molecular Nanoparticles

Molecular nanoparticles (MNPs), such as fullerenes and carboranes, show remarkable theranostic potential but are limited by poor solubility, aggregation, and suboptimal pharmacokinetics. Protein-based "Trojan horse" strategies enhance their stability, bioavailability, and targeting, enabling controlled delivery and improved biomedical performance.