



Dottorato in Scienze Molecolari e Biomolecolari
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche
Settore Scientifico Disciplinare CHIM/09

SVILUPPO DI *PULMONARY DRUG DELIVERY SYSTEMS* PER IL TRATTAMENTO DI PATOLOGIE RESPIRATORIE CRONICHE

**IL DOTTORE
MARTA CABIBBO**

**IL COORDINATORE
PROF.SSA GIOVANNA PITARRESI**

**IL TUTOR
PROF.SSA GENNARA CAVALLARO**

**CO TUTOR
PROF.SSA EMANUELA FABIOLA CRAPARO**

**CICLO XXXV
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2023**

1	INTRODUZIONE	1
1.1.	L'inflammation	1
1.2.	Il ruolo dell'inflammation nelle patologie respiratorie croniche	2
1.3.	La broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO)	4
1.3.2.	Patogenesi della BPCO: qual è il ruolo dell'inflammation?	8
1.3.3.	I macrofagi alveolari nella BPCO	12
1.3.4.	Terapia farmacologica della BPCO	14
1.3.4.1.	<i>Inibitori delle fosfodiesterasi 4 (PDE-4)</i>	16
1.3.5.	BPCO e invecchiamento	18
1.3.5.1.	<i>Prospettive terapeutiche future: la Rapamicina per il trattamento della BPCO</i>	19
1.4.	La fibrosi cistica (FC)	22
1.4.1.	La terapia farmacologica della fibrosi cistica	25
1.4.2.	L'inflammation nella fibrosi cistica	28
1.4.2.1.	<i>L'innovazione fa la differenza: gli analoghi delle prostacicline per il trattamento della fibrosi cistica</i>	31
1.5.	La terapia inalatoria	34
1.5.1.	Cenni di anatomia e fisiologia polmonare	35
1.5.2.	Deposizione degli aerosol nelle vie aeree	37
1.5.3.	Dispositivi di inalazione	40
1.5.4.	Il destino degli aerosol	45
1.6.	Sistemi di rilascio innovativi per terapia inalatoria	47
1.6.1.	Liposomi	48
1.6.2.	Nanoparticelle polimeriche (NPs)	51
1.6.3.	Nanoparticelle ibride lipide-polimero (LPHNPs)	55
1.6.4.	Microparticelle polimeriche	57
1.7.	<i>Escape o uptake macrofagico?</i>	59
1.8.	La terapia genica nel trattamento dell'inflammation	62
2.	SCOPO DELLA TESI	67
3.	RISULTATI E DISCUSSIONE	82
3.1.	Sviluppo di microparticelle polimeriche porose inalabili per la veicolazione di Rapamicina per il trattamento della BPCO	82

3.1.1. Sintesi e caratterizzazione del copolimero	82
3.1.2. Preparazione e caratterizzazione delle microparticelle polimeriche porose	87
3.1.2.1. <i>Analisi superficiale e porosità</i>	97
3.1.2.3. <i>Valutazione del comportamento aerodinamico</i>	102
3.1.3. Microparticelle polimeriche porose contenenti la Rapamicina	104
3.1.4. Conclusioni	108
3.2. Sviluppo di una formulazione Nano into Micro (NiM) per la somministrazione polmonare di Iloprost per il trattamento dell'iper-infiammazione nella fibrosi cistica	111
3.2.1. Sintesi e caratterizzazione dei copolimeri	111
3.2.2. Preparazione e caratterizzazione delle nanoparticelle polimeriche	116
3.2.3. Formulazione <i>Nano into Micro</i> (NiM)	123
3.2.3.1. <i>Caratterizzazione biologica</i>	128
3.2.4. Conclusioni	133
3.3. Sviluppo di sistemi ibridi lipide-polimero per la somministrazione inalatoria di Roflumilast per il trattamento della BPCO	135
3.3.1. Sintesi e caratterizzazione del copolimero PHEA-g-RhB-g-Succ-PCL	135
3.3.2. Preparazione delle nanoparticelle fluorescenti ibride lipide-polimero (LPHFNPs)	141
3.3.3. Caratterizzazione delle LPHFNPs	143
3.3.4. Valutazione delle interazioni tra LPHFNPs e mucina	154
3.3.4.1. <i>Analisi turbidimetriche</i>	154
3.3.4.2. <i>Analisi reologiche</i>	155
3.3.5. Studi di caratterizzazione biologica	157
3.3.6. Formulazione <i>Nano into Micro</i> (NiM)	161
3.3.7. Conclusioni	162
3.4. Sviluppo di una formulazione Nano into Micro (NiM) a base di sistemi ibridi lipide-polimero per la veicolazione inalatoria di siRNA nella terapia genica antinfiammatoria	166
3.4.1. Sintesi e caratterizzazione del copolimero	166
3.4.1.1. <i>Studi di complessazione</i>	176
3.4.2. Preparazione e caratterizzazione delle nanoparticelle ibride lipide-polimero (LPHNPs)	177
3.4.2.1. <i>Valutazione delle interazioni tra LPHNPs@siGFP e mucina</i>	182
3.4.3. Studi di caratterizzazione biologica	184
3.4.4. Formulazione <i>Nano into Micro</i> (NiM)	189
3.4.5. Conclusioni	193
4. CONCLUSIONI	195
5. PARTE SPERIMENTALE	199
5.1. Sviluppo di microparticelle polimeriche porose inalabili per la veicolazione di Rapamicina per il trattamento della BPCO	199
5.1.1. Materiali	199

5.1.2. Colture cellulari	200
5.1.3. Sintesi e caratterizzazione del copolimero	200
5.1.3.1. <i>Sintesi e caratterizzazione del PHEA-g-RhB</i>	200
5.1.3.2. <i>Sintesi e caratterizzazione del PHEA-g-RhB-g-PLA</i>	201
5.1.4. Preparazione e caratterizzazione delle microparticelle polimeriche porose	203
5.1.4.1. <i>Analisi morfologica e distribuzione dimensionale</i>	204
5.1.4.2. <i>Analisi con Microscopio a Forza Atomica (AFM)</i>	205
5.1.4.3. <i>Analisi Brunauer-Emmett-Teller (BET)</i>	206
5.1.4.4. <i>Densità e diametro aerodinamico teorico</i>	207
5.1.4.5. <i>Comportamento aerodinamico</i>	208
5.1.5. Microparticelle polimeriche porose contenenti la Rapamicina	210
5.1.5.1. <i>Determinazione della Drug Loading (DL%)</i>	210
5.1.5.2. <i>Cinetiche di rilascio</i>	211
5.1.5.3. <i>Test di vitalità cellulare</i>	211
5.1.6. Analisi statistica	212
5.2. Sviluppo di una formulazione Nano into Micro (NiM) per la somministrazione polmonare di Iloprost per il trattamento dell'iper-infiammazione nella fibrosi cistica	213
5.2.1. Materiali	213
5.2.2. Sintesi e caratterizzazione dei copolimeri	214
5.2.2.1. <i>Sintesi e caratterizzazione del PHEA-g-PLGA</i>	214
5.2.2.2. <i>Sintesi e caratterizzazione del copolimero PHEA-g-PLGA-g-PEG</i>	215
5.2.2.3. <i>Determinazione dei pesi molecolari dei copolimeri mediante Size Exclusion Chromatography</i>	216
5.2.3. Preparazione e caratterizzazione delle nanoparticelle polimeriche	216
5.2.3.1. <i>Analisi dimensionale e misure di potenziale ζ</i>	217
5.2.3.2. <i>Determinazione della Drug Loading (DL%)</i>	217
5.2.3.3. <i>Cinetiche di rilascio</i>	218
5.2.3.4. <i>Analisi chimica di superficie</i>	218
5.2.3.5. <i>Determinazione della densità di peghilazione superficiale</i>	218
5.2.3.6. <i>Analisi turbidimetrica</i>	221
5.2.4. Formulazione Nano into Micro (NiM)	222
5.2.4.1. <i>Muco artificiale di fibrosi cistica</i>	222
5.2.4.2. <i>Analisi reologica</i>	223
5.2.5. Caratterizzazione biologica	223
5.2.5.1. <i>Colture cellulari</i>	223
5.2.5.2. <i>Test di vitalità cellulare</i>	224
5.2.5.3. <i>Estrazione e quantificazione dell'RNA (qRT-PCR)</i>	224
5.2.6. Analisi statistica	225
5.3. Sviluppo di sistemi ibridi lipide-polimero per la somministrazione inalatoria di Roflumilast per il trattamento della BPCO	226
5.3.1. Materiali	226

5.3.2. Sintesi e caratterizzazione del copolimero PHEA-g-RhB-g-Succ-PCL	227
5.3.3. Nanoparticelle fluorescenti ibride lipide-polimero (LPHFNPs)	230
5.3.3.2. <i>Liposomi</i>	231
5.3.3.3. <i>Preparazione delle nanoparticelle ibride lipide-polimero (LPHFNPs)</i>	232
5.3.4. Caratterizzazione delle LPHFNPs	232
5.3.4.1. <i>Analisi dimensionale e misure di potenziale ζ</i>	232
5.3.4.2. <i>Analisi morfologica</i>	233
5.3.4.3. <i>Quantificazione percentuale del contenuto di fosfolipidi</i>	233
5.3.4.4. <i>Analisi chimica di superficie</i>	234
5.3.4.5. <i>Determinazione della densità di peghilazione superficiale</i>	234
5.3.4.6. <i>Determinazione della Drug Loading (DL%)</i>	235
5.3.4.7. <i>Cinetiche di rilascio</i>	236
5.3.4.8. <i>Analisi calorimetrica differenziale a scansione</i>	236
5.3.5. Valutazione delle interazioni tra LPHFNPs e mucina	237
5.3.5.1. <i>Analisi turbidimetrica</i>	237
5.3.5.2. <i>Analisi reologica</i>	237
5.3.6. Caratterizzazione biologica	238
5.3.6.1. <i>Colture cellulari</i>	238
5.3.6.2. <i>Test di vitalità cellulare</i>	239
5.3.6.3. <i>Studi di uptake cellulare</i>	240
5.3.7. Formulazione Nano into Micro (NiM)	240
5.3.7.1. <i>Caratterizzazione delle NiM</i>	241
5.3.8. Analisi statistica	241
5.4. Sviluppo di una formulazione Nano into Micro (NiM) a base di sistemi ibridi lipide-polimero per la veicolazione inalatoria di siRNA nella terapia genica antinfiammatoria	242
5.4.2. Sintesi e caratterizzazione del copolimero	243
5.4.2.1. <i>Sintesi e caratterizzazione del copolimero PHEA-g-bAPAE</i>	244
5.4.2.2. <i>Sintesi e caratterizzazione del copolimero PHEA-g-bAPAE-g-DY676</i>	245
5.4.2.3. <i>Sintesi e caratterizzazione del copolimero PHEA-g-bAPAE-g-DY676-g-PLGA</i>	246
5.4.2.4. <i>Studi di stabilità</i>	247
5.4.2.5. <i>Studi di complessazione</i>	248
5.4.3. Preparazione e caratterizzazione delle nanoparticelle ibride lipide-polimero	249
5.4.3.1. <i>Analisi dimensionale e misure di potenziale ζ</i>	250
5.4.3.2. <i>Quantificazione del siRNA</i>	250
5.4.3.3. <i>Analisi morfologica</i>	251
5.4.3.4. <i>Quantificazione percentuale del contenuto di fosfolipidi</i>	251
5.4.3.5. <i>Analisi turbidimetrica</i>	252
5.4.4. Caratterizzazione biologica	252
5.4.4.1. <i>Colture cellulari</i>	252
5.4.4.2. <i>Test di vitalità cellulare</i>	253
5.4.4.3. <i>Studi di uptake cellulare</i>	253
5.4.4.4. <i>Studio di silenziamento genico</i>	254

5.4.5. Formulazione <i>Nano into Micro</i> (NiM)	254
5.4.5.1. Comportamento aerodinamico	255
5.4.6. Analisi statistica	257
6. BIBLIOGRAFIA	258

1 Introduzione

1.1. L'infiammazione

Gli stimoli irritativi di varia natura (fisici, chimici o biologici) provocano nei tessuti una serie di reazioni volte a prevenire il danno tissutale e la distruzione degli stessi. Questo processo, noto col nome di **infiammazione** o **flogosi**, è prevalentemente localizzato al sito di danno, ma può avere ripercussioni anche a livello sistemico, soprattutto a carico del sistema vascolare e del tessuto connettivo, a causa della messa in circolo di citochine pro-infiammatorie. La reazione infiammatoria è quindi un meccanismo di difesa, che serve a distruggere o arginare l'agente lesivo, allo scopo di determinare la guarigione e la sostituzione del tessuto danneggiato. Le manifestazioni più evidenti del processo infiammatorio sono state già descritte nel I secolo d.C. da Cornelio Celso, e ancora oggi mantengono il loro valore: *rubor*, *calor*, *tumor* e *dolor* (arrossamento, calore, rigonfiamento e dolore) e a questi si aggiunge un quinto segno clinico, la *functio laesa*, ovvero l'incapacità della zona colpita dall'infiammazione di mantenere inalterate le proprie capacità funzionali. Il rossore e il calore sono conseguenza della dilatazione dei vasi e dell'aumento del flusso sanguigno nella zona infiammata, mentre il rigonfiamento è causato dall'aumento del liquido negli spazi interstiziali (essudato) in seguito all'alterata permeabilità. Il dolore è infine espressione di una combinazione di fattori biochimici che comprendono la pressione esercitata sulle terminazioni nervose dall'edema.¹

Sulla base di un criterio temporale è possibile classificare l'infiammazione in due differenti tipi:

- ☞ **Acuta** (Angioflogosi), di breve durata, da pochi minuti a qualche ora o pochi giorni. È caratterizzata dalla formazione di edema infiammatorio o essudato, composto da liquidi, proteine plasmatiche e leucociti, soprattutto neutrofili.
- ☞ **Cronica** (Istoflogosi), di lunga durata, in cui i processi infiammatori, il danno tissutale e i tentativi di riparazione procedono simultaneamente. Può essere conseguenza di una

infiammazione acuta non risolta o essere cronica fin dall'esordio. È caratterizzata dalla presenza dei macrofagi e linfociti, dalla proliferazione dei vasi sanguigni, da fibrosi e necrosi tessutale.

L'infiammazione acuta viene considerata 'positiva', essenziale per l'organismo, in quanto lo protegge da agenti lesivi e ne accelera i meccanismi di riparazione, al contrario, l'infiammazione cronica, è correlata all'insorgenza di numerosi stati patologici, rappresentando dunque un problema più che una soluzione.²

1.2. Il ruolo dell'infiammazione nelle patologie respiratorie croniche

L'infiammazione delle vie aeree è generalmente causata da agenti patogeni, infezioni microbiche o dall'esposizione a tossine, inquinanti e allergeni, e coinvolge meccanismi immunitari sia innati che adattativi.³

Il primo passo verso l'induzione delle risposte immunitarie innate è il riconoscimento di pattern molecolari espressi esclusivamente dai microrganismi patogeni, definiti *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), o di molecole endogene rilasciate in seguito ad un danno cellulare da cellule danneggiate o necrotiche, definite *damage-associated molecular patterns* (DAMPs). Questo riconoscimento avviene grazie a specifici recettori di membrana, noti come *pattern recognition receptor* (PRRs), espressi sulla superficie di macrofagi polmonari, cellule dendritiche ed epiteliali. I PRRs includono recettori *Toll-like* transmembrana (TRLs), recettori citosolici *Nod-like* (NLRs) e recettori *RIG-I-like* (RLRs).^{3,4}

Questo meccanismo di identificazione è cruciale nella mediazione delle risposte infiammatorie alle infezioni e al danno tissutale (**Figura 1**).

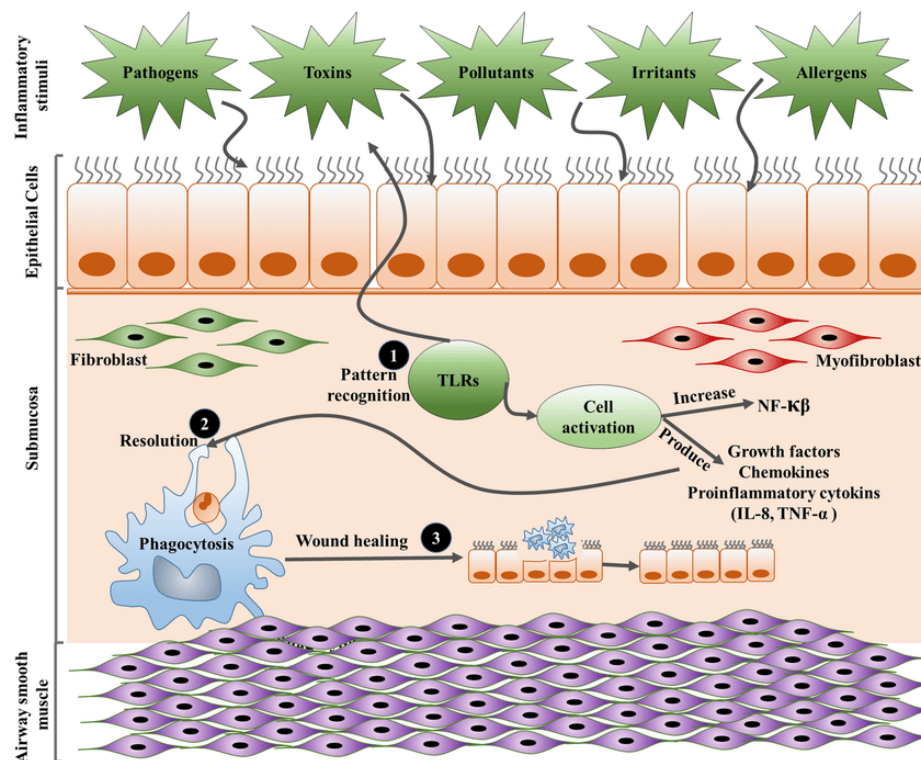


Figura 1. Rappresentazione schematica della risposta infiammatoria nelle vie aeree.³

I PRRs, esposti sulla superficie delle cellule epiteliali, una volta riconosciuti come stimoli infiammatori i PAMPs, espressi esclusivamente dagli agenti patogeni, innescano diverse vie di trasduzione del segnale le quali regolano l'attivazione di fattori trascrizionali, come il fattore nucleare kappa B (NF-κB) e gli interferoni (IRF3 e IRF7), e la trascrizione genica di numerosi mediatori dell'infiammazione e dell'immunità innata, come fattori di crescita, chemochine e citochine pro infiammatorie (IL-8 e TNF-α). Altri noti mediatori coinvolti nei processi infiammatori delle vie aeree sono le metalloproteinasi di matrice-9 e 12 (MMP-9 e 12), la cicloossigenasi-2 (COX-2) e la fosfolipasi A2 citosolica (cPLA2).^{3,4}

Tutte queste cellule infiammatorie attive fagocitano gli agenti patogeni nella regione lesa e aumentano l'espressione delle molecole di adesione delle cellule endoteliali (ICAM-1 e VCAM-1), avviando in tal modo il processo di risoluzione e riparazione cellulare.³

Tuttavia, se questi ultimi falliscono, si verifica la progressione verso uno stato infiammatorio cronico, il quale coinvolge anche le cellule dell'immunità adattativa, ed è responsabile dell'insorgenza di numerose patologie respiratorie croniche, come l'asma, l'ipertensione polmonare, la fibrosi cistica (FC) e la broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO).²

Indipendentemente dalla causa scatenante, queste patologie sono accomunate dall'instaurarsi di una risposta infiammatoria anomala e persistente, che altera quell'equilibrio tra processi infiammatori e antinfiammatori, essenziale per l'omeostasi polmonare.

Inoltre, i siti di infiammazione cronica nelle vie aeree presentano generalmente angiogenesi e fibrosi, e sono caratterizzati da accumuli di infiltrati cellulari, costituiti prevalentemente da macrofagi, linfociti T e B, e cellule *natural killer* (NK), che, insieme ad altre cellule strutturali (epiteliali, endoteliali e fibroblasti), amplificano il processo infiammatorio, e sono responsabili dei cambiamenti strutturali nelle vie aeree, noti col nome di 'rimodellamento bronchiale'.³⁻⁵

Ad oggi, le malattie respiratorie croniche rappresentano un grave problema di salute pubblica, e la loro crescente incidenza stimola la continua ricerca di trattamenti farmacologici sempre più innovativi, allo scopo di migliorare la qualità e le aspettative di vita dei pazienti.⁶

1.3. La broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO)

La broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO) è una sindrome respiratoria complessa che si sviluppa solitamente in soggetti adulti fumatori dopo i 40 anni.

La BPCO è attualmente la terza causa di morte nel mondo con oltre 3 milioni di decessi annui, che, secondo le stime della *World Health Organization* (WHO), dovrebbero raggiungere circa i 5 milioni entro il 2060, a causa dell'invecchiamento della popolazione e della larga diffusione del tabagismo, con conseguente aumento esponenziale del carico e dei costi sanitari per la gestione della patologia.^{7,8}

Nel 2001, un team di esperti nato dalla collaborazione tra il *National Heart, Lung and Blood Institute* e l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), ha lanciato a livello internazionale un importante programma sanitario intitolato “*Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*” (GOLD), finalizzato alla divulgazione ed implementazione delle linee guida per la diagnosi, prevenzione e trattamento della BPCO, attraverso l'impegno coordinato di professionisti coinvolti a livello mondiale in tutti gli aspetti dell'assistenza sanitaria.⁹

La BPCO è caratterizzata da ostruzione bronchiale irreversibile, che costituisce l'alterazione funzionale respiratoria patognomonica della sindrome, e che è dovuta in parte all'infiammazione e al rimodellamento delle vie aeree (bronchiolite), e in parte alla distruzione del parenchima polmonare (enfisema) e perdita degli attacchi alveolari, con comparsa di dispnea e tosse cronica, spesso accompagnati da respiro sibilante (**Figura 2**).¹⁰

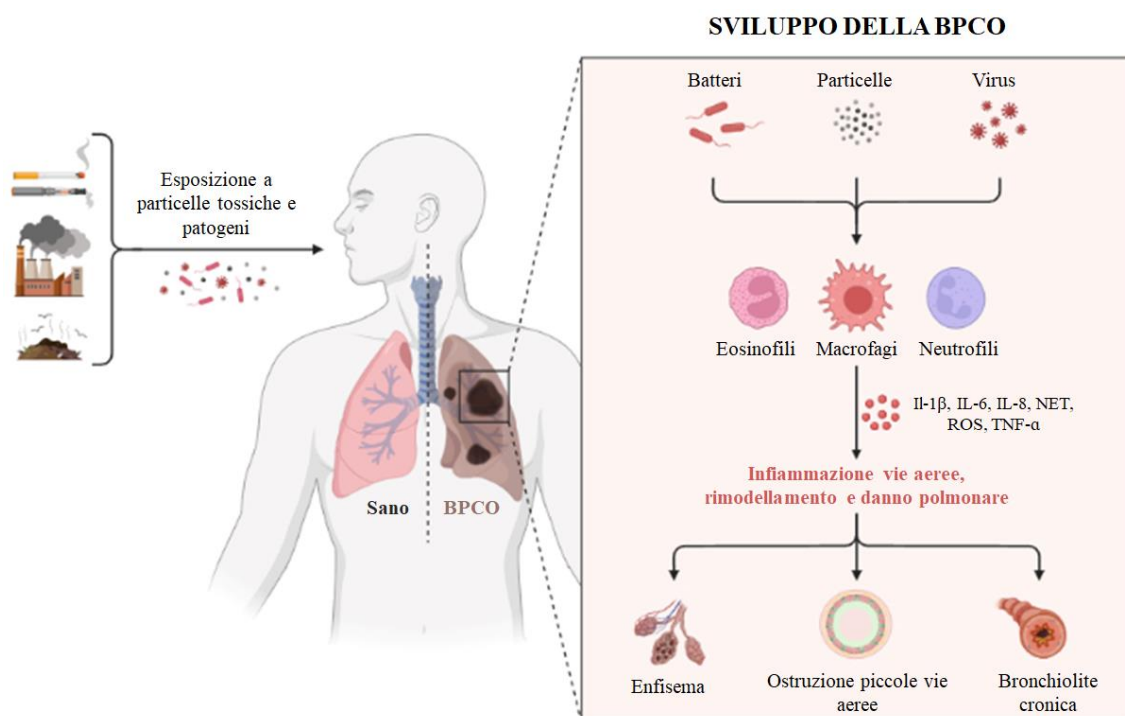


Figura 2. Sviluppo della BPCO.

Nella maggior parte dei paesi industrializzati, la BPCO è causata dal fumo di sigaretta; altri fattori di rischio riconosciuti sono l'inquinamento ambientale, l'esposizione lavorativa, e l'inalazione di particelle e gas irritanti e nocivi; inoltre, essa può essere correlata anche a fattori genetici, quali il deficit di α_1 -antitripsina (α_1 -AT) e autoimmuni.^{10,11}

L'eziologia della BPCO risulta dunque essere abbastanza complessa e multifattoriale.

La presenza di ostruzione bronchiale viene documentata all'esame spirometrico da un rapporto fra volume espiratorio massimo nel primo secondo di espirazione (VEMS) e capacità vitale forzata (CVF) inferiore a 0,7, rapporto misurato 15-30 minuti dopo somministrazione di un broncodilatatore inalatorio. Questo sta a indicare che, di tutta l'aria mobilizzabile in una manovra espiratoria completa, meno del 70% viene mobilizzata nel primo secondo.

Sulla base del quadro spirometrico misurato dopo broncodilatatore, le linee guida della GOLD propongono una classificazione di gravità della BPCO in quattro stadi (**Tabella 1**):⁹

Tabella 1. Classificazione di gravità della BPCO basata sulla spirometria (VEMS postbroncodilatazione).

STADIO	GRAVITA'	CARATTERISTICHE
STADIO I	Lieve	VEMS/CVF < 70%; VEMS $\geq$ 80% del teorico
STADIO II	Moderato	VEMS/CVF < 70%; 50% $\leq$ VEMS < 80% del teorico
STADIO III	Grave	VEMS/CVF < 70%; 30% $\leq$ VEMS < 80% del teorico
STADIO IV	Molto grave	VEMS/CVF < 70%; VEMS < 30% del teorico

1.3.1. Fisiopatologia della BPCO

Le alterazioni fisiopatologiche caratteristiche della BPCO sono determinate dalla condizione di infiammazione cronica nelle vie aeree.

Come già sopracitato, l'ostruzione al flusso aereo irreversibile rappresenta l'elemento fisiopatologico cardine della malattia, causato in parte dalla riduzione della pressione alveolare, e in parte dall'aumento delle resistenze delle vie aeree; il contributo di ciascuna di queste due componenti varia da un paziente all'altro. In particolare, la distruzione parenchimale, che caratterizza il quadro enfisematoso, contribuisce alla limitazione del flusso aereo attraverso la riduzione della forza di retrazione elastica del polmone e la rottura degli attacchi alveolari, ed è responsabile dell'intrappolamento d'aria nelle vie aeree distali (iperinflazione polmonare). L'iperinflazione riduce la capacità inspiratoria, determinando un incremento del lavoro respiratorio e della sensazione di dispnea, che negli stadi iniziali della malattia compare durante l'esercizio fisico, ma negli stadi più avanzati è presente anche a riposo.

L'infiammazione cronica, invece, che determina l'ispessimento della parete delle piccole vie aeree con accumulo di cellule, muco ed essudato a livello intraluminale, contribuisce alla riduzione del flusso aumentando le resistenze (bronchiolite).¹⁰

Il binomio enfisema-bronchiolite comporta non solo una riduzione del flusso aereo, ma anche una alterazione del rapporto ventilazione/perfusione nel polmone con conseguenti anomalie degli scambi gassosi che si manifestano dapprima con ipossiemia e poi con ipercapnia.

Altre alterazioni della fisiologia polmonare sono a carico delle secrezioni; l'aumento del numero di cellule caliciformi, l'ipertrofia e l'iperplasia delle ghiandole sottomucose causano una ipersecrezione di muco che contribuisce all'occlusione delle piccole vie aeree.^{10,12}

In particolare, i recettori per il fattore di crescita dell'epidermide (EGFRs) giocano un ruolo chiave nell'ipersecrezione mucosa.

Essi possono essere attivati direttamente dai neutrofili attraverso l'effetto dell'elastasi neutrofila sull'enzima di conversione del TNF- α (TACE), il quale stimola il rilascio di TGF- α , un ligando specifico per gli EGFRs, e indirettamente, attraverso lo stress ossidativo.

Gli EGFR stimolati attivano le proteine mitogeno-attivate (MAP) chinasi, che aumentano

l'espressione dei geni della mucina MUC5AC e MUCB, con conseguente iperplasia delle cellule del calice e delle ghiandole sottomucose (**Figura 3**).¹²

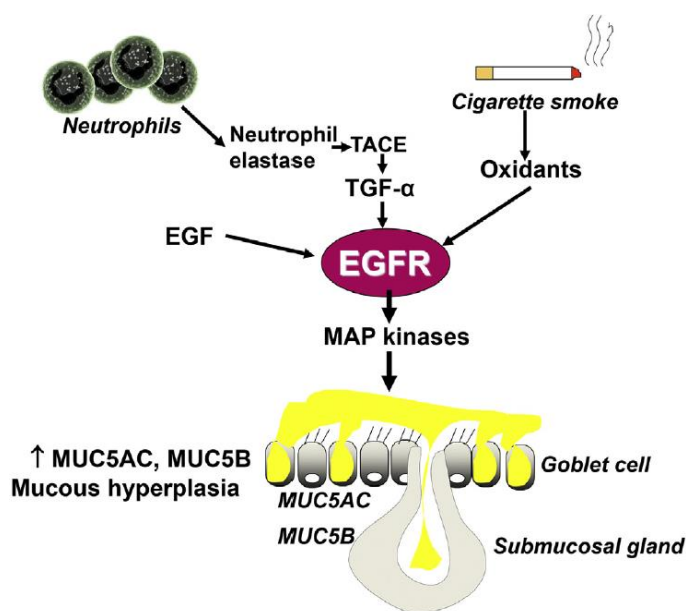


Figura 3. Ipersecrezione di muco e iperplasia nei soggetti affetti da BPCO.¹²

Tutti questi meccanismi contribuiscono al deterioramento della contrattilità della muscolatura respiratoria e alla progressiva perdita della funzionalità polmonare.

1.3.2. Patogenesi della BPCO: qual è il ruolo dell'infiammazione?

Nei pazienti con BPCO, si sviluppa una risposta infiammatoria anomala, perché amplificata e in grado di automantenersi anche una volta rimosso l'agente irritante, per esempio in seguito a cessazione dell'abitudine tabagica.

L'infiammazione nella BPCO non è strettamente confinata al polmone, ma si associa a una infiammazione sistemica che può essere causa di patologie croniche concomitanti, soprattutto a carico del sistema cardiaco e vascolare.

La BPCO è una patologia complessa, i cui meccanismi patogenetici non sono stati ancora

completamente chiariti.

Tradizionalmente, l'ipotesi più accreditata è quella dello squilibrio del sistema proteasi/antiproteasi. Secondo questa ipotesi, l'inalazione di sostanze tossiche, quali il fumo di sigaretta, causa il richiamo e l'attivazione nel polmone di numerose cellule infiammatorie, quali i macrofagi alveolari e i neutrofili, in grado di secernere proteinasi. Nel parenchima polmonare, queste proteinasi, se non neutralizzate dalle antiproteinasi tissutali (α_1 -antitripsina e α_1 -macroglobulina), degradano le diverse componenti del tessuto connettivo, in particolar modo l'elastina, causando enfisema polmonare.¹³ Tra le proteasi, particolare attenzione è stata riservata allo studio di due serin-proteasi di origine neutrofila, ovvero l'elastasi e la tripsina, e tre MMP-8, 9 e 12 prodotte dai macrofagi, le quali, insieme alle catepsine, sono in grado di indurre enfisema polmonare negli animali da laboratorio.^{12,14,15}

Oltre all'ipotesi dello squilibrio proteasi/antiproteasi, anche lo stress ossidativo sembra avere un ruolo chiave nella patogenesi della malattia. Infatti, nei fumatori e nei pazienti con BPCO, si assiste a uno squilibrio tra agenti ossidanti e antiossidanti a favore dei primi, che contribuisce all'insorgenza della malattia attraverso differenti meccanismi, tra i quali l'attivazione del fattore NF- κ B e della proteina chinasi attivata da mitogeno p38 (p38 MAPK), che sono in grado di indurre la trascrizione di TNF- α , IL-8 e altri mediatori infiammatori.^{14,16} Inoltre, lo stress ossidativo determina la compromissione delle difese antiproteasi, la senescenza cellulare e la resistenza ai corticosteroidi attraverso l'inattivazione dell'istone deacetilasi 2 (HDAC 2).^{17,18}

Altra importante caratteristica nella patogenesi della BPCO è la diminuita produzione, indotta dal fumo di sigaretta, di glutathione ridotto (*Reduced-Glutathione*, GSH), un importante antiossidante, a livello alveolare e polmonare. Infatti, una misura diretta dello stress ossidativo a livello delle vie aeree è rappresentata dal riscontro nell'esalato di perossido di idrogeno, che è presente in alte concentrazioni nei pazienti con BPCO rispetto ai soggetti normali.^{12,19}

Recentemente è stato ipotizzato che anche l'apoptosi contribuisce alla patogenesi

dell'enfisema; l'apoptosi deriverebbe dalla disregolazione del fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) che svolge un ruolo nella crescita delle cellule endoteliali ed epiteliali; la disregolazione del VEGF comprometterebbe quindi la riparazione del danno polmonare indotto da particelle nocive.²⁰

Nella BPCO, l'infiammazione coinvolge risposte immunitarie innate e adattative, contraddistinte da un aumentato numero di macrofagi, neutrofili, linfociti T e B nelle vie aeree periferiche, nel parenchima e nei vasi polmonari (**Figura 3**).^{12,14,21} Inoltre, in alcuni pazienti, possono essere aumentati anche gli eosinofili, i Th2 o le cellule linfoidi innate di tipo 2 (ILC2), specialmente dove si verifica una sovrapposizione clinica con l'asma.⁵

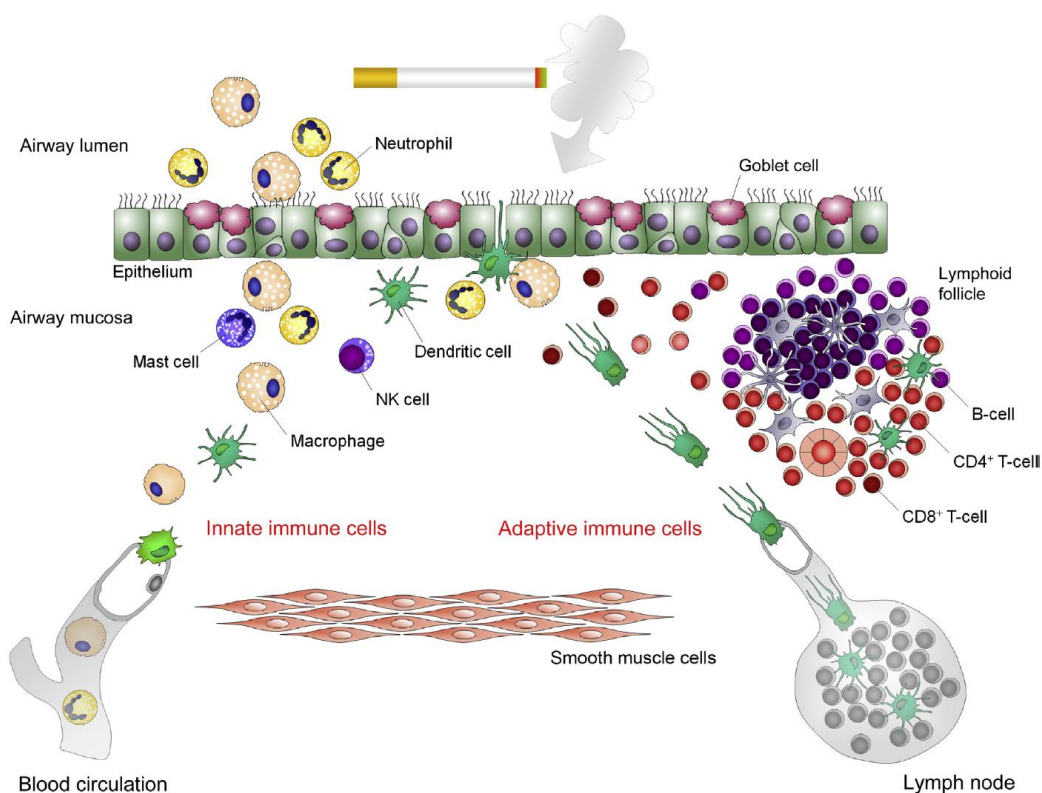


Figura 3. Risposta immunitaria innata e adattativa nella patogenesi della BPCO.²¹

In particolare, nello stadio avanzato della patologia, sia nelle vie aeree che nel compartimento

alveolare, le cellule T citotossiche CD8⁺ risultano essere predominante, e il loro numero aumenta sostanzialmente con la riduzione del flusso d'aria e il progredire dell'enfisema.²²

All'attivazione, le cellule T CD8⁺ rilasciano enzimi proteolitici, come perforina e granzimi, che causano la morte cellulare delle cellule strutturali per apoptosi o necrosi.^{22,23}

È interessante altresì osservare che nei pazienti con BPCO si verifica un'espansione oligoclonale dei linfociti che, nei soggetti più gravi, appaiono organizzati in veri e propri follicoli, con un centro germinativo ricco di linfociti B, circondato da una regione periferica con linfociti T. Questa particolare organizzazione patologica ha suggerito l'ipotesi dello sviluppo di una risposta immunologica acquisita nei confronti di un antigene specifico, con particolare attenzione rivolta verso antigeni endogeni modificati dal fumo di sigaretta. A sostegno di tale teoria, recenti studi hanno dimostrato la presenza di autoanticorpi diretti contro l'elastina e di IgG circolanti con alta avidità per le cellule epiteliali polmonari.^{24,25}

Nella BPCO si svilupperebbe quindi una risposta di tipo acquisito diretta contro auto-antigeni polmonari, con tutte le caratteristiche proprie delle risposte di tipo autoimmune.

Anche le cellule epiteliali svolgono un ruolo importante nella patogenesi della BPCO; esse vengono attivate dal fumo di sigaretta e da altri irritanti inalati a produrre mediatori infiammatori, tra cui IL-1b, IL-6, GM-CSF, e IL-8 e TGF- β , inducendo la fibrosi locale.

La BPCO è spesso caratterizzata da episodi di riacutizzazione della sintomatologia, definiti come eventi caratterizzati da un peggioramento dei sintomi respiratori, causati da infezioni dell'albero tracheo-bronchiale e dall'inquinamento atmosferico secondo meccanismi ancora poco conosciuti.

In corso di riacutizzazioni, inoltre, si osserva anche un aumento del TNF- α , una molecola in grado di aumentare l'espressione delle molecole di adesione sulle cellule endoteliali, facilitando così la migrazione dei leucociti dai vasi del circolo bronchiale al tessuto polmonare.²²

1.3.3. I macrofagi alveolari nella BPCO

I macrofagi alveolari svolgono un ruolo chiave nell'orchestrare, dal punto di vista fisiopatologico, l'infiammazione cronica nei pazienti con BPCO.²⁶

In generale, i macrofagi sono una componente cellulare fondamentale del sistema immunitario innato, avente un ruolo centrale nel riconoscimento di microrganismi, agenti immunogeni e nella regolazione delle risposte infiammatorie.

I macrofagi sono cellule dotate di elevata plasticità, capaci di modificare i loro profili funzionali, in risposta a cambiamenti del microambiente, in due differenti fenotipi M1, pro-infiammatorio e citotossico, e M2, antinfiammatorio ed implicato nella riparazione dei tessuti.

^{27,28}

Le cellule staminali ematopoietiche (HSC), presenti nel midollo osseo, sono i precursori dei fagociti mononucleati, compresi i macrofagi. Tali cellule raggiungono la circolazione dopo essersi differenziate in monociti nel midollo osseo; i monociti migrano in vari organi per extravasare e il microambiente in cui si ritrovano influenza lo sviluppo in macrofagi maturi e cellule dendritiche con fenotipi diversi ma specifici dell'organo.

In particolare, a livello polmonare, i macrofagi si differenziano in quattro fenotipi funzionali, sulla base della loro posizione anatomica: macrofagi intravascolari polmonari, macrofagi pleurici, macrofagi interstiziali e macrofagi alveolari.

Questi ultimi sono i fagociti residenti, che risiedono sulla barriera aria-sangue, rappresentanti la prima linea di difesa immunocellulare polmonare, data la loro capacità di eliminare agenti patogeni e particolato con dimensioni che vanno da 0,5 a 5 μm , attraverso il processo autofagico.²⁹

L'autofagia è un processo di degradazione endocellulare essenziale per la sopravvivenza, la differenziazione, lo sviluppo e l'omeostasi delle cellule, e svolge un ruolo protettivo in diverse patologie, tra cui infezioni, cancro, neurodegenerazione, malattie cardiache e invecchiamento.

Essa si attiva con l'inglobamento delle proteine citosoliche e degli organelli cellulari danneggiati all'interno di vescicole chiamate autofagosomi, le quali si fondono con i lisosomi al cui interno si verifica la digestione del materiale inglobato.^{29,30}

L'autofagia, se non finemente regolata, risulta essere persistente o inefficace e può essere dannosa per le cellule coinvolte.

Nei polmoni di soggetti affetti da BPCO è stato riscontrato non soltanto un incremento del numero dei macrofagi alveolari, ma anche una alterazione del loro processo autofagico, con conseguente aumento della proliferazione batterica a livello delle vie respiratorie e aggravamento dello stato infiammatorio cronico.^{27,28}

Numerose evidenze sperimentali hanno inoltre dimostrato che, il fumo di sigaretta, lo stress ossidativo e il microambiente infiammatorio delle vie aeree causano, nei soggetti affetti da BPCO, un'alterazione dell'equilibrio tra i due fenotipi M1 e M2 dei macrofagi alveolari; il rapporto tra questi due governa i processi patologici della BPCO.

In particolare, la comparsa dei macrofagi M1 causa un eccesso di stress ossidativo, il quale compromette meccanismi di risoluzione, come la fagocitosi e l'efferocitosi mediata dai macrofagi, aumentando la suscettibilità verso colonizzazioni batteriche ed episodi di riacutizzazione. La comparsa di macrofagi M2 contribuisce, invece, a un deleterio rimodellamento/danno polmonare attraverso l'aumento dell'espressione dei geni M2-correlati e l'eccessiva produzione di proteasi (**Figura 4**).³¹

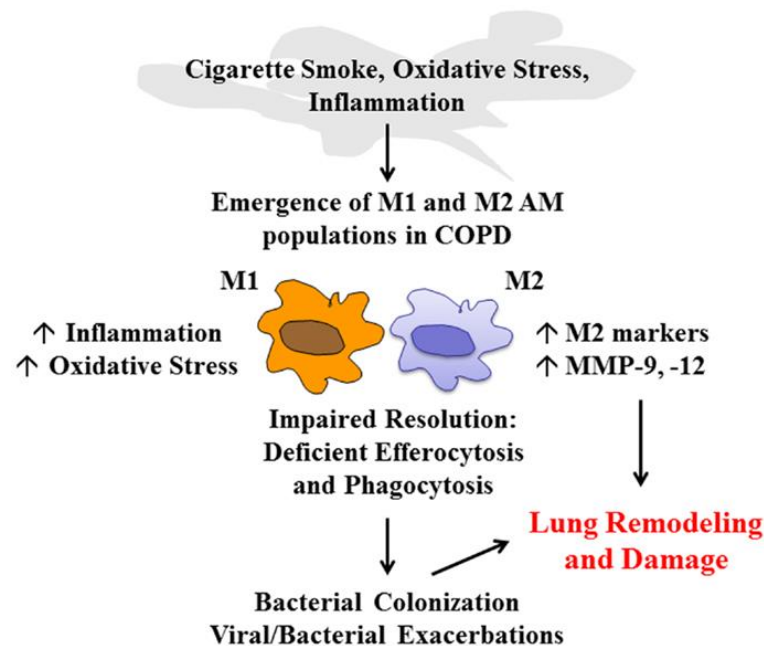


Figura 4. Il ruolo dei macrofagi alveolari nella BPCO. ³¹

1.3.4. Terapia farmacologica della BPCO

Gli obiettivi principali della terapia della BPCO sono volti a prevenire e a gestire i sintomi, a ridurre la frequenza e la gravità delle riacutizzazioni, e a migliorare la qualità della vita dei pazienti, senza però ridurre la progressiva perdita della funzionalità respiratoria e quindi modificare la storia naturale della patologia. ⁹

L'attuale terapia farmacologica prevede l'utilizzo di broncodilatatori, quali β 2-agonisti e antagonisti dei recettori muscarinici (anticolinergici), somministrati sia come terapia regolare sia al bisogno.

In particolare, gli antimuscarinici bloccano il legame dell'acetilcolina (ACh) al recettore muscarinico M3, inibendo così la contrazione delle cellule muscolari lisce. Gli agonisti del recettore β 2-adrenergico, in seguito al legame col recettore, inducono una cascata di eventi di trasduzione del segnale che alla fine portano al rilassamento della muscolatura liscia. L'utilizzo concomitante di β 2-agonisti e anticolinergici ha un effetto additivo sul miglioramento della

funzione polmonare.

Si preferiscono broncodilatatori a lunga durata d'azione, quali $\beta 2$ -agonisti (*long acting beta-adrenoceptor agonists*, LABA) e anticolinergici a lunga durata d'azione (*long acting muscarinic agonists*, LAMA), per la loro maggiore capacità di migliorare la funzione respiratoria.¹⁷ Per il trattamento di pazienti con BPCO grave e rischio di riacutizzazioni, in concomitanza con i broncodilatatori, possono essere somministrati anche corticosteroidi per via inalatoria (*inhaled corticosteroid*, ICS).

Tuttavia, recentemente è stato descritto un meccanismo di resistenza ai glucocorticoidi, strettamente correlato alle caratteristiche patogenetiche della malattia (**Figura 5**); infatti, questo è legato al fatto che il fumo di sigaretta e lo stress ossidativo impediscono la traslocazione nucleare del recettore dei corticosteroidi, e diminuiscono l'attività della proteina co-repressore istone deacetilasi 2 (HDAC-2), riducendo così la capacità dei corticosteroidi di spegnere l'espressione genica pro-infiammatoria.^{18,32,33}

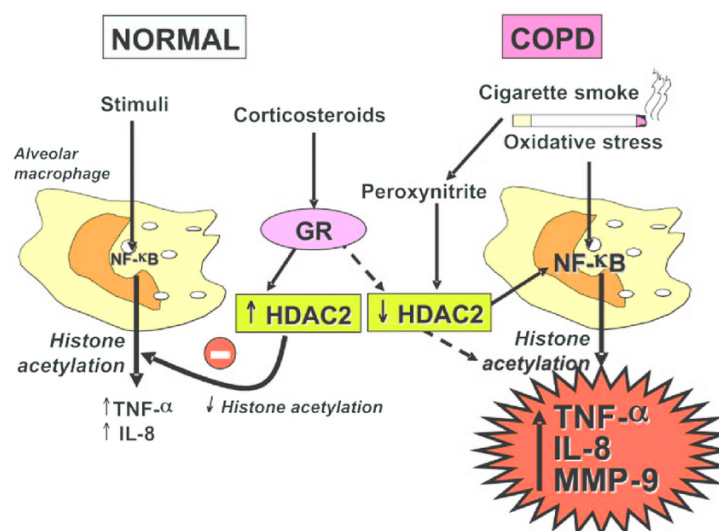


Figura 5. Meccanismo della resistenza ai corticosteroidi nella BPCO.¹⁸

Pertanto, questa resistenza comporta un trattamento della BPCO con corticosteroidi inefficace

e inaccettabili effetti avversi, dovute alle elevate dosi richieste, suggerendo la necessità di nuovi agenti antinfiammatori e nuovi target terapeutici, allo scopo di colpire i meccanismi patogenetici della malattia. Tra questi, notevole interesse hanno suscitato gli inibitori delle fosfodiesterasi 4 (PDE-4).

1.3.4.1. *Inibitori delle fosfodiesterasi 4 (PDE-4)*

Le PDEs sono una famiglia di enzimi ubiquitari con azione degradatrice sui secondi messaggeri, quali l'adenosina monofosfato ciclico (cAMP) e la guanosina monofosfato ciclico (cGMP). Questi ultimi regolano molteplici processi cellulari, inclusi il rilascio dei mediatori dell'infiammazione e il rilassamento delle cellule muscolari lisce.³⁴

La PDE-4 è l'isoenzima predominante nella maggior parte delle cellule infiammatorie implicate nella patogenesi della BPCO. È stato infatti dimostrato che, livelli più elevati di mRNA della PDE-4 sono presenti nei macrofagi alveolari prelevati da pazienti affetti da BPCO rispetto a quelli provenienti da donatori controllo, e ancora in pazienti affetti da BPCO fumatori rispetto ai non fumatori.

Tale evidenza suggerisce la possibilità che PDE-4 possa essere utilizzato come target specifico dei macrofagi nel trattamento dell'infiammazione associata alla BPCO.^{17,34}

In particolare, l'inibizione selettiva della PDE4 inibisce l'idrolisi di cAMP nelle cellule infiammatorie, provocando una vasta gamma di effetti antinfiammatori, tra cui una diminuzione del rilascio di mediatori infiammatori nei neutrofili, di citochine e dell'apoptosi (**Figura 6**).^{34,35}

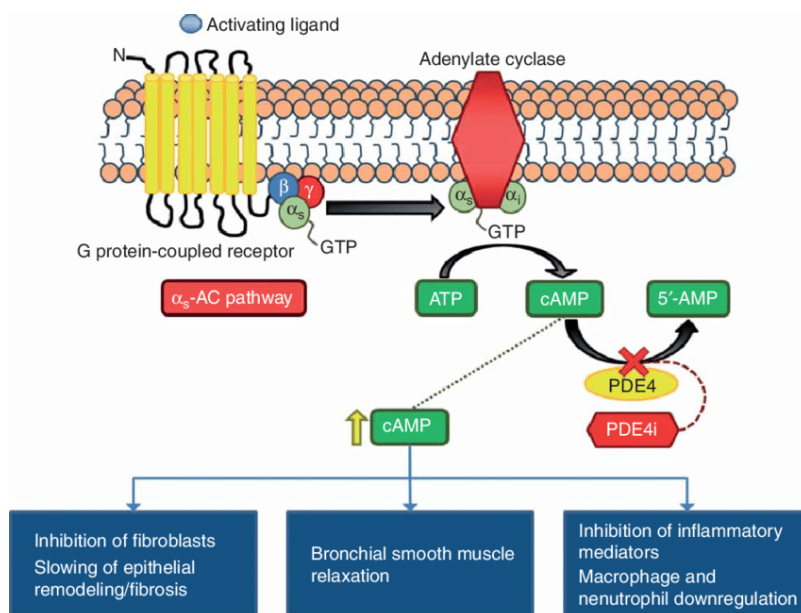


Figura 6. Meccanismo di azione degli inibitori delle fosfodiesterasi 4 (PDE-4). ³⁵

Il Roflumilast (**Figura 7**) è l'unico inibitore delle PDE-4 finora approvato dall'Agenzia Europea dei Medicinali (EMA), per il trattamento di pazienti con BPCO grave associata a bronchite cronica e con una storia clinica di esacerbazioni. ³⁶

Tuttavia, il Roflumilast ha scarso impatto clinico, poiché la sua somministrazione per os causa numerosi effetti avversi, quali ad esempio nausea e depressione.

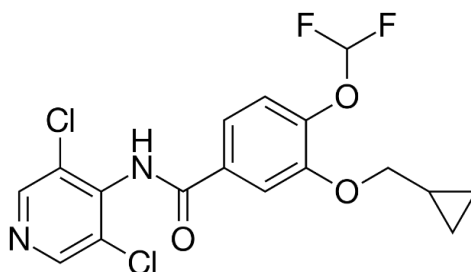


Figura 7. Struttura chimica del Roflumilast.

Il Roflumilast è disponibile in commercio nella forma di dosaggio orale in compresse da 250 e

500 µg, con una biodisponibilità di circa l'80%.

Le concentrazioni plasmatiche massime di Roflumilast sono raggiunte in ~ 1 ora (intervallo: 0,5-2 ore) dopo una singola dose e le concentrazioni massime del metabolita attivo N-ossido sono raggiunte in ~ 8 ore (intervallo: 4-13 ore). Sia il Roflumilast che il suo metabolita attivo sono entrambi altamente legati alle proteine plasmatiche ($\geq 97\%$). Il metabolismo avviene per reazioni di fase I del citocromo P450 (CYP) (isoenzimi 1A2 e 3A4) e per reazioni di coniugazione o di fase II, e l'emivita è di circa 17 ore.

Il Roflumilast è 3 volte più potente del suo metabolita, ma quest'ultimo ha una biodisponibilità 10 volte più grande di quella del principio attivo.^{34,36}

1.3.5. BPCO e invecchiamento

L'invecchiamento è un fenomeno complesso, eterogeneo e multifattoriale, associato a un progressivo declino dell'omeostasi e degenerazione tissutale, che rappresenta uno dei più importanti fattori di rischio per lo sviluppo di patologie croniche. A tal proposito, numerose evidenze sperimentali hanno dimostrato che, la progressione della BPCO è una condizione legata all'accelerazione dell'invecchiamento polmonare, e che quest'ultimo rappresenta il collegamento tra la patologia e le sue molteplici manifestazioni extra polmonari. Inoltre, è stato anche osservato che, la prevalenza della BPCO è 2-3 volte più elevata nei soggetti oltre i 60 anni.^{37,38}

Durante l'invecchiamento, la funzione polmonare si deteriora progressivamente, l'immunità innata viene compromessa, e l'infiammazione polmonare aumenta, determinando numerosi cambiamenti strutturali, come la diminuzione della funzionalità polmonare, la perdita dell'elasticità e l'ampliamento degli spazi aerei distali, riscontrati anche nella BPCO.

In particolare, questi cambiamenti possono essere causati dalla mancata eliminazione delle ROS, dall'accorciamento dei telomeri, a seguito di ripetute divisioni cellulari (ne consegue,

infatti, che la lunghezza dei telomeri risulta essere molto più corta nei pazienti con enfisema), e dal fallimento della riparazione del DNA danneggiato.³⁸ Quest'ultimo può essere indotto anche dallo stress ossidativo, coinvolto nella patogenesi della BPCO, e dal fumo di sigaretta, entrambi fattori di rischio per la carcinogenesi, che spiegano perché i pazienti affetti da BPCO manifestano una aumentata predisposizione a sviluppare il tumore ai polmoni.

Nel processo di invecchiamento polmonare fondamentale è lo stress ossidativo. In particolare, esso determina l'attivazione della fosfoinositide 3-chinasi (PI3K) con riduzione dei livelli di sirtuina-1 e conseguente senescenza cellulare e rilascio di proteine infiammatorie, aumentando ulteriormente lo stress ossidativo.¹²

Generalmente, per contrastare l'invecchiamento, si utilizzano farmaci geroprotettori, quali la melatonina, la metformina, il resveratrolo e la Rapamicina, che agiscono determinando una riduzione delle ROS, rallentando il processo di invecchiamento e, di conseguenza, l'insorgere di patologie età-correlate. Pertanto, un loro impiego a livello polmonare potrebbe rappresentare un approccio interessante per il trattamento della BPCO al fine di prevenire il processo di invecchiamento precoce del polmone.³⁷

1.3.5.1. Prospettive terapeutiche future: la Rapamicina per il trattamento della BPCO

La Rapamicina (o Sirolimus) (**figura 8**) è un composto isolato negli anni '60 da batteri originari del suolo dell'isola di Pasqua (Rapa Nui, da cui deriva il nome), coinvolto in numerosi processi biologici che le conferiscono spiccate attività immunosoppressive, antitumorali, neuroprotettive/neurorigenerative e anti-invecchiamento.³⁹

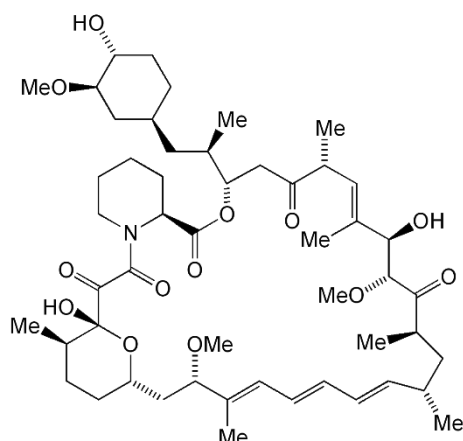


Figura 8. Struttura chimica della Rapamicina.

Il bersaglio molecolare della Rapamicina è mTOR, una proteina chinasi che fosforila serina e treonina. mTOR ha effetti pleiotropici in quanto regola la crescita cellulare, la sopravvivenza, il metabolismo e l'immunità cellulare.⁴⁰

La Rapamicina si associa al recettore intracellulare di mTOR, *FK506-binding protein 12* (FKBP12). Dopo tale associazione si forma il complesso Rapamicina-FKBP12 che interagisce direttamente con il dominio FKBP12-Rapamicina-binding (FRB) di mTOR, inibendolo. Esistono due differenti complessi di mTOR, ovvero il complesso mTOR1 (mTORC1) e il complesso mTOR2 (mTORC2), che presentano subunità proteiche sia sovrapponibili che distinte e sono coinvolti in diversi processi biologici e patologici.³⁹

In particolare, mTORC1 regola la sintesi proteica, attraverso l'attivazione della proteina ribosomiale S6 (RPS6) chinasi e l'inibizione della proteina legante il fattore di iniziazione trascrizionale eucariotico 4E-1, la biogenesi dei ribosomi, la progressione del ciclo cellulare, la sintesi lipidica, la biogenesi mitocondriale ed inibisce l'autofagia.³⁷ mTORC2, invece, regola la polarizzazione dell'actina nella crescita cellulare, l'endocitosi e attiva il recettore del fattore di crescita insulino-simile di tipo I (IGF-IR), attraverso l'attività tirosin-chinasica di mTOR. L'interazione di mTORC1 con la Rapamicina inibisce la progressione del ciclo cellulare dei

linfociti T dalle fasi G1 a S, sopprimendone la proliferazione (**Figura 9**).⁴⁰

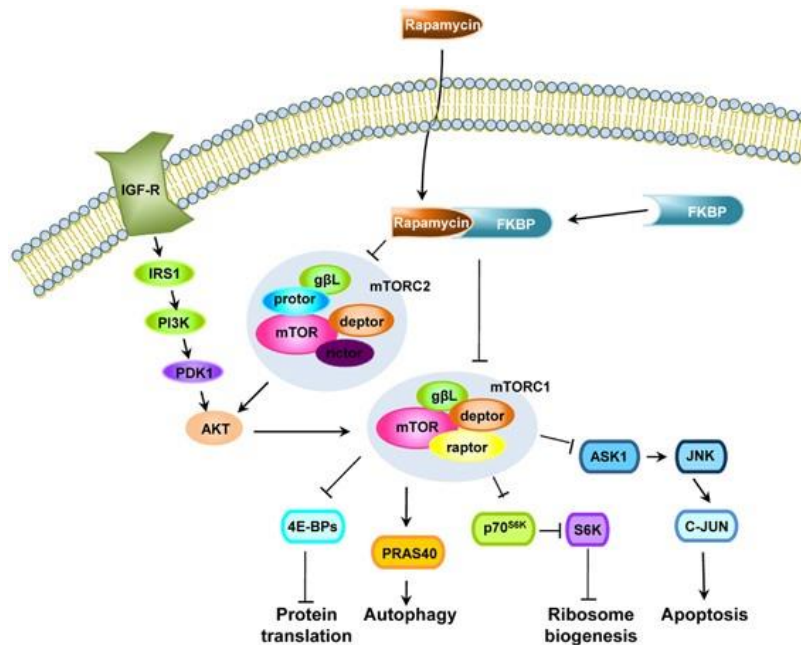


Figura 9. Meccanismo di azione della Rapamicina.³⁹

È stato recentemente dimostrato che, l'invecchiamento cellulare è caratterizzato dall'attivazione cronica basale di mTORC1 e dalla soppressione dell'autofagia.⁴¹

Poiché il processo di invecchiamento del tessuto polmonare è strettamente correlato alla BPCO, la Rapamicina potrebbe rappresentare una nuova strategia terapeutica per il trattamento della suddetta patologia. In effetti, recenti studi supportano tale potenzialità, evidenziando alcuni importanti meccanismi attraverso cui si esplica l'effetto protettivo della Rapamicina nei confronti dei processi patologici alla base della BPCO, quali la regolazione dell'autofagia, la riduzione delle cellule infiammatorie e il ripristino della sensibilità ai corticosteroidi nei pazienti affetti da BPCO.⁴²⁻⁴⁴

1.4. La fibrosi cistica (FC)

La Fibrosi Cistica (FC) è una malattia genetica a trasmissione autosomica recessiva che colpisce circa 70.000 persone in tutto il mondo.⁴⁵

La patologia è causata da mutazioni del gene *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR), codificante per una proteina canale del cloruro regolata dal cAMP, coinvolta anche nel trasporto di ioni bicarbonato, nella *downregulation* del canale epiteliale del sodio (ENaC), nella regolazione del trasporto del cloruro con il canale del cloruro rettificante del cloruro (ORCC) e nell'inibizione dei canali del cloruro endogeni attivati dal calcio.^{45,46}

La proteina CFTR è una glicoproteina transmembrana facente parte della famiglia delle *ATP binding cassette* (ABC). Essa è composta da 1.480 aminoacidi e ha un peso molecolare di 170 kDa. La struttura contiene 5 domini: 2 domini transmembrana costituiti ciascuno da 6 α -eliche; 2 domini leganti nucleotidi (NBDs) sul versante citoplasmatico; ed infine un dominio di regolazione (**Figura 10**). L'idrolisi dell'ATP ad opera del primo NBD porta all'apertura del canale, mentre l'idrolisi attuata da NBD2 chiude il canale.⁴⁵

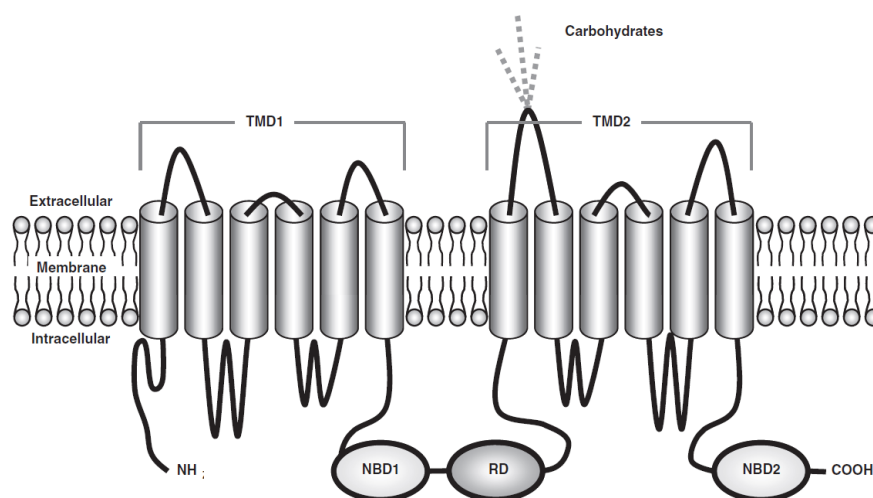


Figura 10. Rappresentazione della struttura della proteina CFTR.⁴⁵

Sono stati identificati circa 2000 tipi di mutazioni in grado di causare un'alterazione dell'attività della proteina CFTR, ma anche una riduzione quantitativa fino all'assenza della proteina stessa a livello della membrana cellulare. Le mutazioni CFTR possono essere classificate in cinque classi, in base alla loro conseguenza funzionale (**Tabella 2**).

Tabella 2. Classificazione delle mutazioni di CFTR.

CLASSE	MUTAZIONE	FENOTIPO CELLULARE
I	W1282X	Assenza di CFTR a livello della membrana plasmatica apicale.
II	$\Delta F508$	Degradazione intracellulare di CFTR con una quantità ridotta della proteina a livello della membrana plasmatica apicale.
III	G551D	Regolazione difettosa dei canali CFTR nella membrana plasmatica apicale.
IV	R117H	Regolazione difettosa dei canali CFTR nella membrana plasmatica apicale.
V	3849 + 10 kb C $\geq$ T	Ridotta sintesi di CFTR.

La più comune mutazione, $\Delta F508$, determina la delezione di una fenilalanina in posizione 508 della proteina CFTR. La forma mutata della proteina presenta dunque una conformazione alterata che viene degradata prima di raggiungere la membrana cellulare, mantenendo solo il 30% della normale attività.⁴⁵

Poiché la proteina CFTR si trova sulla superficie apicale di cellule presenti in numerosi organi o tessuti, i sintomi associati alla patologia sono molteplici e richiedono un impegno giornaliero sostanziale per la loro gestione.

Tuttavia, la gran parte della morbidità e della mortalità causate dalla FC sono dovute

principalmente agli effetti che la alterazione/assenza della proteina CFTR provoca sulla funzionalità polmonare.

La deficienza della proteina CFTR a livello polmonare, causa infatti una riduzione di ioni cloruro nella secrezione delle cellule dell'epitelio polmonare, alterando il trasporto di altri ioni. Ciò determina un aumentato riassorbimento di acqua e un'alterazione della composizione del muco che riveste l'epitelio bronchiale e dello strato di liquido periciliare (LPC).⁴⁷

Negli individui sani, il muco contiene il 97% di acqua e solo il 3% di solidi; di questo 3%, solo un terzo è rappresentato da mucine, mentre la restante parte comprende proteine non muciniche, lipidi, sali e detriti cellulari. Di conseguenza il muco presenta una consistenza di gel fluido e potrà essere facilmente eliminato dalle vie aeree tramite il battito ciliare. Diversamente, lo LPC si compone da grandi quantità di mucine e grandi glicoproteine, entrambe legate alle ciglia. Questa composizione rende difficile il passaggio attraverso l'LPC di macromolecole, incluse le mucine dello strato di muco, e delle particelle inalate. Questo strato bifasico muco-LPC protegge l'epitelio dalla disidratazione, aiutando a umidificare l'aria, e fornisce una barriera protettiva in grado di intrappolare le particelle inalate.⁴⁸

In condizioni di FC invece, il muco (*sputum*) è costituito principalmente da mucine, batteri, cellule infiammatorie, DNA e un ridotto contenuto di acqua; esso è quindi disidratato, denso e viscoso, difficile da espellere, e pertanto tende ad ostruire le piccole vie aeree e le ghiandole sottomucose, causando l'alterazione della clearance muco-ciliare (**Figura 11**) e l'instaurarsi di infezioni batteriche fino a bronchiectasie e insufficienza polmonare.⁴⁷

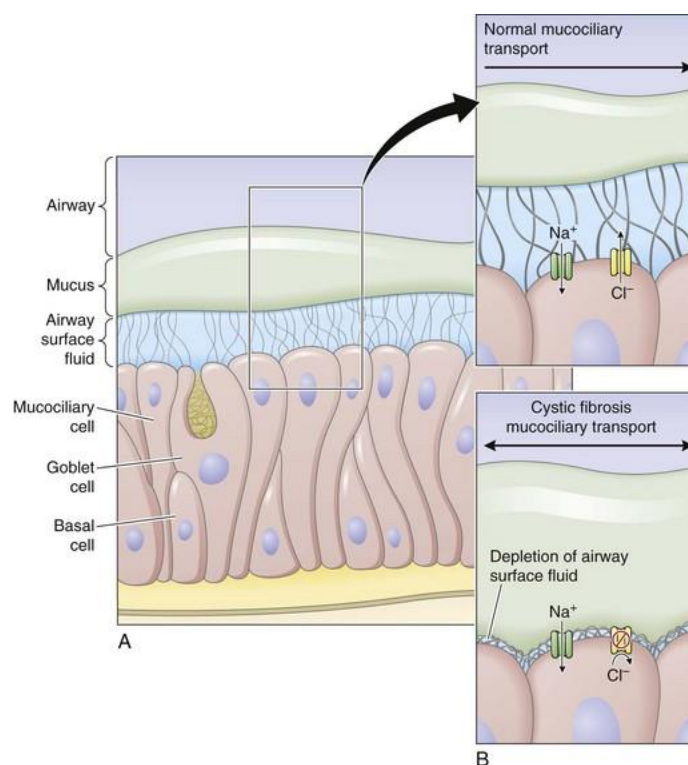


Figura 11. Rappresentazione dello strato di fluido superficiale delle vie aeree e del trasporto muco-ciliare in condizione di salute ed in condizioni di FC.⁴⁷

Alcuni microrganismi, infatti, tipicamente *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, trovano in questo ambiente polmonare condizioni favorevoli per la crescita, che induce la loro trasformazione in un fenotipo “mucoide”: le colonie batteriche sono immerse in una matrice di alginato (biofilm), che conferisce loro resistenza agli antibiotici e alle difese cellulari.

La diagnosi di FC si fa in base al test del sudore, che misura la concentrazione degli ioni cloruro nel sudore. Una concentrazione superiore a 60 milliequivalenti di cloro per litro dopo i 6 mesi di vita e 50 milliequivalenti nei primi mesi orienta decisamente alla diagnosi. Valori di cloro inferiori ai 40 milliequivalenti escludono la malattia.

1.4.1. La terapia farmacologica della fibrosi cistica

L'elevata morbilità e mortalità, associata alla FC, è dovuta alla mancanza di una terapia

effettiva, essendo oggi possibile solo il trattamento della sintomatologia della malattia, tanto che le prospettive di vita media per i pazienti sono approssimativamente di 40 anni.

I principali obiettivi della terapia polmonare della FC sono quelli di promuovere la clearance delle secrezioni, controllare le infezioni polmonari e prevenire l'ostruzione bronchiale. Inoltre, è consigliata l'esecuzione quotidiana di esercizi di fisioterapia toracica, al fine di migliorare la ventilazione polmonare, compensare l'alterata clearance mucociliare, incoraggiare una buona postura, ed evitare le complicazioni muscolo-scheletriche.⁴⁹

La terapia corrente per la FC prevede la somministrazione di:

- ☞ **Mucolitici:** considerata la disidratazione dello strato liquido superficiale delle vie aeree uno dei punti chiave della malattia polmonare legata alla FC, gli interventi terapeutici volti a migliorare la clearance del muco, mediante l'uso di mucolitici, rappresentano una pietra miliare del trattamento della patologia. A questa classe di farmaci appartengono la N-acetilcisteina (NAC), la dornase alfa (Pulmozyme®, farmaco approvato dalla FDA) o soluzioni iperosmolari aerosolizzate di mannitolo (Bronchitol®) o saline (dal 3 al 7% di NaCl). In particolare, la dornase alfa è una DNAsi ricombinante che agisce come mucolitico degradando il DNA rilasciato dai neutrofili nel muco, grazie alla quale è stato possibile osservare un miglioramento della funzionalità respiratoria.^{50,51}
- ☞ **Broncodilatatori:** la presenza diffusa di ostruzione e iperreattività delle vie aeree nella FC, ha spinto all'utilizzo di farmaci antiasmatici, come i broncodilatatori (salbutamolo, terbutalina, fenoterolo, ipatropio bromuro, salmeterolo) inalatori, i quali sono tra le terapie mediche più frequentemente utilizzate nei pazienti con FC. Il loro uso ha evidenziato un miglioramento della clearance mucociliare con conseguente miglioramento della funzione polmonare.
- ☞ **Antibiotici:** I pazienti affetti da FC utilizzano solitamente uno o più antibiotici, a seconda dello stadio di insorgenza e dell'entità delle infezioni.

Antibiotici come la ciprofloxacina e l'azitromicina sono utilizzati per via orale come profilassi per prevenire l'infezione, mentre per mantenere la funzione polmonare e diminuire la crescita dei batteri colonizzati si utilizzano antibiotici per via inalatoria, come la tobramicina e la colistina. In particolare, una sofisticata formulazione di tobramicina è rappresentata da TOBI® Podhaler® (Novartis), che consiste in una polvere secca per inalazione (DPI), prodotta mediante processo di spray-drying, in cui il farmaco è incorporato in microparticelle porose.⁵²

Diverse sono le limitazioni associate alla terapia antibiotica convenzionale, come il ristretto indice terapeutico, le basse concentrazioni nell'espettorato e la tossicità dose-limitante per diversi organi, e soprattutto una grave resistenza dei microrganismi agli antibiotici.

- ☞ Antinfiammatori: i corticosteroidi per via orale (ibuprofene) sono indicati nei casi di complicanze infiammatorie. Tuttavia, il loro utilizzo non è raccomandato come trattamento di routine, a causa degli effetti collaterali derivati dalla somministrazione prolungata degli stessi per via orale.⁵³ Non vi è alcuna evidenza invece sull'efficacia degli steroidi per via inalatoria.

Lo scenario relativo al trattamento farmacologico della FC ha subito un'importante svolta grazie alla sintesi di nuove molecole in grado di correggere la funzionalità della proteina CFTR difettosa, ovvero i modulatori della proteina CFTR:^{52,54}

- Ivacaftor (VX-770), somministrato per via orale in compresse o granuli (Kalydeco®), è efficace nei pazienti con mutazioni cosiddette di *gating*, ovvero mutazioni che producono una proteina CFTR capace di raggiungere la superficie delle cellule ma non funzionante.
- Lumacaftor (VX-809), disponibile in forma di dosaggio orale in combinazione con Ivacaftor (Orkambi®), avendo benefici non sufficienti da solo. Il Lumacaftor agisce

come chaperone durante il ripiegamento delle proteine e aumenta il numero di proteine CFTR trasportate sulla superficie cellulare.

- Tezacaftor/Ivacaftor (Symkevi®), è un'associazione simile alla precedente, avente efficacia simile ma una maggiore tollerabilità. È indicato in pazienti con doppia mutazione F508del o mutazione F508del associata ad altre ulteriori 26 mutazioni (*residual function*) che consentono una parziale funzionalità residua della proteina CFTR.
- Ivacaftor/Elexacaftor/Tezacaftor (Kaftrio®), si tratta di un'associazione incisiva sul difetto sia di apertura del canale, sia di conformazione della proteina e trasporto verso la membrana apicale. Indicato per la doppia mutazione F508del e gli eterozigoti per F508del e una mutazione a funzione minima sul secondo allele.

1.4.2. L'infiammazione nella fibrosi cistica

Il quadro polmonare della FC è dominato dall'instaurarsi di un circolo vizioso tra infezione e infiammazione, quest'ultima caratterizzata dall'accumulo di neutrofili e macrofagi nella mucosa e nel lume bronchiale.

Come si è già visto, la disfunzione della proteina CFTR è associata a un'alterazione dell'omeostasi di fluidi ed elettroliti delle cellule epiteliali, e quindi della composizione del muco. Quest'ultimo, nei soggetti con FC, diventa denso e viscoso, ostruisce le piccole vie aeree, e contribuisce allo sviluppo di un'infiammazione polmonare cronica e ad un aumento del rischio di infezioni polmonari.⁴⁹

La risposta infiammatoria nella FC è assai complessa ed alcuni meccanismi non sono ancora noti.

I mediatori pro-infiammatori, quali TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-17, IL-33, GM-CSF, G-CSF e HMGB-1, e cellule dell'immunità, quali neutrofili, macrofagi e linfociti T, rappresentano una

componente fondamentale di questa risposta e, in maniera analoga alla BPCO, sono presenti in elevate concentrazioni nelle vie aeree di soggetti con FC.

Questi mediatori causano una serie di problemi, tra cui l'aumento delle risposte infiammatorie e secretive, la stimolazione delle risposte di fase acuta, il ritardo dell'apoptosi dei neutrofili e l'inibizione della clearance delle cellule infiammatorie delle vie aeree. Inoltre, possono indurre febbre, promuovere il catabolismo proteico muscolare e persino la cachessia associata alla FC. L'elevata concentrazione e attivazione di neutrofili e macrofagi, invece, aumentano il rilascio di proteasi (elastasi e metalloproteasi di matrice), ossidanti e altri prodotti tossici che possono inibire la CFTR e degradare il tessuto polmonare, inducendo bronchiectasie.

I neutrofili rappresentano circa il 60-70% delle cellule immunitarie nelle vie aeree di pazienti con FC. In condizioni fisiologiche, essi eliminano i microrganismi attraverso la fagocitosi, secernono peptidi antimicrobici e producono delle trappole extracellulari neutrofile (NET), composti prevalentemente da DNA batterico; i batteri rimangono così intrappolati nei NET e gli altri neutrofili possono digerirli.⁵⁵

Nella FC, a causa della sovra-espressione dei neutrofili, dovuta sia alla chemiotassi che alla riduzione della loro clearance, questi normali meccanismi di difesa diventano patologici.

In particolare, la ridotta clearance dei neutrofili da parte dei macrofagi, porta i neutrofili in fase di decomposizione piuttosto che di eliminazione, con conseguente versamento del contenuto intercellulare. Quest'ultimo è costituito prevalentemente da actina, DNA, e sostanze chemio attrattive, che contribuiscono ad aumentare la viscosità dell'espettorato di FC, e promuovono l'afflusso di altri neutrofili, alimentando ulteriormente lo stato infiammatorio. Inoltre, anche la clorurazione degli agenti patogeni fagocitati è compromessa, causando un'alterata difesa dell'ospite con persistenza di batteri.

Il quadro flogistico nella FC è caratterizzato anche da: un basso rapporto tra acido docosaesaenoico (DHA) e acido arachidonico nelle membrane cellulari, che favorisce

l'infiammazione TLR4-dipendente, un aumento della trascrizione del fattore NFκB e una segnalazione difettosa del fattore nucleare eritroide 2 (Nrf2), che causano una diminuzione della sintesi di glutatione e un aumento della trascrizione ed esocitosi della mucina.

La secrezione di bicarbonato nelle vie aeree dipende da una CFTR funzionante. In pazienti con FC, il pH dello strato mucoso e periciliare è otto volte più acido del normale; questo comporta sia una inibizione dell'attività antibatterica, con conseguente compromissione dell'immunità, sia la formazione di uno spesso strato denso di mucine che intrappola le particelle e aderisce fortemente alle cellule epiteliali, promuovendo anche in questo caso l'infiammazione delle vie aeree (**Figura 12**).⁵⁶

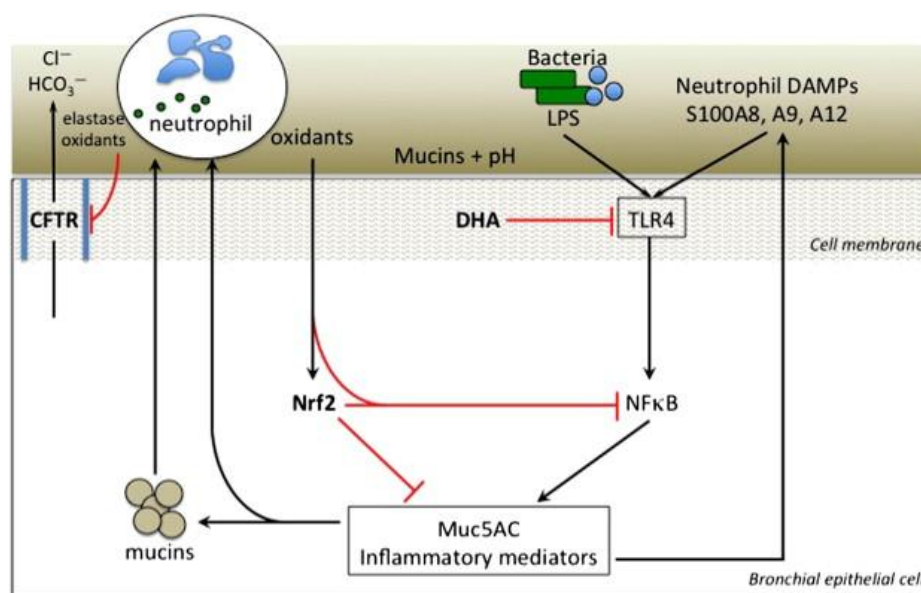


Figura 12. Potenziali connessioni tra la disfunzione di CFTR e l'infiammazione polmonare nella FC (le linee rosse rappresentano l'inibizione, quelle nere l'induzione). S100A8, A9 and A12 sono proteine infiammatorie derivanti dai neutrofili.⁵⁶

Nella FC, la criticità non è soltanto rappresentata da una anomala e abnorme risposta infiammatoria, ma anche dall'incapacità del sistema immunitario di attenuarla o spegnerla in

modo appropriato.

Infatti, diversi mediatori regolatori dell'infiammazione, come l'IL-10, l'ossido nitrico e la lipossina A4, sono carenti nelle vie aeree della FC. Ad esempio, la diminuzione dell'ossido nitrico può inibire l'attività antimicrobica e compromettere la capacità di rilassamento della muscolatura liscia delle vie aeree, promuovendo così l'infiammazione.

Pertanto, la mancanza di questi fattori di contro-regolazione determina uno squilibrio tra fattori pro- e antinfiammatori, che rappresenta la chiave di volta dell'eccessiva risposta infiammatoria, anche in assenza di infezione.^{55,56}

Ricapitolando, il quadro infiammatorio nella FC è determinato sia dalla disfunzione della proteina CFTR che dalle infezioni batteriche, e costituisce la principale causa di distruzione del tessuto polmonare.

Nonostante ciò, come già visto, l'uso prolungato di farmaci corticosteroidi per via orale non è attualmente raccomandato, a causa dei gravi effetti avversi sistemici, suggerendo pertanto lo sviluppo di una terapia antinfiammatoria innovativa.

1.4.2.1. L'innovazione fa la differenza: gli analoghi delle prostacicline per il trattamento della fibrosi cistica

Come già discusso in precedenza, la FC è causata da mutazioni del gene CFTR, codificante per una proteina canale del cloruro. Poiché l'attivazione di CFTR è cAMP-dipendente, tutte le sostanze in grado di aumentarne i livelli intracellulari potrebbero avere un potenziale nel trattamento della FC.⁵⁷ A supporto di tale teoria, è stato recentemente dimostrato che gli analoghi della prostaciclina, combinati con altri farmaci, come gli inibitori della PDE4, possono indurre l'espressione e il *gating* della proteina CFTR e di quella mutata, grazie alla loro capacità di aumentare i livelli di cAMP nelle cellule bronco-epiteliali, rappresentando pertanto un nuovo promettente approccio per il trattamento della FC.^{57,58}

La prostaciclina, nota anche come prostaglandina I₂ (PGI₂), è un derivato dell'acido arachidonico sintetizzato per opera dell'enzima ciclo-ossigenasi, denominata anche prostaglandina endoperossido H₂ sintetasi, localizzato nelle cellule muscolari lisce ed endoteliali vascolari.

PGI₂ agisce principalmente come antagonista per il recettore dell'inositolo trifosfato (IP), accoppiato a una proteina G_s, che in seguito all'attivazione stimola l'attivazione dell'adenosina monofosfato ciclico (cAMP), con conseguente aumento dei livelli intracellulari di cAMP e attivazione delle vie di segnalazione delle cellule A dipendenti (cellule dipendenti dall'acido arachidonico). Come risultato finale si ha l'induzione del rilassamento della muscolatura liscia vascolare.

Gli analoghi della PGI₂ sono farmaci ampiamente utilizzati nel trattamento delle malattie vascolari polmonari e periferiche, grazie ai potenti effetti vasodilatatori, all'inibizione dell'aggregazione piastrinica e della proliferazione delle cellule muscolari lisce nella parete vascolare, e alla regolazione dell'immunità innata e adattativa, con effetti antinfiammatori e immunosoppressivi.⁵⁸⁻⁶⁰ È stato inoltre dimostrato che, gli analoghi della prostaciclina possono ridurre l'infiammazione vascolare spegnendo efficacemente i programmi trascrizionali pro-infiammatori dei macrofagi e il conseguente rilascio di citochine.⁶¹⁻⁶³

L'Iloprost (**Figura 13**) è un derivato chimicamente stabile di seconda generazione della PGI₂, sintetizzato nel 1980 ed approvato dalla Food and Drug Administration (FDA) nel 2004 per il trattamento dell'ipertensione polmonare arteriosa (IPA).

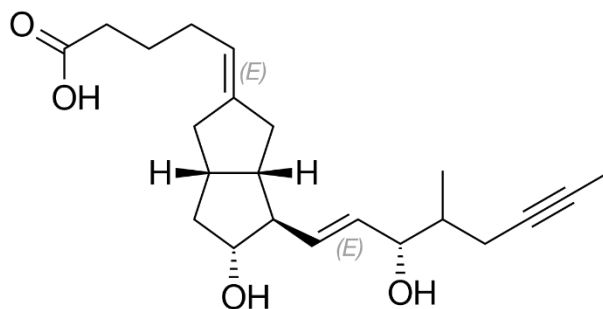


Figura 13. Struttura chimica dell'Iloprost.

L'Iloprost si presenta come una miscela di diastereoisomeri 4R e 4S, presenti rispettivamente con un rapporto di circa 53:47, dei quali l'isomero 4S è il vasodilatatore più potente.

Il farmaco viene rapidamente assorbito per via parenterale, con una biodisponibilità del 63%, si trova, indipendentemente dalla concentrazione somministrata, per il 60% coniugato alle proteine plasmatiche, soprattutto all'albumina, e viene metabolizzato principalmente a livello epatico, per beta ossidazione della catena laterale carbossilica, dando vita ad un metabolita inattivo.

Attualmente, esistono in commercio due forme farmaceutiche contenenti Iloprost: l'Endoprost® per via endovenosa, e il Ventavis® somministrato per via inalatoria.

In particolare, l'Endoprost è una formulazione in fiale, disponibile in due diverse concentrazioni da somministrare per infusione, una da 1 ml e una da 0,5 ml contenenti rispettivamente 0,100 mg e 0,050 mg di Iloprost trometamolo.

Indipendentemente dal dosaggio la somministrazione dell'Endoprost si effettua in ambito ospedaliero, tramite un accesso venoso in infusione giornaliera, e tale trattamento prosegue per un totale di 4 settimane. La velocità di infusione viene regolata sulla base della tollerabilità individuale del paziente nell'ambito di un range di infusione compreso fra 0,5 e 2 ng Kg min per una durata di 6 ore.

La somministrazione sistemica di Iloprost è associata a gravi effetti collaterali, che possono

essere parzialmente superati dalla via polmonare.

Il Ventavis si presenta sottoforma di fiale da nebulizzare, commercializzate in tre diversi dosaggi di Iloprost: 10 µg (1 ml), 20 µg (2 ml), 20 µg (1 ml) di Iloprost trometamolo.

Il contenuto delle fiale è somministrato tramite specifici nebulizzatori quali il Breelib, l'I-Neb, e il Ventaneb, e la somministrazione del farmaco avviene mediante l'inspirazione della soluzione nebulizzata.

Tuttavia, anche in questo caso, la comparsa di effetti collaterali e le frequenti sedute di inalazione (da sei a nove al giorno), necessarie a causa della breve emivita del farmaco (circa 30 minuti), riducono il successo della terapia.⁶⁴

1.5. La terapia inalatoria

La via inalatoria è da tempo riconosciuta come una importante via di accesso dei farmaci per il trattamento o la profilassi delle patologie respiratorie, come l'asma, la BPCO e la FC.

Per queste patologie, la somministrazione locale del farmaco presenta numerosi vantaggi. In primo luogo, con tale modalità è possibile ottenere importanti effetti terapeutici con dosi significativamente inferiori rispetto a quelle necessarie quando si utilizza la via sistemica. Portare la sostanza farmacologicamente attiva direttamente sull'organo bersaglio presenta infatti due rilevanti conseguenze: da un lato un aumento della concentrazione locale della stessa, con ridotto effetto di primo passaggio e di catabolismo complessivo, dall'altro una netta riduzione degli effetti farmacologici indesiderati soprattutto a livello sistemico.

Inoltre, la natura non invasiva della via di somministrazione aumenta la compliance e l'aderenza alla terapia.⁶⁵

L'inalazione, considerata la via d'elezione per il trattamento di malattie limitate alle vie respiratorie, negli ultimi anni viene impiegata anche come possibile accesso al circolo

sistemico. Infatti, grazie alla presenza di una elevata area superficiale disponibile per l'assorbimento di farmaci, allo spessore relativamente sottile della barriera epiteliale a livello alveolare e all'elevato flusso sanguigno, il polmone potrebbe rappresentare un sito di somministrazione più conveniente rispetto alla somministrazione parenterale.

L'inizio dell'azione farmacologica del farmaco, a seguito della somministrazione polmonare, è molto rapido, paragonabile a quello ottenuto in seguito a somministrazione endovenosa; l'assorbimento sistemico dei farmaci invece, rispetto ad altre vie non tradizionali di somministrazione sistemica (buccale, sublinguale, nasale, rettale, vaginale) non è comparabile a quello ottenuto per via inalatoria, che risulta relativamente più alto.⁶⁶

1.5.1. Cenni di anatomia e fisiologia polmonare

Il sistema respiratorio, in associazione con il sistema circolatorio, è deputato agli scambi gassosi ossigeno-anidride carbonica.

Da un punto di vista anatomico, il tratto respiratorio viene distinto in vie aeree superiori, caratterizzate da naso, faringe e laringe, e vie aeree inferiori; queste ultime vengono convenzionalmente suddivise in una zona conduttiva o centrale, costituita da trachea, bronchi, bronchioli, bronchioli terminali e respiratori, e una zona respiratoria o periferica costituita da bronchioli respiratori e regioni alveolari.

La trachea si dirama in due bronchi primari destro e sinistro, i quali si dividono progressivamente nei bronchi secondari e terziari per i lobi dei polmoni (due per il polmone sinistro e tre per il polmone destro) e in bronchioli sempre più piccoli fino a diventare respiratori bronchioli (**Figura 14**).

Questi a loro volta forniscono aria attraverso i condotti alveolari negli alveoli, sede degli scambi gassosi, dove infatti l'ossigeno diffonde attraverso le pareti degli alveoli nei capillari sanguigni.

La riduzione del diametro delle vie aeree e l'aumento della superficie sono i due fattori più

importanti che influenzano la funzionalità polmonare. Il diametro della trachea è di circa 1,8 cm, mentre il diametro dei condotti è di circa 0,04 cm, consentendo un'adeguata penetrazione dell'aria nelle vie aeree inferiori necessaria per l'espansione dei polmoni.⁶⁷

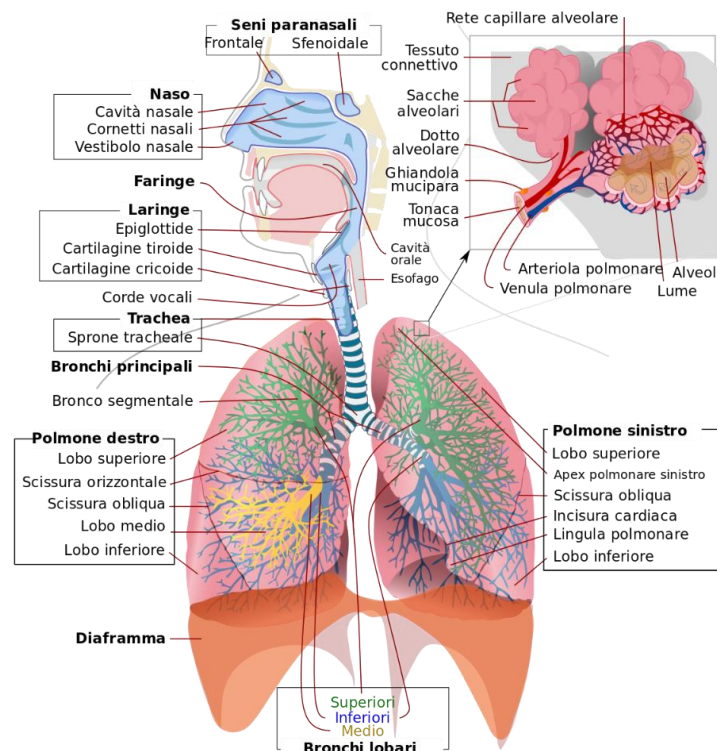


Figura 14. Struttura anatomica del sistema respiratorio.

Un altro importante fattore che influenza la funzionalità polmonare è la presenza o assenza di cartilagine nelle vie aeree. La trachea e i bronchi sono rinforzati con cartilagine ialina al fine di tenere aperte le vie aeree, garantendo la pervietà e l'accessibilità anche quando la pressione interna è inferiore a quella esterna. Il diametro maggiore e la struttura rigida sono responsabili di una piccola resistenza conferita dalla trachea e dai bronchi al flusso d'aria. Invece i bronchioli non hanno cartilagine e sono circondati da muscoli lisci che per via della loro contrazione influenzano il lume del bronchiolo.

L'apparato respiratorio è coperto da un epitelio colonnare pseudostratificato ciliato che varia

lungo il tratto e serve ad inumidire e proteggere le vie respiratorie fungendo da barriera a potenziali agenti patogeni e particelle estranee, al fine di prevenire l'infezione e le lesioni dei tessuti dall'azione della *clearance* mucociliare.⁶⁷

La maggior parte delle cellule che costituiscono l'epitelio respiratorio sono costituite da cellule ciliate (specializzate nelle modifiche), caliciformi (con capacità di secernere muco e liquido periciliare) e una membrana basale. A livello dei bronchioli più fini l'epitelio diventa cuboidale, mentre gli alveoli sono caratterizzati da un epitelio squamoso, le cui cellule sono anche chiamate pneumociti di tipo I con la funzione di facilitare lo scambio dei gas. Tra queste vi sono sparse le cellule cuboidali anche chiamate pneumociti di tipo II, le quali secernono il surfactante, tensioattivo costituito per il 90% da lipidi e il 10% da proteine, con la funzione di ridurre la tensione superficiale e prevenire il collasso degli alveoli. Gli spazi alveolari si trovano in comunicazione con l'ambiente esterno attraverso le vie aeree, pertanto facilmente accessibili dai patogeni; tuttavia, l'organismo risulta essere protetto da ciò, grazie alla presenza dei linfociti e macrofagi.⁴⁸

1.5.2. Deposizione degli aerosol nelle vie aeree

Al fine di somministrare un farmaco per via inalatoria è necessario che esso sia formulato in forma di aerosol, ovvero un sistema bifasico di particelle microscopiche di sostanze liquide o solide disperse in fase gassosa.⁶⁵

La deposizione polmonare dipende da molteplici fattori quali le proprietà del farmaco, le caratteristiche della formulazione, il dispositivo impiegato per l'aerosolizzazione, le caratteristiche del paziente (geometria dei polmoni, sesso, età, integrità del sistema polmonare o presenza di malattie) e la sua capacità nell'impiegare il dispositivo.

La proprietà fisica più importante per un aerosol è la dimensione delle particelle, la quale è standardizzata calcolando il diametro aerodinamico (d_a) della particella, definito come il

diametro di una sfera di densità unitaria che ha la stessa velocità di sedimentazione nell'aria della particella in esame: ⁶⁵

$$d_a = d \sqrt{\frac{\rho}{\rho_0 \chi}}$$

dove d è il diametro geometrico della particella, ρ è la densità della particella, χ è il fattore forma della particella, che denota la deviazione della forma dalla sfericità, e ρ_0 è la densità unitaria (cioè 1 g cm^{-3}).

Inoltre, la dimensione delle particelle inalate è definita dal diametro aerodinamico mediano di massa (MMAD), che descrive il diametro di una particella di massa uguale al diametro medio delle particelle di una popolazione, ovvero il diametro rispetto al quale il 50 % p/p della massa dell'aerosol ha dimensioni maggiori e il 50% p/p dell'aerosol ha dimensioni minori.

La distribuzione dimensionale delle particelle è in genere rappresentata dalla Deviazione Standard Geometrica (DSG); quest'ultima è calcolata come il rapporto tra l'ottantaquattresimo percentile stimato e il cinquantesimo percentile ed è indicativa dell'ampiezza della distribuzione della dimensione aerodinamica delle particelle.

Un'altra proprietà correlata alla dimensione delle particelle è l'igroscopicità; quando le particelle entrano nel tratto respiratorio, trovano un'umidità relativa elevata che potrebbe provocare la condensazione dell'acqua sulla loro superficie. L'eventuale incremento del diametro dovuto ad igroscopicità e conseguente aggregazione delle particelle può influenzare la deposizione di particelle, determinando una deposizione più alta nel tratto respiratorio rispetto a quanto sarebbe stato previsto dalle valutazioni della loro dimensione iniziale. ⁶⁵

In generale, si ritiene che la crescita dimensionale dovuta ad igroscopicità non abbia molto effetto nelle particelle con MMAD inferiore a $0.1 \mu\text{m}$, mentre tale effetto è molto intenso in particelle con MMAD maggiore di $0.5 \mu\text{m}$. ⁶⁶

L'efficacia di un aerosol terapeutico dipende dunque dalla sua capacità di penetrare nelle vie respiratorie e di depositarsi in esse. Per penetrare nelle regioni più profonde, gli aerosol richiedono un d_a inferiore a circa 5-6 μm , e minore di 2 μm per la deposizione alveolare. Particelle più grandi si depositano nel tratto respiratorio superiore e vengono rapidamente rimosse mediante il processo di clearance mucociliare; il farmaco può quindi conseguentemente essere assorbito per via sistemica e può potenzialmente causare effetti avversi.

Diversamente, le particelle porose, con diametro fisico dell'ordine di 20 μm , vengono efficacemente trasportate e depositate nei polmoni, poiché avendo bassa densità per via della presenza di porosità elevata nella loro struttura, presentano basso diametro aerodinamico e vengono quindi trasportate nei tratti più profondi dell'albero respiratorio.⁶⁵

In particolare, la deposizione delle particelle nelle vie aeree può avvenire attraverso tre differenti meccanismi: impatto inerziale, sedimentazione gravitazionale e diffusione Browniana.

L'impatto inerziale è quel fenomeno per il quale la particella inalata tende a continuare una traiettoria attraverso le vie aeree, indipendentemente dalla conformazione e dalle curve del tratto respiratorio. Se le particelle posseggono un momento sufficientemente alto, non seguiranno il flusso d'aria, ma nei punti in cui il flusso cambia improvvisamente direzione impattano sulle pareti delle vie aeree. Ciò accade principalmente nelle sedi bronchiali in cui la velocità dell'aria è elevata e il flusso è turbolento, coinvolgendo le particelle di dimensioni superiori a 5 μm che sono per lo più trattenute nella regione orofaringea.⁶⁵

La sedimentazione gravitazionale delle particelle inalate dipende dalle loro dimensioni e dalla densità, oltre che dal tempo di permanenza nelle vie aeree. Tale meccanismo coinvolge principalmente le particelle con un diametro compreso nell'intervallo 1-5 μm , che si depositano nelle vie aeree inferiori e negli alveoli e quelle che non sono soggette alla deposizione per impatto.

La diffusione è un fenomeno relativo alle particelle con MMAD inferiore a 1 μm che, in seguito ai moti browniani, si muovono in modo irregolare dalla nube dell'aerosol alle pareti delle vie aeree. Tali particelle generalmente non si depositano e vengono espulse ancora una volta all'espirazione.⁶⁶

Sebbene quelli appena menzionati siano i principali, altri meccanismi che possono verificarsi sono l'intercezione, tipico di particelle aventi forme irregolari, e l'attrazione elettrostatica, secondo cui una carica elettrostatica su una particella induce una carica di segno opposto sulle pareti del tratto respiratorio, determinando così l'attrazione tra particella e parete.⁶⁵

1.5.3. Dispositivi di inalazione

Nonostante il concetto di terapia inalatoria possa sembrare semplice, in realtà, la sua applicazione pratica ha comportato la progettazione e la costruzione di dispositivi di inalazione ancora oggi in continua evoluzione, dai più semplici ai più complessi e sofisticati, aventi diverse modalità di impiego e finalità.

Generalmente, i dispositivi utilizzati per la somministrazione inalatoria di agenti terapeutici sono di tre tipologie: nebulizzatori, inalatori pressurizzati di aerosol dosato (*Pressurized Metered Dose Inhaler*, pMDI) ed inalatori di polvere secca (*Dry Powder Inhaler*, DPI).⁶⁵

I principali problemi legati all'uso dei dispositivi inalatori sono la deposizione di particelle aerosolizzate nella regione orofaringea e nelle vie aeree superiori e la mancanza di coordinamento tra l'azionamento del dispositivo e l'inalazione del paziente, particolarmente difficile nei bambini e negli anziani.

I **nebulizzatori** sono dispositivi che convertono i liquidi in aerosol; forniscono volumi relativamente grandi di soluzioni o sospensioni per un periodo prolungato e sono spesso utilizzati per farmaci che non possono essere opportunamente formulati in pMDI o DPI, o dove la dose terapeutica è troppo elevata per essere somministrata con questi sistemi.^{65,68}

Questi strumenti nebulizzano in modalità a jet o a ultrasuoni e rappresentano il mezzo più efficiente per l'assunzione dei farmaci inalatori.

Il flusso, erogato in modo costante, può essere assunto senza particolari manovre da parte del paziente, cui viene richiesto esclusivamente di respirare al proprio volume corrente.

L'ingombro, la rumorosità, la necessità di alimentazione tramite rete elettrica, la manutenzione regolare, il tempo necessario per assumere le dosi e la quantità elevata di farmaco consumata, sono alcuni aspetti svantaggiosi legati all'uso di questi strumenti.⁶⁸

Gli **inalatori dosati pressurizzati** (*pressurized Metered-Dose Inhalers*, **pMDI**), sono stati introdotti a metà degli anni '50 e sono i dispositivi di somministrazione di farmaci per inalazione più comunemente usati per il trattamento di patologie respiratorie.

Esistono due grandi categorie di pMDI: quelli tradizionali e quelli attivati dal respiro. I tradizionali pMDI hanno un design del tipo “premi e respira”: premendo la bomboletta viene rilasciata dentro l'attivatore la miscela farmaco-propellente, che poi si espande e vaporizza per convertire il farmaco liquido in aerosol. Gli pMDI attivati dal respiro (Autohaler™), invece, sono stati progettati per eliminare la necessità di coordinazione manuale durante la somministrazione dei farmaci per aerosol. Il suo meccanismo è attivato dall'inalazione attraverso un beccuccio attivato dal respiro, che garantisce una risposta automatica allo sforzo inspiratorio del paziente.

Nei pMDI il farmaco è disciolto o sospeso in uno o più propellenti liquidi opportuni con altri eccipienti, come tensioattivi, ed è contenuto in recipienti pressurizzati dotati di una valvola di dosaggio, grazie alla quale ogni erogazione è caratterizzata da una dose predeterminata di farmaco che il paziente deve inalare.⁶⁵

I propellenti utilizzati nelle formulazioni per pMDI sono gas liquefatti: essi sono gas a temperatura ambiente e a pressione atmosferica, ma si liquefanno non appena si riduce la temperatura o aumenta la pressione. Inizialmente, venivano impiegati i clorofluorocarburi

(CFC), i quali essendo stati vietati dal 1995 nell'Unione Europea e negli Stati Uniti perché dannosi per l'ozono, sono stati rimpiazzati dagli idrofluoroalcani (HFA). In particolare, HFA-134a e HFA-227 vengono usati come alternativa al CFC-12.⁶⁹

Gli pMDI hanno avuto una grandissima diffusione derivante senza dubbio dalla loro praticità d'uso, dalla facile trasportabilità e dal basso costo.

Uno dei punti critici nell'uso di questi strumenti, invece, consiste nella necessità di un'adeguata tecnica di inalazione e quindi di una partecipazione attiva del paziente, che a tale scopo deve essere istruito adeguatamente, per evitare il depositarsi della maggior parte del principio attivo nelle prime vie aeree, con conseguente inefficacia terapeutica.

Per semplificare l'uso dei pMDI, esistono i distanziatori e gli spaziatori o camere ad alto volume o *holding-chambers*, che diminuiscono la necessità di coordinamento tra erogazione ed inalazione. In particolare, il distanziatore è costituito da un tubo che si interpone tra la bocca del paziente e l'erogatore e che consente al farmaco emesso di non disperdersi nell'ambiente mentre il paziente effettua la respirazione.^{65,68}

Infine, un altro svantaggio legato all'uso dei pMDI è rappresentato dal fatto che solo una piccola parte della dose rilasciata raggiunge il sito d'azione; ciò si verifica in quanto la maggior delle particelle erogate impatta nell'area orofaringea, poiché con l'attivazione del dispositivo, le prime goccioline del propellente escono ad alta velocità (> 30 m/s). Solitamente le dimensioni medie delle particelle emesse superano i 40 μm e i propellenti non possono evaporare rapidamente per generare particelle/goccioline di dimensioni adeguate alla deposizione polmonare nelle zone più profonde.⁶⁸

Il primo pMDI a dose multipla, il Medihaler®, è stato inventato nel 1956 dai laboratori Riker, per la somministrazione locale di broncodilatatori e corticosteroidi per il trattamento dell'asma e della BPCO. Ad oggi, sono numerose le preparazioni per aerosol disponibili sottoforma di pMDI; si tratta di β_2 agonisti, anticolinergici, combinazioni di β_2 agonisti e anticolinergici,

corticosteroidi e farmaci antiasmatici, impiegati soprattutto per la cura dell'asma e della BPCO. Gli inalatori a nebbia morbida (*soft mist inhaler*, SMI), sono stati sviluppati al fine di ridurre o eliminare la dipendenza dallo sforzo inspiratorio del paziente per disperdere il farmaco; questi utilizzano una fonte di energia interna, che può essere una batteria, un gas compresso o un meccanismo a molla, per aerosolizzare il letto di polvere nel DPI.⁶⁸

Questi nuovi dispositivi di inalazione non si classificano perfettamente nelle categorie tradizionali di pMDI, DPI e nebulizzatori, poiché operano su principi alternativi. Tra questi, il Respimat Soft Mist® (Boehringer Ingelheim) rappresenta il primo SMI disponibile in Italia per uso clinico nel trattamento della BPCO. Si tratta di un dispositivo multidose, privo di propellente che si utilizza per la somministrazione di formulazioni liquide. Il suo utilizzo ha dimostrato di essere bene accettato dai pazienti grazie alle sue caratteristiche di inalazione e manipolazione.⁶⁵

Negli **inalatori di polvere secca (*Dry Powder Inhaler*, DPI)** il farmaco è pre-caricato nel dispositivo di inalazione o dispensato in capsule di gelatina rigida o in dischi di blister che vengono inseriti nel dispositivo prima dell'uso.

Le formulazioni DPI sono prive di propellente e generalmente non contengono alcun eccipiente, ad eccezione del veicolo, solitamente il lattosio, di piccole dimensioni e quindi facilmente trasportabili, impiegato per migliorare le proprietà di flusso della polvere.

Questi dispositivi sono azionati dal respiro, per cui hanno il vantaggio di non richiedere il coordinamento tra l'attuazione del dispositivo e l'inalazione. Altro vantaggio dei DPI è la possibilità di erogare dosi di farmaco maggiori rispetto ai sistemi pMDI, in cui l'erogazione del farmaco è limitata dalla capacità volumetrica della valvola dosatrice e dalla concentrazione della sospensione che non deve causare ostruzione della valvola.

Uno degli svantaggi dei DPI è rappresentato dal fatto che la liberazione delle polveri dal dispositivo e la disaggregazione delle particelle sono limitate dalla capacità inalatoria del

paziente che può essere compromessa in caso di malattia respiratoria. Inoltre, una maggiore turbolenza del flusso d'aria, generata da un aumento della velocità dell'aria inalata, aumenta la disaggregazione delle particelle emergenti, ma anche la possibilità di impatto inerziale nelle vie aeree superiori e nella gola.

Per produrre particelle di dimensioni adeguate (preferibilmente inferiori a 5 μm), le polveri da utilizzare nei DPI sono generalmente micronizzate; le tecniche più utilizzate a tal proposito sono *spray-drying*, *spray-freeze-drying* e tecnologia dei fluidi supercritici.⁶⁵

Attualmente i DPI possono essere classificati in tre categorie, a seconda del modello del loro contenitore di dose.

I *DPI* mono-dose funzionano rilasciando il farmaco in polvere da una capsula forata. Il primo dispositivo *DPI* mono-dose sviluppato è stato lo Spinhaler® per la somministrazione del sodio cromoglicato. Altri esempi sono l'Aerolizer®/Cyclohaler® (Novartis/Teva) per la somministrazione di formoterolo e salbutamolo, e l'HandiHaler® (Boehringer Ingelheim) per quella di tiotropio bromuro.

Sebbene tali dispositivi abbiano strutture diverse, il loro principio di funzionamento è simile: quando viene utilizzato un *DPI* mono-dose, l'utente posiziona la singola capsula nell'apposito spazio dedicato ad accogliere il farmaco. Successivamente, il dispositivo deve essere approntato bucando la capsula mono-dose per permettere all'aria di entrare nel dispositivo per la successiva dispersione con l'atto inspiratorio. Il principale svantaggio dei *DPI* mono-dose è legato al tempo necessario per caricare una dose per ogni utilizzo.

I *DPI* a unità-dose multiple utilizzano dosi confezionate in fabbrica e sigillate in modo che il dispositivo possa contenere più dosi contemporaneamente senza dover essere ricaricato. Un dispositivo molto comune di questo tipo è l'Accuhaler®, noto anche come inalatore Diskus® (Glaxo-SmithKline), che contiene fino a 60 dosi.

L'inalatore Ellipta® (Glaxo SmithKline), progettato per essere facilmente azionato da pazienti

di tutte le età, è un dispositivo che può contenere fino a 30 dosi di farmaco senza dover sostituire cartucce o capsule.

I *DPI* multi-dose misurano la dose a partire da un reservoir di farmaco in polvere o erogano singole dosi attraverso blister pre-misurati. I modelli più comuni di *DPI* multi-dose includono il Clickhaler® (Innovata Biomed), il Twisthaler® (Schering-Plough), il Flexhaler® (AstraZeneca, Wilmington, DE) ed il Diskus® (GlaxoSmithKline), utilizzati per la somministrazione di corticosteroidi e broncodilatatori. Un altro importante dispositivo è il Turbohaler® (Astrazeneca), il quale contiene fino a 200 dosi di farmaco non diluito, micronizzato e aggregato, contenuto all'interno di un serbatoio dal quale scorre mediante un disco rotante nell'unità di dosaggio.⁶⁵

1.5.4. Il destino degli aerosol

Una volta depositate nelle vie aeree, le particelle inalate possono essere eliminate attraverso diversi meccanismi fisiologici, quali la tosse, la dissoluzione, la traslocazione in altri siti, la fagocitosi da parte dei macrofagi e la clearance mucociliare.⁶⁵

Nelle vie aeree, le particelle vengono a contatto con il tensioattivo presente nel fluido di rivestimento delle vie aeree; quest'ultimo migliorerà la capacità delle stesse di essere bagnate nel fluido presente, penetrando nello stesso.⁷⁰

La dissoluzione delle particelle dipende sia dal volume dei fluidi presenti nel sito di deposizione, sia dalla solubilità e dalla quantità delle particelle.⁷⁰ I composti liberamente solubili in acqua (sali organici e composti polari) si dissolveranno prontamente nel fluido delle vie aeree; le molecole solubilizzate vengono così diluite nel fluido delle vie aeree, dove potranno legarsi a proteine oppure ad altri costituenti ed essere successivamente metabolizzate o assorbite, oppure eliminati dalla clearance mucociliare.

Le particelle scarsamente solubili richiedono più tempo per dissolversi e riescono a penetrare

nelle regioni alveolari, dove vengono rimosse più lentamente.

La clearance mucociliare opera nelle vie aeree ciliate, dove il movimento delle ciglia trasporta il muco, contenente le particelle, sulla superficie epiteliale verso la faringe-laringe e quindi verso il tratto gastrointestinale.⁷⁰

Le velocità delle clearance mucociliari diminuiscono in maniera proporzionale al diametro delle vie aeree: nella trachea è 5,5 mm/min., mentre nei bronchi principali 2,4 mm/min.

La composizione e la clearance del muco respiratorio sono spesso alterate nei pazienti che soffrono di malattie respiratorie e ciò può influire sul destino del farmaco inalato. Ad esempio, lo spessore dello strato di muco può aumentare da 2 a 30 μm nei polmoni sani a oltre 250 μm nelle patologie ostruttive delle vie respiratorie, determinando una scarsa o assente penetrazione degli agenti terapeutici.⁶⁵

Generalmente, i macrofagi alveolari fagocitano tali particelle tramite la chemiotassi che coinvolge l'opsonizzazione. Si ritiene che la fagocitosi dei macrofagi si completi entro 12 ore dopo la deposizione delle particelle negli alveoli.⁷⁰

Una volta interiorizzate nei macrofagi, le particelle potranno essere disintegrate dagli enzimi lisosomiali oppure accumularsi nel sistema linfatico. Anche in questo, la presenza di patologie respiratorie ostruttive, nelle quali generalmente si verifica una abnorme risposta infiammatoria con una sovra-espressione di cellule macrofagiche, può compromettere i meccanismi di fagocitosi.⁷⁰

Quando le particelle inalate riescono ad eludere i meccanismi di difesa appena descritti, possono essere endocitate dalle cellule epiteliali, oppure trasportate al sistema linfatico o a quello circolatorio, tramite fenomeni di transitosi; a seguito della traslocazione, giungono nella circolazione sistemica, ove possono causare effetti indesiderati.⁷⁰ Questo meccanismo potrebbe però essere sfruttato qualora lo scopo sia una somministrazione sistemica.

Un'azione rapida del farmaco può essere ottenuta tramite l'impiego di soluzioni o polveri di

sali solubili in acqua, un assorbimento più lento o prolungato, invece, utilizzando formulazioni in sospensione o innovativi sistemi di veicolazione micro- e nanostrutturati innovativi.⁶⁵

1.6. Sistemi di rilascio innovativi per terapia inalatoria

Come descritto in precedenza, la terapia inalatoria rappresenta la modalità terapeutica più sicura ed efficace per il trattamento delle patologie respiratorie, in quanto consente al farmaco di agire direttamente sull'organo bersaglio, offrendo l'opportunità di ottenere importanti effetti terapeutici con dosi decisamente inferiori rispetto a quelle richieste dalla via sistemica, e di ridurre al contempo gli effetti indesiderati sistemici.⁶⁵

Nonostante ciò, le alterazioni fisiopatologiche del sito di somministrazione, quali ad esempio l'ipersecrezione mucosa, l'alterazione della clearance mucociliare e l'aumento di cellule fagocitiche, possono influire negativamente sulla deposizione della forma di dosaggio a livello polmonare e sull'assorbimento del farmaco, limitandone pertanto l'efficacia terapeutica.⁷¹

Ad oggi, una migliore comprensione degli eventi molecolari e cellulari alla base della risposta infiammatoria, ha aperto la strada a nuove prospettive nel trattamento dell'infiammazione; in particolare, un crescente interesse è stato rivolto verso lo sviluppo di carrier nanostrutturati, opportunamente progettati, sia per la possibilità di agire su un bersaglio specifico, che per ottenere un rilascio controllato delle molecole bioattive.⁷²

Rispetto alle forme farmaceutiche convenzionali, i carrier nanostrutturati operano sulla stessa scala dei meccanismi biologici, e il loro utilizzo è applicabile in ambiti che vanno dalla diagnostica al *drug delivery*.

I sistemi nanostrutturati possono essere utilizzati per incorporare principi attivi sia idrofili che idrofobi, modulandone il profilo farmacocinetico anche a livello polmonare.^{72,73}

Inoltre, la loro progettazione con specifiche e proprietà chimico-fisiche modulabili (ad es.

dimensioni, forma, chimica di superficie), in grado di superare i meccanismi di clearance polmonare, potrebbe fornire tempi di permanenza prolungati dell'agente terapeutico all'interno delle vie respiratorie, migliorandone l'efficacia terapeutica.⁷⁴

Pertanto, lo sviluppo di innovativi *carrier* nanostrutturati (**Figura 15**), opportunamente studiati e ingegnerizzati, in grado di proteggere e veicolare il farmaco a livello polmonare e di superare tutte quelle che sono le barriere fisiologiche e patologiche, rappresenta una valida e promettente alternativa per il trattamento dell'inflammatione.⁷⁵

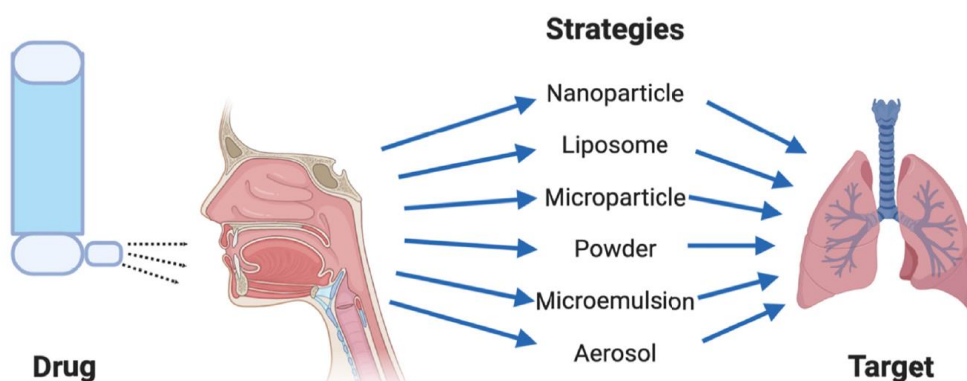


Figura 15. Carrier innovativi per la somministrazione di farmaci per via inalatoria.⁷⁵

1.6.1. Liposomi

I liposomi sono dei sistemi colloidali, costituiti da uno o più doppi strati fosfolipidici che circoscrivono al loro interno un core acquoso, capaci di incapsulare farmaci sia idrofili che idrofobi, poiché questi si posizionano rispettivamente nella fase interna acquosa o tra le code idrofobe del doppio strato fosfolipidico.⁷⁶

La formazione di doppi strati fosfolipidici è consentita dalla natura anfipatica dei fosfolipidi, mentre la loro rigidità e stabilità dipende dalla presenza e dalla quantità di colesterolo presente nella formulazione.

In base alla loro dimensione e al numero di *bilayer* fosfolipidici, possono essere suddivisi in:

small unilamellar vesicle (10-100 nm), *large unilamellar vesicle* (100-300 nm) e *multilamellar vesicle*.

In particolare, la composizione influenza la fluidità della membrana, e quindi la diffusione del farmaco, mentre il numero di doppi strati fosfolipidici può modulare la velocità di rilascio del farmaco.⁷⁶

I liposomi sono carrier nanostrutturati caratterizzati da elevata versatilità, biocompatibilità, biodegradabilità e assenza di immunogenicità.^{76,77}

Teoricamente, i liposomi rappresentano il carrier ideale per la somministrazione inalatoria, grazie alla loro elevata rassomiglianza con i surfattanti polmonari, che gli conferisce eccellente biocompatibilità.⁷⁸

I liposomi possono facilitare il rilascio intracellulare, a livello polmonare, di diversi agenti terapeutici attraverso la fusione con i lipidi della membrana plasmatica, l'endocitosi mediata da recettori e la fagocitosi. Inoltre, grazie alla loro natura anfipatica, offrono l'opportunità di un rilascio prolungato del farmaco in un'area localizzata, agendo come un sistema reservoir, e facilitano la consegna intracellulare ai macrofagi alveolari.

I fosfolipidi comunemente utilizzati per la realizzazione dei liposomi sono la dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), la fosfatidilcolina (PC), la distearoilfosfatidilcolina (DSPC), il dimiristoilfosfatidilglicerolo (DMPG), la dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) e la dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE).

Per le patologie respiratorie, il successo della terapia rappresenta da tempo una sfida, poiché la maggior parte delle molecole terapeutiche impiegate per il trattamento sono di natura idrofobica, presentando così delle serie problematiche nello sviluppo e nella somministrazione delle formulazioni. Inoltre, il deposito di molecole insolubili nei polmoni causa tossicità, anche se il farmaco viene somministrato localmente.

I liposomi possono essere veicolati ai polmoni mediante o nebulizzazione di una dispersione

acquosa di liposomi o come polvere secca.⁷⁷

Tuttavia, la nebulizzazione può causare la rottura del sistema con conseguente rilascio incontrollato del farmaco incapsulato. Le polveri secche di liposomi possono essere preparate mediante *spray-drying*, *spray-freeze-drying* e *freeze-drying* seguito da micronizzazione.

Recentemente, un nuovo farmaco, Arikayce, una sospensione liposomiale caricata con amikacina da nebulizzare, è stato approvato dalla FDA per il trattamento delle malattie polmonari infettive causate da un particolare gruppo di batteri, *Mycobacterium avium complex*. Gli studi controllati per questa formulazione hanno mostrato che circa il 29% dei pazienti a cui è stato somministrato Arikayce non ha mostrato crescita di micobatteri nelle colture dell'espettorato per 3 mesi. Inoltre, la formulazione è risultata efficace anche contro il *Mycobacterium abscessus* in pazienti affetti da fibrosi cistica, se somministrata una volta al giorno.⁷⁹

Attualmente, sono in fase di studio anche numerose formulazioni liposomiali per la veicolazione polmonare di agenti antiossidanti, potenzialmente sfruttabili per il trattamento dello stress ossidativo, coinvolto nella patogenesi della BPCO.

Infatti, l'efficacia terapeutica di agenti antiossidanti lipofili (α -tocoferolo), idrofili (glutazione e NAC), ed enzimi antiossidanti (superossido dismutasi, SOD e catalasi, CAT), in seguito a somministrazione inalatoria, è scarsamente limitata a causa delle loro proprietà chimico-fisico sfavorevoli. L'intrappolamento in vescicole liposomiali ha mostrato risultati promettenti, aumentando notevolmente l'attività di questi enzimi.^{80,81}

A tal proposito, Hoesel e collaboratori hanno testato in vitro formulazioni liposomiali caricate con NAC, dimostrando una riduzione del 59% dell'indice di permeabilità polmonare in una lesione acuta indotta dal 2-cloroetil solfuro di etile (CEES), agente chimico capace di avviare un danno cellulare associato a uno squilibrio tra ossidanti e antiossidanti, e delle concentrazioni dei mediatori pro-infiammatori nei fluidi di lavaggio bronco-alveolare.⁸²

Nonostante questi incoraggianti risultati, ad oggi, la terapia inalatoria con i liposomi presenta diversi limiti; infatti, i liposomi sono generalmente associati a perdita di farmaco a causa della loro relativa instabilità durante la nebulizzazione, processi di *spray-drying* e conservazione.

1.6.2. Nanoparticelle polimeriche (NPs)

Le nanoparticelle polimeriche (NPs) sono sistemi colloidali con un diametro medio generalmente compreso tra 10 e 500 nm. Da diversi anni ormai, questi sistemi hanno attratto moltissimi gruppi di ricerca, grazie all'innovazione che hanno apportato nell'ambito del drug delivery e della diagnostica.

Infatti, le NPs, aventi particolari proprietà chimico-fisiche, presentano numerosi vantaggi rispetto ad altri tipi di *nanocarrier*, quali un'ampia possibilità di scelta di polimeri biodegradabili e biocompatibili, una maggiore efficienza di caricamento del farmaco, una maggiore stabilità in condizioni fisiologiche, una migliore biodisponibilità dei farmaci ed un rilascio controllato del farmaco per un periodo di tempo prolungato, soddisfacendo pertanto i rigorosi requisiti richiesti per la veicolazione polmonare; inoltre, sfuggono in gran parte all'assorbimento da parte dei macrofagi polmonari e possono rimanere nel tessuto polmonare per settimane.⁸³⁻⁸⁵

Le nanostrutture polimeriche possono essere costituite da polimeri naturali, semisintetici e sintetici. A prescindere dalla loro natura, per poter essere utilizzati nella realizzazione di NPs, è necessario che questi soddisfino importanti criteri quali la biocompatibilità e la biodegradabilità.⁸⁴

I polimeri naturali più comunemente usati includono il chitosano, l'albumina, la gelatina, il collagene, le ciclodestrine, l'alginato e l'acido ialuronico (HA).

Essi hanno il vantaggio di combinare proprietà biologiche (quali la capacità di imitare la matrice extracellulare, che consente di sostenere la crescita cellulare in applicazioni di ingegneria

tissutale), e proprietà meccaniche. Inoltre, sono stati impiegati per lungo tempo per aumentare la permanenza in situ delle NPs e consentire un contatto intimo del sistema di somministrazione con la mucosa, grazie alle loro proprietà mucoadesive.

Tuttavia, la loro applicazione è spesso limitata a causa della loro bassa idrofobicità, che può compromettere l'incapsulamento di farmaci lipofili e causare un rapido rilascio di farmaci dalla matrice, e dalla limitata versatilità nella costruzione di una matrice extracellulare con specifiche proprietà.⁸⁶

I limiti dei polimeri naturali possono essere superati e compensati in parte con l'uso di polimeri sintetici, quali poliesteri, poliammidi e polianidridi, riproducibili su grande scala e più stabili; inoltre, possono essere trasformati in una matrice tridimensionale nella quale la struttura principale, le proprietà meccaniche e la velocità di degradazione possono essere controllate e manipolate.

I poliesteri alifatici, come l'acido polilattico (PLA), il copolimero acido polilattico-*co*-glicolico (PLGA) e il poli- ϵ -caprolattone (PCL) (**Figura 16**), sono i polimeri sintetici maggiormente studiati ed utilizzati per la realizzazione di *nanocarrier*, anche per applicazione polmonare, grazie alla loro bassa tossicità.^{87,88}

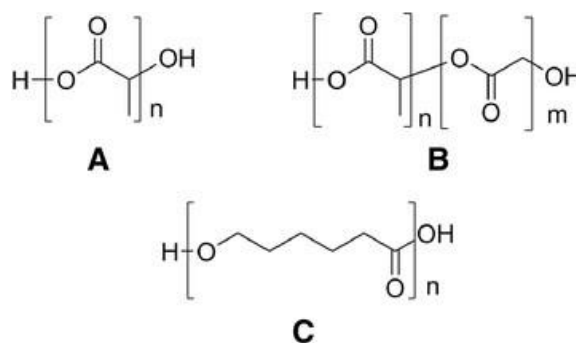


Figura 16. Strutture chimiche di: A) PLA, B) PLGA e C) PCL.

Tuttavia, la bassa velocità di degradazione (da settimane a mesi) potrebbe portare ad un accumulo indesiderato nel tratto respiratorio, soprattutto quando è richiesto un dosaggio frequente.^{88,89}

Inoltre, la bassa affinità dei farmaci con la matrice polimerica, spesso, porta a interazioni relativamente fragili tra farmaco e polimero, accompagnate da velocità di rilascio elevate, soprattutto per i farmaci idrofili, come alcune classi di antibiotici.

Un modo per arginare tale problema è quello di sintetizzare polimeri con caratteristiche particolari, come tassi di degradazione più rapidi e funzionalità ben definite per promuovere le interazioni con i composti terapeutici. In tal senso, la funzionalizzazione con polimeri idrofili, potrebbe conferire proprietà anfifiliche ai polimeri idrofobi, come i poliesteri, e renderli più adatti alle formulazioni polmonari.

Uno dei polimeri idrofili più utilizzati per applicazioni biomediche è il poli(etilenglicole) (PEG) (**Figura 17**) grazie alle sue comprovate proprietà quali idrofilia, neutralità elettrica, assenza di gruppi funzionali e flessibilità di catena.⁹⁰

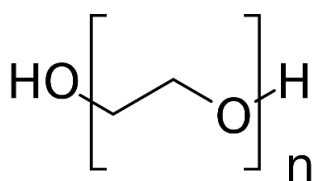


Figura 17. Struttura chimica del PEG.

Il PEG è utilizzato anche per rivestire la superficie di sistemi nanostrutturati di diversa natura, al fine di ottenere formulazioni "*stealth*", prolungando la permanenza della particella nel flusso sanguigno e impedendone l'eliminazione da parte del sistema reticoloendoteliale (RES) o del sistema fagocitario mononucleare presente in vari siti del corpo.⁹¹

Infatti, è ampiamente dimostrato in letteratura che, l'impiego di sistemi nanostrutturati, per la veicolazione di farmaci al polmone, con caratteristiche stealth risulta alquanto vantaggioso al fine di evitare il rapido assorbimento e la degradazione del farmaco, e per eludere la clearance polmonare, nonché per prolungare contemporaneamente l'emivita del farmaco in loco.

In particolare, la natura neutra, flessibile e idrofila del PEG può produrre correttamente strati di barriera superficiale che riducono l'adesione delle opsonine sulle particelle rendendole "invisibili" alle cellule fagocitiche.⁹¹

Tuttavia, se il rivestimento col PEG da un lato riduce il processo di opsonizzazione, dall'altro può indurre l'attivazione del complemento che è coinvolto nella rimozione delle nanoparticelle. Studi condotti con nanoparticelle polimeriche peghilate, infatti, hanno confermato che questi sistemi possono indurre l'attivazione del complemento, indipendentemente dalla lunghezza della catena PEG e dalla densità della superficie, promuovendo la rimozione da parte dell'assorbimento macrofagico della RES. L'attivazione del complemento è risultata, invece, inversamente correlata al peso molecolare del PEG, suggerendo che l'ostacolo sterico sulla superficie delle particelle dovuto al rivestimento polimerico riduce l'avvicinamento e l'associazione di proteine di grandi dimensioni, come la convertasi C3.⁹¹

Il rivestimento con PEG può migliorare, inoltre, la penetrazione dei vettori inalati attraverso lo strato mucoso e il liquido periciliare, che risulta fondamentale nel trattamento di patologie respiratorie di tipo ostruttivo, come la fibrosi cistica e la BPCO, ove l'alterazione patologica della composizione del muco, ostacola fortemente il passaggio di farmaci.⁹²

In particolare, le proprietà di penetrazione da parte di sistemi nanoparticellari, che espongono il PEG in superficie, nel muco potrebbero essere ottenute selezionando un PEG con peso molecolare sufficientemente basso (compreso tra 2 e 5 kDa) da evitare interazioni mucoadesive con le mucine, e con un'adeguata densità di rivestimento della superficie particellare per schermare o proteggere efficacemente il nucleo delle NPs.^{93,94} Anche la conformazione della

catena di PEG assume un ruolo importante; infatti, una conformazione del PEG “*brush like*”, conferisce uno shell protettivo, facilitando la penetrazione di particelle peghilate attraverso lo strato di muco al contrario, una conformazione “*mushroom like*” aumenta il tempo di permanenza della frazione di particelle aderente sullo strato di muco.⁹²

Considerando che per un’ottimale deposizione nelle vie aeree profonde, le particelle devono avere un d_a compreso tra 1 e 5 μm , risulta evidente che i nanosistemi tal quali non posso essere somministrati per via inalatoria poiché verrebbero immediatamente esalati; pertanto, le formulazioni a base di nanoparticelle richiedono lo sviluppo di una formulazione con opportune proprietà aerodinamiche.

Uno degli approcci più promettenti per convertire i sistemi nanostrutturati in polvere secca inalabile è la strategia *Nano in Micro* (NiM), che prevede l’incorporazione di nanoparticelle all’interno di matrici microparticellari idrosolubili aventi un opportuno diametro aerodinamico; in questo modo le microparticelle inalate, dopo deposizione nei polmoni, si disassemblano, liberando così le nanoparticelle.⁹⁵

Come materiali formanti la matrice microparticellare, possono essere scelti materiali inerti, che fungono solo da vettore per la somministrazione polmonare, come il mannitolo, oppure eccipienti “funzionali”, quali ad esempio i materiali mucoadesivi, come il chitosano o l’acido ialuronico, in modo da prolungare il tempo di permanenza della formulazione nel sito di assorbimento, consentendo un contatto prolungato con la mucosa, diminuendo di conseguenza la frequenza di somministrazione e aumentando la compliance del paziente.

1.6.3. Nanoparticelle ibride lipide-polimero (LPHNPs)

Le *lipid-polymer hybrid nanoparticles* (LPHNPs) rappresentano una nuova e promettente classe di nanostrutture, ampiamente studiata a livello preclinico grazie alle loro proprietà multifunzionali e alle loro innumerevoli applicazioni in ambito biomedico.⁹⁶

Queste, infatti, consentono la possibilità di miscelare una ampia gamma di lipidi e polimeri, racchiudendo in un unico sistema i vantaggi dei liposomi, come la biocompatibilità e la biodegradabilità, e delle nanoparticelle polimeriche come la stabilità e le elevate capacità di drug loading.

Strutturalmente, le LPHNPs mostrano tre diverse componenti funzionali: un core polimerico biodegradabile che può contenere farmaci di diversa natura; uno shell lipidico che consente di aumentare la ritenzione del farmaco all'interno del nucleo polimerico, proteggendolo dai fluidi esterni; ed infine uno strato esterno costituito dalle teste idrofile di lipidi che possono essere variamente funzionalizzate, ad esempio con il PEG; quest'ultimo conferisce proprietà stealth evitando il riconoscimento delle LPHNPs da parte del sistema immunitario, allungandone così l'emivita in circolo, e stabilizza il sistema. Il PEG può, inoltre, consentire la coniugazione con innumerevoli ligandi specifici, come molecole direzionanti, che possono facilitare il raggiungimento del tessuto bersaglio da parte del sistema ibrido.^{96,97}

Questo design strutturale unico garantisce un'elevata integrità strutturale e biocompatibilità, la capacità di caricare più agenti terapeutici e di *imaging*, stabilità di conservazione, proprietà di targeting molecolare e cinetiche di rilascio ben definite. Inoltre, le LPHNPs si prestano bene ad essere somministrati per qualsiasi via, anche quella polmonare, ottimizzando la biodisponibilità dei farmaci incapsulati, e se necessario, e riducendone gli effetti indesiderati.

Il meccanismo molecolare che determina la formazione di strutture ibride stabili tra lipidi e nanoparticelle è termodinamicamente favorito e dipende dal metodo di preparazione.^{97,98}

I sistemi ibridi trovano largo impiego sia in ambito chemioterapico, dove hanno già ampiamente dimostrato la loro superiorità rispetto ai liposomi e alle NPs aumentando l'accumulo dei farmaci nelle cellule tumorali e quindi riducendo la tossicità della terapia, sia nel trattamento di patologie respiratorie.^{99,100}

Chikuma e collaboratori hanno preparato delle LPHNPs costituite da PLGA/DOTAP, per il co-

delivery di Mn-porfirina dimero (MnPD) e pHDAC2, come approccio epigenetico e di controllo dei ROS per il trattamento della BPCO.

Le LPHNPs ottenute hanno mostrato ottime capacità di incapsulare entrambi gli agenti, e una significativa attività antiossidante, sopprimendo la sovrapproduzione di IL-8, una chemochina associata alla BPCO, e migliorando la resistenza ai glucocorticoidi in un modello in vitro di BPCO.¹⁰¹

1.6.4. Microparticelle polimeriche

Le microparticelle polimeriche sono particelle sferiche con dimensioni comprese tra 1-1000 μm , ampiamente impiegate in ambito farmaceutico, ove hanno apportato un significativo miglioramento nella formulazione di numerosi farmaci, grazie alle loro caratteristiche chimico-fisiche. Le microparticelle vengono prodotte a partire dagli stessi polimeri precedentemente descritti per la realizzazione delle NPs, tramite processi di *spray-dying*, *spray freeze drying* o tramite l'impiego di fluidi supercritici.¹⁰²

Le microparticelle formulate per l'inalazione devono possedere dimensioni sufficientemente piccole per la deposizione, ma anche sufficientemente grandi per consentire il dosaggio della polvere durante la produzione della forma di dosaggio e l'erogazione dal DPI; a tal proposito, la modulazione di parametri, quali la densità e le dimensioni delle particelle, risulta fondamentale.

In particolare, la densità delle microparticelle dipende dalla densità del materiale che costituisce la matrice, mentre la superficie specifica è determinata direttamente dalla dimensione delle particelle, aumentando con il diminuire del diametro di queste ultime.

Questo potrebbe rappresentare un limite al fine di consentire un'adeguata somministrazione polmonare, per la quale sono auspicabili una elevata superficie specifica, ma grandi dimensioni e bassa densità.

Le microparticelle polimeriche porose (MPs) sono caratterizzate dalla presenza di pori nella matrice e sulla superficie delle particelle, che ne determinano una bassa densità di massa ($<0,4 \text{ g/cm}^3$), e diametri geometrici di 1-5 μm .

Se paragonate a particelle non porose, le MPs sono caratterizzate da grandi diametri geometrici, bassa densità, e di conseguenza da piccoli diametri aerodinamici, presentando pertanto profili di deposizione polmonare ottimali. Queste proprietà uniche, le rendono carrier ideali per la somministrazione di farmaci a livello polmonare.^{103,104}

Inoltre, le MPs mostrano una minore tendenza ai fenomeni di aggregazione, una minore fagocitosi da parte dei macrofagi alveolari, e senza dubbio una maggiore efficienza di aerosolizzazione.

Il numero, il diametro e la struttura dei pori influenzano in modo significativo le proprietà delle MPs. Secondo la IUPAC, i materiali porosi possono essere classificati secondo la dimensione dei pori (larghezza) come materiali microporosi ($< 2 \text{ nm}$), materiali mesoporosi (2-50 nm), e materiali macroporosi ($> 50 \text{ nm}$).

La formazione dei pori nelle MPs è data dalla presenza di porigeni o di agenti template durante la formazione delle particelle. In particolare, i porigeni, quali il bicarbonato di ammonio, formano i pori principalmente producendo gas o per volatilizzazione durante il processo di preparazione delle particelle.¹⁰³

I criteri principali di selezione delle MPs, come sistemi per il rilascio di farmaci, si basano sulla porosità superficiale e sulle dimensioni dei pori, in quanto tali parametri determinano l'efficienza di intrappolamento e la cinetica di rilascio delle molecole intrappolate.^{104,105}

Diversi farmaci, come corticosteroidi, antibiotici, proteine e chemioterapici, sono già stati formulati all'interno di MPs.

In particolare, Zhang e collaboratori hanno sviluppato delle MPs di PLGA inalabili caricate con budesonide per il trattamento della BPCO. La formulazione, opportunamente ottimizzata, ha

mostrato un comportamento aerodinamico ottimale per una efficace somministrazione polmonare del farmaco.¹⁰⁶

1.7. *Escape o uptake macrofagico?*

L'apparato respiratorio opera, secondo meccanismi molto complessi e altamente coordinati, nella rimozione di particelle inalate e agenti potenzialmente patogeni.

Il contatto con sostanze esogene o agenti infettivi, infatti, può costituire un rischio per la salute, e per tale motivo, il loro riconoscimento e conseguente eliminazione da parte del sistema respiratorio, in seguito all'inalazione, è finemente regolato.

Questi meccanismi di difesa coinvolgono processi quali la clearance mucociliare, la secrezione di proteine anti-patogene endogene e la risposta tempestiva dei leucociti residenti nei polmoni.²⁸

In particolare, il sistema fagocitico mononucleare (MPS), costituito principalmente dai macrofagi residenti nella regione alveolare (AM), svolge un ruolo critico nella ricognizione immunitaria, nell'avvio e nella regolazione della risposta infiammatoria verso particelle e organismi invasori, e nella loro successiva rimozione mediante fagocitosi.

Pertanto, la somministrazione polmonare di sistemi particellari potrebbe comportare il riconoscimento, da parte dei AM, come corpi estranei, con conseguente eliminazione mediante fagocitosi.¹⁰⁷

Per tale motivo, il mondo della ricerca si è focalizzato sullo sviluppo di formulazioni innovative che siano in grado di aumentare o evitare l'*uptake* da parte degli AM e ottenere così il risultato terapeutico desiderato, sfruttando i meccanismi che stanno alla base del processo di fagocitosi (**Figura 18**).^{107,108}

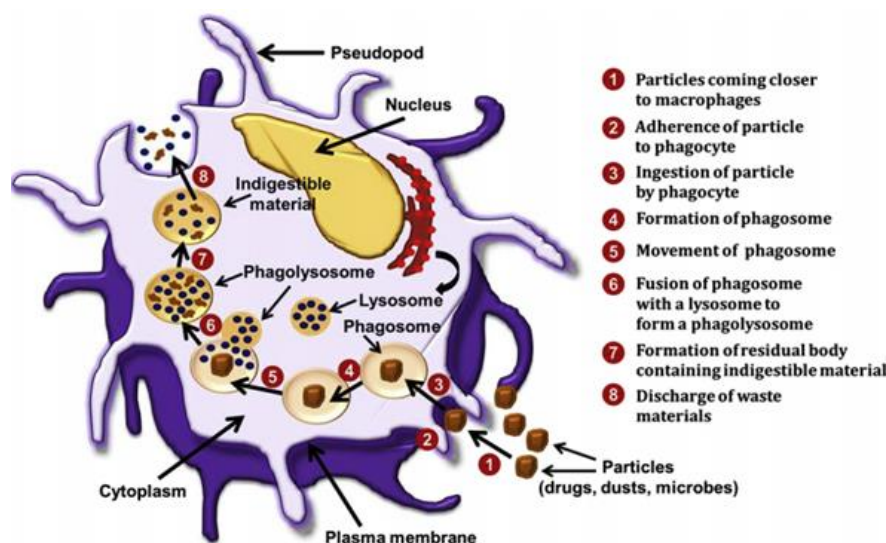


Figura 18: Rappresentazione schematica delle varie fasi del processo di fagocitosi di particelle esogene da parte dei macrofagi alveolari.¹⁰⁸

Il processo di riconoscimento ha inizio con l'adsorbimento, sulla superficie delle nanoparticelle, di proteine solubili, chiamate opsonine.

In seguito, le particelle opsonizzate, trovandosi nelle vicinanze dei macrofagi, interagiscono con specifici recettori (*scavenger receptor*) localizzati sulla membrana del fagocita. Questi includono recettori del mannosio CD206, CD136, CD36, TRLs e integrine.¹⁰⁸

Il legame particella-macrofago causa un riarrangiamento strutturale del citoscheletro, con conseguente internalizzazione macrofagica delle particelle, ed endocitosi, formando così un fagosoma all'interno del citosol del macrofago.

Il fagosoma si fonde con un lisosoma formando un fagolisosoma, ove, grazie al contenuto enzimatico e all'ambiente acido, avviene la distruzione della particella.

Recenti studi hanno evidenziato che, i componenti dello strato surfattante polmonare, come il DPPC e le proteine surfattanti, agiscono in maniera analoga alle opsonine: il loro adsorbimento sulla superficie di nanoparticelle ne influenza l'*uptake* da parte dei macrofagi alveolari.^{107,108}

Questo processo di interazione con i macrofagi può essere pertanto sfruttato, favorendolo o

meno, a scopo terapeutico, in funzione dell'eventuale coinvolgimento dei macrofagi nella patologia da trattare.

In patologie che necessitano effetti terapeutici prolungati, come l'ipertensione polmonare, meccanismi che favoriscono l'*escape* macrofagico dei sistemi terapeutici nanoparticellari, come ad esempio la peghilazione superficiale, sono utili al fine di incrementare il tempo di permanenza del principio attivo nei polmoni. Nel caso, invece, di patologie infiammatorie, come l'asma e la BPCO, dove i macrofagi partecipano in prima linea alla progressione della malattia attraverso numerosi pathway fisiologici e immunologici, allo scopo di ottenere un effetto mirato contro l'infiammazione, è auspicabile favorire l'*uptake* macrofagico dei nanosistemi.¹⁰⁹ L'*uptake* macrofagico può avvenire attraverso un processo di targeting passivo o attivo (**Figura 19**).

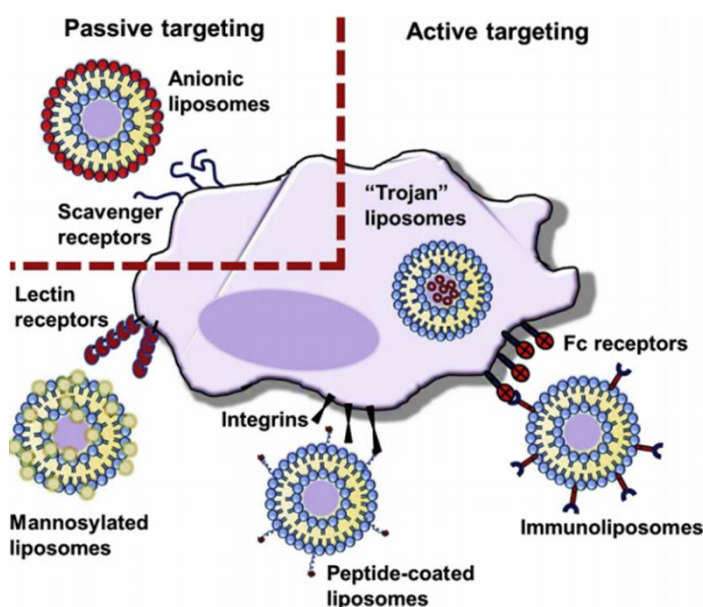


Figura 19. Approcci di targeting attivi e passivi che utilizzano sistemi lipidici nanostrutturati per la somministrazione di farmaci ai macrofagi.¹⁰⁸

Qualora si volesse sfruttare il targeting passivo, bisognerebbe ottimizzare le proprietà fisico-

chimiche dei sistemi particellari come dimensioni, carica superficiale e loro composizione; il targeting attivo, invece, richiede la decorazione della superficie particellare con ligandi specifici, quali ad esempio polisaccaridi o glicoproteine contenenti residui di mannosio e fucosio, verso i recettori di superficie dei macrofagi, al fine pertanto di aumentare il riconoscimento e l'internalizzazione del sistema terapeutico.¹⁰⁸

In **tabella 3** vengono evidenziate le caratteristiche dei sistemi particellari che favoriscono o evitano l'*uptake* da parte di macrofagi alveolari.

Tabella 3. Strategie per favorire o evitare l'*uptake* da parte dei macrofagi alveolari. (PS=fosfatidilserina; PG=fosfatidilglicerolo).

Caratteristiche per favorire l' <i>uptake</i>	Caratteristiche per evitare l' <i>uptake</i>
Dimensione 100-200 nm e 1-6 μm	Dimensione <1 μm e >6 μm
Forma sferica	Forma allungata
Particelle contenenti PS e PG	Particelle contenenti colesterolo
Elevata carica superficiale	Bassa o neutra carica superficiale
Particelle rigide e non porose	Particelle poco rigide e porose
Particelle idrofobe	Particelle idrofile
Superficie modificata con mannosio	Superficie modificata con PEG

1.8. La terapia genica nel trattamento dell'infiammazione

Per terapia genica si intende il trasferimento di materiale genetico all'interno di cellule, allo scopo di prevenire, curare o diagnosticare una patologia.¹¹⁰

Negli ultimi anni, un'affascinante branca della terapia genica, che sta rivoluzionando il mondo della ricerca, è rappresentata dal meccanismo di *RNA interference* (RNAi).

Il meccanismo dell'RNAi è coinvolto normalmente nelle difese cellulari contro le infezioni

virali ed è l'unico meccanismo di silenziamento genico post-trascrizionale.¹¹¹

Esistono diverse classi di RNA che agiscono attraverso questa via; si tratta di piccole molecole di RNA, classificate in tre categorie in base alla loro funzione e origine: *small interfering RNAs* (siRNA), *short hairpin RNAs* (shRNA), and *microRNAs* (miRNA).

I siRNA sono una classe di molecole di RNA a doppio filamento costituite da 19-25 nucleotidi appaiati, con dimensioni inferiori a 10 nm e un peso molecolare di circa 15 kDa. Essi agiscono innescando la degradazione di un mRNA specifico dopo la trascrizione, bloccandone di fatto la traduzione e riducendo l'espressione di un determinato gene (**Figura 20**).¹¹⁰⁻¹¹²

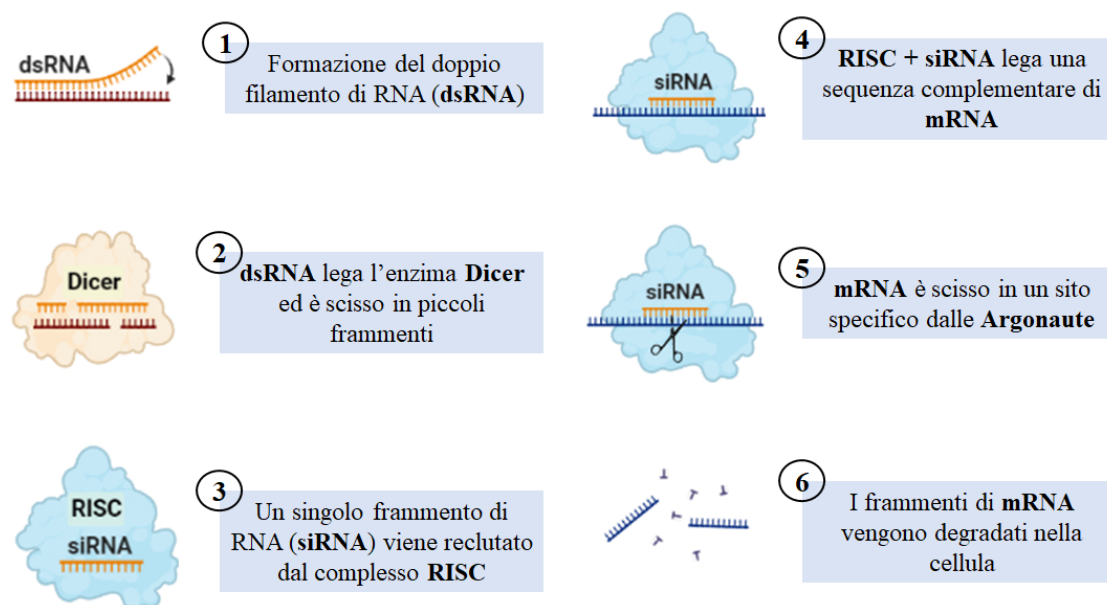


Figura 20. Rappresentazione schematica del meccanismo di RNAi.

In virtù del loro meccanismo d'azione, i siRNA possono trovare un'importante applicazione terapeutica in tutte quelle patologie in cui si osserva un aumento dell'espressione di alcuni geni. Nel caso specifico di patologie respiratorie croniche, dove la cascata infiammatoria trova numerose proteine come protagoniste, i fattori di trascrizione svolgono un ruolo chiave e sono considerati potenti bersagli per il targeting dei siRNA.¹¹¹

Ad oggi, sono stati identificati innumerevoli bersagli coinvolti nella patogenesi di FC e BPCO; tra questi troviamo geni che codificano per citochine (IL-4, IL-5, IL-13, IL-8, IL-17, TNF α), per il fattore di crescita TFG- β , per il recettore delle chemochine (CCR3), per trasduttori di segnale e attivatori di trascrizione come GATA3 e NFkB (fattore nucleare kB), e per la proteina CFTR. Inoltre, per i soggetti affetti da FC, sono stati individuati nuovi target per una potenziale terapia genica, quali le proteine associate al recettore per l'antigene presente sulle cellule B (BAP), che inibiscono il normale *trafficking* della proteina CFTR, e le proteine contenenti valosina (VCP), in grado di complessare la proteina CFTR durante il trasferimento dal reticolo endoplasmatico, la cui ridotta espressione riduce la degradazione di CFTR.¹¹³⁻¹¹⁶

Il fattore di trascrizione NF-kB è un fondamentale segnale molecolare di avvio dell'infiammazione polmonare; esso regola molteplici aspetti delle funzioni immunitarie innate e adattative, inducendo l'espressione di vari geni pro-infiammatori, compresi quelli che codificano citochine e chemochine, in particolare IL-8 e TNF- α , e partecipando alla regolazione dell'inflammasoma.¹¹⁴

Numerosi studi hanno dimostrato che, una iperattivazione del fattore Nfkb, nelle cellule bronchiali epiteliali di soggetti affetti da FC, può essere inibita, sia in vitro che in vivo, grazie alla trasfezione di siRNA contro lo stesso NF-kB.^{113,114,117,118}

Rispetto ai farmaci tradizionali, i siRNA mostrano effetti terapeutici superiori grazie alla loro elevata selettività e potenza. Inoltre, possono essere progettati per fornire una terapia personalizzata.^{119,120}

Inoltre, tra gli altri RNAi, i siRNA costituiscono la scelta più popolare; una delle ragioni principali di ciò è che i siRNA agiscono legandosi al RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*), presente nel citoplasma, per identificare quelle regioni di mRNA complementari ed indurne la scissione nucleolitica (e quindi per la *down-regulation* della proteina d'interesse).

Rispetto a questo approccio relativamente sicuro, i plasmidi che codificano gli shRNA devono

invece entrare nel sito di trascrizione nucleare, per la loro corretta espressione, per cui devono superare un'ulteriore barriera nucleare, mentre i dsRNA, a causa delle loro grandi dimensioni, possono causare la risposta dell'interferone nelle cellule di mammifero.^{121,122}

Ciò nonostante, il loro impiego è ad oggi estremamente limitato poiché non possono essere somministrati come tali. L'organismo umano è infatti dotato di enzimi che lo proteggono dall'eventuale introduzione di materiale genetico esogeno, rappresentati principalmente dalle nucleasi, che degradano rapidamente i siRNA presenti nel circolo ematico. Inoltre, essi vengono riconosciuti dal sistema reticolo endoteliale (RES) come estranei all'organismo e di conseguenza fagocitati dai macrofagi.^{111,123,124}

I siRNA incontrano difficoltà anche nell'attraversare le membrane cellulari, a causa della loro natura idrofila, piccole dimensioni, e delle repulsioni elettrostatiche tra i gruppi fosfato, presenti nell'oligonucleotide, e la superficie carica negativamente delle cellule. La piccola frazione di siRNA che riesce a superare tali ostacoli e a penetrare a livello cellulare deve fronteggiare poi il problema del sequestro endosomiale e della degradazione lisosomiale, a causa dell'ambiente acido, oltre alla degradazione da parte delle nucleasi citosoliche.¹²³

A livello polmonare, nonostante l'attività nucleasica sia ridotta rispetto a quella sistemica, la veicolazione di siRNA tal quali mostra delle problematiche associate agli ostacoli fisiologici, immunologici e metabolici imposti dal polmone; problematiche che si aggravano in presenza di patologie croniche.¹²³

Pertanto, al fine di favorire il trasporto e l'assorbimento dei siRNA nel polmone sono necessari vettori efficaci e sicuri, adeguatamente progettati, in grado di superare le barriere imposte dal polmone e al contempo di complessare in maniera stabile il siRNA.

In linea generale i vettori per la terapia genica sono distinti in vettori virali e non virali; in particolare, i non virali principalmente costituiti da lipidi, peptidi o polimeri cationici (PEI, inulina, poli-L-lisina), sono stati sviluppati come alternativa relativamente sicura ai vettori

virali, in quanto meno immunogenici, più facili da modificare, e prodotti su larga scala. Tali sistemi, dotati di carica positiva, formano con il materiale genetico complessi interpolielettrolitici, noti come lipoplessi o poliplessi, in grado di far penetrare il materiale genetico all'interno delle cellule.¹¹²

2. Scopo della tesi

Le malattie respiratorie croniche, come la broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO) e la fibrosi cistica (CF), la cui eziologia è molto complessa e multifattoriale, sono accomunate dallo sviluppo di una risposta infiammatoria cronica incontrollata, che, nei casi più gravi, può compromettere l'integrità e la funzionalità polmonare.

In queste condizioni patologiche, il delicato equilibrio tra fattori pro-infiammatori e anti-infiammatori è fortemente sbilanciato a favore di una iper-espressione di mediatori pro-infiammatori, come citochine e chemochine, e del reclutamento di cellule dell'immunità, primi tra tutti i macrofagi. La manifestazione fisiopatologica conseguente a tale condizione infiammatoria è rappresentata dalla ostruzione bronchiale al flusso d'aria, spesso irreversibile ed aggravata dalla presenza di una maggiore secrezione di muco.³

Le terapie convenzionali attuali prevedono dei trattamenti farmacologici protratti e basati sulla somministrazione giornaliera di più farmaci (ad es. mucolitici, broncodilatatori, antinfiammatori), i quali possono comportare dei miglioramenti della condizione patologica pur non essendo mai risolutivi.

La via inalatoria rappresenta la via d'elezione per il trattamento di tali patologie, grazie agli innumerevoli vantaggi associati alla terapia locale; infatti, la somministrazione di un farmaco direttamente nel sito d'azione ne determina la rapida insorgenza dell'effetto farmacologico, la riduzione della dose richiesta e degli effetti collaterali sistemici. Tuttavia, le barriere anatomiche, fisiologiche e immunologiche, presenti nel polmone in condizioni patologiche, possono determinare una rapida eliminazione dei farmaci inalati, limitandone fortemente l'efficacia terapeutica.^{6,17}

In questo complesso scenario, i *drug delivery system* (DDS) possono rappresentare un approccio innovativo e proattivo, in grado di affrontare in maniera olistica le problematiche

connesse al trattamento di queste patologie, e di soddisfare tutti quei bisogni clinici ai quali le terapie convenzionali non riescono a dare una risposta efficace.

Tra i potenziali vettori proposti, i sistemi micro- e nanometrici hanno rivoluzionato il campo della ricerca tecnologica-farmaceutica, ponendosi al centro delle più moderne strategie di *drug delivery*.

In particolare, le nanoparticelle e le microparticelle polimeriche sono ampiamente accettate per la veicolazione inalatoria di farmaci, in virtù delle loro caratteristiche chimico-fisiche e tecnologiche vantaggiose, descritte già in dettaglio nella parte introduttiva.¹²⁵

Questi sistemi possono essere progettati con un opportuno razionale al fine di ottenere una migliore interazione con il sito di somministrazione polmonare, un rilascio controllato del farmaco e di conseguenza un aumento della biodisponibilità nel sito *target*.¹²⁶

Considerato lo stato dell'arte, lo scopo della presente tesi di dottorato è stato quello di realizzare differenti *pulmonary drug delivery system* potenzialmente sfruttabili per il trattamento dell'infiammazione associata a patologie quali BPCO e FC. Per la produzione di tali sistemi è stata utilizzata l' α,β -poli(N-2-idrossietil)-D,L-aspartammide (PHEA) come polimero di partenza.

Il PHEA (**Figura 21**) è un polimero di sintesi a struttura poliamminoacidica, ottenuto per apertura degli anelli succinimmidici della polisuccinimide (PSI) con etanolamina, secondo una procedura standardizzata nel laboratorio dove ho svolto la mia tesi di dottorato.

Il PHEA è stato ed è attualmente utilizzato per la produzione di sistemi polimerici per la veicolazione di farmaci e ciò grazie alle sue eccellenti proprietà biologiche e chimiche, quali atossicità, biocompatibilità, assenza di immunogenicità, elevata solubilità in acqua.¹²⁷⁻¹²⁹

Esso presenta in catena laterale dei gruppi idrossilici (uno per unità ripetitiva) funzionalizzabili, mediante i quali è possibile legare covalentemente al *backbone* polimerico molecole di varia natura quali agenti direzionanti, farmaci e altre catene polimeriche, in grado di orientare il

copolimero o i sistemi da esso ottenuti verso cellule o organi bersaglio.

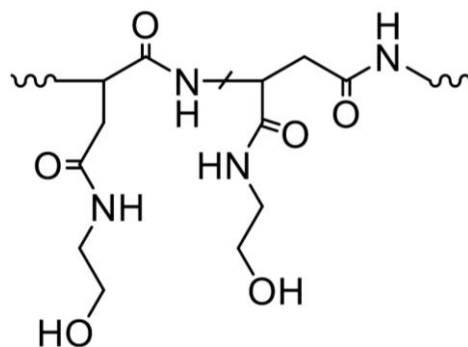


Figura 21. Struttura chimica del PHEA.

La prima linea di ricerca ha riguardato lo sviluppo di microparticelle polimeriche (MPs) porose con caratteristiche chimico-fisiche e tecnologiche modulabili, potenzialmente sfruttabili come vettori per la somministrazione e il rilascio inalatorio di Rapamicina, un farmaco immunosoppressore che, grazie al suo meccanismo d'azione, ha recentemente attirato l'attenzione per il trattamento di alcune patologie polmonari infiammatorie come la BPCO.

39,42,43,130

Queste MPs sono state realizzate tramite tecnica dello *spray-drying*, a partire da un derivato anfifilico del PHEA, il PHEA-g-RhB-g-PLA (**Figura 22**), ed utilizzando il bicarbonato di ammonio (AB), come agente porogeno.

In particolare, il copolimero PHEA-g-RhB-g-PLA è stato ottenuto derivatizzando il *backbone* polimerico del PHEA dapprima con la Rodamina B (RhB), per rendere il copolimero fluorescente, e successivamente con l'acido polilattico (PLA), al fine di introdurre catene idrofobiche nel PHEA.

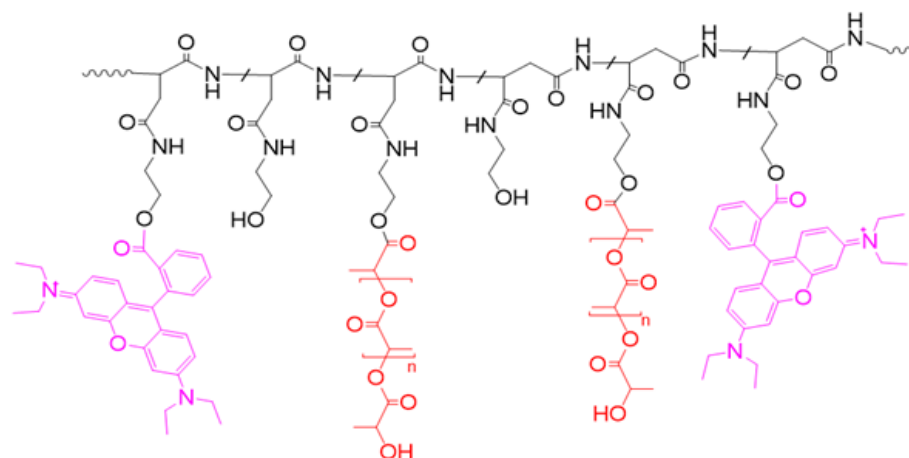


Figura 22. Struttura chimica del copolimero *graft* PHEA-g-RhB-g-PLA (n=194).

La versatilità di tale derivato anfifilico per la realizzazione di sistemi *smart* biocompatibili sia micro che nano, utilizzabili in varie applicazioni biomediche, è già stata ampiamente dimostrata.^{130–132}

È noto che parametri quali la concentrazione di polimero nel fluido di alimentazione dello *spray-drying* influenzano significativamente le proprietà dei sistemi ottenuti.

Pertanto, sono state inizialmente prodotte delle microparticelle polimeriche, variando la concentrazione di polimero, al fine di determinare quella ottimale per l'ottenimento di sistemi con dimensioni e caratteristiche idonee alla somministrazione inalatoria.

Le microparticelle polimeriche ottenute sono state caratterizzate in termini di diametro medio, morfologia e proprietà di superficie.

Dopo avere selezionato il valore ottimale di concentrazione del polimero, sono state prodotte delle MPs utilizzando quantità crescenti di AB nel fluido di alimentazione del processo di *spray-drying*, allo scopo di modulare la densità e la porosità delle microparticelle ottenute.

L'AB è un agente porogeno estremamente versatile e largamente utilizzato per la formazione di microparticelle porose mediante *spray-drying*; rispetto ad altri materiali, esso infatti presenta il vantaggio di sublimare durante il processo, sviluppando H₂O, NH₃ e CO₂, e pertanto

determinando la formazione di pori nella matrice senza la necessità di essere allontanato in seguito alla formazione delle MPs.¹⁰³

Una volta ottenute, le MPs sono state opportunamente caratterizzate in termini di dimensione media, morfologia, proprietà di superficie, area superficiale, distribuzione dei pori e densità *tapped* (ρ).

Inoltre, con la collaborazione del Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente dell'Università di Cagliari, è stata valutata la deposizione delle MPs nel tratto respiratorio tramite studi di aerosolizzazione in vitro, in accordo con quanto previsto dalle metodologie riportate nella Farmacopea Ufficiale Europea.

Infine, allo scopo di valutare come l'area superficiale e la porosità di un *carrier* particellare possano influenzare la cinetica di rilascio del farmaco in esso incorporato, è stato valutato il profilo di rilascio della Rapamicina e l'assenza di tossicità dei sistemi microparticellari quando incubati con cellule epiteliali bronchiali (16-HBE).

Sebbene sia le micro- che le nanoparticelle siano egualmente riconosciute nell'ambito del *drug delivery*, la principale differenza tra i due sistemi, in termini di dimensioni, riflette delle sostanziali differenze funzionali.

Le microparticelle polimeriche, infatti, hanno dimensioni tali da non permettere la loro internalizzazione cellulare e per questo non sono in grado di superare le barriere biologiche, per cui vengono impiegate allo scopo di veicolare e rilasciare l'agente terapeutico al sito di somministrazione. Dall'altra parte, invece, le nanoparticelle sono in grado di superare numerose barriere biologiche e patologiche e di interagire con diversi tipi cellulari, veicolando e rilasciando il farmaco direttamente al tessuto o alle cellule *target*.

Alla luce di queste considerazioni, l'obiettivo del secondo lavoro è stato quello di sviluppare delle nanoparticelle polimeriche, in grado di diffondere attraverso la barriera mucosale, per la

veicolazione inalatoria di un analogo della prostaciclina, l'Iloprost, da proporre come potenziale strumento terapeutico per la gestione mirata dell'iper-infiammazione associata alla FC.

Recenti studi hanno infatti dimostrato che, gli analoghi della prostaciclina, come l'Iloprost, in virtù della loro capacità di incrementare i livelli di cAMP nelle cellule bronchiali epiteliali, potrebbero essere utilizzati per il trattamento della flogosi in soggetti affetti da FC.^{46,57,58,61}

Come già noto, l'Iloprost, approvato dalla FDA per il trattamento dell'ipertensione polmonare arteriosa, è ad oggi disponibile in commercio in due differenti forme farmaceutiche, l'Endoprost® e il Ventavis®, somministrabili rispettivamente per via endovenosa ed inalatoria.

La somministrazione sistemica di Iloprost è associata a gravi effetti collaterali, che possono essere parzialmente superati da quella polmonare; infatti, anche in questo caso, la comparsa di effetti collaterali e le frequenti sedute di inalazione riducono il successo della terapia.

Pertanto, lo sviluppo di una formulazione a rilascio prolungato per la veicolazione inalatoria dell'Iloprost, potrebbe proporre la possibilità di fornire molteplici vantaggi in termini di riduzione degli effetti collaterali, aumento dell'efficienza farmacologica e della *compliance* del paziente.

Per raggiungere tale obiettivo, è stato sviluppato un nuovo derivato anfifilico del PHEA, il PHEA-g-PLGA-g-PEG (**Figura 23**), in grado di formare nanoparticelle polimeriche.

Come porzione idrofobizzante si è scelto di usare l'acido polilattico-co-glicolico (PLGA), un poliestere non tossico, biodegradabile, biocompatibile e bioriassorbibile;^{87,88,133} come porzione idrofila si è scelto invece di utilizzare il polietilenglicole (PEG), in grado di conferire capacità *stealth* ai sistemi risultanti evitandone il riconoscimento da parte dei macrofagi alveolari, e di ridurre le interazioni con le catene proteiche della mucina, conferendo capacità di muco penetrazione ai sistemi, altamente auspicabili nel trattamento di patologie muco ostruttive quali la FC.^{91,92}

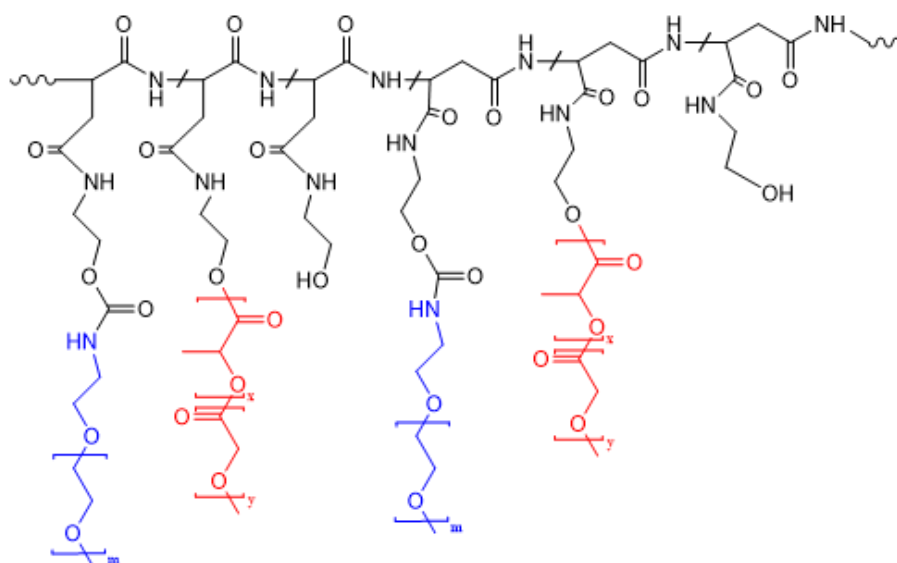


Figura 23. Struttura chimica del copolimero *graft* PHEA-g-PLGA-g-PEG (x e $y=92$; $m=44$).

Il copolimero *graft* PHEA-g-PLGA-g-PEG è stato caratterizzato da un punto di vista chimico-fisico ed utilizzato per la preparazione delle nanoparticelle polimeriche contenenti l'Iloprost, utilizzando la tecnica della nanoprecipitazione.

Le nanoparticelle polimeriche così ottenute sono state caratterizzate in termini di dimensioni medie, proprietà superficiali, contenuto e profilo di rilascio dell'Iloprost, ed interazioni con la mucina, mediante studi turbidimetrici.

Al fine di ottenere una formulazione inalabile, è stata sfruttata la strategia *Nano into Micro* (NiM), incorporando le nanoparticelle polimeriche contenenti l'Iloprost in matrici microparticellari di mannitolo, utilizzando la tecnica dello *spray-drying*.

La strategia NiM rappresenta uno degli approcci più promettenti al fine di rendere somministrabili per via inalatoria le nanoparticelle, intrappolandole in matrici microparticellari idrosolubili.

Idealmente, queste ultime, una volta depositate sui fluidi polmonari (ad esempio, il muco), dovrebbero dissolversi rapidamente e rilasciare le particelle colloidali incorporate, che in virtù

delle loro caratteristiche superficiali, potrebbero diffondere efficacemente attraverso le membrane respiratorie, raggiungendo il sito bersaglio.⁹⁵

Il mannitolo è un agente osmotico già utilizzato clinicamente per via inalatoria (Bronchitol®), grazie alla sua capacità di aumentare il flusso di acqua nel lume bronchiale e migliorare la clearance del muco nei pazienti affetti da FC.¹³⁴

Le microparticelle ottenute sono state caratterizzate in termini di morfologia, diametro medio, contenuto di farmaco, ed interazioni con i componenti del muco.

Infine, con la collaborazione del Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche dell'Università di Foggia, sono stati valutati la citocompatibilità e gli effetti antinfiammatori delle particelle NiM contenenti l'Iloprost quando incubate con cellule bronchiali epiteliali che sovraesprimono la F508 del CFTR (CFBE-F508del), valutando in particolar modo la riduzione dell'espressione genica di citochine come IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-8.

Insieme alle nanoparticelle polimeriche, anche i liposomi presentano caratteristiche chimico-fisiche e tecnologiche favorevoli per la veicolazione inalatoria di farmaci.

Recentemente, una nuova classe di sistemi colloidali, le nanoparticelle ibride lipide-polimero (*lipid-polymer hybrid nanoparticles*, LPHNPs), ha affermato la sua superiorità nell'ambito dei *drug delivery system*; queste ultime, infatti, combinano in un unico *carrier* le proprietà favorevoli dei liposomi con quelle delle nanoparticelle polimeriche, cercando di superarne le limitazioni, quali il rilascio precoce dell'agente terapeutico incorporato e l'aggregazione particellare.

Considerati gli innumerevoli vantaggi associati all'utilizzo di sistemi ibridi, già descritti nella parte introduttiva, questi sono stati oggetto di studio nel terzo e nel quarto lavoro sviluppati in questa tesi.

In particolare, il terzo lavoro si è proposto di sviluppare una formulazione inalatoria innovativa, a base di sistemi nanostrutturati ibridi polimero-lipide, per la veicolazione del Roflumilast,

direzionate verso i macrofagi alveolari. Questi ultimi, aumentati nelle vie aeree di soggetti affetti da BPCO, hanno rappresentato il principale *target* per il trattamento dell'inflammatione associata alla patologia.^{26,135–137}

Come è noto, il Roflumilast, un inibitore della PDE-4 approvato dalla FDA per il trattamento della BPCO, ad oggi è disponibile in commercio esclusivamente sottoforma di compresse, il cui uso è associato a effetti collaterali gastrointestinali e sistemici; lo sviluppo di una formulazione somministrabile per via inalatoria potrebbe consentire una riduzione dell'esposizione sistemica, riducendo le dosi richieste e migliorando l'indice terapeutico del farmaco.¹³⁸

A tale scopo, sono state realizzate delle nanoparticelle ibride polimero-lipide (LPHNPs), ipotizzando per questi sistemi una struttura *core-shell*.

In particolare, come materiale costituente il core polimerico è stato sintetizzato un nuovo copolimero *graft* poliaspartammide-policaprolattone, il PHEA-g-RhB-g-Succ-PCL (**Figura 24**).^{137,139} Quest'ultimo è stato ottenuto derivatizzando il *backbone* polimerico del PHEA, dapprima con la RhB, per rendere fluorescente il copolimero risultante, e successivamente con il poli-ε-caprolattone (PCL). Quest'ultimo, grazie alle sue eccellenti proprietà chimico-fisiche e tecnologiche, quali biodegradabilità, biocompatibilità e processabilità, è stato scelto come agente idrofobizzante, in quanto consente di introdurre nel *backbone* polimerico del PHEA catene idrofobiche che conferiscono proprietà anfifiliche al copolimero risultante, tanto da permettere la realizzazione di strutture per il *drug delivery*.

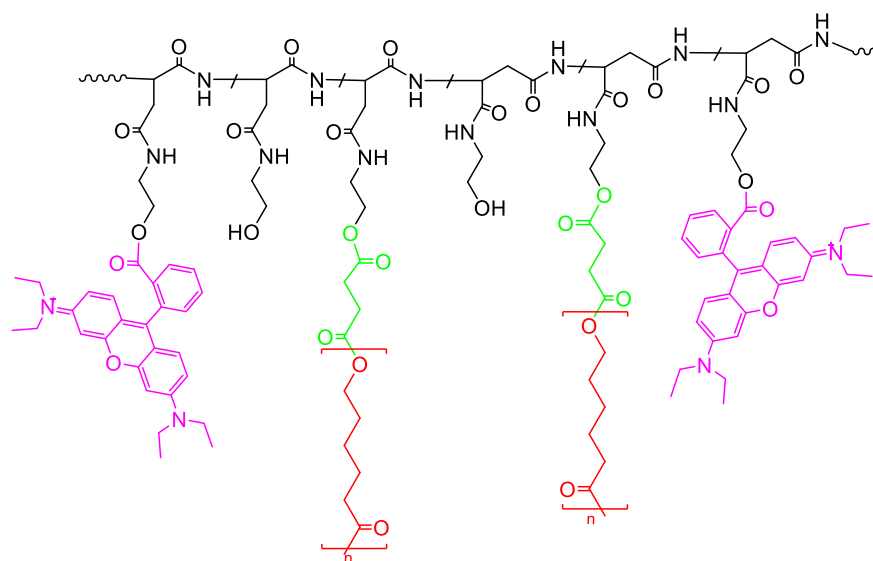


Figura 24. Struttura chimica del copolimero *graft* PHEA-g-RhB-g-Succ-PCL ($n=122$).

Il copolimero *graft* PHEA-g-RhB-g-Succ-PCL ottenuto è stato prima caratterizzato dal punto di vista chimico-fisico e poi, una volta appurate le sue caratteristiche anfifiliche, utilizzato per la preparazione delle nanoparticelle polimeriche contenenti il Roflumilast.

Per costituire lo *shell* lipidico, è stata scelta una miscela costituita dalla 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC, **Figura 25**), maggiore costituente del surfactante polmonare, e l'1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(polietilenglicole)₂₀₀₀-Mannosio (DSPE-PEG₂₀₀₀-Mannosio, **Figura 26**), un fosfolipide peghilato che presenta il mannosio ad un'estremità, scelto allo scopo di stabilizzare i sistemi ibridi grazie alla presenza del PEG, e determinarne il *targeting* attivo ai macrofagi polmonari, favorito dall'overespressione dei recettori del mannosio (CD206, CD136 e CD36) sulla loro superficie nei pazienti affetti da BPCO. ^{140–143}

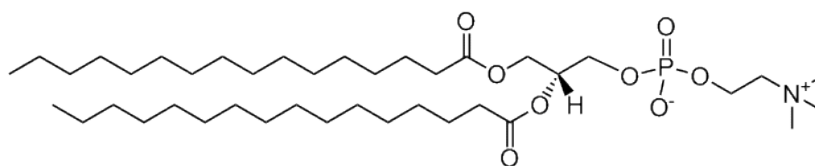


Figura 25. Struttura chimica del DPPC.

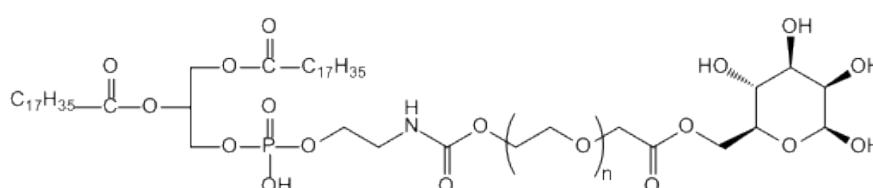


Figura 26. Struttura chimica del DSPE-PEG₂₀₀₀-Mannosio.

Tra i metodi riportati in letteratura per la realizzazione delle LPHNPs, è stato scelto di utilizzare il metodo *two-step*, il quale prevede la miscelazione delle nanoparticelle polimeriche preformate con vescicole lipidiche anch'esse preformate, con successiva incubazione con immissione di energia, la quale consente l'adsorbimento dei fosfolipidi sulla superficie delle nanoparticelle mediante interazioni di natura elettrostatica, idrofobica o di Van Der Waals.⁹⁶

Nel presente lavoro di tesi, la miscela fisica tra le dispersioni acquose di nanoparticelle e liposomi, previamente ottenuti rispettivamente per nanoprecipitazione e *thin layer evaporation*, è stata sottoposta a cicli successivi di omogeneizzazione ad alta pressione (HPH).

Le LPHNPs ottenute sono state caratterizzate in termini di dimensioni, morfologia, contenuto di fosfolipidi e Roflumilast, proprietà superficiali, comportamento termico, profilo di rilascio del farmaco ed eventuale capacità di interagire con la mucina, tramite studi reologici e turbidimetrici.

Sono stati anche condotti degli studi biologici, sia per valutare l'assenza di tossicità cellulare

dei sistemi ibridi, quando incubati con cellule epiteliali bronchiali (16-HBE) e macrofagiche (RAW 264.7), sia per determinare la funzione di *targeting* del mannosio verso i macrofagi.

Infine, allo scopo di ottenere una formulazione somministrabile per via inalatoria come polvere secca, le LPHNPs sono state incorporate in microparticelle a base di polivinilalcol (PVA) e L-leucina (Leu), secondo l'approccio *Nano into Micro* (NiM), utilizzando la tecnica dello *spray-drying*.

Le microparticelle ottenute sono state caratterizzate in termini di dimensioni e morfologia.

Il quarto ed ultimo lavoro è stato incentrato sullo sviluppo di una formulazione secondo l'approccio *NiM* per la veicolazione inalatoria di siRNA, capace di silenziare l'espressione del gene bersaglio in modo post-trascrizionale, potenzialmente sfruttabile come terapia genica nel trattamento di patologie respiratorie su base infiammatoria.

Infatti, sebbene la somministrazione di siRNA rappresenti attualmente una terapia sicura e potenzialmente risolutiva per numerose patologie polmonari, essa non è attuabile in quanto il siRNA non può essere somministrato tal quale. Pertanto, è necessario un sistema di veicolazione adeguatamente progettato, capace di superare gli ostacoli anatomici, fisiologici e metabolici imposti dal polmone e al contempo di complessare in maniera stabile il siRNA.

112,123

Alla luce di tali considerazioni, sempre utilizzando il PHEA come polimero di partenza, è stato sintetizzato un nuovo copolimero mediante coniugazione al *backbone* principale diverse molecole con lo scopo di conferire specifiche proprietà al copolimero risultante.

Per renderlo cationico, il PHEA è stato innanzitutto derivatizzato con la poliammina 1,2-Bis(3-amminopropilammino)etano (bAPAE), ottenendo il copolimero *graft* PHEA-g-bAPAE, avente in catena laterale ammine protonabili, le quali conferiscono la capacità di complessare il materiale genico mediante interazioni elettrostatiche.¹⁴⁴

Successivamente il PHEA-g-bAPAE è stato funzionalizzato con una sonda *far-red*

fluorescente, la DY676, allo scopo di ottenere un copolimero fluorescente facilmente visualizzabile negli esperimenti di caratterizzazione biologica.

Il PHEA-g-bAPAE-g-DY676 è stato infine derivatizzato con il PLGA, al fine di conferire idrofobicità al copolimero risultante e rendere possibile la produzione di sistemi nanoparticellari insolubili, ottenendo così il copolimero PHEA-g-bAPAE-g-DY676-g-PLGA (**Figura 27**).

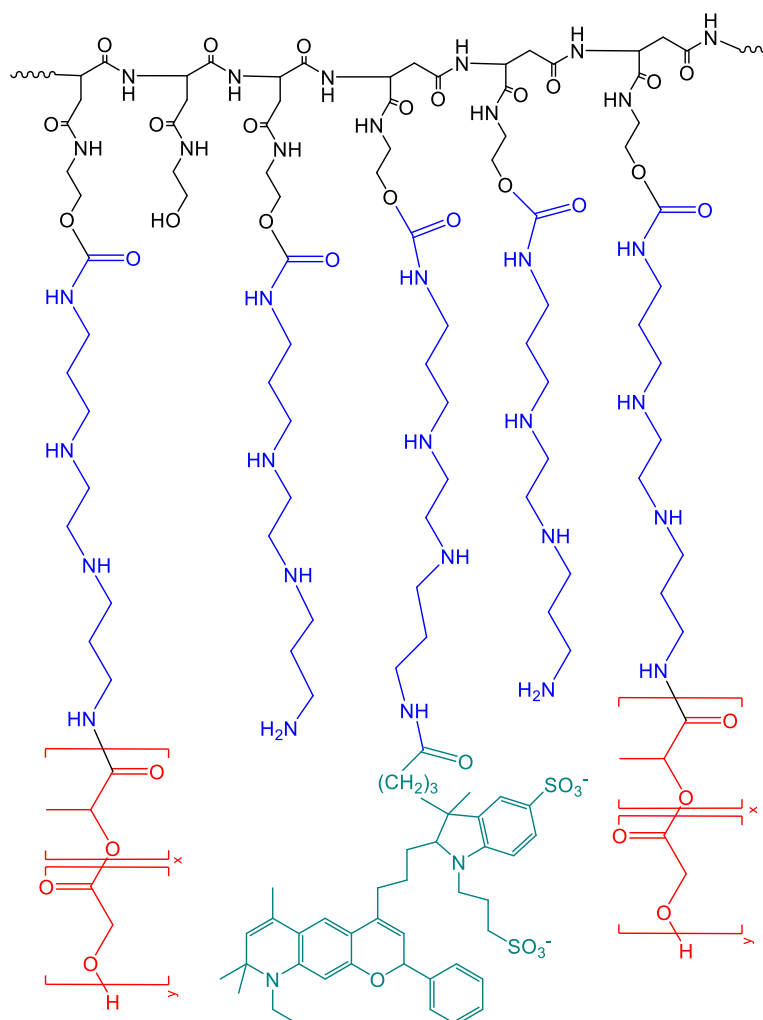


Figura 27. Struttura chimica del copolimero *graft* PHEA-g-bAPAE-g-DY676-g-PLGA (x e y=92).

Il copolimero ottenuto è stato caratterizzato da un punto di vista chimico-fisico; inoltre, è stata valutata la stabilità della sonda covalentemente legata al *backbone* polimerico.

Una volta appurata la capacità complessante del copolimero PHEA-g-bAPAE-g-DY676-g-PLGA, esso è stato utilizzato come materiale costituente il core polimerico di LPHNPs, in grado di complessare il siRNA per la *green fluorescent protein*; come componente lipidica è stata utilizzata una miscela di fosfolipidi costituita da DPPC e 1',2-distearoil-sn-glicerolo-3-fosfoetanolamina-N-(polietilenglicole)₂₀₀₀ (DSPE-PEG₂₀₀₀).

Questi ultimi sono stati selezionati allo scopo di conferire alle particelle ibride risultanti da una parte biocompatibilità e capacità di essere internalizzate dalle cellule epiteliali bronchiali, dall'altra proprietà mucodiffusive.

Le LPHNPs sono state ottenute utilizzando la tecnica dell'emulsione ed evaporazione del solvente, che è stata opportunamente ottimizzata variando parametri quali la concentrazione del copolimero e il rapporto in peso fosfolipidi/polimero.¹¹⁷

Una volta prodotte, le LPHNPs sono state caratterizzate in termini di dimensione media, potenziale ζ , morfologia, contenuto di fosfolipidi, efficienza di caricamento del siRNA ed interazioni con la mucina, tramite studi turbidimetrici.

Parallelamente, le LPHNPs sono state caratterizzate anche dal punto di vista biologico, valutandone l'assenza di citotossicità sulle cellule di carcinoma polmonare umano (H1299) e la capacità di essere internalizzate da parte delle stesse; inoltre, su cellule H1299, che esprimono stabilmente il gene reporter *enhanced green fluorescent protein* (H1299/eGFP, è stata valutata la capacità di *gene silencing* dei sistemi ibridi.

Infine, allo scopo di ottenere una formulazione con caratteristiche fisiche adeguate alla somministrazione polmonare, sono state prodotte delle microparticelle mediante la strategia NiM. In particolare, le LPHNPs sono state intrappolate in matrici di trealosio mediante tecnica

dello *spray-drying*.

Le NiM ottenute sono state caratterizzate in termini di dimensioni, morfologia e proprietà aerodinamiche, tramite studi di aerosolizzazione in vitro, in accordo con quanto previsto dalle metodologie riportate nella Farmacopea Ufficiale Europea.

3. Risultati e discussione

3.1. Sviluppo di microparticelle polimeriche porose inalabili per la veicolazione di Rapamicina per il trattamento della BPCO

La Rapamicina è un inibitore di mTOR (proteina chinasi che regola la crescita, la proliferazione, la motilità e la sopravvivenza delle cellule), utilizzato per via orale come farmaco anti-rigetto nei trapianti d'organo.

Recentemente sono stati evidenziati alcuni importanti meccanismi attraverso cui si esplica l'effetto protettivo della Rapamicina nei confronti dei processi patologici alla base della BPCO, quali la regolazione dell'autofagia, la riduzione delle cellule infiammatorie e il ripristino della sensibilità ai corticosteroidi nei pazienti affetti da BPCO.⁴²⁻⁴⁴

Nonostante queste innumerevoli potenzialità terapeutiche, le sue proprietà chimico-fisiche, tra cui l'instabilità chimica, e alcuni effetti sistemici avversi dose-dipendenti, correlati alla biodistribuzione aspecifica del farmaco dopo somministrazione orale, ne limitano le possibili applicazioni terapeutiche.³⁹

Lo sviluppo di una formulazione inalatoria per la somministrazione di Rapamicina potrebbe ridurre queste limitazioni, specialmente se il farmaco viene utilizzato nel trattamento di patologie respiratorie come la BPCO.

Alla luce di tali considerazioni, obiettivo di questo primo lavoro è stato lo sviluppo di una formulazione innovativa a base di microparticelle polimeriche porose (MPs), aventi proprietà chimico-fisiche e tecnologiche altamente modulabili, per la veicolazione inalatoria della Rapamicina potenzialmente sfruttabile per il trattamento della BPCO.

3.1.1. Sintesi e caratterizzazione del copolimero

Come materiale di partenza per la produzione delle microparticelle polimeriche è stato utilizzato un derivato *graft* anfifilico dell' α,β -poli(N-2-idrossietil)-D,L-aspartammide (PHEA). In particolare, sul *backbone* polimerico del PHEA sono state legate covalentemente opportune quantità di Rodamina B (RhB) e di acido polilattico (PLA), al fine di ottenere il copolimero *graft* PHEA-g-RhB-g-PLA, già largamente studiato e impiegato nell'ambito del *drug delivery*.

95,145

In particolare, la funzionalizzazione con la RhB ha permesso l'introduzione di una sonda fluorescente stabilmente legata al *backbone* principale del PHEA rendendolo fluorescente; grazie a ciò è stato possibile effettuare una prima indagine generale sulla morfologia delle microparticelle ottenute dal copolimero fluorescente tramite analisi al microscopio ottico in fluorescenza; essa può essere sfruttata anche per la valutazione di altre proprietà del *carrier*, in quanto ne permette la localizzazione in eventuali test in vitro.

L'utilizzo del PLA, invece, ha permesso di introdurre nel PHEA catene idrofobiche biodegradabili, che conferiscono proprietà anfifiliche al copolimero risultante, rendendolo adatto alla formazione di sistemi particellari e alla incorporazione di molecole attive scarsamente solubili in acqua.

La sintesi del copolimero *graft* PHEA-g-RhB-g-PLA è stata effettuata in due step successivi, come riportato in **Figura 28**.

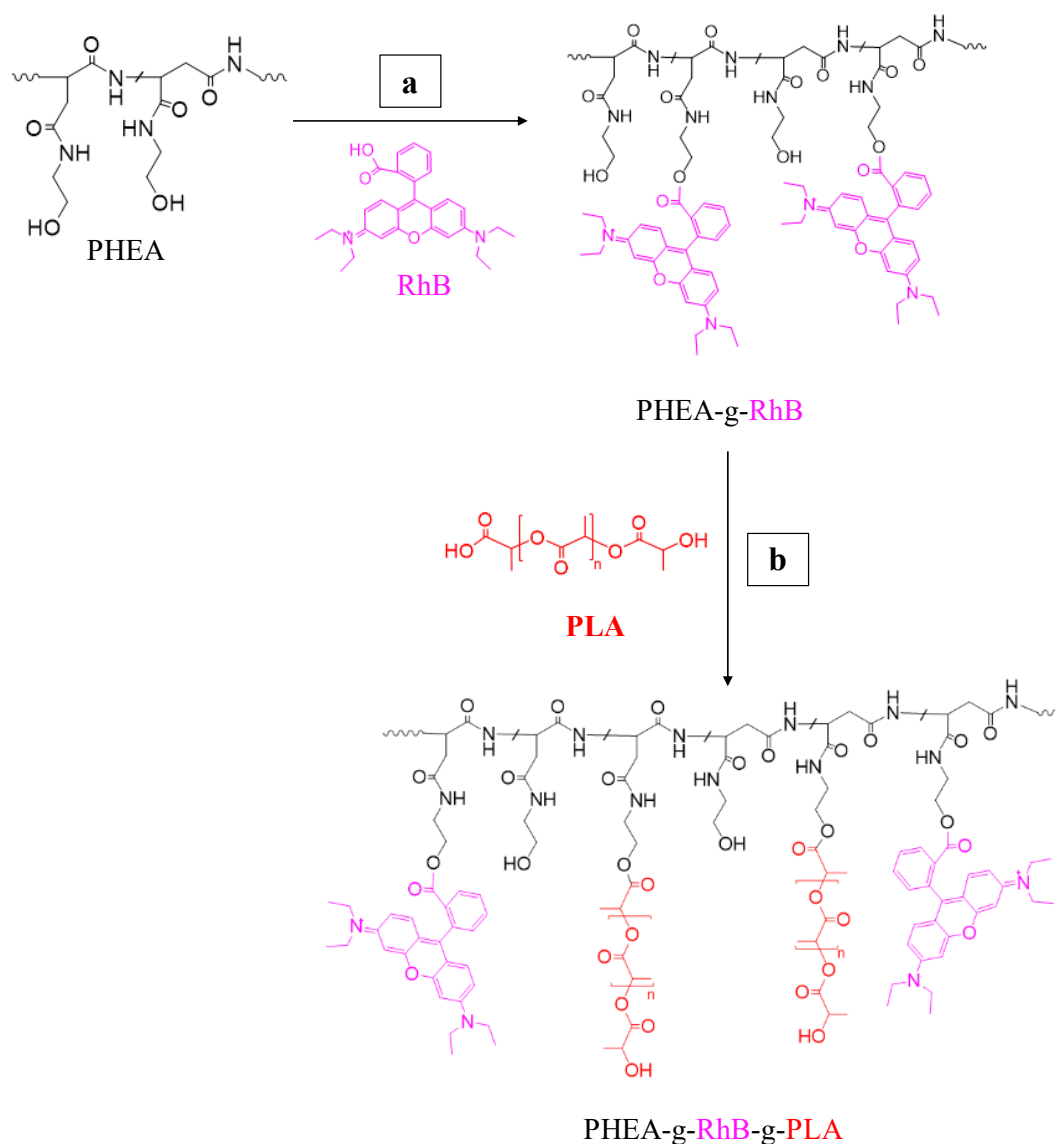


Figura 28. Schema di sintesi del copolimero PHEA-g-RhB-g-PLA ($n=194$). Condizioni sperimentali: **a)** DMF-a, CDI, 4 h a 40°C; DEA 48 h a 40°C. **b)** DMF-a, CDI, 4 h a 40°C; DEA, 68 h a 40°C. *Backbone* del PHEA (nero); RhB (fucsia); PLA (rosso).

Inizialmente è stata condotta la sintesi del copolimero PHEA-g-RhB, per reazione di esterificazione di alcuni gruppi ossidrilici del PHEA con il gruppo carbossilico della RhB. La reazione è stata condotta in dimetilformammide anidra (DMF-a), utilizzando il carbonildiimidazolo (CDI) come attivante dei gruppi carbossilici della RhB e la dietilammina

(DEA) come catalizzatore della reazione. La procedura di sintesi e la struttura molecolare del copolimero PHEA-g-RhB è riportata in **Figura 28 a**.

Come descritto nella parte sperimentale, le quantità di RhB, CDI e DEA impiegate sono state calcolate rispettivamente secondo i seguenti rapporti molari $R_1=1,25$, $R_2=0,01$ e $R_3=5$.

La fase di attivazione dei gruppi carbossilici della RhB è stata condotta a 40°C per 4 ore, al termine della quale la soluzione di PHEA è stata aggiunta a quella di RhB attivata, lasciandoli reagire per 48 ore a 40°C. Una volta ottenuto e purificato, il copolimero PHEA-RhB è stato caratterizzato mediante analisi $^1\text{H-NMR}$ e SEC.

Il grado di derivatizzazione in moli % di RhB (*Derivatization Degree*, $\text{DD}_{\text{RhB}}\%$) rispetto alle moli di unità ripetitive (U.R.) del copolimero PHEA-g-RhB è stato calcolato dallo spettro $^1\text{H-NMR}$, registrato in ossido di deuterio (D_2O), rapportando l'integrale dei picchi compresi tra δ 8,00-8,50 (m, 10H_{RhB} **H-Ar**), relativi ai protoni della RhB legata, all'integrale del picco δ 3,29 (t, 2H_{PHEA} - $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{O-}$) relativo ai protoni del PHEA. Il $\text{DD}_{\text{RhB}}\%$ in moli % rispetto alle moli di unità ripetitive (U.R.) del copolimero PHEA-g-RhB è stato espresso come valore medio di tre determinazioni ed è risultato pari a $0,60 \pm 0,05\%$ in moli.

Considerando il peso molecolare del PHEA di partenza (53.600 Da), questo risultato indica che in media ciascuna catena polimerica è funzionalizzata con una molecola di RhB.

Il peso molecolare medio pesato $\bar{M}_w$ del PHEA-RhB è risultato pari a 52.500 Da e l'indice di polidispersità $\bar{M}_w/\bar{M}_n$ pari a 1,6.

Un volta ottenuto e purificato, il PHEA-g-RhB è stato derivatizzato con il PLA, per reazione di esterificazione di alcuni gruppi ossidrilici del PHEA con il gruppo carbossilico del PLA. La reazione è stata condotta in DMF-a, utilizzando il CDI come attivante dei gruppi carbossilici del PLGA e la DEA come catalizzatore della reazione. La procedura di sintesi e la struttura molecolare del copolimero PHEA-g-RhB-g-PLA è riportata in **Figura 28 b**.

Come descritto nella parte sperimentale, le quantità di PLA, CDI e DEA impiegate sono state calcolate rispettivamente secondo i seguenti rapporti molari $R_4=0,06$, $R_5=2$ e $R_6=5$.

La fase di attivazione dei gruppi carbossilici del PLA è stata condotta a 40°C per 4 ore, al termine della quale la soluzione di PHEA è stata aggiunta a quella di PLA attivata, lasciandoli reagire per 68 ore a 40°C. Una volta ottenuto e purificato, il copolimero PHEA-g-RhB-g-PLA è stato caratterizzato mediante analisi $^1\text{H-NMR}$ e SEC.

Il grado di derivatizzazione in moli % del PLA (DD_{PLA}) rispetto alle moli di unità ripetitive (U.R.) del copolimero PHEA-g-RhB-g-PLA è stato calcolato dallo spettro $^1\text{H-NMR}$ registrato in DMF deuterata (DMF-d_7) (**Figura 29**), è stato calcolato dallo spettro $^1\text{H-NMR}$ rapportando l'integrale dei picchi a δ 1,3-1,7 ($582 \text{ H}_{\text{PLA}} -\text{OCOCH}(\text{CH}_3)\text{O}-$), a δ 4,2-4,5 e δ 5,1-5,5 ($194 \text{ H}_{\text{PLA}} -\text{OCOCH}(\text{CH}_3)-$) relativi ai protoni del PLA legato, all'integrale del picco a δ 4,8 ($1 \text{ H}_{\text{PHEA}} -\text{NHCH}(\text{CO})\text{CH}_2-$) relativo al protone del PHEA.

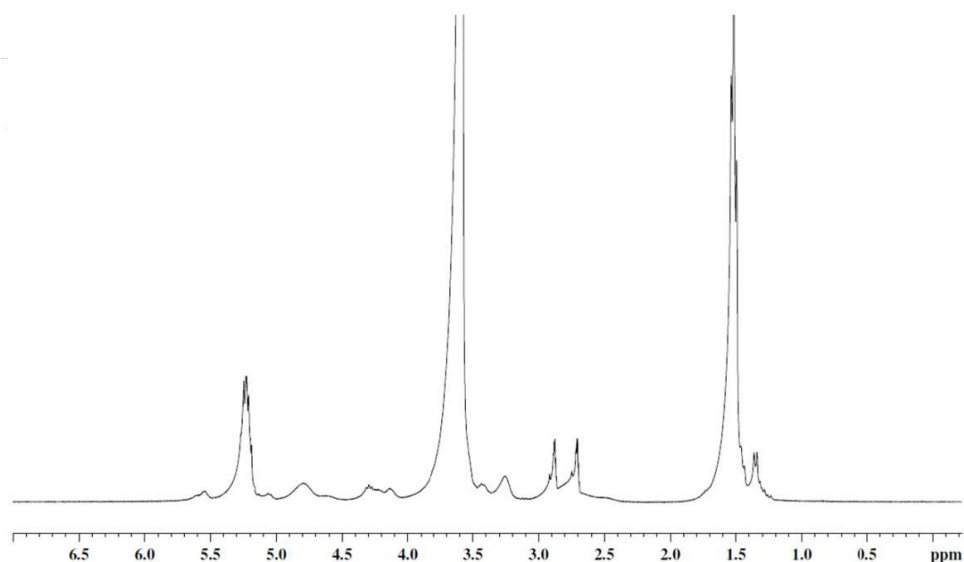


Figura 29. Spettro $^1\text{H-NMR}$ del PHEA-g-RhB-g-PLA in DMF-d_7 .

Il DD_{PLA} in moli % è stato espresso come valore medio di tre determinazioni ed è risultato pari a $2,0 \pm 0,2$ % in moli. Nel caso specifico del PHEA utilizzato, che presenta un $\bar{M}_w$ di 43.700 Da, tale DD indica che ci sono in media 5-6 catene di PLA legate per ogni macromolecola di PHEA. Il $\bar{M}_w$ del PHEA-g-RhB-g-PLA è risultato pari a 156.000 Da e il valore di indice di polidispersità ($\bar{M}_w/\bar{M}_n$) pari a 1,4.

3.1.2. Preparazione e caratterizzazione delle microparticelle polimeriche porose

Le microparticelle polimeriche (MPs) porose sono state preparate a partire dal copolimero anfifilico graft sintetizzato, il PHEA-g-RhB-g-PLA tramite processo di *spray-drying* (SD).

Il processo di SD è una tecnica avanzata e al contempo molto semplice, utilizzata per convertire un fluido (soluzione, dispersione colloidale o sospensione) in polvere secca, tramite la sua nebulizzazione attraverso una maglia, con fori di dimensioni prestabilite, in una camera di essiccazione sottoposta ad un flusso d'aria deumidificata e preriscaldata.

Questa tecnica consente la modulazione e l'ottimizzazione delle proprietà delle particelle (dimensione, indice di polidispersità, densità, morfologia) e delle caratteristiche macroscopiche della polvere (scorrevolezza, densità bulk, etc.).^{146,147}

Infatti, regolando opportunamente le variabili del processo e le caratteristiche del fluido di alimentazione, è possibile ottenere una polvere fine, uniforme, omogenea (basso indice di polidispersità), scorrevole e a basso tenore di umidità composta da MPs con dimensioni sferiche e superficie uniforme, da sfruttare in campo farmaceutico per la somministrazione di farmaci.

Inoltre, il processo può essere utilizzato per incapsulare farmaci termosensibili senza una sostanziale degradazione termica grazie alla rapida essiccazione (secondi o millisecondi) e al tempo di esposizione al calore relativamente breve.

In particolare, in questo lavoro è stato utilizzato un *Nano Spray-Dryer B-90 HP*. L'innovazione di questo strumento risiede nella presenza di un flusso di essiccazione laminare in co-corrente con lo spruzzo del fluido di alimentazione e nella presenza di un collettore elettrostatico che consente l'ottenimento e la raccolta di particelle con dimensioni nanometriche.^{146,147}

In particolare, la nebulizzazione è generata da un attuatore piezoelettrico che, sottoposto a corrente elettrica, si espande e contrae, provocando la vibrazione di una maglia metallica perforata, che determina la formazione di milioni di gocce con dimensioni uniformi nella camera di essiccazione.

La dimensione delle gocce, che determina il diametro delle microparticelle, è influenzata principalmente dalla grandezza dei fori della maglia e dalla concentrazione del fluido di alimentazione, oltre che dalle proprietà chimico-fisiche del fluido, come la tensione interfacciale e la viscosità.

Le maglie sono disponibili con dimensioni indicate rispettivamente come *small*, *medium* e *large mesh*. In particolare, con la maglia *large*, scelta in questo lavoro, vengono prodotte gocce con dimensioni di circa 8-15 μm .

Il primo step per l'ottenimento delle nostre MPs porose è stato quello di ottimizzare i parametri dello SD al fine di ottenere delle microparticelle con caratteristiche chimico-fisiche adatte a una somministrazione polmonare.

In particolare, come liquido di alimentazione dello SD è stata scelta una dispersione a diverse concentrazioni del copolimero PHEA-g-RhB-g-PLA in miscela acetone:acqua 39:1 v/v, e un flusso d'aria nella camera di essiccamento di 12 L/min, deumidificato e preriscaldato a 60°C.

Tale studio ha dimostrato che, nelle condizioni sperimentali scelte, le concentrazioni del copolimero PHEA-g-RhB-g-PLA nel fluido di alimentazione, pari a 1,5 e 3,0% p/v, rappresentano i valori ottimali per la produzione di MPs porose sferiche e poco polidisperse.

Le polveri raccolte sono state denominate, rispettivamente, MP_NT_1,5% e MP_NT_3% in funzione della concentrazione finale del copolimero nel liquido di alimentazione.

La **Figura 30** mostra delle immagini ottenute mediante microscopia a scansione elettronica (SEM) rappresentative dei campioni di MPs ottenute; il diametro medio e la relativa deviazione standard, calcolati con il *software ImageJ* su queste immagini, sono riportati nella **Tabella 4**, mentre la distribuzione delle dimensioni in frequenza nella **Figura 31**.

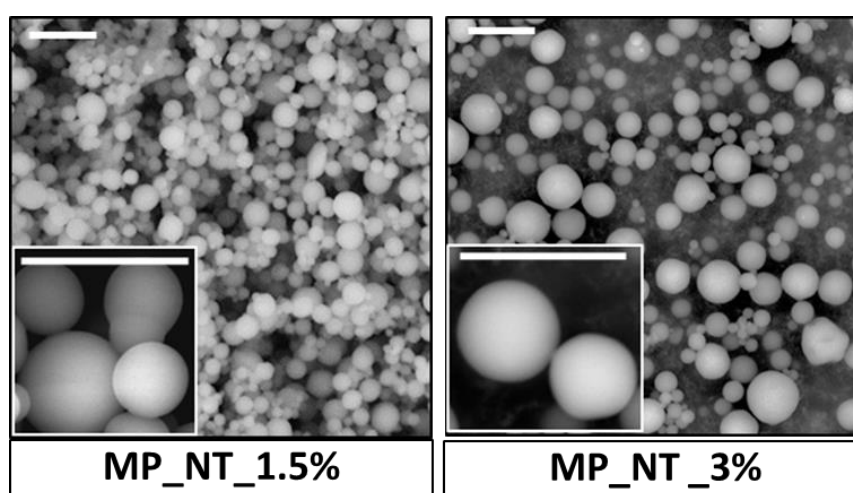


Figura 30. Immagini SEM dei campioni MP_NT_1.5% e MP_NT_3%. (ingrandimento: l'immagine più grande=8000x; quella interna=50.000x). La barra rappresenta 4 μm .

Tabella 4. Diametro geometrico (d_g) ottenuto con il software ImageJ software (numero di particelle contate > 1500) per i campioni MP_NT_1,5% e MP_NT_3%. Dati riportati come media di 3 analisi differenti.

	$d_g \pm \text{S.D.}$ (μm)
MP_NT_3%	$2,6 \pm 0,7$
MP_NT_1,5%	$2,2 \pm 0,3$

Come si può notare dai risultati ottenuti, all'aumentare della concentrazione di copolimero nel liquido di alimentazione (1,5% vs 3,0% p/v), le particelle ottenute mostrano un diametro medio maggiore e una polidispersità più elevata. L'effetto della concentrazione del copolimero sulle dimensioni delle particelle e sulla polidispersità è ancor di più evidenziato dalle distribuzioni della frequenza dimensionale delle particelle, mostrate nella **Figura 31**.

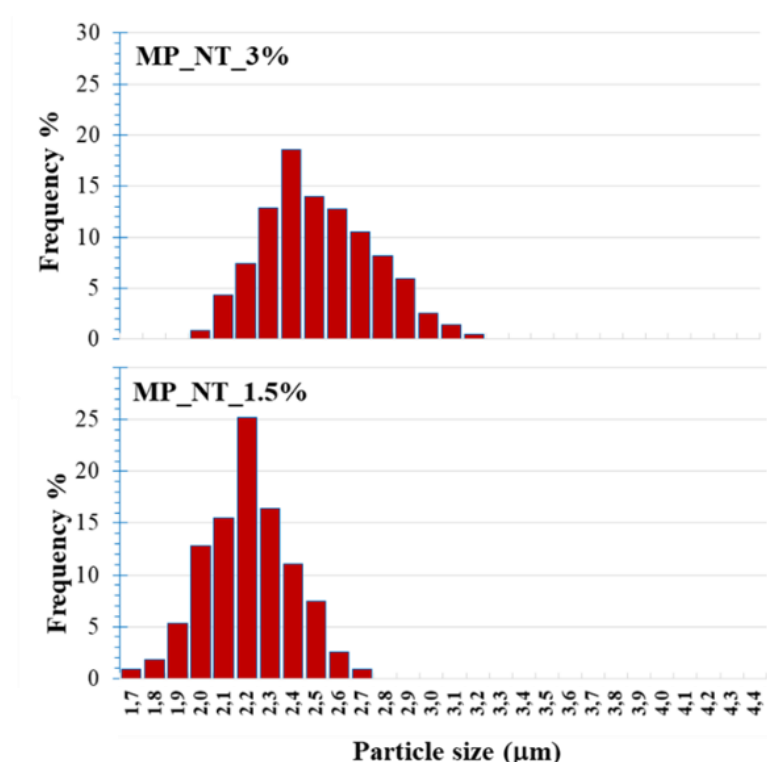


Figura 31. Distribuzione della frequenza dimensionale dei campioni MP_NT_1,5% e MP_NT_3%.

Allo scopo di ottenere maggiori informazioni sulle caratteristiche superficiali delle MPs in termini di morfologia e rugosità della loro superficie, è stata effettuata un'analisi di microscopia a forza atomica (AFM) su entrambi i campioni ottenuti (**Figura 32**).

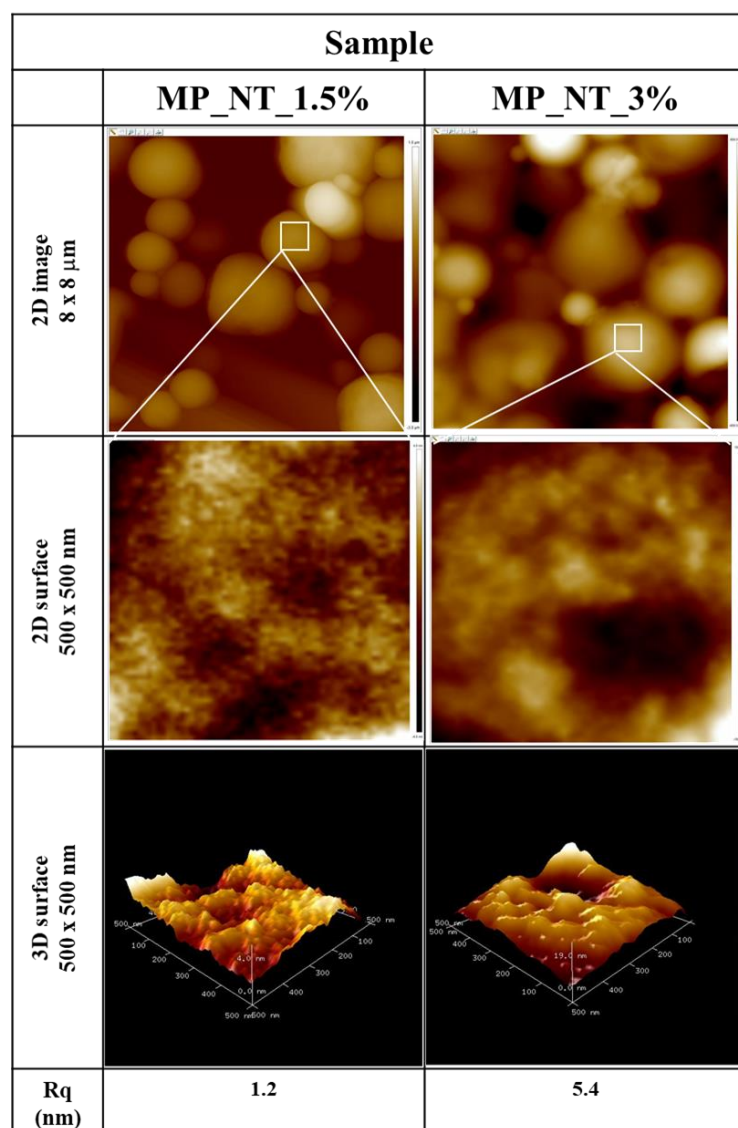


Figura 32. Immagine 2D, 3D e R_q dei campioni MP_NT_1,5% e MP_NT_3%.

In particolare, è stata ottenuta una prima immagine bidimensionale, con un'area di $8 \mu\text{m} \times 8 \mu\text{m}$, che ha permesso di apprezzare la dimensione media delle particelle. Per determinare la rugosità superficiale, invece, dalla prima immagine sono state selezionate almeno tre porzioni di superficie delle particelle, con un'area di $500 \text{ nm} \times 500 \text{ nm}$, e su ciascuna immagine è stata sottratta una superficie polinomiale quadratica per imitare la stessa superficie, ma sferica e liscia. In questo modo, per ogni campione è stato calcolato il valore della rugosità quadratica media (R_q), che fornisce una misura della regolarità dei pori/solchi presenti sulla superficie.

Come si può osservare nella **Figura 32**, la superficie delle particelle del campione MP_NT_3% ha mostrato grandi "buchi/solchi" e un elevato valore di R_q , presentando quindi ampie fluttuazioni laterali. D'altra parte, a una concentrazione dimezzata di copolimero (1,5% p/v), la superficie è morfologicamente più regolare, così come il valore R_q è significativamente ridotto rispetto al campione MP_NT_3% (1,2 nm vs 5,4 nm).

Pertanto, alla luce dei risultati ottenuti e delle considerazioni fatte finora, per la produzione delle nostre MPs porose è stata scelta l'1,5% p/v come concentrazione di copolimero di partenza nel fluido di alimentazione, a cui è stato aggiunto il bicarbonato di ammonio (AB) in percentuale in peso pari al 10 e al 20 % rispetto alla quantità del copolimero utilizzata.

L'AB è un sale che si decompone al di sopra dei 50°C in anidride carbonica e ammoniaca. Il suo utilizzo come porogeno per la produzione di microparticelle polimeriche o scaffold mediante diverse tecniche consente di produrre matrici con grandi pori con estrema facilità. Pertanto, in questo lavoro, l'AB è stato scelto come agente porogeno, considerando che a 60°C è probabile che venga rimosso direttamente durante il processo di SD formando pori nelle particelle della matrice.^{103–105}

In questo caso, il porogeno è stato solubilizzato in fase acquosa e aggiunto alla dispersione acetonica di copolimero all'1,5% p/v, mantenendo un rapporto volumetrico acetone:acqua pari a 39:1.

In seguito al processo SD, sono stati prodotti due campioni MPs porosi: MP_AB_10 e MP_AB_20, rispettivamente con l'aggiunta di una percentuale in peso di AB pari a 10 o 20% rispetto alla quantità di copolimero utilizzata.

Le rese ottenute sono state entrambe superiori al 57% in peso rispetto al peso totale dei componenti di partenza dispersi nel fluido di alimentazione.

L'analisi FT-IR ha dimostrato che il porogeno è stato efficacemente eliminato durante il

processo di SD, essendo gli spettri dei campioni perfettamente sovrapponibili a quelli del campione ottenuto in assenza di AB (**Figura 33**).

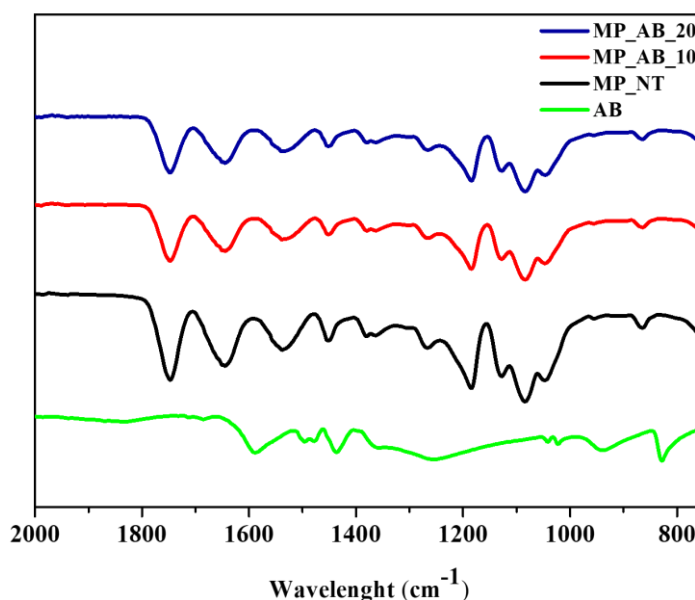


Figura 33. Spettri FT-IR dei campioni: AB (verde), MP-NT (nero), MP_AB_10 (rosso) e MP_AB_20 (blu).

L'analisi SEM dei campioni MP_AB_10 e MP_AB_20, riportata in **Figura 34**, evidenzia la forma sferica e una matrice non omogenea per MP_AB_20. I valori delle dimensioni medie, ottenuti come per i precedenti campioni dall'analisi delle immagini con il *software ImageJ* e le distribuzioni della frequenza dimensionale delle particelle, sono riportati rispettivamente in **Tabella 5** e in **Figura 35**.

I risultati ottenuti dimostrano che l'aggiunta del porogeno provoca un aumento significativo del diametro medio delle MPs rispetto a quello delle particelle ottenute dal solo copolimero. Inoltre, all'aumentare della percentuale in peso di AB, il diametro medio aumenta significativamente.

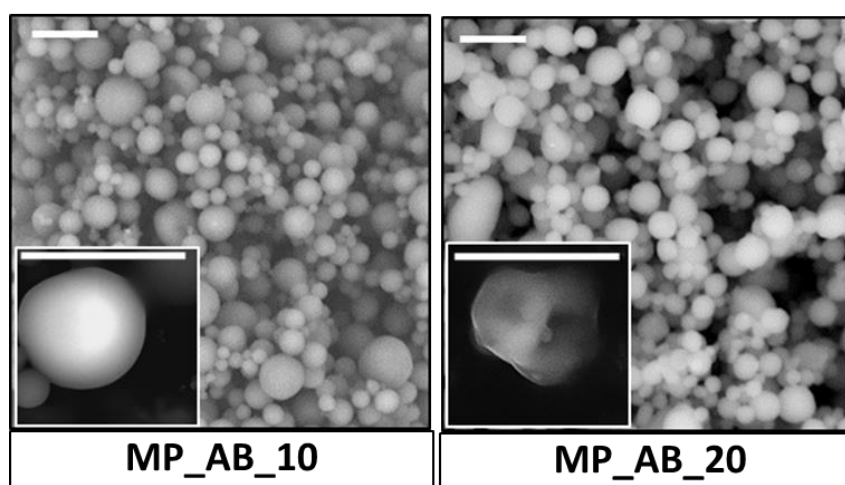


Figura 34. Immagini SEM dei campioni MP_AB_10 e MP_AB_20. (ingrandimento: l'immagine più grande=8000x; quella interna=50.000x). La barra rappresenta 4 μm .

Tabella 5. Diametro geometrico (d_g) ottenuto con il software ImageJ software (numero di particelle contate > 1500) per i campioni MP_AB_10 e MP_AB_20. Dati riportati come media di 3 analisi differenti.

	$d_g \pm \text{S.D.}$ (μm)
MP_AB_10	$3,6 \pm 0,5$
MP_AB_20	$3,8 \pm 0,5$

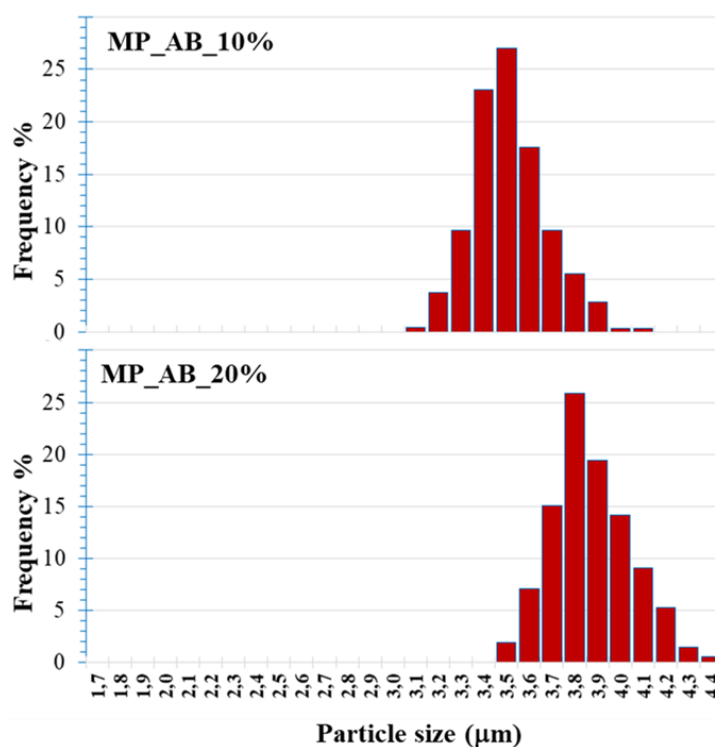


Figura 35. Distribuzione della frequenza dimensionale dei campioni MP_AB_10 e MP_AB_20.

L'analisi AFM è stata condotta anche sui campioni MP_AB_10 e MP_AB_20, al fine di valutare l'effetto dell'uso del porogeno sulle caratteristiche superficiali delle MPs. Le immagini ottenute e la R_q sono riportate in **Figura 37**.

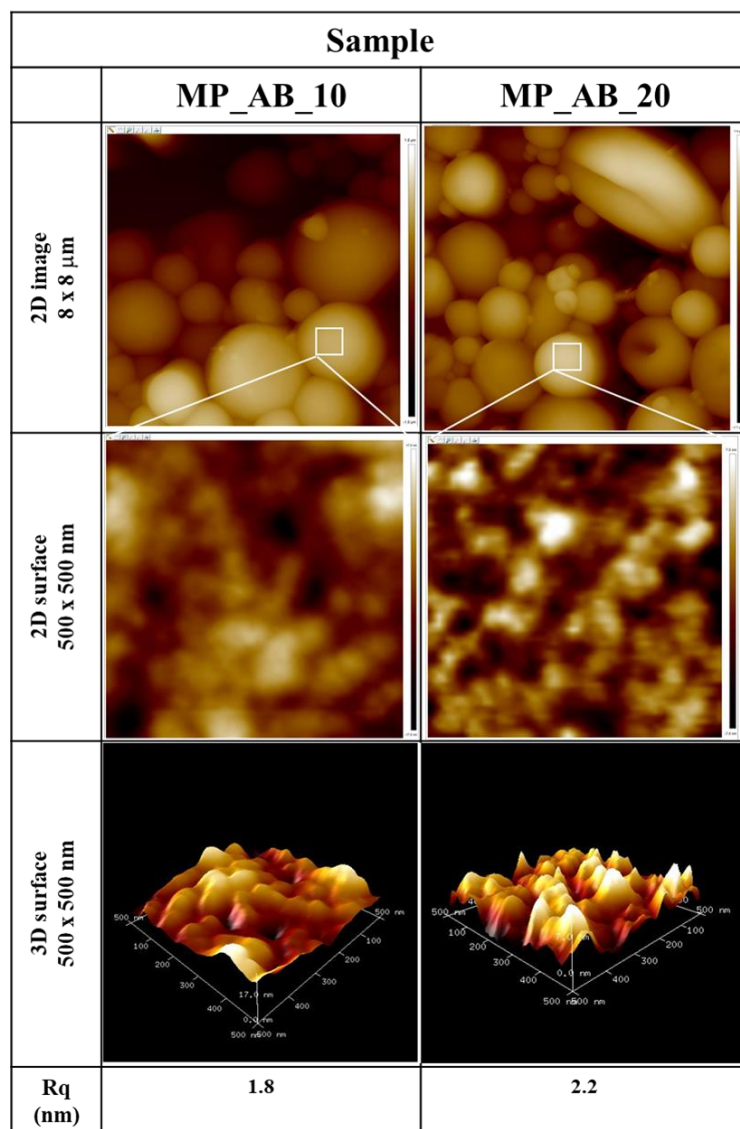


Figura 37. Immagine 2D, 3D e R_q dei campioni MP_AB_10 e MP_AB_20.

In particolare, questa ha rivelato una morfologia superficiale delle particelle con pori chiaramente visibili, che aumentano in numero e dimensioni all'aumentare della quantità di AB aggiunta al liquido di alimentazione del processo SD. Inoltre, anche la rugosità superficiale aumenta all'aumentare della quantità di porogeno aggiunto (R_q 1,8 nm vs 2,2 nm).

Pertanto, l'aggiunta di AB influenza la morfologia superficiale dei campioni ottenuti, così come la dimensione media delle particelle, con effetti più evidenti all'aumentare della quantità aggiunta.

3.1.2.1. Analisi superficiale e porosità

Allo scopo di confermare la presenza e la dimensione dei pori/solchi, già rilevati dall'analisi morfologica e AFM sulla superficie delle MPs porose, e di conoscere l'area superficiale delle stesse, tutti i campioni sono stati caratterizzati mediante la determinazione della quantità di gas adsorbito/desorbito sulla superficie, che attraverso l'applicazione di opportuni modelli matematici, permette di calcolare l'area superficiale specifica e la distribuzione dimensionale di pori eventualmente presenti su quest'ultima.

In particolare, per ricavare il valore dell'area superficiale specifica, è stato utilizzato il metodo *Multipoint Brunauer-Emmet-Teller* (BET), mentre per ottenere il valore della dimensione dei pori e la loro distribuzione, è stato adoperato il modello *Barrett, Joyner and Halenda* (BJH). Quest'ultimo è stato selezionato in quanto rappresenta il metodo più idoneo per la caratterizzazione di materiali mesoporosi (come risultano i nostri campioni dall'analisi AFM), ovvero con dimensioni dei pori compresi tra 2-50 nm.^{148,149}

Per effettuare l'analisi, ciascun campione è stato degasato per 6 ore e sottoposto a valori di pressioni relative P/P_0 di N_2 crescenti fino al valore di 1, e poi decrescenti.

Le isoterme di adsorbimento di N_2 a 77 K sulle superfici delle MPPs, ottenute tramite il metodo *multipoint* BET, sono riportate in **Figura 38**, rispettivamente in assenza dell'agente porogeno e in presenza di AB in quantità crescenti; esse mostrano come varia il volume di gas adsorbito sulla superficie delle particelle in funzione della pressione relativa P/P_0 di N_2 .

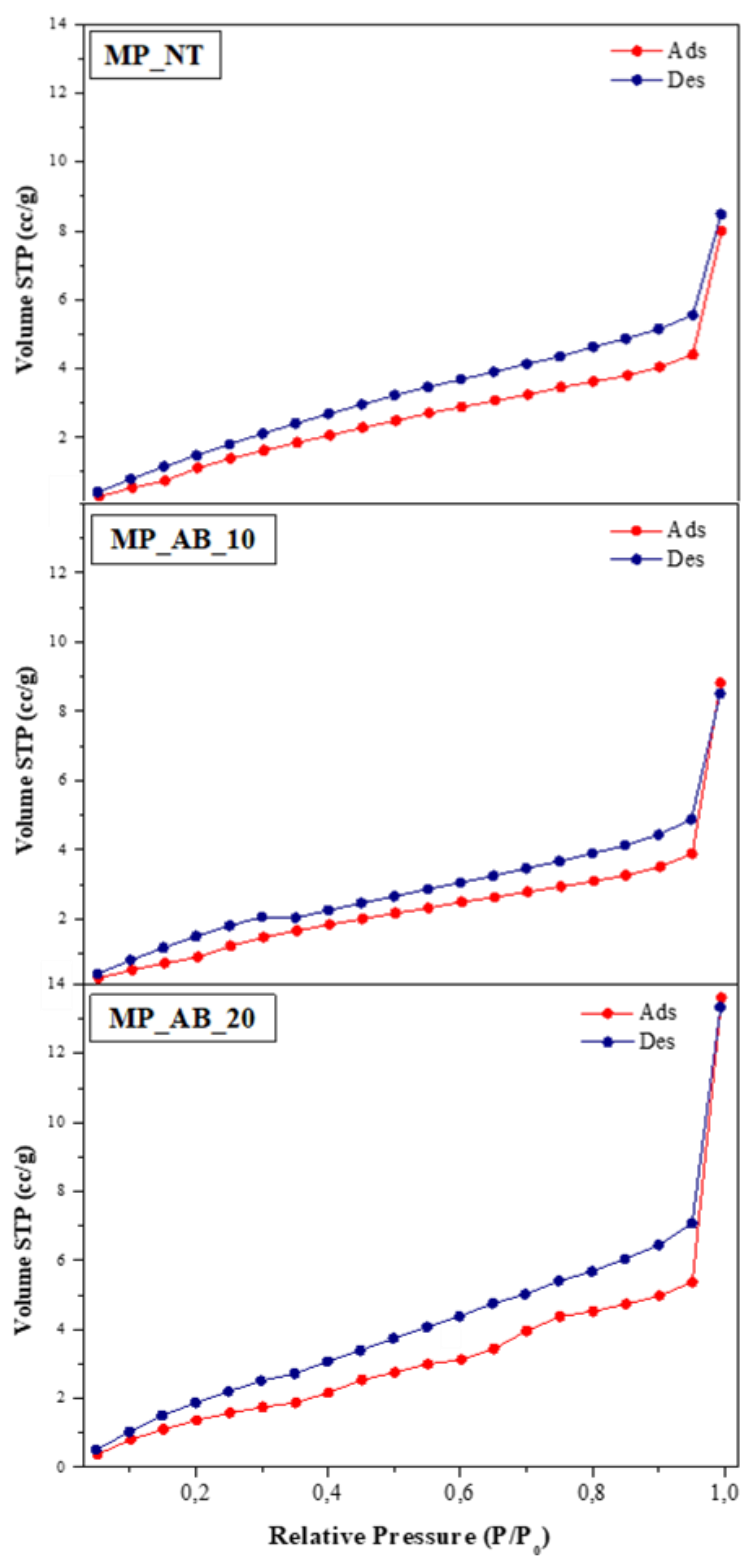


Figura 38. Isotherme BET lineari dei campioni MP_NT 1,5% p/v, MP_AB_10 e MP_AB_20.

Secondo la IUPAC, tutte le isoterme ottenute sono di tipo III, essendo caratterizzate da un basso adsorbimento di adsorbato a bassi valori di pressione parziale, che aumenta ad elevate pressioni fino a quando P/P_0 raggiunge l'unità. Inoltre, in tutte le isoterme è presente un ciclo di isteresi, che mostra un diverso andamento del profilo di adsorbimento/desorbimento del gas.¹⁴⁹

L'analisi dei dati ottenuti mediante i modelli BET e BJH fornisce i valori delle aree superficiali, delle dimensioni medie e del volume dei pori per tutti i campioni ottenuti (**Tabella 6**). In **Figura 39**, invece, è riportata la distribuzione delle dimensioni dei pori sulla superficie dei nostri campioni in funzione del volume di gas adsorbito.

Tabella 6. Dati ottenuti con i metodi di analisi *Multipoint* BET e BJH. Dati riportati come media di 3 analisi differenti.

	Surface Area (Multipoint BET) (m ² /g ± S.D.)	Surface area of pores (BJH) (m ² /g ± S.D.)	Average pore diameter (nm ± S.D.)	Pore volume (cc/g ± S.D.)
MP_NT	10,84 ± 0,232	10,822 ± 0,403	1,942 ± 0,096	0,015 ± 0,003
MP_AB_10	7,178 ± 0,365	9,378 ± 0,144	2,456 ± 0,126	0,016 ± 0,002
MP_AB_20	9,033 ± 0,502	13,491 ± 0,336	3,060 ± 0,171	0,024 ± 0,004

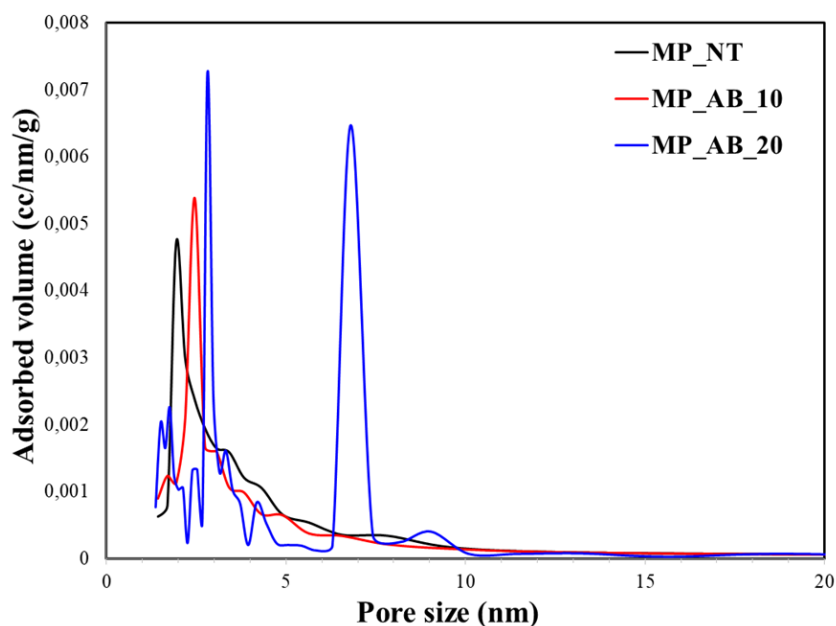


Figura 39. Distribuzione dimensionale dei pori dei campioni di MPs ottenuti in assenza (NT) e in presenza di porogeno AB, determinato con il metodo BJH. Dati riportati come media di 3 analisi differenti.

I valori dell'area superficiale, ottenuti sia con il modello BET che con il modello BJH, mostrano un andamento simile per tutti i campioni. In particolare, il campione MP_NT mostra i valori di area superficiale più elevati, che possono essere giustificati considerando le dimensioni più ridotte delle microparticelle ($2,2 \pm 0,3 \mu\text{m}$) rispetto a quelli ottenuti in presenza di porogeno. Inoltre, l'area superficiale aumenta all'aumentare della percentuale in peso di AB nella dispersione *spray-dried* (10 vs 20%), così come il diametro medio e il volume dei pori. In particolare, il campione MP_AB_10 mostra un leggero aumento del volume dei pori (0,016 vs 0,015 cc/g) e del diametro medio rispetto al campione MP_NT (2,456 vs 1,942 nm). D'altra parte, il campione che appare significativamente diverso dagli altri è MP_AB_20, in quanto sia il volume occupato dai pori è quasi raddoppiato rispetto a MP_NT (0,024 vs 0,015 cc/g), sia in quanto mostra due popolazioni di pori con diametri pari a 2,818 e 6,805, rispettivamente. Pertanto, possiamo concludere che la porosità dei nostri campioni può essere modulata in

funzione della presenza e della quantità di porogeno utilizzato per la loro produzione. Una tendenza simile è stata già riportata in altri studi; in particolare, Oh e collaboratori hanno dimostrato che la dimensione dei pori e il diametro medio di microparticelle porose a base di acido polilattico-co-glicolico (PLGA) aumentano con l'aumento della concentrazione di AB utilizzata per la loro produzione.^{106,150}

3.1.2.2. Densità e diametro aerodinamico teorico

Sulla base di questi risultati, si prevede che anche le proprietà di flusso, importanti per un'adeguata inalazione, possano essere influenzate dalle differenze evidenziate tra i campioni ottenuti.

In particolare, per valutare il potenziale comportamento aerodinamico delle MPs ottenute dopo l'inalazione, sono stati calcolati i valori di densità *tapped* (ρ_{tapp}) e l'indice di Carr (CI) con il metodo della siringa (**Tabella 7**).^{151,152} Come si può notare, i valori di ρ_{tapp} diminuiscono all'aumentare della percentuale in peso di porogeno nell'alimento liquido, indicando che il campione di MPs diventa meno compatto a causa della formazione di pori nelle matrici.

Tabella 7. Valori di densità *tapped* (ρ_{tapp}), diametro geometrico medio (d_g), diametro aerodinamico teorico (d_{aer}) delle MPs ottenute. Dati riportati come la media 3 analisi differenti.

	ρ_{tapp} (g/ml $\pm$ SD)	d_g (μ m $\pm$ SD)	d_{aer} teorico (μ m $\pm$ SD)	CI (% $\pm$ SD)
MP_NT	0,75 $\pm$ 0,03	2,2 $\pm$ 0,3	1,9 $\pm$ 0,2	49,3 $\pm$ 6,3
MP_AB_10	0,54 $\pm$ 0,04	3,6 $\pm$ 0,5	2,6 $\pm$ 0,4	50,0 $\pm$ 3,7
MP_AB_20	0,50 $\pm$ 0,03	3,8 $\pm$ 0,5	2,7 $\pm$ 0,2	36,0 $\pm$ 4,2

Applicando la formula descritta nel paragrafo 4.1.3.4 della parte sperimentale, è stato calcolato il diametro aerodinamico teorico (d_{aer}) per ciascun campione ottenuto.^{153,154} I dati mostrano che l'utilizzo del porogeno determina un aumento delle dimensioni delle MPs porose, ma allo stesso tempo la formazione di pori, che causa una riduzione del d_{aer} teorico. D'altra parte, il basso valore di d_{aer} del campione MP_NT, nonostante abbia il più alto valore di densità *tapped*, può essere spiegato considerando il più piccolo diametro medio geometrico (2,2 μm) utilizzato nella formula.^{153,154} Per quanto riguarda la scorrevolezza delle polveri costituite dalle MPs, valutata attraverso il calcolo del CI (**Tabella 7**), il campione MP_AB_20 mostra le migliori proprietà di flusso avendo il valore più basso.

3.1.2.3. Valutazione del comportamento aerodinamico

Al fine di valutare la deposizione della polvere e determinarne i parametri aerodinamici, i campioni sono stati testati utilizzando il dispositivo del tipo *dry powder inhaler* (DPI) Breezhaler® collegato ad un *Next Generation Impactor* (NGI), secondo procedura riportata nella parte sperimentale. La deposizione % della polvere negli stadi dell'NGI è riportata in **Figura 40**.

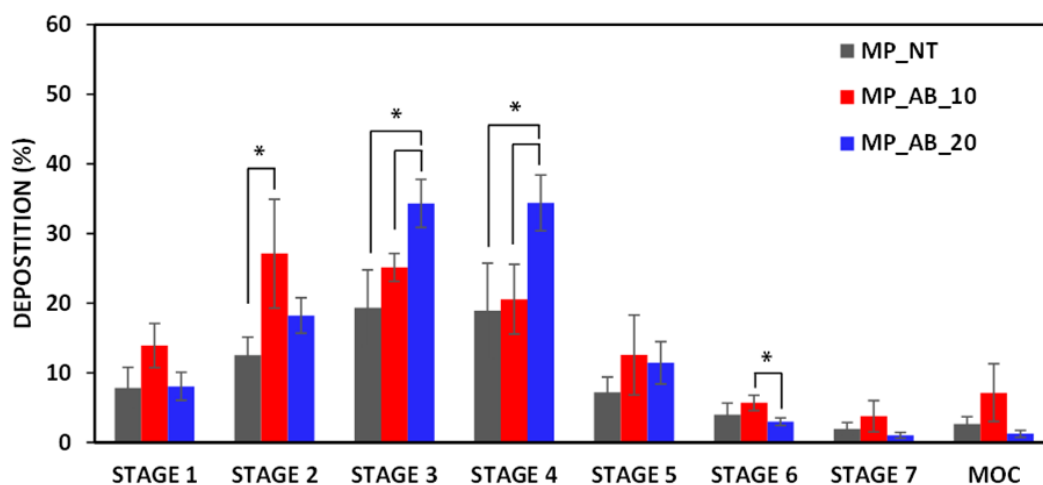


Figura 40. Deposizione% della polvere di MPs negli stage di un NGI, in seguito ad aerosolizzazione tramite Breezhaler® con un flusso di 90 L/min (* $p < 0,05$). Dati riportati come la media di 3 differenti esperimenti.

Come è possibile notare, le polveri dei campioni MP_AB hanno mostrato migliori proprietà aerodinamiche rispetto a MP_NT, depositandosi principalmente negli stadi intermedi (3 e 4), con una deposizione significativamente più alta per il campione MP_AB_20.

Per quanto riguarda i parametri aerodinamici (**Tabella 8**), tutti i campioni testati hanno mostrato un'elevata efficienza di aerosolizzazione in termini di ED, con valori compresi tra 69,4 e 69,8%. L'MP_AB_20 ha mostrato un leggero aumento dell'FPF% rispetto al campione senza il porogeno, variando dall'11,1% (MP_NT) al 12,5% (MP_AB_20). È già riportato in letteratura che l'FPF di MPs porose aumenta in funzione della quantità di AB utilizzato.¹⁵⁵ Inoltre, il MMAD è risultato quasi invariato tra tutti i campioni (da 2,1 a 2,2 μm) e paragonabile a quello teorico, dando un DI inferiore all'unità.

Pertanto, è possibile concludere che l'aggiunta di AB determina la formazione di matrici più grandi e meno compatte grazie alla formazione di pori durante il processo di SD e, di conseguenza, una modulazione delle caratteristiche della polvere, riducendone la densità.

Per quanto riguarda le proprietà aerodinamiche, MP_AB_20 mostrano valori di MMAD paragonabili al d_{aer} teorico, confermando le ottime proprietà di flusso e aerosolizzazione delle particelle ottenute, adatte quindi all'utilizzo come vettori polmonari inalabili di farmaci.

Tabella 8. Parametri aerodinamici dei campioni testati: *emitted dose (ED%)*, *fine particle dose (FPD)*, *fine particle fraction (FPF)*, *mass median aerodynamic diameter (MMAD)*, *geometric standard deviation (GSD)* e *dispersibility index (DI)*. Dati riportati come la media di 3 differenti esperimenti.

	MP_NT	MP_AB_10	MP_AB_20
ED%	69,8 ± 3,0	69,4 ± 2,0	69,5 ± 3,3
FPD (mg)	1,9 ± 0,6	1,4 ± 0,5	2,3 ± 0,2
FPF (%)	11,1 ± 3,6	8,9 ± 2,6	12,5 ± 1,4
MMAD (µm)	2,1 ± 0,1	2,2 ± 0,3	2,2 ± 0,2
GSD	3,3 ± 0,1	3,5 ± 0,1	3,0 ± 0,1
DI	1,1	0,8	0,8

3.1.3. Microparticelle polimeriche porose contenenti la Rapamicina

Una volta caratterizzate le MPs porose ottenute dal punto di vista chimico-fisico e tecnologico e avendo dimostrato che la loro produzione in presenza di un AB determina la formazione di matrici più grandi e meno compatte grazie alla formazione di pori/solchi dopo l'allontanamento di AB, è stato studiato come queste caratteristiche possano influenzare la cinetica di rilascio di un farmaco in esse incorporato.

Per fare ciò, è stata scelta la Rapamicina come farmaco modello. Come risulta da studi precedenti, essa presenta una scarsa velocità di rilascio da parte di matrici polimeriche di composizione simile.¹⁵⁶

Pertanto, in questo lavoro, per produrre le MPs, la Rapamicina è stata solubilizzata nella stessa dispersione acetonica del copolimero PHEA-g-RhB-g-PLA e sottoposta a processo di SD seguendo i parametri già visti in precedenza.

I valori di dimensione media e di densità tapped ottenuti per i campioni MPs caricati con Rapamicina sono risultati sovrapponibili a quelli dei campioni vuoti (dati non mostrati).

La quantità di farmaco incorporata nelle MPs, espressa come *Drug Loading* (DL%), è risultata pari al 2,2%, con un'efficienza di incapsulamento (EE%) del 44% p/p e non significativamente differente per tutti i campioni. Altri autori hanno già riportato una EE% inferiore al 50% p/p per valori teorici di DL% pari al 5 come in questo caso.¹⁵⁷

I profili di rilascio del farmaco (**Figura 41**) mostrano differenze non significative nella quantità di farmaco rilasciato dai campioni MP_NT e MP_AB_10 fino a 12 ore di incubazione in entrambi i terreni scelti (terreno cellulare e liquido polmonare simulato, SLF4).

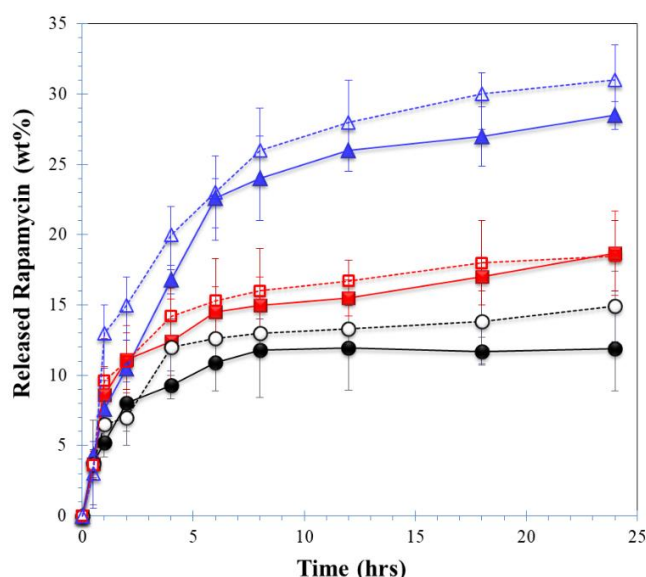


Figura 41. Profilo di rilascio della Rapamicina da: MP_NT (nero), MP_AB_10 (rosso) e MP_AB_20 (blu), in mezzo cellulare (linea continua), e in fluido polmonare simulato (linea tratteggiata). Dati riportati come la media di 3 esperimenti differenti.

A tempi di incubazione superiori a 12 ore nel mezzo cellulare, la differenza diventa significativa, raggiungendo valori di 11,9 e 18,7% di farmaco rilasciato, rispettivamente, dai campioni MP_NT e MP_AB_10 dopo 24 ore di incubazione. Al contrario, la quantità di farmaco rilasciata dai campioni MP_NT e MP_AB_10 nel liquido polmonare simulato (SLF4) non è statisticamente significativa dopo 24 ore di incubazione, essendo pari al 14,9 e al 18,5% di farmaco rilasciato, rispettivamente. D'altra parte, il profilo di farmaco rilasciato dal campione MP_AB_20 in entrambi i terreni di coltura è significativamente più alto rispetto agli altri campioni già dopo 2 ore di incubazione, raggiungendo il 28,5 e il 31,0% della quantità totale caricata dopo 24 ore di incubazione, rispettivamente, nel terreno cellulare e in SLF4. Questo risultato può essere spiegato considerando un'area superficiale e una porosità significativamente più elevate di MP_AB_20 rispetto agli altri campioni di MPs.

In letteratura, esistono diverse evidenze che dimostrano come la velocità di rilascio dei farmaci caricati in MPs porose a base di PLGA, in condizioni *sink*, dipenda dalla concentrazione del porogeno impiegato (come AB, PBS o PVP); all'aumentare del porogeno, la cinetica di rilascio è infatti più rapida.^{106,150} Allo stesso modo, un rilascio più rapido di nanoparticelle endosomolitiche da MPs porose a base di PLGA è stato associato a un aumento dell'area superficiale dovuto all'uso di diverse quantità di AB.¹⁵⁸

Inoltre, è ampiamente dimostrato in letteratura che sia il processo di produzione delle MPs porose, che il tipo e la concentrazione di porogeno impiegato, nonché la necessità di rimuovere quest'ultimo se di natura polimerica, provocano un *burst effect* nel profilo di rilascio del farmaco, chiaramente dipendente anche dalla natura del farmaco in questione.^{150,159}

Per i nostri sistemi, questo effetto è assente, poiché il metodo di produzione scelto, l'utilizzo di AB e quindi l'assenza della necessità di allontanarlo dopo la preparazione delle MPs, evita la possibile diffusione del farmaco verso i pori e la superficie delle particelle. In ogni caso, questi risultati implicano che la cinetica di rilascio del farmaco dalle MPs porose è modulabile

attraverso la regolazione del contenuto di porogeno.

Pertanto, le MPs porose ottenute rappresentano dei potenziali vettori per la somministrazione polmonare di farmaci, essendo possibile modularne le caratteristiche chimico-fisiche e tecnologiche, quali la porosità, la quale influisce significativamente sull'area superficiale e sul comportamento aerodinamico e sui profili di rilascio dei farmaci incorporati.

Poiché queste MPs sono proposte per una potenziale somministrazione inalatoria, ne è stata valutata in vitro la citotossicità su cellule bronchiali epiteliali (16-HBE). La citocompatibilità delle MPs caricate con Rapamicina è stata valutata utilizzando diverse concentrazioni e confrontata con il farmaco libero e con MPs vuote (alla concentrazione corrispondente ai campioni caricati con il farmaco) dopo 24 ore di incubazione (**Figura 42**).

Come si evince dai risultati ottenuti, sia le MPs vuote che caricate con Rapamicina non hanno mostrato effetti significativi sulla vitalità cellulare dopo 24 ore di incubazione, essendo quest'ultima sempre superiore all'80%, alle condizioni sperimentali scelte. D'altra parte, il farmaco libero mostra una significativa citotossicità dipendente dalla dose. Questa differenza è dovuta alla lenta cinetica di rilascio del farmaco dalle matrici, che porta a una minore quantità di Rapamicina disponibile per le cellule.

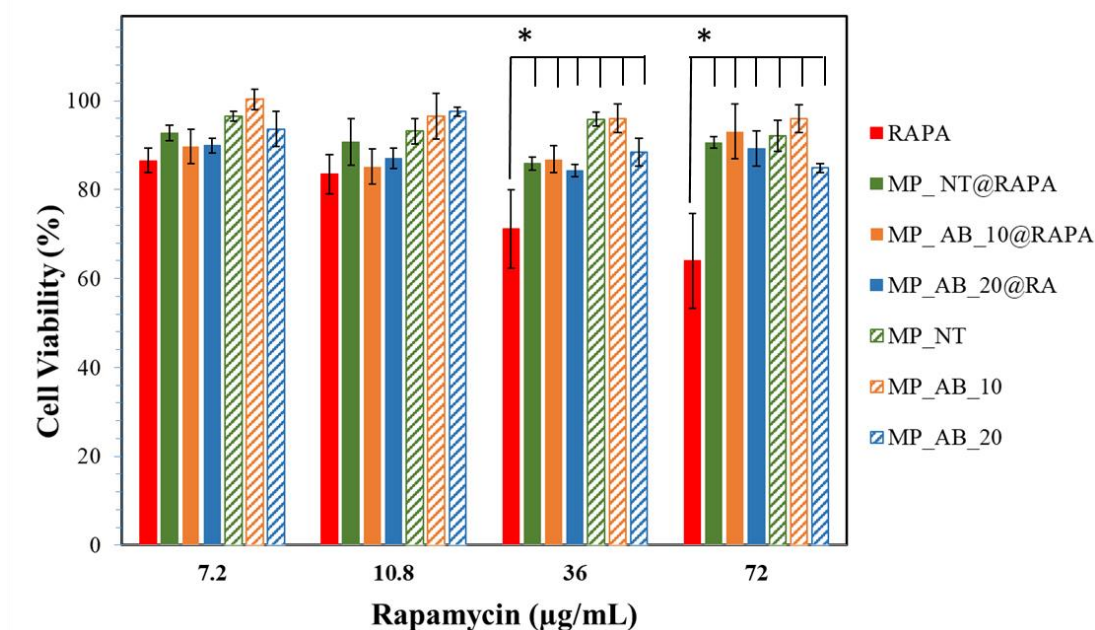


Figura 42. Vitalità % delle cellule 16-HBE dopo 24 ore di incubazione con MPs vuote e caricate con Rapamicina (concentrazione farmaco nel range 7,2–72 µg/ml). Dati riportati come media di 3 esperimenti differenti.

3.1.4. Conclusioni

In questo lavoro, sono state sviluppate delle microparticelle polimeriche (MPs) inalabili mediante tecnica dello *spray-drying* (SD), proposte come potenziali vettori per la somministrazione inalatoria della Rapamicina per il trattamento di patologie polmonari croniche quali la BPCO.

Queste particelle sono state ottenute utilizzando come liquido di alimentazione del processo SD una dispersione di acetone/acqua di un copolimero *graft* poliaspartamide-polilattide fluorescente, il PHEA-g-RhB-g-PLA. Il bicarbonato di ammonio (AB) è stato aggiunto al liquido di alimentazione del processo al fine di modificare la morfologia e la densità delle microparticelle e, di conseguenza, le loro proprietà tecnologiche, come il comportamento di aerosolizzazione e profilo di rilascio del farmaco. In particolare, AB sublima e si decompone durante il processo di SD, determinando la formazione di pori nella matrice senza la necessità

di essere rimosso in seguito alla formazione delle MPs.

Dall'analisi dimensionale delle MPs ottenute, è stato dimostrato che l'utilizzo di quantità crescenti di AB determina un aumento del diametro medio rispetto al campione ottenuto senza porogeno. L'analisi al microscopio a forza atomica (AFM) ha evidenziato che la morfologia delle MPs dipende sia dalla concentrazione del copolimero PHEA-g-RhB-g-PLA che dalla quantità di AB aggiunta per la loro produzione. In particolare, in assenza di porogeno, si ottengono particelle con superficie omogenea e rugosità ridotta. Al contrario, l'aggiunta di quantità crescenti di agente porogeno determina la formazione di "buchi" più numerosi e più grandi sulla superficie, nonché un aumento della rugosità e della porosità.

La quantificazione del gas adsorbito/desorbito sulla superficie delle particelle ha indicato che l'area superficiale e la porosità delle MPs aumentano all'aumentare dell'agente porogeno, mostrando i valori più elevati di area superficiale e porosità nel campione ottenuto con una percentuale in peso di porogeno rispetto al copolimero pari a 20. Allo stesso tempo, anche i valori di densità *tapped* di ciascun campione diminuiscono all'aumentare della quantità di porogeno aggiunto nel liquido di alimentazione del processo SD. Da questi dati è stato possibile calcolare il diametro aerodinamico (d_{aer}) teorico, che diminuisce, rispetto al diametro geometrico, all'aumentare della quantità di porogeno utilizzato. I parametri aerodinamici sono stati ulteriormente studiati testando le MPs con un DPI commerciale collegato all'NGI. I risultati complessivi hanno mostrato che parametri quali MMAD dei campioni aerosolizzati era di circa 2 μm , cioè sovrapponibile al d_{aer} teorico.

Inoltre, il vantaggio di ottenere matrici con porosità diverse è stato evidenziato valutando il profilo di rilascio della Rapamicina, scelta come farmaco modello, e incorporata nelle MPs durante il processo di SD. In particolare, la cinetica di rilascio del farmaco ottenuta dal campione MP_AB_20 è risultata significativamente più elevata; questo risultato conferma le differenze significative nelle matrici ottenute modulando la quantità di AB durante la

produzione dei campioni MP.

Tutte le matrici, indipendentemente dalla quantità di AB utilizzata per la loro produzione e dalla presenza del farmaco incorporato, sono inoltre risultate poco tossiche sulle cellule 16-HBE rispetto al farmaco libero dopo 24 ore di incubazione, dimostrando la biocompatibilità delle matrici polimeriche ottenute e confermando la lenta cinetica di rilascio del farmaco.

3.2. Sviluppo di una formulazione Nano into Micro (NiM) per la somministrazione polmonare di Iloprost per il trattamento dell'iper-infiammazione nella fibrosi cistica

È stato recentemente dimostrato che gli analoghi della prostaciclina, come l'Iloprost, in virtù del loro meccanismo d'azione, potrebbero essere utilizzati per il trattamento dell'iper-infiammazione polmonare associata alla fibrosi cistica (FC). Tuttavia, la loro applicazione clinica è ostacolata dal loro breve tempo di dimezzamento e dagli effetti collaterali legati alle vie di somministrazione sia sistemiche che polmonari.^{46,57,58}

Pertanto, considerata la necessità di migliorare l'efficacia terapeutica del farmaco e di ridurre gli effetti collaterali quando somministrato per via inalatoria, in questo secondo lavoro, applicando la strategia *Nano into Micro* (NiM), cioè incorporando nanoparticelle polimeriche peggiate, caricate con Iloprost in matrici micrometriche di mannitolo, è stata sviluppata una formulazione da somministrare per inalazione, che entrando a contatto con i fluidi polmonari possono dissolversi e liberare le nanoparticelle contenenti Iloprost, potenzialmente sfruttabile per la gestione dell'iper-infiammazione associata alla FC.

Questi *nanocarrier*, ottenuti a partire da materiali sintetici biocompatibili e biodegradabili, sono stati studiati e progettati con il duplice obiettivo di migliorare il *delivery* del farmaco alle cellule epiteliali delle vie aeree, attraverso una rapida diffusione della barriera mucosale e, allo stesso modo, di promuoverne l'*uptake* cellulare da parte delle stesse, così da migliorare l'efficacia terapeutica dell'Iloprost.

3.2.1. Sintesi e caratterizzazione dei copolimeri

Al fine di realizzare delle nanoparticelle polimeriche capaci di incorporare stabilmente l'Iloprost e di diffondere abilmente attraverso lo strato mucosale che ricopre le vie aeree di

soggetti affetti da FC, è stato sintetizzato un nuovo copolimero *graft* anfifilico peghilato partendo dal PHEA.

In particolare, sul *backbone* polimerico del PHEA sono state legate covalentemente opportune quantità di acido polilattico-co-glicolico (PLGA), un poliestere alifatico dalle ottime proprietà chimico-fisico e tecnologiche,⁸⁸ che consente di introdurre nella struttura del PHEA catene idrofobiche biodegradabili che conferiscono proprietà anfifiliche al copolimero risultante, e di polietilenglicole (PEG), scelto per le comprovate capacità di conferire proprietà *stealth* e mucopenetranti ai sistemi nanoparticellari che lo espongono in superficie, riducendo le interazioni con la mucina.^{90,92}

La sintesi del copolimero *graft* anfifilico PHEA-g-PLGA-g-PEG è stata effettuata in due step successivi come illustrato in **Figura 43**.

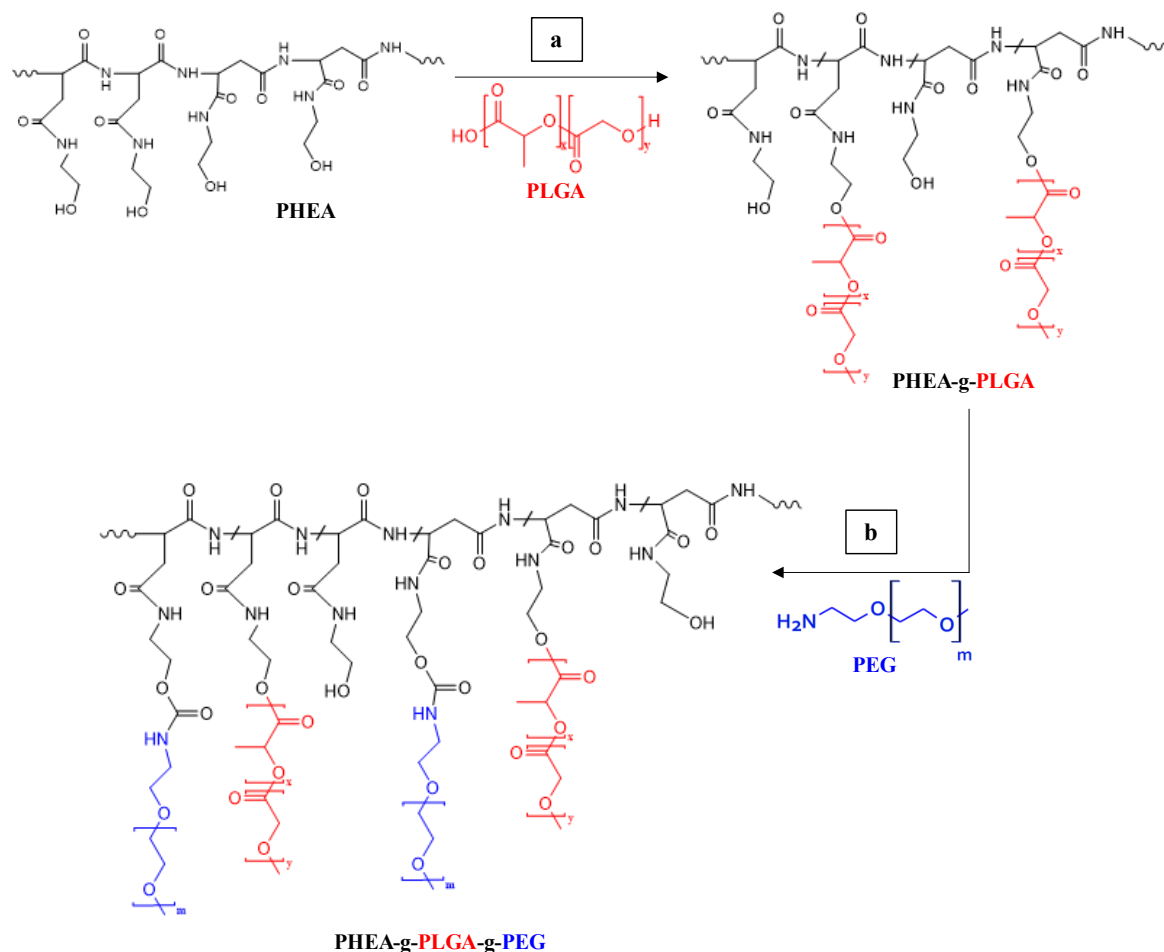


Figura 43. Schema di sintesi dei copolimeri *graft* a) PHEA-g-PLGA e b) PHEA-g-PLGA-g-PEG (x and $y = 92$; $m = 44$). Condizioni sperimentali: a) a-DMF, CDI, DEA 4 h a 40°C, 48 h a 40°C; b) a-DMA, DSC, TEA 4 h a 40°C, 18 h a 25°C.

Inizialmente è stata condotta la sintesi del copolimero *graft* PHEA-g-PLGA, per reazione di esterificazione di alcuni gruppi ossidrilici del PHEA con il gruppo carbossilico del PLGA. La reazione è stata condotta in dimetilformammide anidra (DMF-a), utilizzando il carbonildimidazolo (CDI) come attivante dei gruppi carbossilici del PLGA e la dietilammina (DEA) come catalizzatore della reazione. La procedura di sintesi e la struttura molecolare del copolimero PHEA-g-PLGA è riportata in **Figura 43 a**.

Come descritto nella parte sperimentale, le quantità di PLGA, CDI e DEA impiegate sono state calcolate rispettivamente secondo i seguenti rapporti molari $R_1 = 0,05$, $R_2 = 2$ e $R_3 = 5$.

La fase di attivazione dei gruppi carbossilici del PLGA è stata condotta a 40°C per 4 ore, al termine della quale la soluzione di PHEA è stata aggiunta a quella di PLGA attivata, lasciandoli reagire per 48 ore a 40 °C. Una volta ottenuto e purificato, il copolimero PHEA-g-PLGA è stato caratterizzato mediante analisi ^1H -NMR e SEC.

Il grado di derivatizzazione in moli % del PLGA (DD_{PLGA}) rispetto alle moli di unità ripetitive (U.R.) del copolimero PHEA-g-PLGA è stato calcolato dallo spettro ^1H -NMR registrato in DMF deuterata (**Figura 44**), rapportando l'integrale dei picchi compresi tra δ 1,5-1,7 (m, 3-HPLGA $[-\text{OCOCH}(\text{CH}_3)]_{92}$) relativi ai protoni del PLGA legato, all'integrale del picco δ 3,50 [t, 2-HPHEA $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$] relativo ai protoni del PHEA.

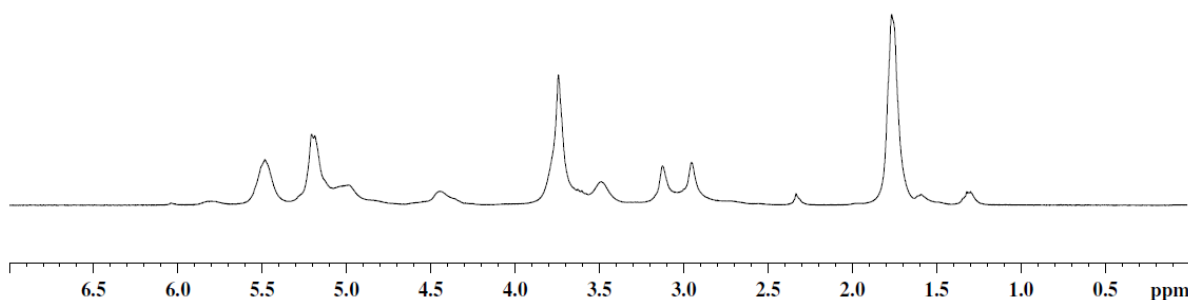


Figura 44. Spettro ^1H -NMR del copolimero *graft* PHEA-g-PLGA in DMF-d7.

Il DD_{PLGA} in moli % è stato espresso come valore medio di tre determinazioni ed è risultato pari a $3,6 \pm 0,6\%$ in moli. Tale valore indica che ogni 100 unità ripetitive di PHEA, in media tre sono funzionalizzate con il PLGA, e tale funzionalizzazione è sufficiente a rendere il copolimero insolubile in acqua quindi in grado di formare nanoparticelle. Il $\bar{M}_w$ del PHEA-g-PLGA è risultato pari a 124.000 Da con un indice di polidispersità ($\bar{M}_w/\bar{M}_n$) pari a 1,19.

Il secondo step di sintesi ha coinvolto la funzionalizzazione del PHEA-g-PLGA con il PEG allo scopo di ottenere il copolimero finale PHEA-g-PLGA-g-PEG. Quest'ultimo è stato preparato per reazione del PHEA-g-PLGA con il PEG in dimetilacetammide anidra (DMA-a), utilizzando

il disuccinimidilcarbonato (DSC) come attivante i gruppi ossidrilici del PHEA e la trietilammina (TEA) come catalizzatore della reazione.

La procedura di sintesi e la struttura molecolare del copolimero PHEA-g-PLGA-g-PEG sono riportate in **Figura 43 b**. Le quantità di PEG, DSC e TEA utilizzate sono definite dai seguenti rapporti $R_4 = 0,075$, $R_5 = 0,1$ e $R_6 = 1$, come descritto nella parte sperimentale. Il grado di derivatizzazione in moli % del PEG (DD_{PEG}) rispetto alle moli di unità ripetitive (U.R.) del copolimero PHEA-g-PLGA-g-PEG è stato calcolato dallo spettro ^1H -NMR registrato in DMF deuterata (**Figura 45**), rapportando l'integrale del picco a δ 3,7 ($4H_{PEG}$, $-[CH_2CH_2O]_{44}-$) relativi ai protoni del PEG legato, all'integrale del picco δ 3,5 (t, $2H_{PHEA}$ $-NHCH_2CH_2O-$) relativo ai protoni del PHEA.

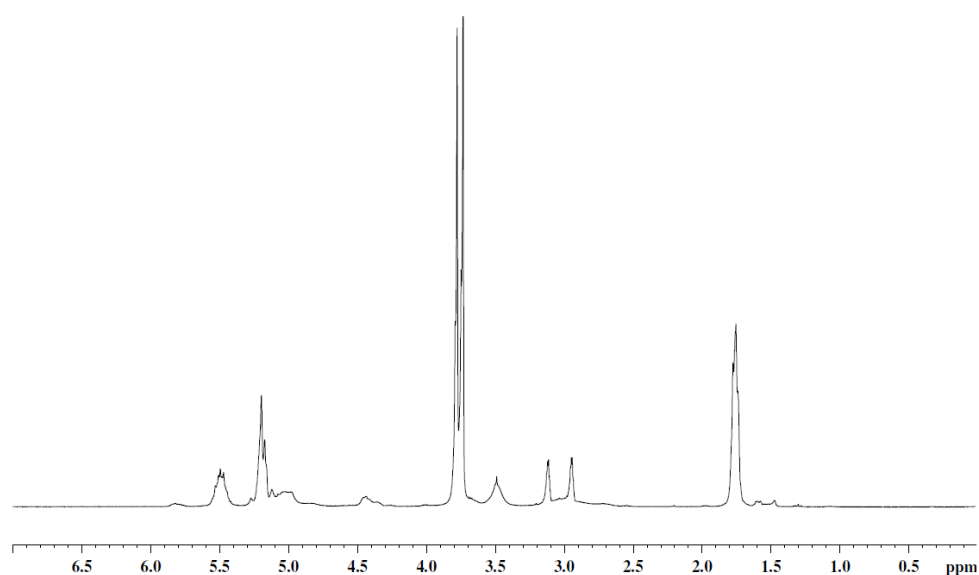


Figura 45. Spettro ^1H -NMR del copolimero *graft* PHEA-g-PLGA-g-PEG in DMF-d7.

Il DD_{PEG} in moli % è stato espresso come valore medio di tre determinazioni ed è risultato pari a $4,5 \pm 0,2\%$ in moli. Tale valore indica che ogni 100 unità ripetitive di PHEA, in media quattro

sono funzionalizzate con il PEG. Il $\bar{M}_w$ del PHEA-g-PLGA-g-PEG è risultato pari a 130.000 Da e l'indice di polidispersità ($\bar{M}_w/\bar{M}_n$) pari a 1,23.

Grazie all'innesto del PLGA nel *backbone* polimerico del PHEA, i copolimeri ottenuti sono risultati insolubili in mezzi acquosi e solubili in solventi organici, come acetone e diclorometano (DCM), risultando quindi materiali adatti alla produzione di nanoparticelle mediante nanoprecipitazione.

3.2.2. Preparazione e caratterizzazione delle nanoparticelle polimeriche

Considerato un potenziale impiego dell'Iloprost come farmaco antinfiammatorio nel trattamento della FC e la necessità di migliorare la biodisponibilità polmonare del farmaco dopo l'inalazione, sono state preparate delle nanoparticelle polimeriche peghilate contenenti l'Iloprost (NP_PEG+Ilo) per nanoprecipitazione diretta. Tale metodo prevede il gocciolamento di una soluzione organica di polimero, ottenuta solubilizzando una certa quantità di polimero in un solvente organico (fase interna) miscibile all'acqua, in un grande eccesso di "non solvente" (fase esterna). La rapida diffusione del solvente organico nell'acqua consente la formazione di nanoparticelle.¹²⁶

Esperimenti preliminari hanno dimostrato che una concentrazione di copolimero PHEA-g-PLGA-g-PEG in acetone pari a 2,0 p/v%, e un rapporto di fasi tra la fase interna organica e quella esterna acquosa pari a 1/4 sono i valori di partenza ottimali al fine di ottenere particelle nell'intervallo nanometrico e poco polidisperse.

Essendo lipofilo, l'Iloprost è stato solubilizzato nella stessa dispersione organica del copolimero ed è stato incorporato con successo durante la formazione delle nanoparticelle.

Per valutare l'effetto della presenza del farmaco sulla formazione dei nanosistemi, sono state preparate anche delle nanoparticelle polimeriche peghilate vuote (NP_PEG). Inoltre, nanoparticelle vuote e caricate con Iloprost (NP e NP+Ilo, rispettivamente), da utilizzare come

campioni di controllo non peghilati, sono state ottenute a partire dal copolimero *graft* PHEA-g-PLGA.

Allo scopo di determinare le proprietà chimico-fisiche dei sistemi nanoparticellari ottenuti, essi sono stati caratterizzati in termini di dimensioni medie, espresse come *Z-Average*, indice di polidispersità (PDI), potenziale ζ in acqua, quantità di farmaco caricata, espressa come *drug loading* (DL%), ed efficienza di incapsulamento (EE%). I risultati sono riportati nella **Tabella 9**.

Tabella 9. Valori di dimensione media, PDI, potenziale ζ , DL% e EE% di tutti i campioni ottenuti. Dati riportati come media di 3 esperimenti differenti.

	Z-average (nm $\pm$ S.D.)	PDI $\pm$ S.D.	ζ Potential (mV $\pm$ S.D.)	DL% (wt% $\pm$ S.D.)	EE% (wt% $\pm$ S.D.)
NP	187,6 $\pm$ 3,2	0,22 $\pm$ 0,01	-18,3 $\pm$ 3,6	-	-
NP_PEG	129,3 $\pm$ 1,8	0,20 $\pm$ 0,02	-20,8 $\pm$ 6,7	-	-
NP+Ilo	195,6 $\pm$ 1,2	0,26 $\pm$ 0,03	-23,1 $\pm$ 4,5	0,15 $\pm$ 0,04	75,0 $\pm$ 2,5
NP_PEG+Ilo	140,3 $\pm$ 4,2	0,23 $\pm$ 0,02	-21,5 $\pm$ 5,6	0,13 $\pm$ 0,02	65,0 $\pm$ 1,2

Nelle condizioni sperimentali scelte, è stato possibile ottenere delle nanoparticelle vuote con una dimensione media, compresa tra 129-187 nm, influenzata dal farmaco intrappolato, in quanto, in presenza di Iloprost, la dimensione media aumenta fino ai 140-195 nm. Inoltre, le nanoparticelle ottenute a partire dal copolimero peghilato hanno mostrato dimensioni più piccole e una polidispersità più bassa.

La **Tabella 9** mostra anche i valori del potenziale ζ , che sono risultati negativi e paragonabili per tutti i campioni ottenuti.

La quantità di Iloprost incorporata, determinata mediante analisi HPLC come riportato nella parte sperimentale, ed espressa come DL% è risultata paragonabile per i campioni NP+Ilo e

NP_PEG+Ilo, essendo sia i valori di DL% che di EE% non significativamente differenti ($p > 0,05$).

Allo scopo di valutare la cinetica di rilascio del farmaco dai sistemi nanoparticellari peghilati e di garantire un rilascio prolungato dell'Iloprost, è stato effettuato uno studio di rilascio in una miscela PBS (pH 7,4)/etanolo (90/10, v/v) in condizioni sink, seguendo la procedura riportata nella parte sperimentale. I dati ottenuti sono riportati nella **Figura 46**. Come controllo è stata valutata anche la cinetica di rilascio del farmaco dalle NP+Ilo.

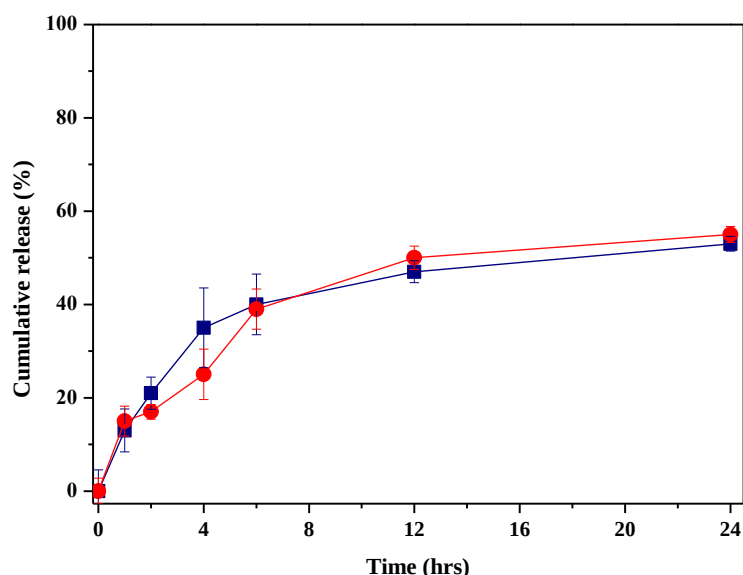


Figura 46. Percentuale di Iloprost rilasciata dalle NP_PEG+Ilo (blu) and NP+Ilo (rosso). Dati riportati come media di 3 analisi differenti.

Nelle condizioni sperimentali scelte, le NP_PEG+Ilo rilasciano il farmaco in maniera controllata senza mostrare alcun *burst effect* e raggiungendo circa il 55% in peso della quantità totale entro le 24 ore. Non sono state riscontrate differenze significative tra i campioni NP_PEG+Ilo e NP+Ilo.

Pertanto, le nanoparticelle ottenute sono comparabili tra loro, sia in termini di quantità di farmaco intrappolato che capacità di rilasciarlo in un mezzo fisiologico simulato.

La peghilazione del copolimero di partenza, utilizzata per ottenere le NP_PEG, ha lo scopo di ottenere sistemi con catene di PEG esposte in superficie, con interazioni mucoadesive basse o assenti, le quali potrebbero ostacolare la penetrazione delle particelle attraverso lo strato mucoso.^{91,92}

Pertanto, al fine di valutare la presenza del PEG sulla superficie delle nanoparticelle ottenute, è stata investigata la composizione chimica superficiale delle NP_PEG, utilizzando NP come campione di controllo, attraverso la spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS). Le curve di *fitting* dei picchi fotoelettronici di C 1s dei campioni NP e NP_PEG sono riportate in **Figura 47**.

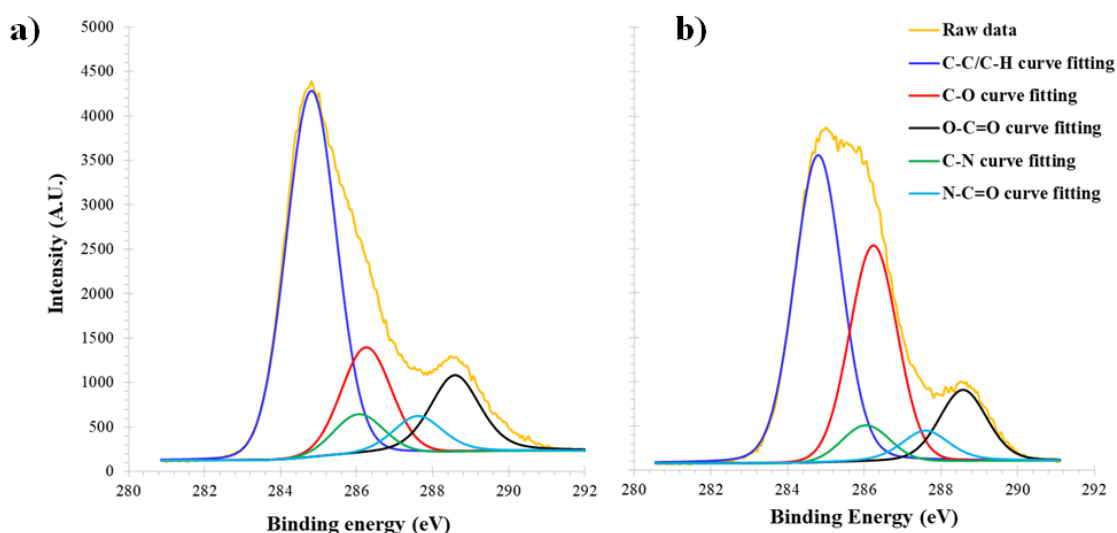


Figura 47. Curve di *fitting* dello spettro C 1s di a) NP e b) NP_PEG.

Come si evince dai dati ottenuti, l'energia di legame (BE) a 286,0-286,4 eV, attribuita ai legami C-O-C appartenenti alle catene di PEG (in rosso nello spettro), è significativamente più alta per le NP_PEG, se confrontata con quella del campione non peghilato, suggerendo pertanto la

presenza di alcune catene di PEG esposte sulla superficie delle NP_PEG.^{95,160,161}

A sostegno di ciò, è stata determinata anche la densità di peghilazione superficiale delle NP_PEG utilizzando un metodo ¹H-NMR riportato in letteratura. Le NP sono state analizzate come campione di controllo.

Tale metodo si basa sull'evidenza che il PEG, presente all'interno dei sistemi particellari, non viene visualizzato nello spettro ¹H-NMR, a differenza di quello presente in superficie che, essendo a contatto con il mezzo disperdente può essere determinato e quantificato.

In particolare, confrontando gli integrali del picco del PEG nello spettro di una dispersione acquosa di NP_PEG con una curva di calibrazione del PEG (concentrazioni comprese tra 0,5-2 mg/ml), registrata in D₂O utilizzando la RhB come standard interno, la peghilazione superficiale è risultata pari a 0,000615 mmol/100 mg di NP_PEG, corrispondente a circa il 40 p/p% della quantità totale di PEG innestato nel PHEA-g-PLGA-g-PEG incorporato nel NP_PEG.

Tenendo conto del fatto che tutte le catene di PEG in superficie siano di 2 kDa, è stata calcolata la densità di peghilazione superficiale (Γ), come il numero di catene PEG per 100 nm² di superficie particellare sulle NP_PEG, attraverso l'impiego di un sistema di calcolo riportato in letteratura e descritto in dettaglio nel paragrafo 4.2.3.5 della parte sperimentale, che è risultato essere pari a 35.¹⁶²

Per essere esposte e fungere da direzionante, però, le catene di PEG devono avere una conformazione estesa, tale da rendere i sistemi mucopenetranti.

Pertanto, al fine di valutare la conformazione delle catene di PEG sulla superficie delle NP_PEG è stato utilizzato il parametro Γ^* , il quale indica il numero di molecole di PEG che possono ricoprire 100 nm² di superficie nanoparticellare, calcolato mediante un'equazione riportata in letteratura e descritta nel paragrafo 4.2.3.5 della parte sperimentale.¹⁶² Tale parametro, per il PEG con un $\bar{M}_w = 2000$ Da, è risultato pari a 11,025.

Il rapporto Γ/Γ^* è un indice della densità superficiale di peghilazione della superficie e da questo si può desumere la conformazione delle catene di PEG sulla superficie nanoparticellare; infatti, valori di $\Gamma/\Gamma^* < 1$ indicano una bassa densità superficiale di peghilazione che comporta una conformazione *mushroom-like*; invece, valori di $\Gamma/\Gamma^* > 1$ indicano un'alta densità superficiale di peghilazione che comporta una conformazione *brush-like* delle catene di PEG. In generale, affinché i sistemi nanoparticellari abbiano proprietà mucopenetranti, è necessaria la conformazione *brush-like* che somiglia a lunghe e sottili setole.

Infatti, sistemi nanoparticellari descritti in letteratura con un'alta densità di peghilazione superficiale hanno la capacità di diffondere attraverso il muco, al contrario, le nanoparticelle con una bassa densità di peghilazione superficiale, che comporta una conformazione *mushroom-like* delle catene di PEG mostrano dei tempi di residenza nel muco maggiori rispetto alle prime.^{92,162}

Per il campione NP_PEG, si è ottenuto un rapporto Γ/Γ^* pari a 3,17, sinonimo dunque di un'elevata densità superficiale di peghilazione e una conformazione *brush-like* delle catene di PEG.

Altri nanosistemi polimerici, con caratteristiche simili ai nostri in termini di dimensioni, potenziale zeta, densità di PEG superficiale e conformazione della catena di PEG, hanno già mostrato un'elevata capacità di penetrare negli strati di muco.^{95,129,145}

Allo scopo di valutare se la peghilazione superficiale ottenuta fosse in grado di ridurre, effettivamente, le interazioni con la mucina, presente nel muco polmonare, è stata eseguita un'analisi turbidimetrica.

Il test turbidimetrico è un'analisi facile e comune per valutare l'interazione tra macromolecole, considerando che il verificarsi di interazioni nanoparticelle-mucina porta alla formazione di disomogeneità microscopiche, che a loro volta causano una riduzione della trasmittanza nel tempo.¹⁶³

In particolare, la torbidità delle dispersioni acquose mucina/NP_PEG è stata misurata mediante analisi UV per 6 ore e confrontata con quella di una dispersione mucina/chitosano come controllo positivo. Inoltre, come confronto, la stessa analisi è stata condotta anche sulle NP e su nanoparticelle ottenute da solo PLGA. I dati ottenuti sono riportati nella **Figura 48** come valori di trasmittanza a 500 nm in funzione del tempo di incubazione.

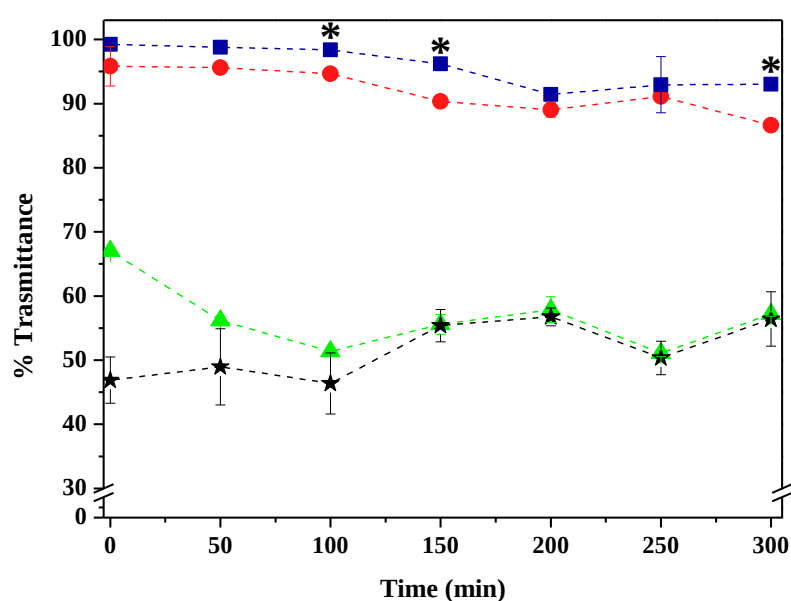


Figura 48. Trasmittanza a 500 nm di dispersioni contenenti la mucina in presenza di NP_PEG (blu), NP (rosso), nanoparticelle solo di PLGA (verde), e chitosano (nero). Dati riportati come media di 3 analisi differenti.

Come si può notare, sia le NP_PEG che le NP non mostrano alcuna interazione con la mucina, come evidenziato dagli elevati valori di trasmittanza durante tutto l'esperimento. Tuttavia, le particelle non peghilate hanno mostrato valori di trasmittanza significativamente più bassi rispetto alle NP_PEG dopo 2 ore di incubazione. Il chitosano, invece, porta a una diminuzione significativa della trasmittanza, al di sotto del 60%, dopo 6 ore di incubazione.

È interessante inoltre osservare come la trasmittanza delle nanoparticelle ottenute solo dal

PLGA diminuisca fino a seguire lo stesso andamento del chitosano dopo circa 2 ore di incubazione, suggerendo una forte mucoadesione del campione conferita dalla natura idrofobica del PLGA.

3.2.3. Formulazione *Nano into Micro* (NiM)

Sulla base dei risultati ottenuti finora, le NP_PEG mostrano delle caratteristiche chimico-fisiche favorevoli per un loro possibile utilizzo come carrier di farmaci al polmone, quali dimensioni medie inferiori a 200 nm, potenziale ζ negativo, elevato grado di peghilazione superficiale e conformazione *brush-like* delle catene di PEG esposte in superficie, la quale limita fortemente le interazioni con la mucina, conferendo quindi potenziali proprietà mucodiffusive.

Tuttavia, è stato già ampiamente dimostrato che le dimensioni colloidali non consentono l'inalazione diretta delle nanoparticelle tal quali come polvere.

Pertanto, allo scopo di ottenere una formulazione adatta alla somministrazione polmonare, le nanoparticelle sono state incorporate all'interno di microparticelle inalabili utilizzando la strategia *Nano in Micro* (NiM).

L'idea che sta alla base di tale strategia è quella di sfruttare microparticelle, con proprietà di aerosolizzazione adatte alla somministrazione polmonare come polvere in grado di raggiungere i polmoni profondi, come veicolo per i sistemi colloidali.¹⁵⁶

Nel caso di particelle NiM costituite da un eccipiente solubile nel fluido polmonare, queste possono dissolversi rilasciando le nanoparticelle in esse incapsulate nel sito di deposizione, dove possono diffondere attraverso la barriera mucosa in funzione delle loro proprietà.

In questo lavoro, le particelle NiM sono state prodotte mediante tecnica dello *spray-drying* a partire da una dispersione acquosa di NP, NP_PEG, NP+Ilo e NP_PEG+Ilo contenente mannitolo (4% p/v) come eccipiente formante la matrice, con un rapporto di peso pari a 1:8 tra

nanoparticelle e mannitolo. Le condizioni operative del processo sono descritte nel dettaglio nella parte sperimentale.

Il mannitolo è un agente iperosmotico muco attivo già approvato dalla *Food and Drug Administration* (FDA) come formulazione in polvere secca per la terapia aggiuntiva nei pazienti con FC (Bronchitol[®]). Grazie al suo effetto osmotico, il mannitolo modifica le proprietà viscoelastiche del muco, aumentando la clearance mucociliare.^{134,164}

Le particelle NiM contenenti NP, NP_PEG, NP+Ilo e NP_PEG+Ilo sono state denominate rispettivamente NiM_NP, NiM_NP_PEG, NiM_NP+Ilo e NiM_NP_PEG+Ilo.

Tutti i campioni sono stati caratterizzati mediante microscopia elettronica a scansione (SEM) al fine di investigarne la forma e le dimensioni; le immagini rappresentative sono riportate nella

Figura 49.

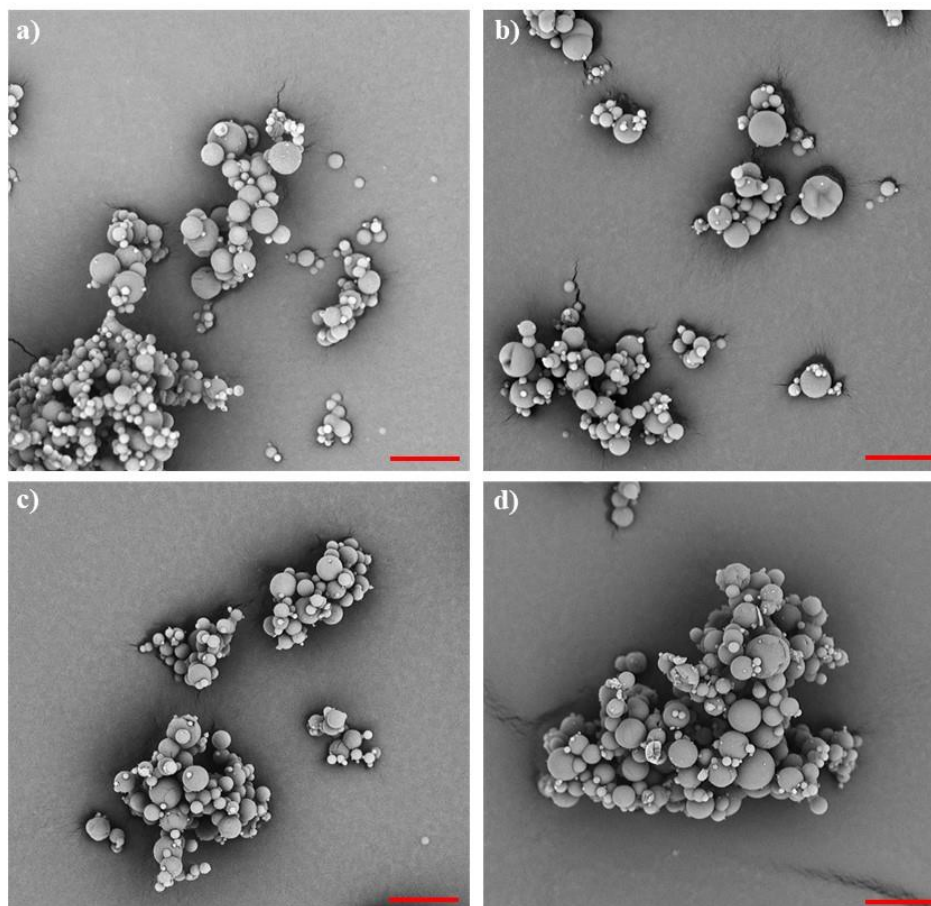


Figura 49. Immagini SEM di a) NiM_NP, b) NiM_NP_PEG, c) NiM_NP+Ilo and d) NiM_NP_PEG+Ilo. La barra rappresenta 10 μm (Ingrandimento 4000x).

Tutte le microparticelle, ottenute con una resa superiore al 40% p/p rispetto alla quantità iniziale dei materiali utilizzati, non hanno mostrato differenze morfologiche significative, avendo una forma sferica e un diametro medio compreso tra 2 e 3 μm (calcolato dalle immagini SEM con l'ausilio del *software ImageJ* e riportato nella **Tabella 10**), e quindi dimensionalmente e morfologicamente adatte per una deposizione polmonare ottimale.

La ridispersibilità delle nanoparticelle dalle particelle NiM è stata valutata disperdendo una certa quantità di polvere secca in acqua. La dispersione di nanoparticelle ottenuta è stata poi caratterizzata in termini di dimensione media, PDI, e DL% (**Tabella 10**).

Tabella 10. Principali caratteristiche delle particelle NiM ottenute tramite *spray-drying*, come polvere secca e dopo ridispersione in acqua. Dati riportati come media di tre esperimenti differenti.

	Come polvere secca			Dopo ridispersione in acqua	
	Diametro medio ($\mu\text{m} \pm \text{S.D.}$)	Resa % (p/p $\pm$ S.D.)	DL% (p/p $\pm$ S.D.)	Z-average (nm $\pm$ S.D.)	PDI (nm $\pm$ S.D.)
NiM_NP	$2,23 \pm 0,81$	$42 \pm 1,3$	-	$194,2 \pm 2,6$	$0,24 \pm 0,2$
NiM_NP_PEG	$2,34 \pm 0,82$	$60 \pm 1,6$	-	$137,1 \pm 1,7$	$0,28 \pm 0,3$
NiM_NP+Ilo	$2,50 \pm 0,64$	$46 \pm 2,1$	$0,012 \pm 0,01$	$203,8 \pm 1,0$	$0,25 \pm 0,1$
NiM_NP_PEG+Ilo	$2,86 \pm 0,47$	$67 \pm 1,2$	$0,010 \pm 0,02$	$148,8 \pm 1,2$	$0,29 \pm 0,1$

I dati ottenuti hanno dimostrato che la formulazione in polvere, a contatto con un mezzo acquoso, è in grado di dissolversi e liberare le nanoparticelle; quest'ultime mostrano valori di dimensione media e polidispersità paragonabili a quelli riportati in **Tabella 9**, dimostrando che il processo di *spray-drying* non altera le proprietà tecnologiche delle particelle.

Inoltre, è stato anche quantificato il contenuto di Iloprost nelle particelle NiM, al fine di valutare se il processo di formazione delle microparticelle influisce sulla stabilità del farmaco e quindi sulla quantità di farmaco. A questo proposito, sulla base dei valori di DL% ottenuti, è stata riscontrata una perdita del 25-28% del farmaco, probabilmente dovuta alla sua ben nota instabilità alle alte temperature, dovute al processo di *spray-drying*.^{165,166}

Nei pazienti affetti da FC, l'espressione difettosa del canale CFTR porta a una sovrapproduzione di muco nelle vie aeree che, insieme alla sua composizione alterata e alle sue proprietà reologiche anomale, determina una ridotta permeabilità di farmaci e particelle.¹⁶⁷

Sulla base di queste considerazioni, la somministrazione di farmaci ai polmoni nella FC

potrebbe essere migliorata ingegnerizzando le particelle al fine di conferire loro proprietà mucopenetranti.

Pertanto, al fine di valutare la capacità di tutti i campioni ottenuti di interagire con tutti i componenti del muco FC, è stato condotto uno studio reologico utilizzando un modello di muco artificiale FC (CF-AM), preparato secondo procedura riportata in letteratura e descritta nel paragrafo 4.2.4.1 della parte sperimentale.⁹⁵

Questo muco mostra un comportamento reologico tipico dei fluidi pseudoplastici, con una riduzione della viscosità in seguito all'aumento dello sforzo di taglio simile a quella osservata nell'espettorato intero dei pazienti FC.¹⁶⁸

È stata quindi determinata la viscosità complessa (η^*) del CF-AM da solo o trattato con tutti i campioni prodotti mediante un reometro rotazionale e i risultati ottenuti sono riportati nella

Figura 50.

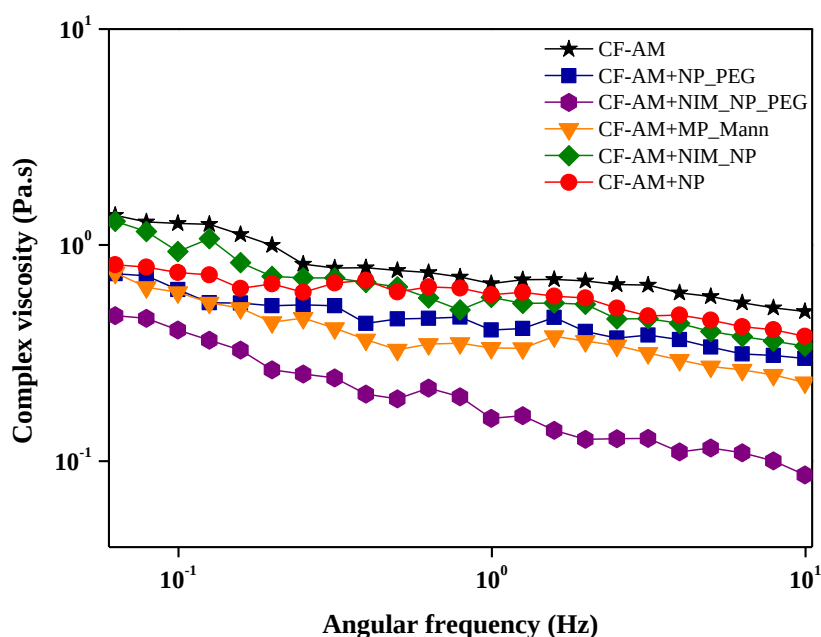


Figura 50. Viscosità complessa (η^*) di: CF-AM non trattato (nero) e trattato con NP (rosso), NP_PEG (blu), NiM_NP (verde), NiM_NP_PEG (viola), e MP_Mann (arancione).

Come mostrato, tutti i campioni sono in grado di ridurre la viscosità complessa del CF-AM rispetto a quello non trattato, in particolare NiM_NP_PEG è in grado di ridurla significativamente.

Questo comportamento può essere associato sia all'elevato grado di peghilaione superficiale delle nostre nanoparticelle intrappolate, sia alla ben nota capacità del mannitolo di interagire con le mucine, con conseguente aumento della macroporosità della rete muco-polimerica. Inoltre, a parità di sforzo di taglio applicato, la viscosità complessa del CF-AM trattato con NiM_NP non è significativamente diversa rispetto a quello non trattato.

Quindi, se da un lato l'analisi turbidimetrica ha mostrato che le NP sembrano comportarsi in modo abbastanza simile alle NP_PEG nel non interagire con la mucina se confrontate con le nanoparticelle basate su altri materiali (PLGA, chitosano), dall'altro la misura reologica evidenzia ancor di più le differenze dovute alla presenza di PEG sulla superficie delle nanoparticelle.

Possiamo quindi concludere che sia l'uso del copolimero *graft* PHEA-g-PLGA-PEG per ottenere nanoparticelle polimeriche peghilate, sia la scelta del mannitolo come matrice formante le particelle NiM si sono rivelate delle ottime strategie per aumentare la capacità di mucopenetrazione dei nostri sistemi.

3.2.3.1. Caratterizzazione biologica

Considerando le potenzialità del campione NP_PEG+Ilo come strumento terapeutico per il trattamento dell'iper-infiammazione nelle cellule epiteliali di pazienti affetti da FC, con la collaborazione dell'Università di Foggia, sono stati effettuati test in vitro su cellule epiteliali bronchiali di fibrosi cistica (CFBE) che sovraesprimono in modo stabile F508del CFTR (CFBE-F508del), scelte come modello della mutazione più comune nella patologia.

In primo luogo, è stata valutata la citocompatibilità delle formulazioni NiM dopo 24 ore di incubazione, utilizzando un saggio MTT.

Il trattamento delle cellule CFBE-F508del con tutte le formulazioni NiM, vuote o contenenti Iloprost, non ha provocato riduzioni significative della vitalità a tutte le concentrazioni testate, come mostrato in **Figura 36**. Anche le MP_Mann non hanno mostrato effetti citotossici.

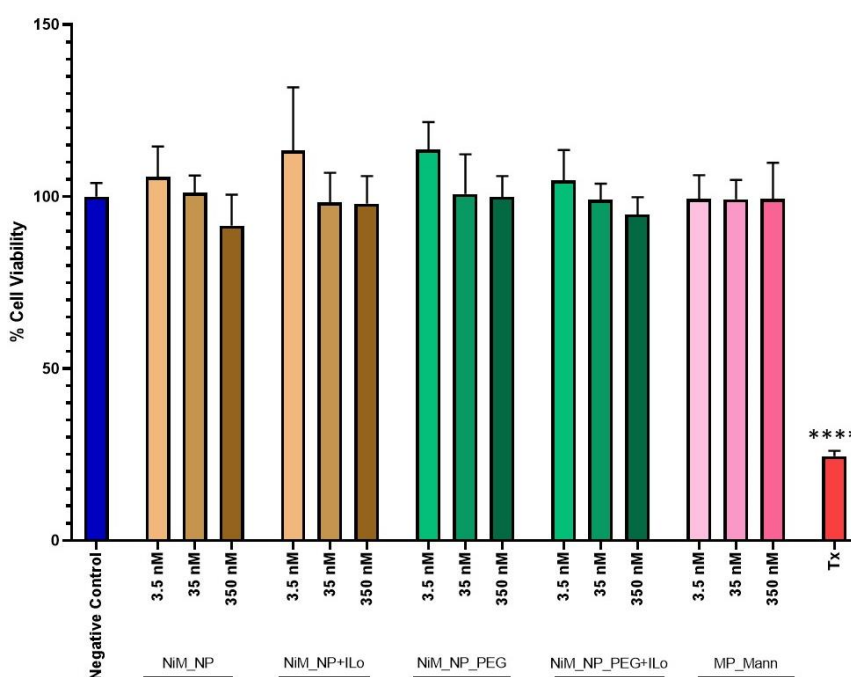


Figura 36. Citotossicità delle formulazioni NiM. Le cellule CFBE-F508del sono state trattate per 24 ore con i campioni NiM_NP+Ilo and NiM_NP_PEG+Ilo alle concentrazioni di Iloprost indicate (in nM). Le particelle NiM vuote sono state utilizzate alla stessa concentrazione delle NiM con Iloprost. Le cellule non trattate rappresentano il 100 % di vitalità, mentre il Triton X-100 1% (Tx) è stato utilizzato come controllo positivo. Dati riportati come la media di due differenti esperimenti (****p<0,0001 rispetto alle cellule non trattate)

Sulle cellule CFBE-F508del è stata inoltre studiata l'espressione genica di citochine pro-infiammatorie, quali le citochine infiammatorie primarie (IL-1 β , TNF α , IL-6) e la chemochina dei neutrofili (IL-8), in seguito al trattamento l'Iloprost.

In particolare, è stata dapprima stimolata l'espressione genica delle citochine pro-infiammatorie con l'utilizzo dell'LPS di *P. aeruginosa*, uno dei patogeni più comuni presenti nelle vie aeree della FC.

In primo luogo, è stato valutato l'effetto antinfiammatorio dell'Iloprost libero (**Figura 51**), trattando le cellule CFBE-F508del con con 10 µg/mL LPS +/- 35 or 350 nM di Iloprost per 4 ore. In seguito, l'RNA codificante per IL-1β, TNFα, IL-6 and IL-8 è stato estratto dalle cellule trattate e quantificato mediante qRT-PCR.¹⁶⁹

Dai risultati ottenuti, si evince una diminuzione dose-dipendente dell'espressione degli mRNA di IL-1β, TNFα, IL-6 e IL-8, con una differenza più lieve tra le concentrazioni di 35 e 350 nM per TNFα. In questi esperimenti, la concentrazione di 3,5 nM non è stata testata poiché non ha dato un effetto significativo sulla secrezione di IL-6 e IL-8.

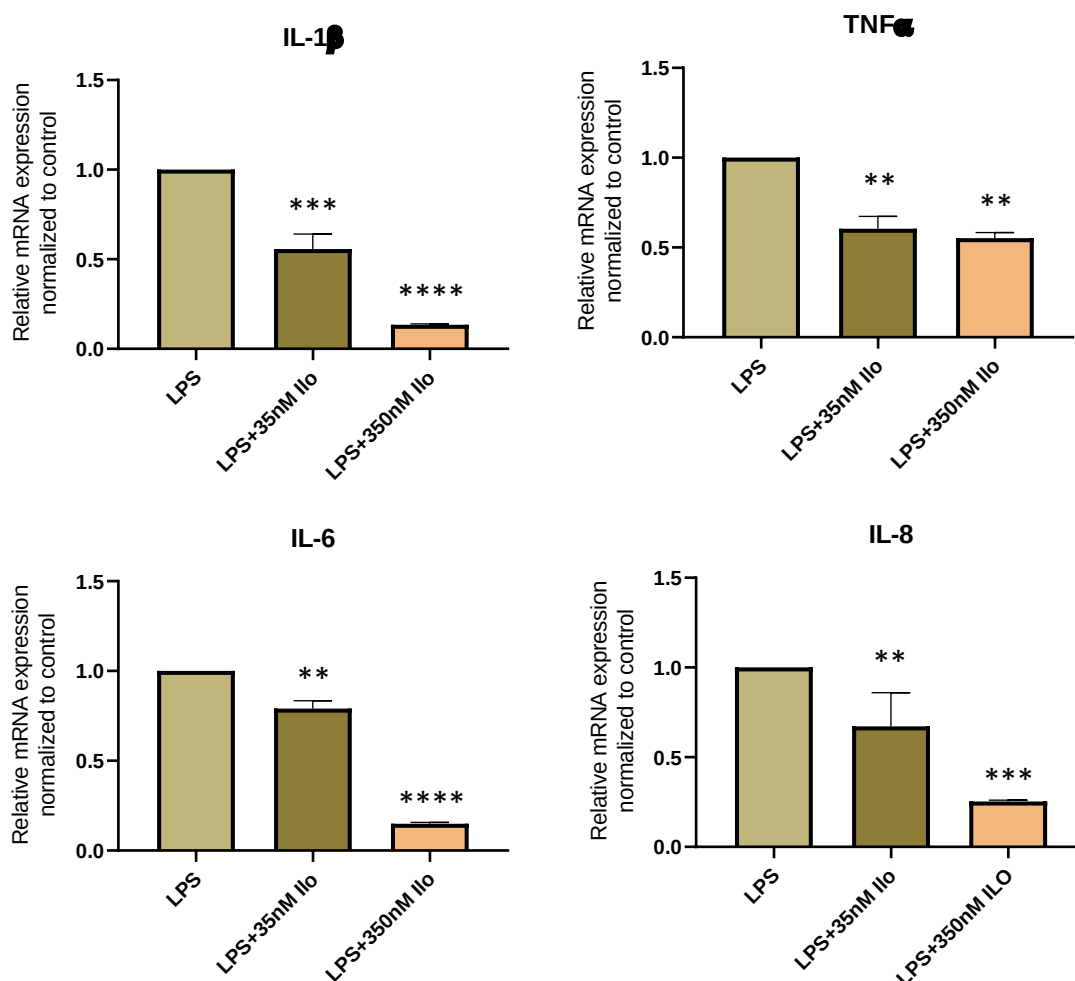


Figura 51. Effetto dell'Iloprost libero sull'espressione genica delle citochine. Dati riportati come la media di due differenti esperimenti. (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; and **** $p < 0,0001$ rispetto alle cellule trattate solo con LPS).

Seguendo la stessa procedura, è stato valutato l'effetto antinfiammatorio dell'Iloprost quando intrappolato nelle formulazioni NiM. Tutte le particelle NiM sono state testate e i risultati ottenuti sono riportati in **Figura 52**.

In particolare, sia le NiM_NP+Ilo che le NM_NP_PEG+Ilo sono stati significativamente efficaci nel ridurre l'espressione genica delle citochine a 350 nM. Come previsto, i campioni vuoti, NiM_NP e NiM-NP-PEG, non sono stati associati a tale effetto.

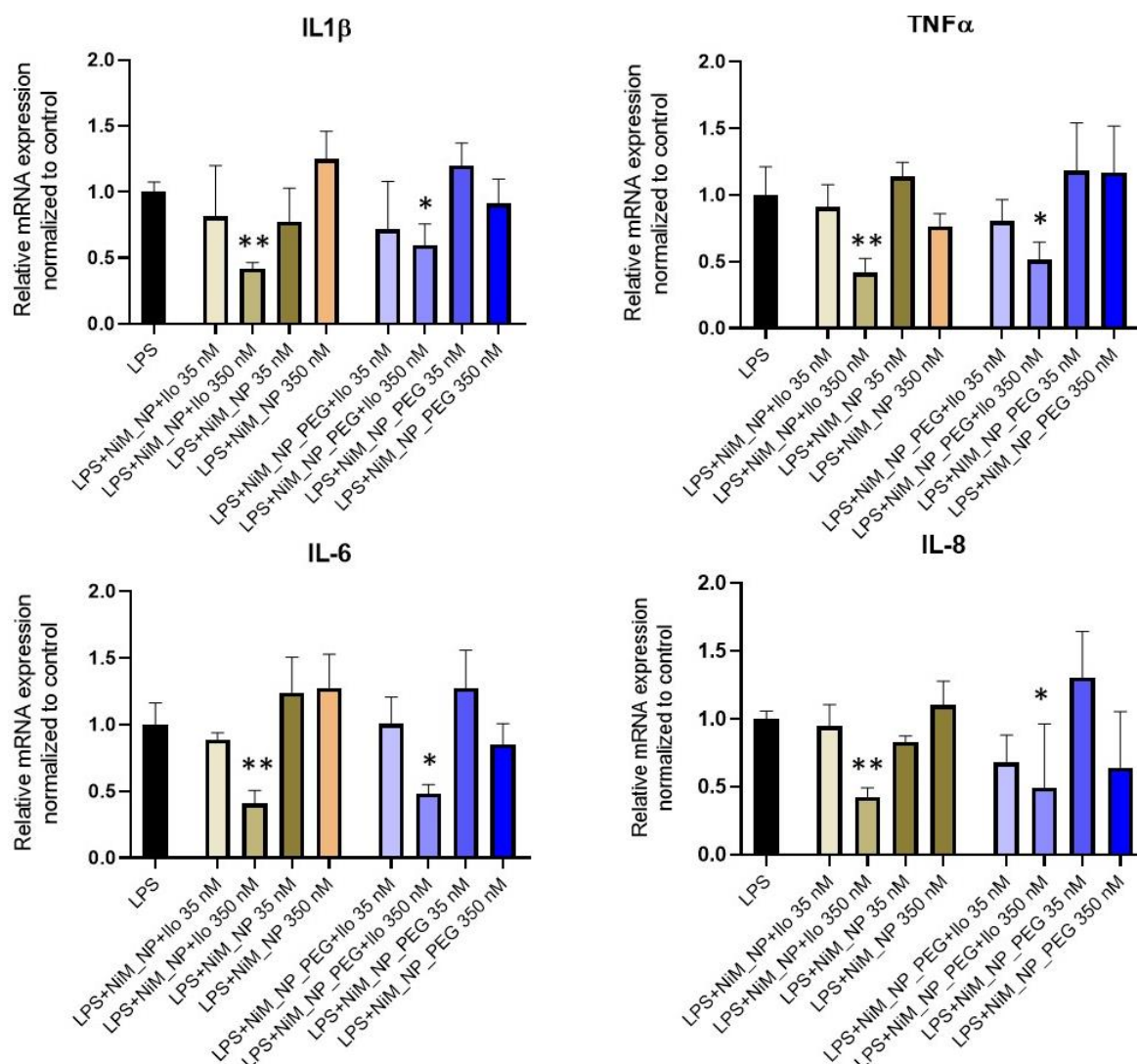


Figura 52. Effetto delle formulazioni NiM sull'espressione genica delle citochine. Dati riportati come la media di due differenti esperimenti (* $p < 0,05$ and ** $p < 0,01$ rispetto alle cellule trattate solo con LPS).

Pertanto, gli studi in vitro hanno evidenziato che, dopo la dissoluzione della matrice di mannitolo, le nanoparticelle peghilate incorporate nelle particelle NiM sono in grado di ridurre l'espressione genica delle citochine nelle cellule CFBE-F508del.

Considerando anche i dati ottenuti dalla caratterizzazione reologica, possiamo quindi concludere che la formulazione NiM_NP_PEG+Ilo rappresenta un ottimo candidato per la veicolazione inalatoria dell'Iloprost per la gestione dell'iper-infiammazione associata alla FC.

3.2.4. Conclusioni

In questo lavoro, è stata sviluppata e caratterizzata una formulazione innovativa del tipo *Nano into Micro* (NiM) per la veicolazione inalatoria dell'Iloprost, un analogo stabile della prostaciclina, proposta come potenziale strumento terapeutico per la gestione dell'iper-infiammazione associata alla fibrosi cistica (FC).

In particolare, le NiM sono state realizzate a partire da nanoparticelle polimeriche peghilate, aventi proprietà mucopenetranti, caricate con Iloprost (NP_PEG+Ilo) incorporate in matrici micrometriche di mannitolo.

In particolare, le NP_PEG+Ilo sono state preparate per co-nanoprecipitazione del farmaco e del copolimero PHEA-g-PLGA-g-PEG, sintetizzato passo dopo passo a partire dal PHEA mediante successive reazioni di funzionalizzazioni del *backbone* polimerico del PHEA con (PLGA) e il (PEG).

La caratterizzazione chimico-fisica del campione ottenuto ha mostrato dimensioni nell'intervallo nanometrico (~140 nm), elevata uniformità dimensionale e potenziale ζ negativo. Inoltre, le NP_PEG+Ilo, una volta ridisperse in un mezzo fisiologico, sono state in grado di rilasciare il farmaco intrappolato in modo controllato, senza mostrare *burst effect*.

L'analisi superficiale XPS e la determinazione della densità di peghilazione superficiale hanno dimostrato che la superficie delle NP_PEG risulta rivestita da una corona di PEG *brush-like*, in grado di conferire loro un grande potenziale di diffusione attraverso lo strato di muco.

A supporto di ciò, l'analisi turbidimetrica ha dimostrato l'assenza di interazioni mucoadesive con la mucina.

Per rendere questi nanosistemi inalabili, sono state prodotte delle microparticelle a base di mannitolo contenenti NP_PEG+Ilo mediante *spray-drying*, con forma e dimensioni adatte all'inalazione come polvere secca.

Grazie alla peghilazione superficiale del campione di nanoparticelle e al mannitolo, è stato

anche possibile modificare le proprietà reologiche del muco artificiale di FC (CF-AM), riducendone la viscosità e potenzialmente facilitando la diffusione delle nanoparticelle attraverso di esso.

Infine, la buona citocompatibilità e la capacità dell'Iloprost caricato nel campione NiM_NP_PEG+Ilo di ridurre in larga misura l'espressione dei geni delle citochine pro-infiammatorie (IL-1 β , TNF α , IL-6) e delle chemochine neutrofile (IL-8) in cellule CFBE che sovraesprimono in modo stabile la F508del CFTR (CFBE-F508del) evidenziano il potenziale della formulazione ottenuta come vettore per la somministrazione inalatoria dell'Iloprost per la terapia antinfiammatoria in pazienti con FC.

3.3. Sviluppo di sistemi ibridi lipide-polimero per la somministrazione inalatoria di Roflumilast per il trattamento della BPCO

Gli inibitori delle fosfodiesterasi 4 rappresentano una classe di farmaci antiinfiammatori molto promettente per il trattamento della (BPCO).

Le fosfodiesterasi 4 (PDE-4) sono degli enzimi con azione degradatrice sull'cAMP in grado di modulare la risposta infiammatoria, predominanti nella maggior parte delle cellule immunitarie coinvolte nella patogenesi della BPCO.³⁴

Il Roflumilast è l'unico farmaco di questa classe approvato dall'Agenzia Europea dei Medicinali (EMA). Tuttavia la sua somministrazione per os causa numerosi effetti avversi sistemici che potrebbero essere ridotti mediante una somministrazione locale.^{135,170}

Pertanto, allo scopo di ridurre gli effetti avversi e ottenere un rilascio sito-specifico del Roflumilast, direzionandolo ai macrofagi alveolari, in questo lavoro è stata realizzata una formulazione inalatoria a base di sistemi nanostrutturati ibridi polimero-lipide contenenti il Roflumilast. Questi una volta somministrati sottoforma microparticellare, dovranno veicolare il farmaco attraverso lo strato mucoso, e pertanto dovranno possedere proprietà muco diffusive, fino ai macrofagi alveolari.

3.3.1. Sintesi e caratterizzazione del copolimero PHEA-g-RhB-g-Succ-PCL

Per la realizzazione dei nanosistemi ibridi è stato utilizzato un copolimero graft biocompatibile e biodegradabile, sintetizzato a partire dall' α,β -poli(N-2-idrossietil)-DL-aspartammide (PHEA).

In particolare, sul *backbone* polimerico del PHEA sono state legate covalentemente opportune quantità di RhB, per rendere fluorescenti i derivati risultanti, e un derivato succinato del policaprolattone, il PCL-Succ, al fine di ottenere un copolimero anfifilico, il PHEA-g-RhB-g-

Succ-PCL, altamente processabile e utile per ottenere nanoparticelle polimeriche per nanoprecipitazione.^{139,171}

La sintesi del copolimero *graft* anfifilico PHEA-g-RhB-g-Succ-PCL è stata effettuata in tre step successivi, come illustrato in **Figura 53**.

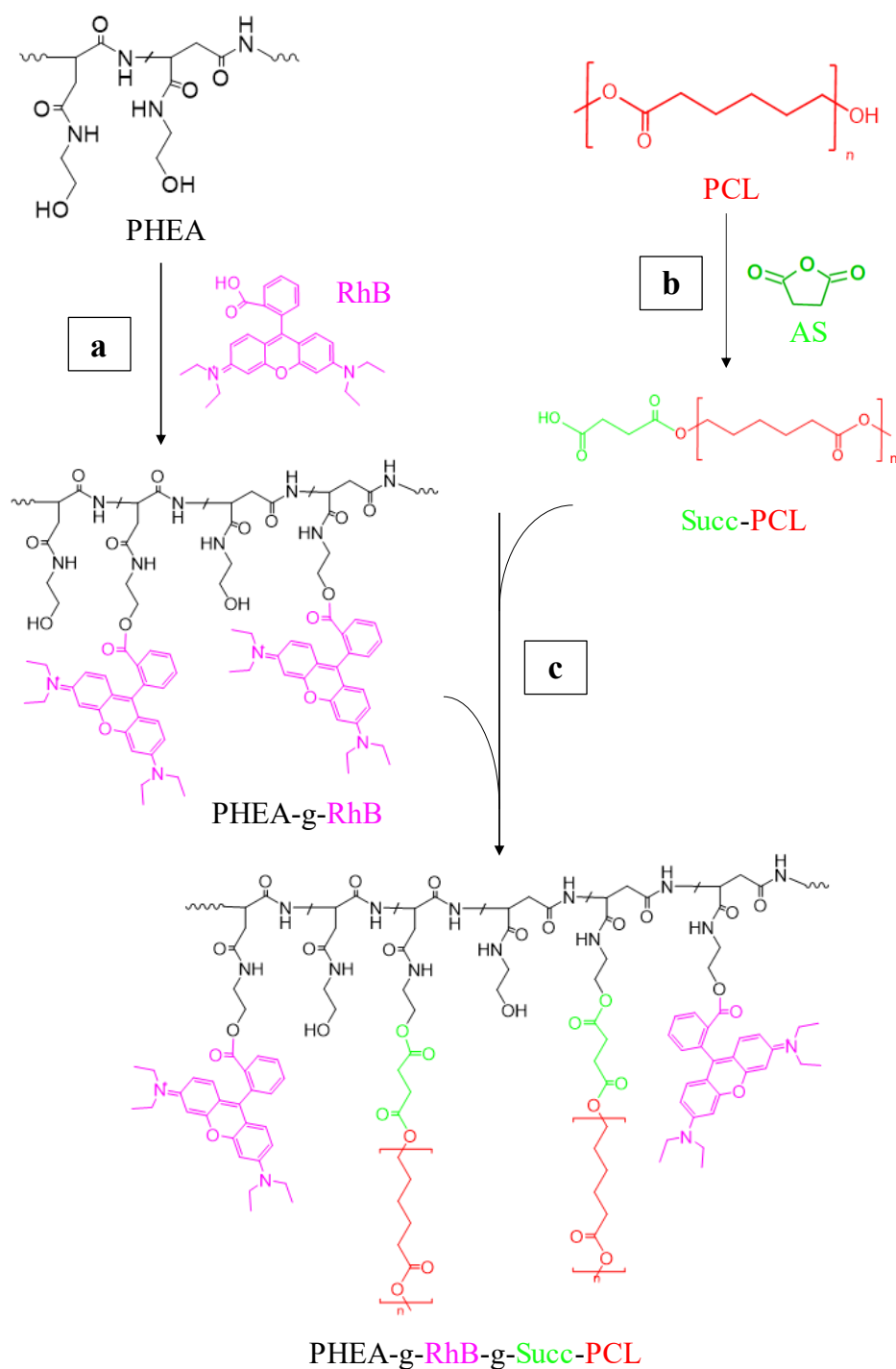


Figura 53. Schema di sintesi del copolimero PHEA-g-RhB-g-Succ-PCL ($n = 122$). Condizioni sperimentali: **a)** DMF-a, CDI, 4 h a 40°C; DEA 48 h a 40°C. **b)** DMF-a, 4-DMAP, 24 h a 60°C; **c)** DMF-a, CDI, 5 h a 40°C; DEA, 68 h a 40°C. *Backbone* del PHEA (nero); RhB (fucsia); PCL (rosso); anidride succinica (verde).

Inizialmente è stata condotta la sintesi del copolimero PHEA-g-RhB (**Figura 53 a**). La procedura di sintesi e la caratterizzazione di tale copolimero sono già riportate nel paragrafo 3.1.1.

Al fine di aumentare la reattività del PCL verso la successiva coniugazione con il PHEA, è stata effettuata una reazione di succinazione del PCL ($\bar{M}_w = 10\text{-}18$ kDa) con anidride succinica (AS) al fine di ottenere il copolimero PCL-Succ. In tal modo è stata introdotta una funzione carbossilica in posizione terminale al PCL, in grado di formare legami esterei con i gruppi idrossilici del PHEA in condizioni di reazione blande.^{139,171}

La reazione di succinazione del PCL è stata condotta in DMF-a, utilizzando come catalizzatore la 4-dimetilamminopiridina (4-DMAP), a 60°C per 24 ore. La procedura di sintesi è riportata in **Figura 53 b**.

Le quantità di AS e 4-DMAP adoperate sono state calcolate rispettivamente secondo i rapporti molari $R_4 = 40$ e $R_5 = 1,2$, descritti nella parte sperimentale. Il grado di succinazione del PCL è stato determinato tramite una titolazione in ambiente organico ed è risultato che ciascuna catena è stata funzionalizzata con un gruppo carbossilico ad una estremità.

Una volta ottenuto e opportunamente caratterizzato, il PCL-Succ è stato utilizzato per la successiva ed ultima reazione di funzionalizzazione del copolimero PHEA-g-RhB, ottenendo il copolimero finale PHEA-g-RhB-g-Succ-PCL, la cui sintesi e struttura chimica sono rappresentate in **Figura 53 c**.

In particolare, l'attivazione dei gruppi carbossilici del PCL-Succ è stata condotta con il CDI a 40°C per 5 ore; in seguito, il PCL-Succ attivato è stato posto a reagire con il PHEA-RhB, disperso anch'esso in DMF-a, a 40°C per 68 ore, utilizzando la DEA come catalizzatore.

Le quantità di CDI, PCL-Succ e DEA utilizzate sono state calcolate a partire dai rapporti molari, $R_6 = 3$, $R_7 = 0,12$ e $R_8 = 5$, descritti nella parte sperimentale.

Grazie all'introduzione delle catene idrofobiche di PCL sul *backbone* del PHEA, il prodotto ottenuto è risultato insolubile in acqua, ma solubile in solventi organici quali dimetilsolfossido (DMSO), dimetilformammide (DMF) e dimetilacetammide (DMA).

Dopo aver isolato e purificato il copolimero, esso è stato caratterizzato mediante analisi ^1H -NMR e SEC. Il grado di derivatizzazione molare % in PCL ($\text{DD}_{\text{PCL}}\%$) è risultato pari a 2,5% in moli rispetto alle moli di unità ripetitive (U.R.) di PHEA. Quest'ultimo è stato calcolato dallo spettro ^1H -NMR registrato in DMF-d_7 rapportando l'integrale dei picchi a δ 1,6-1,8 (6H_{PCL} - $[\text{O}(\text{O})\text{CCH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2]_{122-}$) attribuiti ai protoni del PCL legato, all'integrale del picco a δ 3,50 relativo ai due protoni del PHEA (2H_{PHEA} , $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), riportato in **Figura 54**.

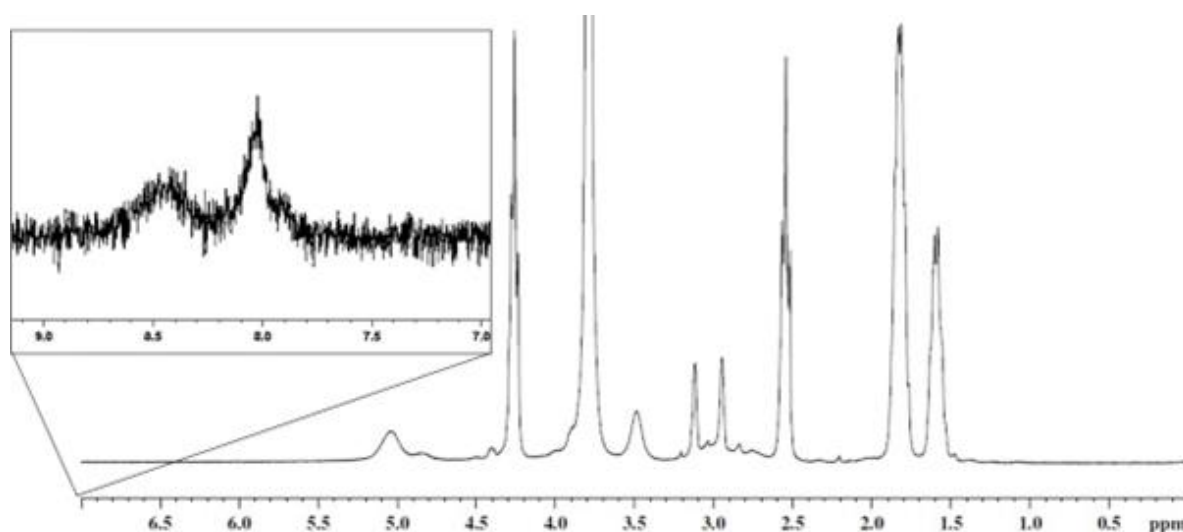


Figura 54. Spettro ^1H -NMR del copolimero PHEA-g-RhB-g-Succ-PCL in DMF-d_7 .

Il risultato indica che ogni 100 unità ripetitive di PHEA-g-RhB, circa 2 sono funzionalizzate con PCL, pertanto considerando che il PHEA-g-RhB utilizzato ha un $\bar{M}_w$ di 52.500 Da, ci sono in media 6 catene di PCL legate per ogni macromolecola di PHEA.

Questo grado di funzionalizzazione è stato confermato mediante analisi SEC, in cui il $\bar{M}_w$ del copolimero PHEA-g-RhB-g-Succ-PCL è risultato pari a 136.000 Da ($\bar{M}_w/\bar{M}_n = 1,5$), che presenta una buona corrispondenza con quanto atteso.

Sono state inoltre effettuate analisi FT-IR sui copolimeri ottenuti; la sovrapposizione degli spettri FT-IR, riportata in **Figura 55**, evidenzia la presenza nello spettro del PHEA-g-RhB-g-Succ-PCL di bande tipiche di entrambi i polimeri PHEA e PCL-Succ.

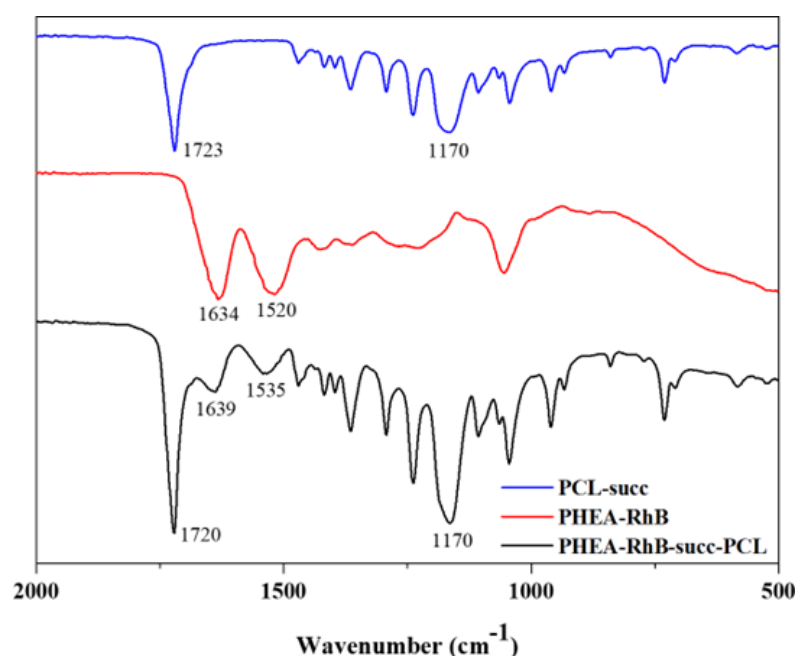


Figura 55. Spettri FT-IR dei copolimeri ottenuti.

In particolare, lo spettro FT-IR del copolimero PHEA-g-RhB-g-Succ-PCL ha mostrato le bande caratteristiche a 1639 cm^{-1} (ammide I) e 1535 cm^{-1} (ammide II), corrispondenti rispettivamente allo *stretching* asimmetrico C=O e al *bending* N-H del backbone del PHEA, e due bande a 1720 e 1170 cm^{-1} attribuite, rispettivamente, allo *stretching* asimmetrico di C=O e C-O del PCL.

3.3.2. Preparazione delle nanoparticelle fluorescenti ibride lipide-polimero (LPHFNPs)

Dopo aver verificato l'insolubilità del copolimero PHEA-g-RhB-g-Succ-PCL in solventi acquosi e la solubilità in solventi organici, quali DMF e DMA, questo è stato utilizzato per realizzare delle nanoparticelle polimeriche fluorescenti, vuote e caricate con il Roflumilast, attraverso il metodo della nanoprecipitazione diretta.

L'utilizzo di una soluzione satura di NaCl anziché di acqua come fase esterna, ha permesso di ottenere un'efficienza di incapsulamento del Roflumilast superiore, con una quantità di farmaco caricato (*drug loading*, DL%), valutata con un metodo HPLC appropriato, pari $1,0 \pm 0,2\%$ in peso.

Le nanoparticelle polimeriche fluorescenti ottenute sia vuote (FNPs) che caricate con il farmaco (FNPs@Roflumilast) sono state utilizzate per la preparazione dei sistemi ibridi, previa caratterizzazione tramite tecnica del *Dynamic Light Scattering* (DLS), effettuata al fine di valutare le dimensioni e la carica superficiale. I risultati ottenuti sono riportati in **Tabella 11**.

Tabella 11. Valori di dimensione media, PDI e potenziale ζ delle nanoparticelle. Dati riportati come media di 3 analisi differenti.

	Z-Average (nm $\pm$ S.D.)	PDI $\pm$ S.D.	ζ Potential (mV $\pm$ S.D.)
FNPs	59,0 $\pm$ 3,1	0,21 $\pm$ 0,12	-6,4 $\pm$ 5,4
FNPs@Roflumilast	78,0 $\pm$ 4,1	0,24 $\pm$ 0,07	-8,2 $\pm$ 4,3

Come si evince dai risultati ottenuti, le FNPs ottenute mostrano una dimensione media, espressa come Z-Average, inferiore agli 80 nm; tali dimensioni sono influenzate dall'incorporazione del Roflumilast, risultando più elevate. Inoltre, tutti i sistemi sono poco polidispersi, essendo i valori di PDI inferiori a 0,3, e presentano valori di potenziale ζ prossimi alla neutralità e non

significativamente influenzati dall'incorporazione del farmaco, suggerendo l'assenza di quest'ultimo sulla superficie delle nanoparticelle.

I liposomi sono stati prodotti con il metodo della *thin layer evaporation* (TLE), a partire da una miscela costituita dalla 1,2-dipalmitoil-sn-glicerolo-3-fosfocolina (DPPC) e la 1,2-distearoil-sn-glicerolo-3-fosfoetanolamina-N-(polietilenglicole)₂₀₀₀-Mannosio (DSPE-PEG₂₀₀₀-Mannosio). Il DPPC, principale fosfolipide del tensioattivo polmonare umano, è ampiamente utilizzato in ambito farmaceutico-tecnologico per la preparazione di liposomi e LPHNPs per il rilascio di farmaci. Grazie alla sua carica zwitterionica, il DPPC può garantire la formazione di un adeguato potenziale ζ , stabilizzando le LPHFNPs risultanti e impedendone l'aggregazione.

172,173

Al fine di garantire una somministrazione mirata del Roflumilast ai macrofagi alveolari, al DPPC è stato aggiunto il DSPE-PEG₂₀₀₀-Mannosio. La mannosilazione, infatti, rappresenta una strategia alquanto vantaggiosa per ottenere un *targeting* attivo ai macrofagi, data la sovraespressione dei recettori del mannosio (CD-206, CD-163 e CD-204) sulla superficie dei macrofagi alveolari nei polmoni dei pazienti con BPCO.^{26,141}

A partire dalle due dispersioni acquose, una contenente le FNP o FNP@Roflumilast e l'altra contenente i liposomi, ottenuti dalla miscela DPPC/DSPE-PEG₂₀₀₀-Mannosio, mediante omogeneizzazione ad alta pressione (HPH) sono state preparate rispettivamente le Man-LPHFNPs and Man-LPHFNPs@Roflumilast.

Inoltre, per ottenere dei sistemi ibridi non direzionati da utilizzare come controllo, seguendo la stessa procedura HPH, sono state preparate le LPHFNPs e le LPHFNPs@Roflumilast, a partire rispettivamente dalle FNP e dalle FNP@Roflumilast e da liposomi ottenuti solo da DPPC.

La rappresentazione schematica del processo di produzione delle LPHFNPs è riportata in

Figura 56.

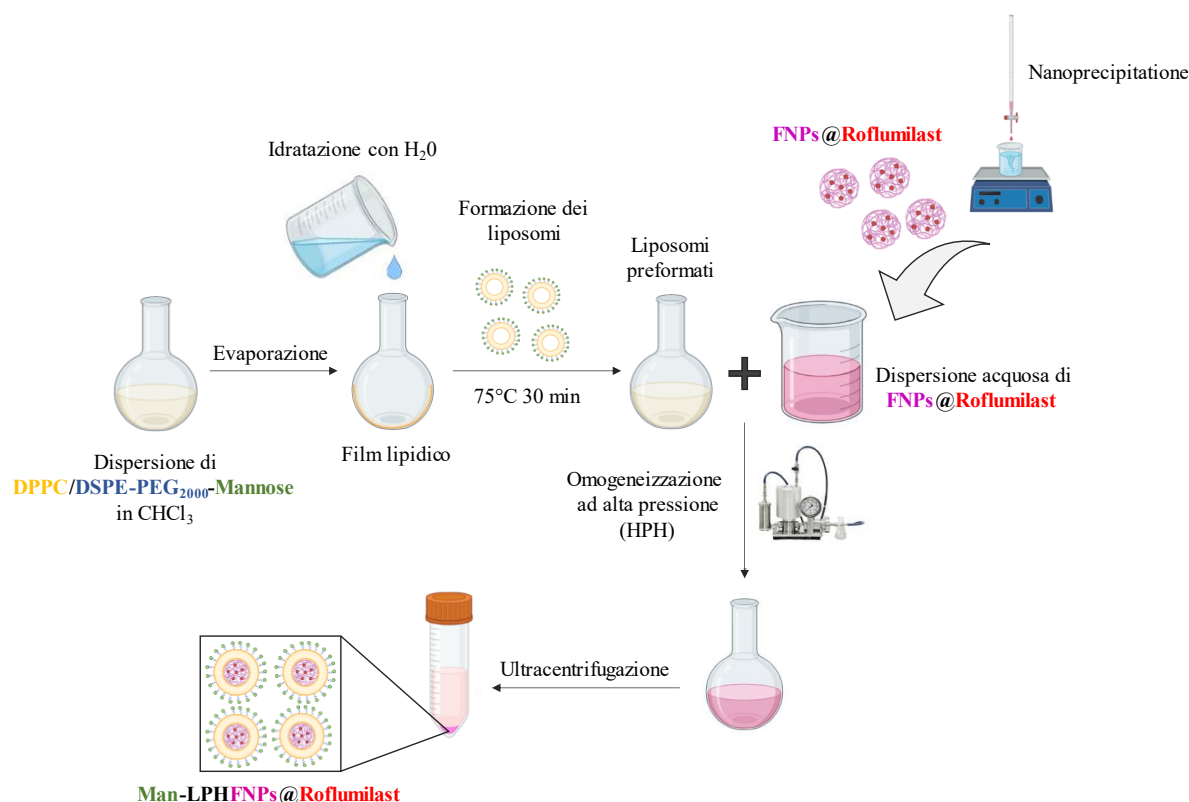


Figura 56. Rappresentazione schematica del processo di produzione delle LPHNPs.

3.3.3. Caratterizzazione delle LPHFNPs

Allo scopo di determinare le proprietà chimico-fisiche dei sistemi nanoparticellari ibridi ottenuti e valutare l'effetto del processo di liofilizzazione sulla ridispersione dei sistemi in mezzo acquoso, in assenza di crioprotettore, tutti i campioni ottenuti sono stati caratterizzati in termini di dimensione media, PDI e potenziale zeta ζ , prima e dopo processo di liofilizzazione. I valori ottenuti sono stati riportati in **Tabella 12**.

Tabella 12. Valori di dimensione media, PDI e potenziale ζ delle LPHFNPs pre- e post-liofilizzazione in H₂O, e post-liofilizzazione in NaCl 10 mM. Dati riportati come media di 3 analisi differenti.

	Z-average (nm $\pm$ S.D.)	PDI $\pm$ S.D.	ζ Potential (mV $\pm$ S.D.)
prima della liofilizzazione/acqua milliQ			
LPHFNPs	82,8 $\pm$ 3,2	0,22 $\pm$ 0,01	-8,8 $\pm$ 5,7
LPHFNPs@Roflumilast	110,8 $\pm$ 3,5	0,20 $\pm$ 0,11	-9,9 $\pm$ 4,5
Man-LPHFNPs	72,1 $\pm$ 4,2	0,16 $\pm$ 0,04	-21,4 $\pm$ 6,4
Man-LPHFNPs@Roflumilast	94,0 $\pm$ 1,3	0,15 $\pm$ 0,04	-20,0 $\pm$ 5,9
dopo liofilizzazione/acqua milliQ			
LPHFNPs	91,4 $\pm$ 4,5	0,17 $\pm$ 0,01	-8,7 $\pm$ 6,2
LPHFNPs@Roflumilast	114,6 $\pm$ 2,6	0,19 $\pm$ 0,03	-9,6 $\pm$ 6,4
Man-LPHFNPs	88,5 $\pm$ 4,1	0,22 $\pm$ 0,08	-18,8 $\pm$ 6,4
Man-LPHFNPs@Roflumilast	114,5 $\pm$ 1,6	0,20 $\pm$ 0,02	-15,0 $\pm$ 5,1
dopo liofilizzazione/NaCl 10mM			
LPHFNPs	169,8 $\pm$ 2,2	0,22 $\pm$ 0,04	-7,4 $\pm$ 4,5
LPHFNPs@Roflumilast	222,4 $\pm$ 4,5	0,28 $\pm$ 0,10	-9,6 $\pm$ 4,9
Man-LPHFNPs	159,1 $\pm$ 3,2	0,24 $\pm$ 0,03	-7,5 $\pm$ 4,9
Man-LPHFNPs@Roflumilast	155,0 $\pm$ 1,7	0,25 $\pm$ 0,06	-10,8 $\pm$ 5,6

Come si evince dalla tabella, sia le LPHFNPs che le Man-LPHFNPs pre-liofilizzazione hanno mostrato una dimensione media compresa tra 70 e 80 nm; tali dimensioni sono influenzate dall'incorporazione del Roflumilast, risultando per le particelle contenenti il Roflumilast maggiori comprese tra 94 e 110 nm. Inoltre, tutti i sistemi sono poco polidispersi, essendo i valori di PDI inferiori a 0,3.

Dai valori ottenuti post-liofilizzazione, si evince come tale processo influenzi solo lievemente le caratteristiche dimensionali delle nanoparticelle ibride, essendo i valori ottenuti superiori a quelli pre-liofilizzazione in un range percentuale del 15%. Tale risultato può essere spiegato

considerando la presenza dello *shell* lipidico che riveste la nanoparticella e facilita la ridispersione dei sistemi nel mezzo acquoso.

Nella **Tabella 12** sono riportati anche i valori di potenziale ζ in acqua, che risultano essere vicini alla neutralità sia prima che dopo processo di liofilizzazione, diventando più alti e più negativi nei campioni mannosilati. Questo shift di carica può essere attribuito alla presenza del mannosio sulla superficie delle nanoparticelle, come già riportato per altri vettori mannosilati.

141

Inoltre, non ci sono differenze significative tra i campioni Man-LPHFNPs e Man-LPHFNPs@Roflumilast.

Sebbene la presenza dei fosfolipidi sulla superficie delle nanoparticelle possa stabilizzare il sistema, impedendone l'aggregazione, diversi altri fattori, come la forza ionica, possono influenzare la stabilità colloidale.⁹⁸ Come già riportato in letteratura infatti, l'aumento della forza ionica da 1 a 150 mM porta a un'aggregazione delle LPHFNPs schermando le loro cariche elettrostatiche.^{96,172} Pertanto, al fine di valutare l'effetto della forza ionica della fase acquosa sulla stabilità colloidale delle nostre LPHFNPs, è stata effettuata un'analisi DLS in una soluzione di NaCl 10 mM su campioni liofilizzati.¹⁷⁴

Dai risultati ottenuti, riportati in **Tabella 12**, si evince che tutti i campioni mostrano dimensioni medie e valori di PDI leggermente superiori a quelli ottenuti in acqua, dimostrando che la presenza del sale favorisce alcuni fenomeni di aggregazione, comunque in ambito colloidale. Inoltre, in soluzione salina, si è ottenuta una riduzione dei valori di potenziale ζ per i campioni mannosilati rispetto a quelli ottenuti in acqua.

Allo scopo di confermare le dimensioni nanometriche dei sistemi ottenuti e di ottenere maggiori informazioni sulla loro morfologia, il campione di Man-LPHFNPs è stato sottoposto ad analisi di trasmissione e scansione (STEM).

Un'immagine registrata è mostrata in **Figura 57**, dove si evince chiaramente che le Man-LPHFNPs hanno mostrato una forma sferica e dimensione nanometrica, con una struttura *core-shell*, avente una porzione esterna più chiara, attribuita al guscio lipidico, e un nucleo più scuro, attribuito alla porzione polimerica.

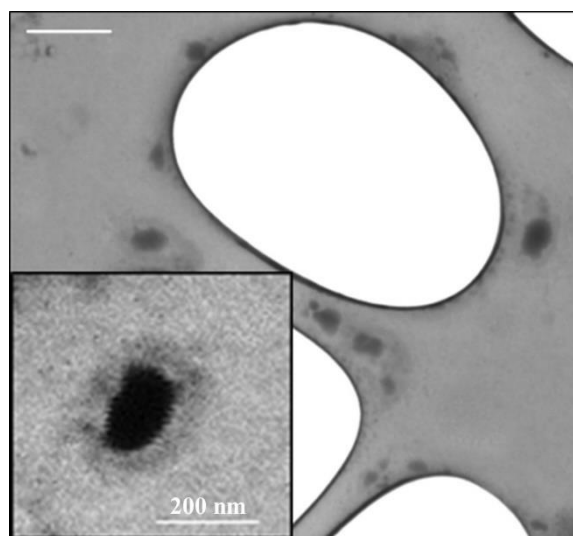


Figure 57. Immagine STEM del campione Man-LPHFNPs.

Una volta confermata la struttura *core-shell* dei sistemi ibridi ottenuti, è stato determinato il contenuto percentuale di DPPC e DSPE-PEG₂₀₀₀-Mannosio presente. A tale scopo, è stato effettuato il saggio colorimetrico dell'ammonio ferro tiocianato.¹⁷⁵

Questo metodo, sviluppato per la quantificazione dei fosfolipidi nei campioni biologici, si basa sulla formazione di un complesso tra i fosfolipidi e il ferrotiocianato di ammonio, quantificabile mediante analisi UV a $\lambda=488$ nm.

I risultati, riportati in **Tabella 13** ed espressi come rapporto percentuale in peso tra la quantità di lipidi e il peso totale del campione, indicano che tutti i campioni contengono circa il 44-51% in peso dei lipidi, con differenze non staticamente significative.

Tabella 13. Contenuto percentuale di fosfolipidi, espresso come rapporto in peso tra lipidi e peso totale delle LPHNPs analizzate, determinate mediante il metodo colorimetrico dell'ammonio ferro tiocianato. Dati riportati come media di 3 analisi differenti.

Contenuto % in fosfolipidi (p/p% $\pm$ S.D.)	
LPHFNPs	46,82 $\pm$ 6,33
LPHFNPs@Roflumilast	44,42 $\pm$ 5,03
Man-LPHFNPs	44,65 $\pm$ 2,33
Man-LPHFNPs@Roflumilast	50,83 $\pm$ 0,86

Allo scopo di confermare la presenza di fosfolipidi sulla superficie, è stata effettuata un'analisi di spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS), sia sulle Man-LPHFNPs che sulle FNP come campione di controllo. I dati, espressi come distribuzione relativa delle specie di carbonio, azoto, ossigeno e fosforo sulla superficie dei campioni, determinati mediante una procedura di *fitting* dei segnali fotoelettronici, sono riportati nella **Tabella 14**, mentre le curve *fitting* degli spettri N 1s sono riportate nella **Figura 58**.

Tabella 14. Composizione chimica superficiale mediante analisi XPS dei campioni FNP e Man-LPHFNPs.

	C 1s	N 1s	O 1s	P 1s
FNP	69,7	3,9	26,4	0
Man-LPHFNPs	80,8	2,3	14,9	1,8

Come si può notare, tra gli elementi presenti sulla superficie del campione Man-LPHFNPs, c'è il fosforo, compatibile con la struttura dei fosfolipidi, assente nel polimero PHEA-g-RhB-g-Succ-PCL che costituisce le nanoparticelle. Inoltre, lo spettro N 1s delle FNP, riportato nella

Figura 58 A, mostra un singolo picco a 399,7 eV, attribuito all'azoto amidico, presente nella struttura del PHEA. Lo spettro N 1s di Man-LPHFNPs, invece, riportato in **Figura 58 B**, mostra due picchi: uno a 399,7 eV, pari a circa il 32,1%, e un altro a 402,3 eV, attribuito al legame N-H⁺, che è predominante e rappresenta il 67,9% dell'azoto totale, confermando pertanto la presenza dei fosfolipidi sulla superficie delle Man-LPHFNPs.

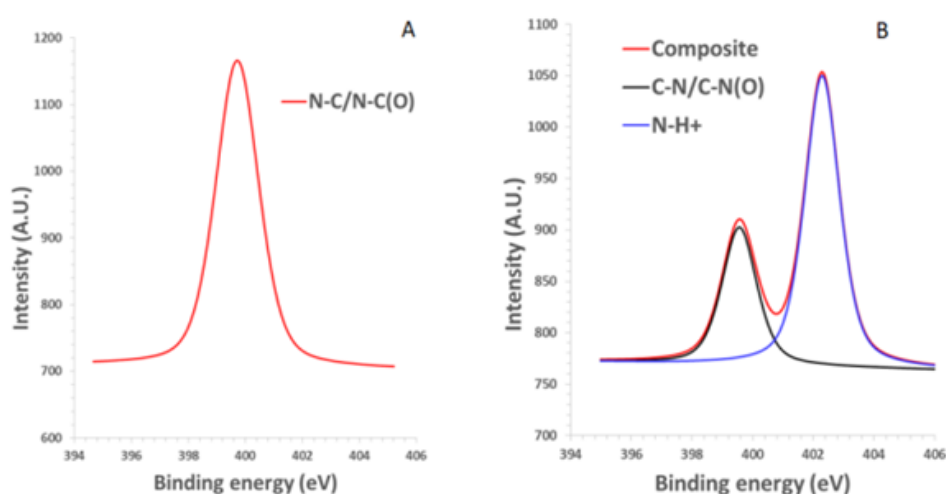


Figure 58. *Curve-fitting* dello spettro N 1s di A) FNP e B) Man-LPHFNPs.

Sebbene le precedenti caratterizzazioni dimostrino la presenza di fosfolipidi sulla superficie delle LPHFNPs, nessuna indicazione ci ha permesso di sapere se effettivamente il PEG (e quindi il mannosio alla fine della catena) fosse presente sulla superficie delle LPHFNPs.

Pertanto, è stata determinata la densità di peghilazione superficiale del campione Man-LPHFNPs mediante un metodo basato sull'analisi ¹H-NMR, già descritto in dettaglio nel paragrafo 3.2.2.¹⁴⁵ Le LPHFNPs sono state analizzate come campione di controllo.

In particolare, è stato ottenuto valore di peghilaione superficiale pari a 0,00297 mmol/100 mg di Man-LPHFNPs, corrispondente a circa il 70 wt% della quantità totale di DSPE-PEG₂₀₀₀-Mannosio determinata mediante saggio colorimetrico.

Pertanto, si può affermare che circa il 70% della quantità totale di fosfolipide peghilato incorporato nel campione ibrido nanoparticellare si trova esposto sulla superficie.

Il valore di densità di PEG superficiale $[\Gamma]$ (numero di PEG per 100 nm²) è risultato di circa 29,71 molecole di PEG per 100 nm², sinonimo di un'elevata densità di peghilaione superficiale.¹⁶² In considerazione del fatto che all'estremità della catena di PEG è legata una molecola di mannosio, si può dedurre che i sistemi Man-PEG-LPHNPs presentino altrettante molecole di mannosio sulla superficie.

Infine, è stato calcolato il rapporto $[\Gamma/\Gamma^*]$, indice necessario al fine di dedurre la conformazione assunta dalle catene di PEG sulla superficie, che per le NP_PEG è risultato pari a 2,72, indicando pertanto un'elevata densità di PEG in superficie, dove le molecole di PEG sono in una conformazione *brush-like*, necessaria per rendere i sistemi mucopenetranti.^{92,162}

Considerando dunque le dimensioni, il potenziale ζ , la densità di peghilaione superficiale e la conformazione *brush-like* delle catene di PEG sulla superficie delle Man-PEG-LPHNPs, possiamo ipotizzare che tali sistemi una volta somministrati avranno la possibilità di diffondere nello strato di muco, poiché le caratteristiche superficiali, il basso potenziale ζ le dimensioni colloidali possedute rientrano all'interno di quei parametri considerati auspicabili per consentire a tali sistemi di avere mucopenetrazione.¹⁴⁵

Inoltre, la conformazione del PEG, che presenta una molecola di mannosio all'estremità esposta nel mezzo di dispersione, potrebbe favorire l'interazione di quest'ultimo con il suo recettore esposto sui macrofagi.

La quantità di Roflumilast incorporata nei sistemi ibridi è stata valutata mediante analisi HPLC, secondo procedura riportata nella parte sperimentale, ed espressa come DL% (**Tabella 15**).

Come si può notare, partendo dalle stesse FNP@Roflumilast, sono stati ottenuti dei sistemi ibridi in grado di incorporare quantità di farmaco comparabili, essendo sia la DL% che la EE% non significativamente diverse ($p > 0,05$).

Tabella 15. DL% delle LPHFNPs contenenti il Roflumilast. Dati riportati come media di 3 analisi differenti.

	DL % (p/p%±S.D.)	EE % (p/p%±S.D.)
LPHFNPs@Roflumilast	0,24 ± 0,03	10,50 ± 2,5
Man-LPHFNPs@Roflumilast	0,28 ± 0,07	13,52 ± 3,2

Il rilascio del Roflumilast è stato valutato in una miscela PBS (pH 7.4)/ethanol (80/20, v/v), utilizzando il metodo della dialisi, al fine di valutare la capacità delle nanoparticelle ibride prodotte di trattenere il farmaco incorporato in condizioni *sink* e garantirne un rilascio prolungato. Le cinetiche di rilascio del farmaco ottenute dai campioni LPHFNPs@Roflumilast e Man-LPHFNPs@Roflumilast sono riportate in **Figura 59**, insieme al profilo di diffusione del farmaco libero attraverso la stessa membrana.

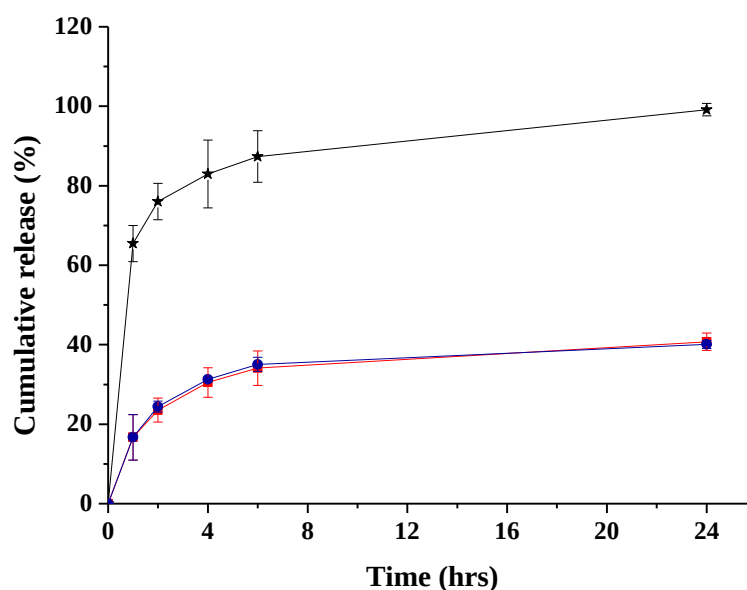


Figure 59. Percentuale di Roflumilast rilasciata dalle LPHFNPs (rosso), Man-LPHFNPs (blu), e profilo di diffusione del farmaco libero (nero). Dati riportati come media di 3 analisi differenti.

Come mostrato, non vi sono differenze significative nella cinetica di rilascio tra i due sistemi ibridi; in entrambi i casi, infatti, il farmaco viene rilasciato lentamente nel mezzo acquoso, senza mostrare *burst effect*, raggiungendo circa il 40% p/p in 24 ore di incubazione.

Allo scopo di ottenere informazioni preliminari sull'arrangiamento spaziale e sull'instaurarsi di eventuali interazioni tra i vari componenti che costituiscono i sistemi ibridi ottenuti, è stata effettuata un'analisi calorimetrica a scansione differenziale (DSC).

È ampiamente riportato in letteratura, infatti, l'uso della caratterizzazione tramite DSC di sistemi ibridi di varia natura al fine di ottenere informazioni chimico-fisiche aggiuntive.^{176–178}

In particolare, i campioni Man-LPHFNPs, Man-LPHFNPs@Roflumilast, FNP, la miscela fisica tra le vescicole liposomiali ottenute dalla miscela DPPC/DSPE-PEG₂₀₀₀-Mannosio e le FNP, e il Roflumilast, sono stati analizzati tramite analisi DSC nell'intervallo di temperature compreso tra 25 °C e 300 °C. I termogrammi ottenuti e le temperature di transizione dei picchi principali sono riportati rispettivamente in **Figura 60** e in **Tabella 16**.

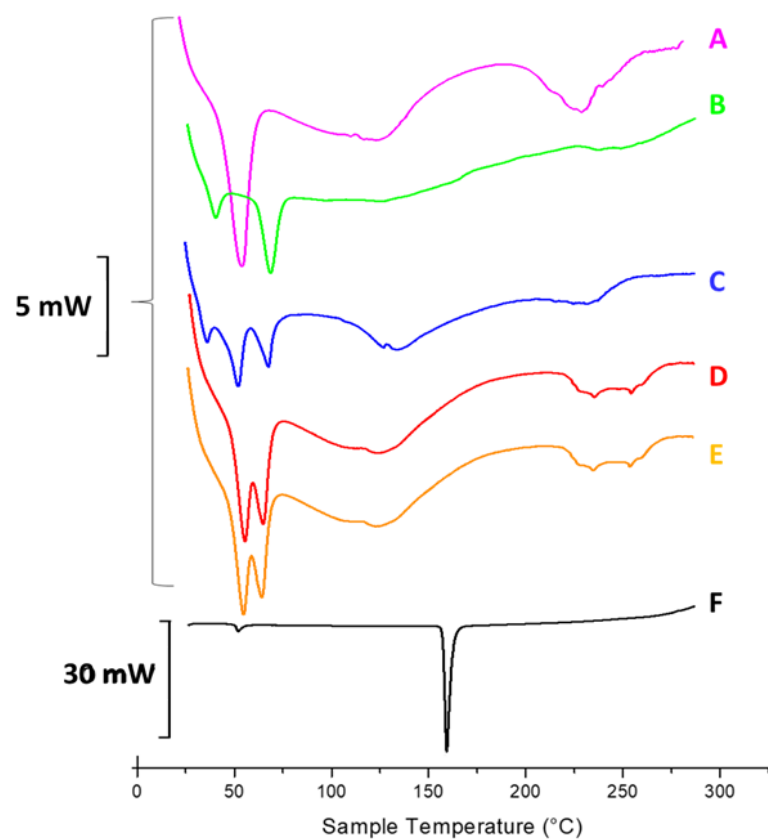


Figura 60. Termogrammi di: A) FNPs, B) liposomi da soli, C) miscela fisica FNPs e liposomi, D) Man-LPHFNPs, E) Man-LPHFNPs@Roflumilast, F) Roflumilast in forma cristallina.

Tabella 16. Valori delle temperature di transizione dei campioni analizzati.

	$T_M/^\circ\text{C}$
FNPs	Picco 1, 54,73 Picco 2, 240
Liposomi	Picco 1, 40,43 Picco 2, 68,75
Miscela fisica	Picco 1, 38,19 Picco 2, 52,30 Picco 3, 67,81
Man-LPHFNPs	Picco 1, 55,59 Picco 2, 65,03
Man-LPHFNPs@Roflumilast	Picco 1, 55,59 Picco 2, 65,03
Roflumilast	159,8

Come si evince dai risultati ottenuti, il termogramma delle FNPs (A) mostra un picco a 54°C che può essere attribuito alla fusione del copolimero PHEA-g-RhB-g-Succ-PCL, ed un picco a circa 240°C verosimilmente attribuibile alla degradazione dello stesso. Il termogramma delle vescicole liposomiali (B) mostra due picchi, rispettivamente a circa 40 e 69°C, attribuibili alle transizioni di fase gel-sol del DSPE-PEG₂₀₀₀-Mannosio e DPPC, rispettivamente. Nel caso della miscela fisica (C), il termogramma mostra invece tre picchi, che sono perfettamente sovrapponibili a quelli presenti nei termogrammi delle FNPs e dei liposomi analizzati singolarmente. Anche i profili delle Man-LPHFNPs sia vuote che piene (D e E) mostrano dei picchi endotermici sovrapponibili a quelli presenti nel termogramma delle FNPs e delle vescicole liposomiali registrati separatamente, suggerendo che la formazione dei sistemi ibride sia avvenuta con successo. Si può notare, inoltre, che il picco relativo alla transizione di fase del DPPC risulta leggermente shiftato passando dalla miscela fisica alle nanoparticelle ibride

(69 vs 65°C), suggerendo che l'incorporazione nei sistemi ibridi determina l'instaurarsi di interazioni che influenzano la temperatura di transizione gel-sol del fosfolipide in questione. Nel caso del DSPE-PEG₂₀₀₀-Mannosio, il picco di transizione non è più visibile nel termogramma dei sistemi ibridi, probabilmente perché la quantità incorporata è ridotta rispetto a quella utilizzata per la miscela fisica.

È inoltre evidente che il picco endotermico a 159,8 °C presente nello spettro del Roflumilast (F), corrispondente alla transizione di fusione di quest'ultimo, è assente nel termogramma delle Man-LPHFNPs@Roflumilast (E), suggerendo che il farmaco all'interno dei sistemi ibridi si trovi disperso in forma amorfa.

3.3.4. Valutazione delle interazioni tra LPHFNPs e mucina

3.3.4.1. *Analisi turbidimetriche*

Allo scopo di valutare se la peghilazione superficiale ottenuta fosse in grado di ridurre, effettivamente, le interazioni con la mucina, presente nel muco polmonare, è stata eseguita un'analisi turbidimetrica.

In particolare, la torbidità delle dispersioni acquose mucina/Man-LPHFNPs e mucina/LPHFNPs a due diverse concentrazioni è stata misurata mediante analisi UV per 6 ore e confrontata con quella di una dispersione mucina/chitosano come controllo positivo. I dati ottenuti sono riportati nella **Figura 61** come valori di trasmittanza a 650 nm in funzione del tempo di incubazione.

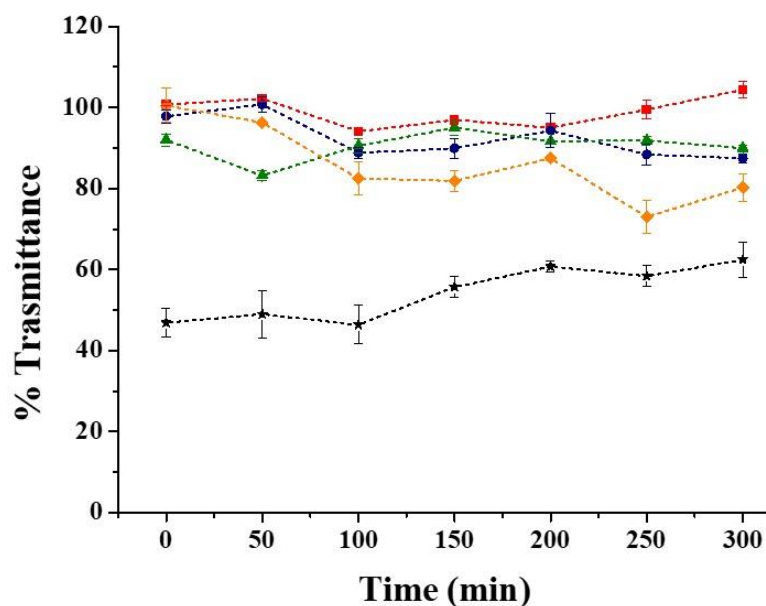


Figura 61. Trasmittanza a 650 nm di dispersioni contenenti mucina in presenza di Man-LPHFNPs [0,1 mg/ml blu; 0,5 mg/ml arancione], LPHFNPs [0,1 mg/ml rosso; 0,5 mg/ml verde], chitosano [0,5 mg/ml, nero]. Dati riportati come media di 3 analisi differenti.

Entrambi i campioni, a una concentrazione di 0,1 mg/ml, non danno interazioni sfavorevoli con la mucina, come evidenziato dai valori di trasmittanza vicini al 100% per 6 ore. D'altra parte, è possibile osservare come la trasmittanza di Man-LPHFNPs, a una concentrazione di 0,5 mg/ml, diminuisca (meno dell'80%), dopo circa 3 ore, suggerendo una leggera mucoadesione del campione. Al contrario, il controllo positivo chitosano determina una diminuzione significativa della trasmittanza dopo 6 ore di incubazione.

3.3.4.2. *Analisi reologiche*

L'analisi reologica è stata condotta per valutare se, e in che termini, la presenza dei nostri nanosistemi ibridi possa modificare le proprietà viscoelastiche del muco, considerando che se si verificano interazioni tra nanoparticelle e i componenti del muco, la viscosità della miscela aumenta.

Per fare ciò, è stato utilizzato un modello di muco artificiale, preparato secondo un metodo già riportato in letteratura.⁹⁵ Come già noto, questo muco mostra un comportamento reologico tipico dei fluidi pseudoplastici, con una riduzione della viscosità in seguito ad un aumento dello sforzo di taglio, simile a quello osservato per l'espettorato dei pazienti con BPCO.^{168,179}

Il muco artificiale è stato incubato da solo o in presenza di LPHFNPs e Man-LPHFNPs, e la viscosità complessa (η^*) è stata determinata con un reometro rotazionale (**Figura 62**).

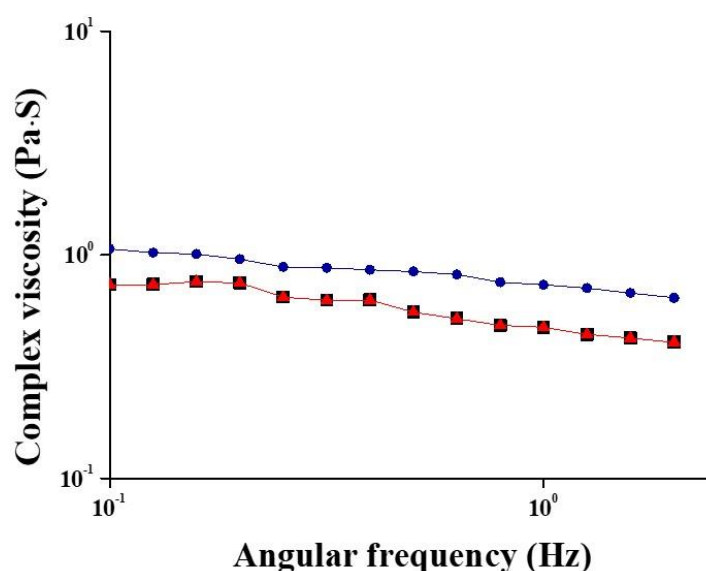


Figura 62. Viscosità complessa (η^*) del muco artificiale da solo (nero) e trattato con LPHFNPs 0,1 mg/ml (rosso) e Man-LPHFNPs 0,1 mg/ml (blu).

In presenza dei sistemi ibridi, l'andamento della viscosità del muco, in funzione dello sforzo di taglio applicato, è del tutto paragonabile a quello osservato per il muco tal quale. D'altra parte però, si può osservare che allo stesso sforzo di taglio applicato, le Man-LPHFNPs determinano un leggero aumento della viscosità complessa rispetto al muco da solo e in presenza di LPHFNPs, confermando i risultati ottenuti dallo studio turbidimetrico.

Pertanto, possiamo concludere che le Man-LPHFNPs hanno mostrato una certa capacità di interagire con i componenti del muco, nelle condizioni sperimentali scelte, che potrebbe essere attribuita alla presenza di residui di mannosio esposti sulla superficie delle nanoparticelle, come già dimostrato da altri studi.^{141,142}

3.3.5. Studi di caratterizzazione biologica

Una delle principali sfide che qualsiasi sistema per la veicolazione di farmaci deve superare, per poter essere applicato in ambito biomedico, è la sua sicurezza clinica.

Per tale motivo, la tossicità di tutti i sistemi ibridi ottenuti è stata valutata incubando i campioni con due differenti linee cellulari, quali le cellule epiteliali bronchiali umane (16-HBE) e una linea macrofagica (RAW 264.7), scelta allo scopo di valutare l'effetto di *targeting* del mannosio, considerato che a differenza delle cellule 16-HBE, espongono sulla loro superficie i recettori CD-206, sovraespressi nei macrofagi alveolari dei pazienti affetti da BPCO.¹¹

In particolare, entrambe le linee cellulari sono state incubate per 24 ore con diverse concentrazioni di Man-LPHFNPs@Roflumilast, LPHFNPs@Roflumilast e farmaco libero. Inoltre, è stato valutato anche l'effetto delle LPHFNPs vuote sulla vitalità cellulare a concentrazioni corrispondenti a quelle utilizzate per i sistemi caricati con il farmaco. I risultati sono riportati in **Figura 63 A e B**.

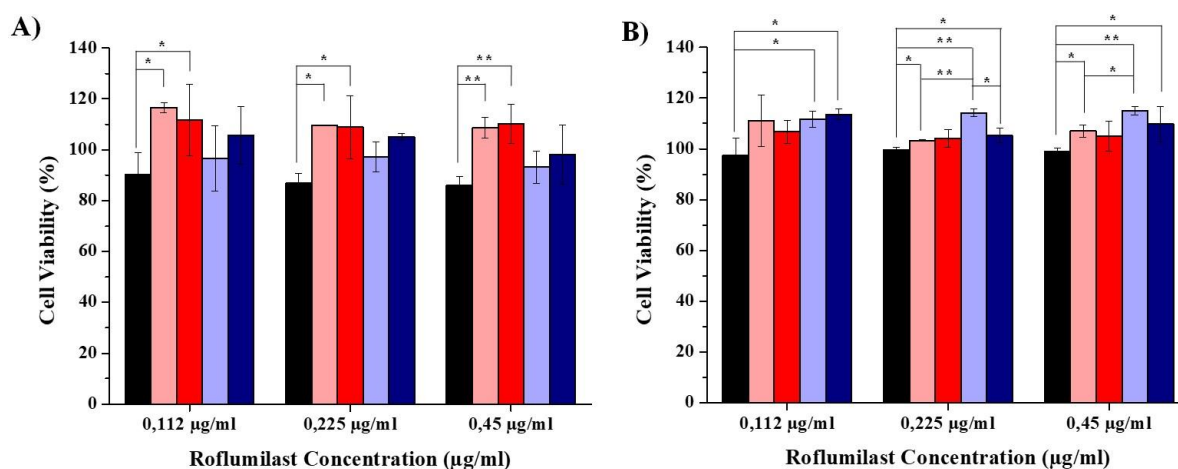


Figure 63. Vitalità cellulare delle linee cellulari A) RAW 264.7 e B) 16-HBE, dopo 24 ore di incubazione con Roflumilast (nero), LPHFNPs (rosa), LPHFNPs@Roflumilast (rosso), Man-LPHFNPs (celeste), Man-LPHFNPs@Roflumilast (blu). (* $P < 0.05$; ** $P < 0.001$). Dati riportati come media di 3 analisi differenti.

Dopo 24 ore di incubazione, tutti i campioni hanno mostrato una citotossicità trascurabile, a tutte le concentrazioni testate.

In particolare, è da notare come l'effetto delle Man-LPHFNPs e Man-LPHFNPs@Roflumilast sulla vitalità delle RAW 264.7 è del tutto paragonabile a quello del farmaco libero, suggerendo una probabile maggiore internalizzazione dei sistemi mirati grazie alla presenza del mannosio. D'altra parte, la citotossicità sulle 16-HBE dei sistemi mannosilati è significativamente inferiore a quella ottenuta con il farmaco libero, a sostegno ancora dell'effetto di *targeting* del mannosio. Grazie alle proprietà di fluorescenza dei nostri sistemi ibridi conferite dall'RhB, è stato valutato, mediante *imaging* di fluorescenza, se l'internalizzazione delle Man-LPHFNPs, da parte delle cellule RAW 264.7, sia effettivamente aumentata grazie alla presenza del mannosio.

Per raggiungere tale obiettivo, le cellule RAW 264.7 sono state trattate con Man-LPHFNPs per 4 e 24 ore a 37°C.

Parallelamente, lo stesso esperimento di *uptake* è stato condotto sia sulle cellule 16-HBE, al fine di confermare ulteriormente l'effetto di *targeting* del mannosio, sia incubando entrambe le linee cellulari con LPHFNPs, utilizzate come controllo negativo.

Come è possibile osservare in **Figura 64 A**, dopo 4 ore di incubazione, le Man-LPHFNPs iniziano ad essere presenti nel citoplasma delle cellule, come indicato dalla debole fluorescenza visibile. Dopo 24 ore di incubazione, si osserva un incremento della fluorescenza, implicando che l'internalizzazione cellulare nelle 16-HBE è dipendente dal tempo.

Nonostante la natura fagocitaria delle cellule RAW 264.7, non si osserva alcuna colorazione quando vengono incubate con sistemi non mannosilati per 4 e 24 ore.

Inoltre, le interazioni mediate dal recettore delle Man-LPHFNPs verso le cellule RAW 264.7 sono state dimostrate utilizzando un saggio di inibizione competitiva, incubando un eccesso (10 mM) di mannosio libero con le Man-LPHFNPs. In particolare, l'*uptake* delle Man-LPHFNPs è risultato fortemente ridotto in presenza di mannosio libero, confermando il contributo e la specificità del CD-206 all'internalizzazione (dati non mostrati).

Per quanto riguarda il saggio di *uptake* su 16-HBE, come si può vedere nella **Figura 64 B**, agli stessi tempi di incubazione, non è stato riscontrato alcun *uptake* di entrambi i sistemi all'interno di queste cellule.

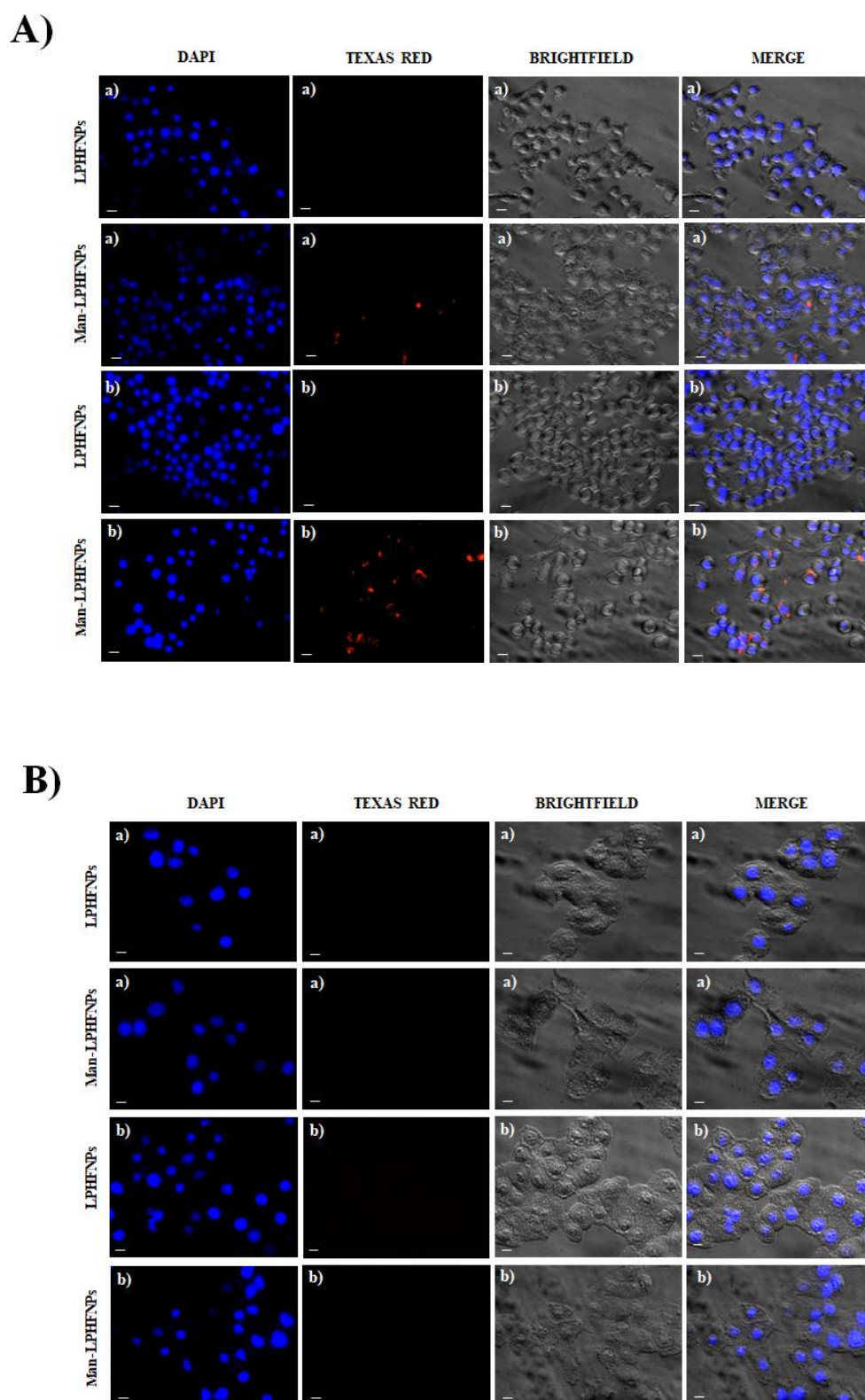


Figure 64. *Uptake* qualitativo dei sistemi Man-LPHFNPs e LPHFNPs su A) RAW 264.7 e B) 16-HBE dopo a) 4 h e b) 24 h di incubazione. La barra rappresenta 10 μ m.

Questi risultati confermano con successo che la preparazione di formulazioni mannosilate possono rappresentare un'ottima strategia per indirizzare i farmaci in modo specifico verso i macrofagi alveolari, in accordo con altri risultati riportati in letteratura.^{141,142,180}

3.3.6. Formulazione *Nano into Micro* (NiM)

Sulla base dei risultati ottenuti finora, i nostri sistemi ibridi presentano delle caratteristiche chimico-fisiche idonee per una loro potenziale somministrazione per via inalatoria, quali ad esempio la scarsa capacità di interagire con i componenti del muco. Tuttavia, è stato già ampiamente dimostrato che le dimensioni colloidali non consentono l'inalazione diretta delle nanoparticelle tal quali come polvere.

Pertanto, allo scopo di ottenere una formulazione adatta alla somministrazione polmonare, le LPHNPs sono state incorporate all'interno di microparticelle inalabili utilizzando la strategia *Nano in Micro* (NiM).

In particolare, in questo lavoro, le microparticelle sono state ottenute mediante tecnica dello *spray-drying* a partire da una dispersione acquosa di Man-LPHFNPs@Roflumilast contenente polivinilalcol (PVA) e L-leucina (Leu), scelti come componenti della matrice microparticellare, secondo procedura riportata in dettaglio nella parte sperimentale. Il PVA e la Leu, copiosamente utilizzati come eccipienti farmaceutici in formulazioni per la somministrazione polmonare, sono stati scelti in virtù dei loro vantaggi, quali la capacità di minimizzare l'aggregazione delle particelle durante l'aerosolizzazione e di migliorare la ridispersibilità acquosa delle polveri.¹⁸¹

La morfologia delle microparticelle (NiM) ottenute è stata esaminata mediante analisi di microscopia a scansione elettronica (SEM) (**Figura 65**).

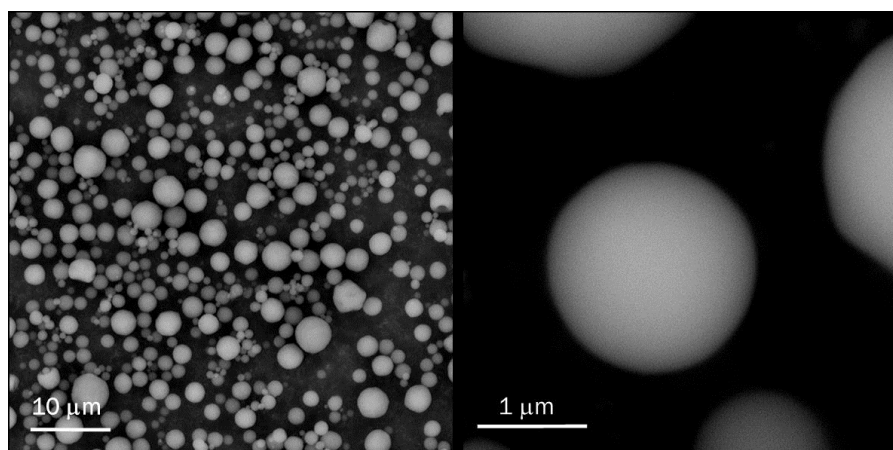


Figure 65. Immagini SEM delle NiM (sn 5000x, dx 66000x).

Le NiM mostrano una forma perfettamente sferica e un diametro medio di $1,87 \pm 1,03 \mu\text{m}$, calcolato con l'aiuto del software ImageJ, quindi morfologicamente e dimensionalmente adatto per una deposizione polmonare ottimale.

La ridispersibilità di Man-LPHFNPs@Roflumilast, in seguito a processo di *spray-drying*, è stata valutata con misure DLS disperdendo una opportuna quantità di NiM in acqua. Dopo la dissoluzione della matrice microparticelle, le Man-LPHFNPs@Roflumilast hanno mostrato dimensioni e potenziale ζ , rispettivamente di $120,23 \pm 2,4 \text{ nm}$ e $-17,2 \pm 4,5 \text{ mV}$, abbastanza paragonabili a quelli ottenuti dopo il processo di liofilizzazione, dimostrando che il processo di *spray-drying* non altera le proprietà tecnologiche delle nostre particelle.

3.3.7. Conclusioni

Nel presente lavoro è stata realizzata una formulazione polmonare innovativa, a base di nanoparticelle ibride lipide-polimero (LPHFNPs), per la veicolazione del Roflumilast ai macrofagi alveolari mediante targeting attivo, potenzialmente sfruttabile per il trattamento della BPCO.

Il Roflumilast è l'unico inibitore selettivo della PDE-4, con effetto antinfiammatorio, approvato per il trattamento orale della BPCO.^{135,170}

A tal fine, è stato sintetizzato il copolimero *graft* anfifilico PHEA-g-RhB-g-Succ-PCL a partire dal PHEA.

La funzionalizzazione del PHEA con la RhB ha permesso di rendere il polimero fluorescente, mentre quella con il PCL ha reso il PHEA-g-RhB insolubile in acqua, permettendo così la realizzazione di nanoparticelle polimeriche contenenti il Roflumilast (FNPs@Roflumilast), mediante nanoprecipitazione.

Considerati i vantaggi legati all'utilizzo di nanosistemi ibridi nell'ambito del *drug delivery*, le FNPs@Roflumilast sono state opportunamente combinate con vescicole liposomiali preparate a partire da una miscela di fosfolipidi DPPC e DSPE-PEG₂₀₀₀-Mannosio, al fine di ottenere delle nanoparticelle ibride (Man-LPHFNPs@Roflumilast) mirate ai recettori per le lectine, sovraespressi sulla membrana dei macrofagi di pazienti affetti da BPCO.

Le Man-LPHFNPs@Roflumilast hanno mostrato dimensioni nanometriche (~100-150 nm), un'elevata uniformità dimensionale e un potenziale ζ negativo. Grazie alla loro composizione, possono essere liofilizzati senza l'uso di crioprotettori, in quanto si disperdono nuovamente dopo essiccamento senza fenomeni di aggregazione.

Inoltre, una volta ridisperse in mezzo fisiologico, sono in grado di rilasciare il farmaco in esse incorporato in modo controllato, senza *burst effect*.

La caratterizzazione delle nanoparticelle ibride mediante saggio colorimetrico per la quantificazione del contenuto lipidico, analisi XPS della superficie, STEM e DSC, dimostra l'incorporazione delle FNPs nelle vescicole lipidiche e l'effettiva formazione delle particelle Man-LPHFNPs@Roflumilast con una struttura *core-shell*.

Inoltre, la determinazione della densità di peghilazione superficiale ha confermato la presenza di catene PEG sulla superficie delle Man-LPHFNPs con una conformazione *brush-like*, necessaria per conferire proprietà di penetrazione mucosa ai nanosistemi e assicurare l'esposizione del ligando direzionante.

Pertanto, considerando le dimensioni colloidali, il potenziale ζ , la densità di peghilaione superficiale e la conformazione delle catene PEG sulla superficie delle Man-LPHFNPs possiamo ipotizzare che, una volta somministrate, esse abbiano la capacità di diffondere attraverso lo strato di muco. Questa teoria è stata ulteriormente supportata dai risultati ottenuti dall'analisi turbidimetrica e reologica, le quali hanno evidenziato l'assenza di interazioni mucoadesive con i componenti del muco artificiale.

Gli studi di vitalità cellulare, condotti su cellule epiteliali bronchiali umane (16-HBE) e macrofagiche (RAW 264.7), hanno mostrato una bassa citotossicità per tutti i campioni ibridi (superiore all'80%). In particolare, le cellule RAW 264.7 trattate con Man-LPHFNPs vuote o caricate col farmaco hanno mostrato un effetto citotossico paragonabile a quello del farmaco libero, probabilmente dovuto all'internalizzazione mediata dalla presenza di mannosio sulla superficie. Questo effetto è stato confermato da studi di *uptake*.

In particolare, è stato dimostrato che le Man-LPHFNPs vengono internalizzate dalle RAW 264.7 e che questo *uptake* è annullato in presenza di mannosio libero.

Inoltre, non è stato osservato alcuna internalizzazione di particelle non direzionate da parte delle stesse cellule, dimostrando il ruolo chiave del mannosio e del recettore CD-206 nel processo di internalizzazione.

Infine, allo scopo di superare le limitazioni aerodinamiche dei nanocarrier per l'inalazione, è stato realizzato, tramite *spray-drying*, un sistema di *drug-delivery* polmonare composto da Man-LPHFNPs@Roflumilast e da alcool polivinilico (PVA) e L-leucina (Leu), utilizzando la strategia NiM.

Sono state prodotte così delle NiM sferiche con dimensioni adatte per una deposizione polmonare ottimale.

Considerando questi risultati incoraggianti, la formulazione ottenuta potrebbe rappresentare un

buon candidato come vettore per la somministrazione polmonare di Roflumilast per il trattamento della BPCO.

3.4. Sviluppo di una formulazione Nano into Micro (NiM) a base di sistemi ibridi lipide-polimero per la veicolazione inalatoria di siRNA nella terapia genica antinfiammatoria

La somministrazione di *small interfering RNA* (siRNA) per via inalatoria, ad oggi, possiede un potenziale unico per il trattamento di diverse patologie polmonari croniche, grazie alla sua capacità di silenziare l'espressione del gene bersaglio in modo post-trascrizionale. Tuttavia, per rendere efficace una somministrazione di siRNA a livello polmonare, è necessario un sistema di veicolazione adeguatamente progettato, capace di complessare stabilmente il siRNA, proteggerlo e veicolarlo attraverso le barriere polmonari, e rilasciarlo nel citosol delle cellule bersaglio, superando prima la membrana della cellula e successivamente quella endosomiale/lisosomiale.^{111,123}

A tal proposito, i polimeri cationici sintetici rappresentano degli ottimi candidati, grazie al fatto che possono essere realizzati con proprietà strutturali e funzionali adeguate in grado di conferire caratteristiche specifiche necessarie per un vettore di materiale genetico.¹¹²

Alla luce di tali considerazioni, il quarto lavoro si propone di sviluppare una formulazione innovativa *Nano into Micro* (NiM) a base di sistemi ibridi lipide-polimero per la veicolazione inalatoria di siRNA. In particolare, combinando i vantaggi dei *nanocarrier* ibridi, già dimostrati nel precedente lavoro, con quelli dei polimeri cationici, sono stati realizzati con successo dei sistemi, capaci di complessare il siRNA e di rilasciarlo nel citosol delle cellule bersaglio, resi inalabili sottoforma di microparticelle tramite la strategia NiM.

3.4.1. Sintesi e caratterizzazione del copolimero

Considerata la necessità di produrre nuovi polimeri protonabili con varie funzionalità al fine di conferire proprietà diverse a una singola macromolecola, in questo lavoro è stato sintetizzato

un nuovo derivato cationico anfifilico del PHEA, già ampiamente utilizzato per lo sviluppo di vettori genici polimerici rivelatisi altamente performanti.^{112,169,182}

In particolare, la sintesi del copolimero *graft* cationico PHEA-g-bAPAE-g-DY676-g-PLGA è stata effettuata in 3 step successivi.

Il primo step ha riguardato la derivatizzazione del *backbone* polimerico del PHEA con la poliammina l'1,2-bis(3-amminopropilammino)etano (bAPAE), al fine di ottenere il copolimero cationico *graft* PHEA-g-bAPAE, avente in catena laterale ammine protonabili, le quali conferiscono al copolimero risultante capacità complessanti del materiale genico, mediante interazioni elettrostatiche.¹⁸³

La reazione è stata condotta utilizzando il bis-nitrofenil carbonato (BNFC) come attivante dei gruppi idrossilici del PHEA, scegliendo un rapporto molare tra BNFC e unità ripetitive di PHEA pari a 0.6.

In particolare, l'attivazione dei gruppi ossidrilici del PHEA con BNPC è stata condotta in DMF a 40°C per 4h. Successivamente il PHEA attivato è stato posto a reagire per 24 ore a 25°C con un eccesso di bAPAE, al fine di evitare possibili processi di reticolazione. La procedura di sintesi e la struttura molecolare del copolimero PHEA-g-bAPAE è riportata in **Figura 66**.

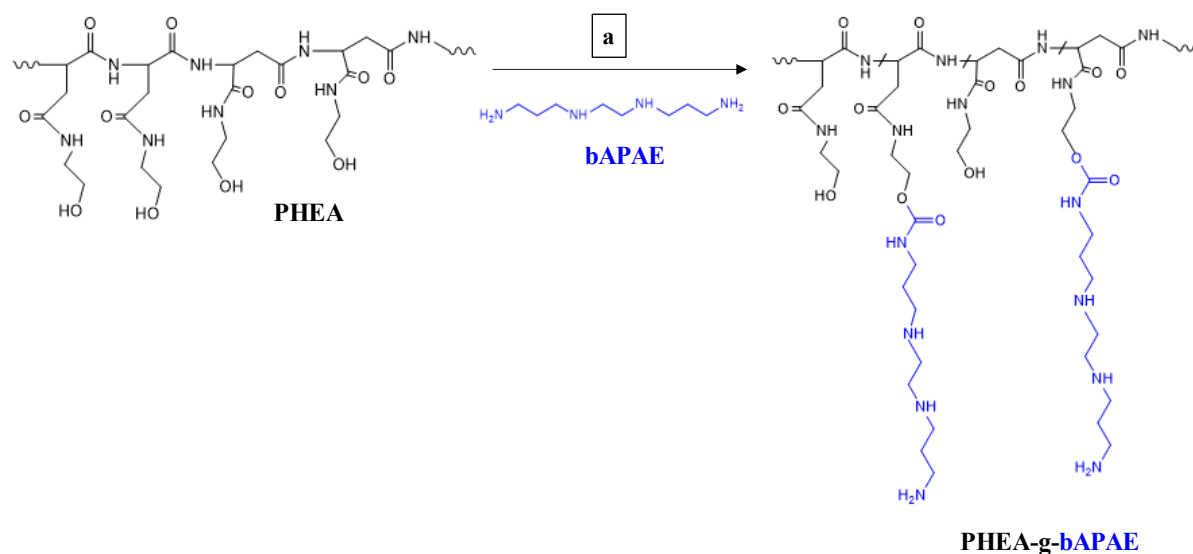


Figura 66. Schema di sintesi del copolimero PHEA-g-bAPAE. Condizioni sperimentali: **a)** a-DMF, BNFC, 4h a 40°C, 20h a 25°C. *Backbone* del PHEA (nero); bAPAE (blu).

Una volta ottenuto e purificato, il copolimero è stato caratterizzato mediante analisi $^1\text{H-NMR}$ e SEC.

Il grado di derivatizzazione in moli % di bAPAE (DD_{bAPAE}) rispetto alle moli di unità ripetitive (U.R.) del copolimero PHEA-g-bAPAE è stato calcolato dallo spettro $^1\text{H-NMR}$ (**Figura 67**) registrato in D_2O a pD 5 rapportando l'integrale dei picchi a δ 1,70-2,20 relativi ai protoni della bAPAE legata (4H_{bAPAE} - $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH-}$), all'integrale del picco a δ 2,73 relativo ai protoni del PHEA (2H_{PHEA} - $\text{COCHCH}_2\text{CONH-}$).

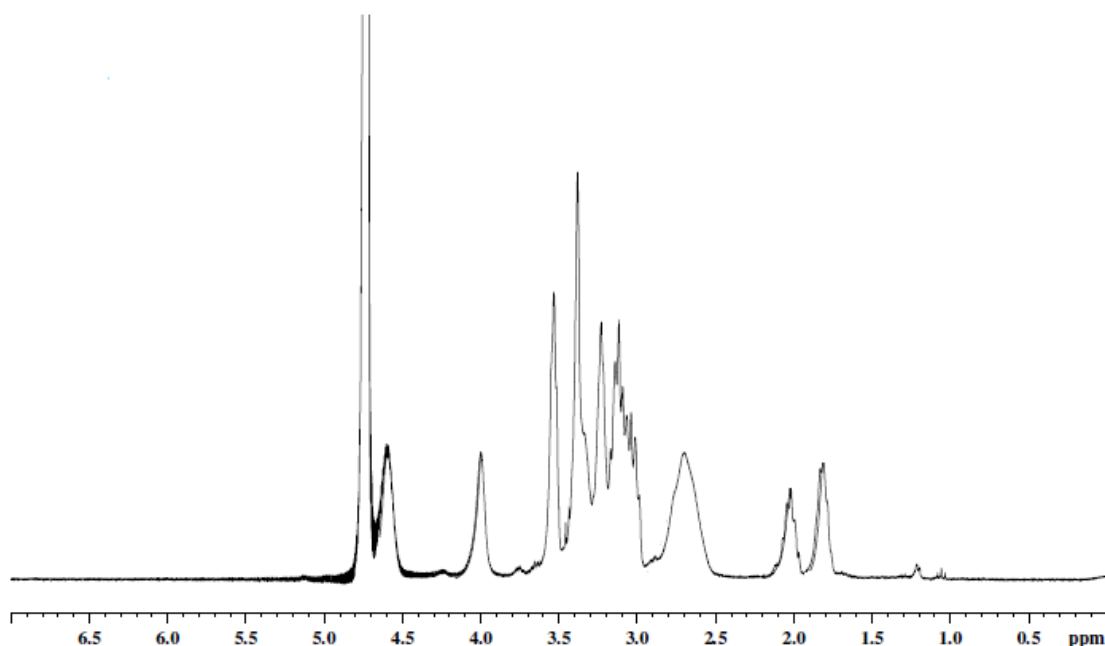


Figura 67. Spettro ^1H -NMR del copolimero *graft* PHEA-g- bAPAE in D_2O a pD 5.

Il DD_{bAPAE} del copolimero PHEA-g-bAPAE, espresso come valore medio di tre determinazioni, è risultato pari a 35 mol% che equivale a circa 35 molecole di bAPAE legate ogni 100 unità ripetitive di PHEA.

Il peso molecolare medio pesato ($\bar{M}_w$) del PHEA-g-bAPAE è risultato pari a 20.921 g/mol con un indice di polidispersità ($\bar{M}_w/\bar{M}_n$) pari a 1,41. Pertanto, su ogni catena polimerica sono presenti circa 35 catene di bAPAE.¹⁸³

Successivamente, il derivato cationico PHEA-g-bAPAE ottenuto è stato funzionalizzato con una sonda fluorescente *far-red*, la DY676 (**Figura 68**), al fine di rendere il copolimero fluorescente e quindi facilitarne la caratterizzazione tecnologica e biologica.

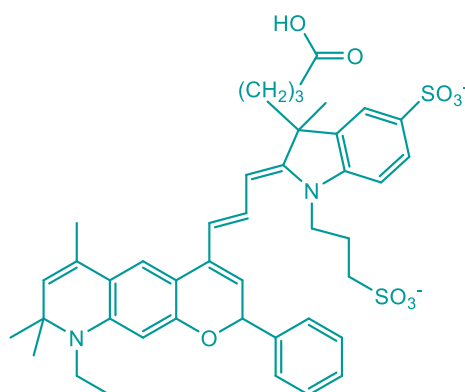


Figura 68. Struttura chimica della sonda *far-red* DY676.

La DY676 presenta un picco massimo di assorbimento/emissione in etanolo a 674 nm/699 nm, ha una assorbanza molare di $180.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ed è solubile in acqua, metanolo, DMF e DMSO. È una sonda utilizzata per condurre studi di imaging a fluorescenza in vivo, di microscopia confocale a scansione laser (CLSM) e di imaging NIRF macroscopico a lunghezze d'onda $> 670 \text{ nm}$.¹⁸⁴

Diversi studi hanno evidenziato importanti proprietà della DY676, quali la stabilità termica e fotochimica, la rapida *clearance* in vivo della sonda libera, e la bassa citotossicità.¹⁸⁴

Pertanto, il secondo *step* di sintesi è stata quella del copolimero *graft* fluorescente cationico PHEA-g-bAPAE-g-DY676 attraverso una reazione condotta in dimetilsolfossido anidro (DMSO-a), utilizzando il CDI come attivante dei gruppi carbossilici della DY676. La procedura di sintesi e la struttura molecolare del copolimero PHEA-g-bAPAE-g-DY676 è riportata in **Figura 69**.

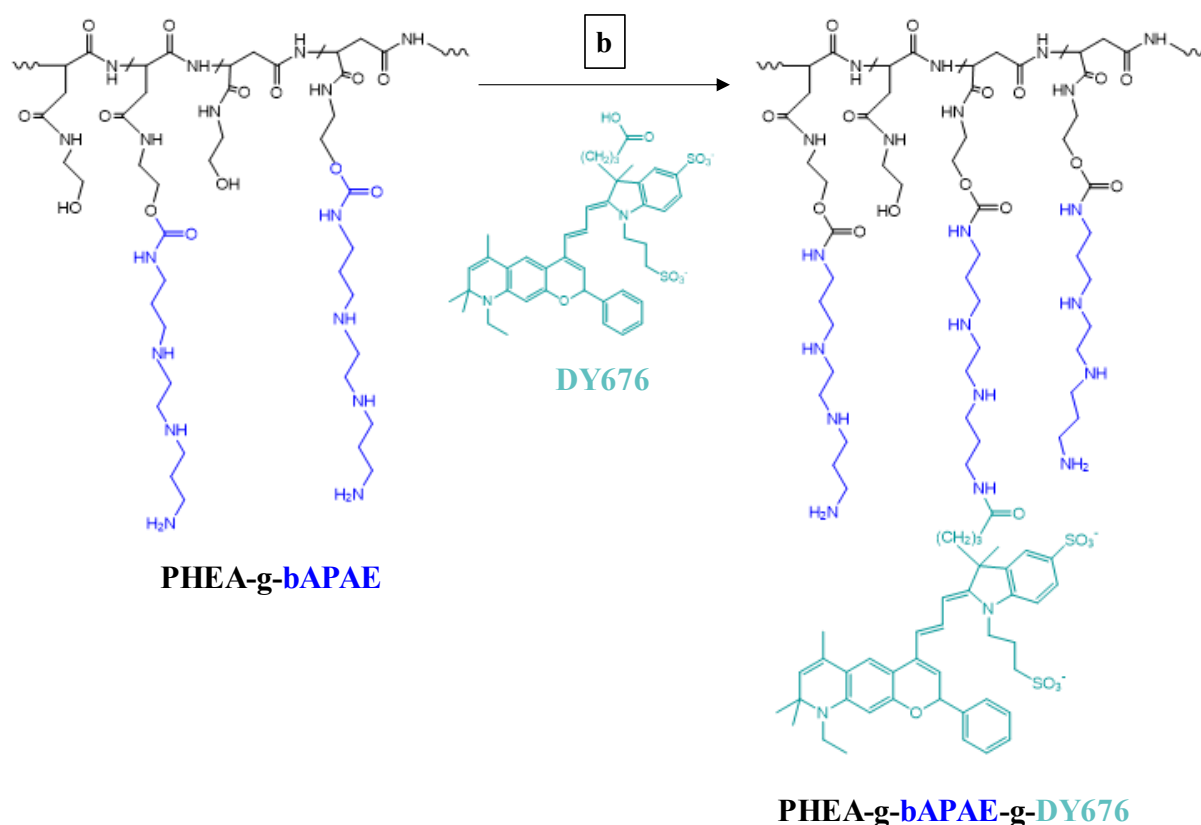


Figura 69. Schema di sintesi del copolimero PHEA-g-bAPAE-g-DY676. Condizioni sperimentali: **a)** a-DMSO, CDI, 4h a 40°C, 48h a 25°C. *Backbone* del PHEA (nero); bAPAE (blu), DY676 (verde acqua).

Le quantità di DY676 e CDI utilizzate sono state calcolate secondo i rapporti molari riportati nella parte sperimentale.

La quantità di sonda legata effettivamente coniugata al copolimero è stata calcolata, in maniera indiretta, mediante il metodo della dialisi, seguendo la procedura riportata nella parte sperimentale. La reazione è risultata essere quantitativa ed il grado di derivatizzazione in moli % della DY676 (DD_{DY676}) rispetto alle moli di unità ripetitive (U.R.) del copolimero PHEA-g-bAPAE-g-DY676 è risultato pari all'0,4 mol%.

Il terzo e ultimo *step* di sintesi ha riguardato la derivatizzazione del copolimero PHEA-g-bAPAE-g-DY676 con il PLGA, con lo scopo di ottenere il copolimero *graft* PHEA-g-bAPAE-

g-DY676-g-PLGA, cationico ed anfifilico, insolubile nei fluidi acquosi, in grado di dar vita a strutture nanoparticellari polimeriche, in cui la porzione policationica di bAPAE complessa il siRNA, mentre la porzione idrofobica ingloba i complessi in una struttura nanoparticellare, in grado di proteggere il siRNA in essa incorporato.

In dettaglio, la reazione è stata condotta in DMF-a, utilizzando CDI come attivante dei gruppi carbossilici del PLGA. La procedura di sintesi e la struttura molecolare del copolimero PHEA-g-bAPAE-g-DY676-g-PLGA è riportata in **Figura 70**.

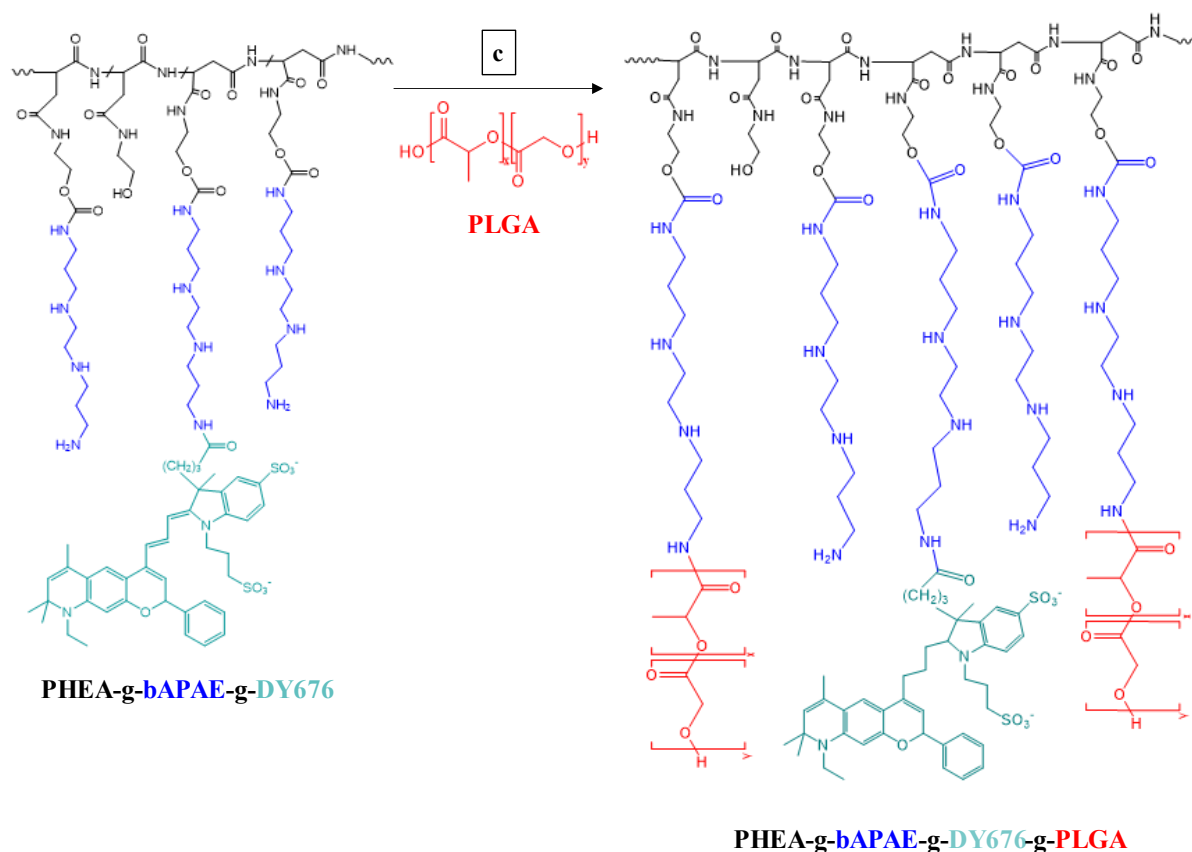


Figura 70. Schema di sintesi del copolimero PHEA-g-bAPAE-g-DY676-g-PLGA. Condizioni sperimentali: **a)** a-DMSO, CDI, 4h a 40°C, 48h a 40°C. *Backbone* del PHEA (nero); bAPAE (blu), DY676 (verde acqua), PLGA (rosso) (x e y=92).

Le quantità di PLGA e CDI utilizzate sono state calcolate considerando i rapporti molari riportati nella parte sperimentale.

Il grado di derivatizzazione in moli % di PLGA (DD_{PLGA}) rispetto alle moli di unità ripetitive (U.R.) del copolimero PHEA-g-bAPAE-g-DY676-g-PLGA è stato calcolato dallo spettro ^1H -NMR registrato in DMF- d_7 (**Figura 71**) a 25 °C rapportando l'integrale dei picchi tra δ 1,5-1,7 (m, 3-HPLGA [-OCOCH(CH₃)]₉₂) relativi ai protoni del PLGA legato, all'integrale del picco δ 3,50 [t, 2-HPHEA -NHCH₂CH₂O-] relativo ai protoni del PHEA.

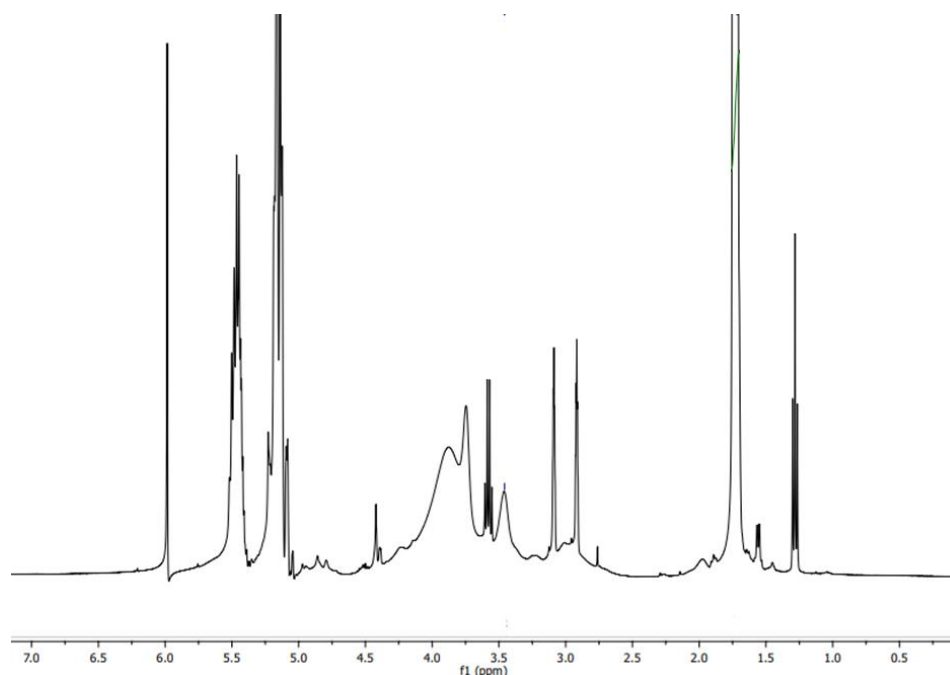


Figura 71. Spettro ^1H -NMR del copolimero *graft* PHEA-g-bAPAE-g-DY676-g-PLGA in DMF- d_7 .

Il DD_{PLGA} del copolimero PHEA-g-bAPAE-g-DY676-g-PLGA è stato espresso come valore medio di tre determinazioni ed è risultato pari a 4,55 mol%, quindi ogni 100 unità ripetitive di PHEA, in media 4-5 sono funzionalizzate con il PLGA. Questa funzionalizzazione è risultata

essere sufficiente a rendere il copolimero insolubile in acqua, ma solubile in solventi organici quali dimetilformammide, dimetilacetammide, diclorometano e cloroformio.

Il $\bar{M}_w$ del PHEA-g-bAPAE-g-DY676-g-PLGA, determinato mediante analisi SEC, è risultato pari a 195.827 Da con un indice di polidispersità ($\bar{M}_w/\bar{M}_n$) pari a 1,97.

Allo scopo di valutare la stabilità della sonda covalentemente legata al *backbone* polimerico, è stato effettuato, sia per il PHEA-g-bAPAE-g-DY676 che sulle nanoparticelle ottenute a partire dal PHEA-g-bAPAE-g-DY676-g-PLGA, uno studio di stabilità, utilizzando il metodo della dialisi, e incubando ciascun componente a 37°C in fluido polmonare simulato (SLF), a pH 7,4 contenente DPPC (0,02% p/v) e in fluido lisosomiale simulato (*artificial lysosomal fluid*, ALS) a pH 4,5, per 24 ore. Quest'ultimo simula il fluido con cui le particelle inalate possono entrare in contatto dopo essere state fagocitate dai macrofagi alveolari e interstiziali nel polmone.¹⁸⁵

La quantità di sonda rilasciata è stata quantificata come descritto nella parte sperimentale e i risultati, espressi in % p/p rispetto alla sonda legata al polimero, sono riportati in **Figura 72** per il PHEA-g-bAPAE-g-DY676, e in **Figura 73** per le nanoparticelle di PHEA-g-bAPAE-g-DY676-g-PLGA.

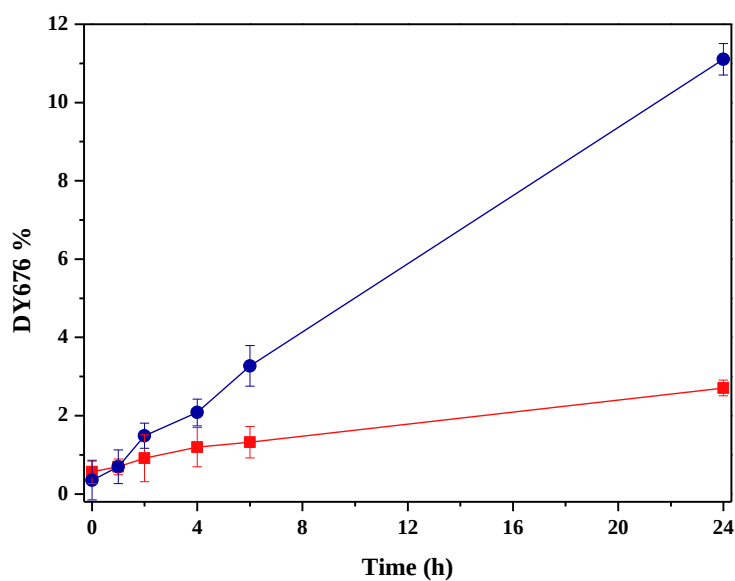


Figura 72. % DY676 rilasciata dal copolimero PHEA-g-bAPAE-g-DY676 incubato a pH 4,5 (blu) e a pH 7,4 (rosso). Dati riportati come media di 3 analisi differenti.

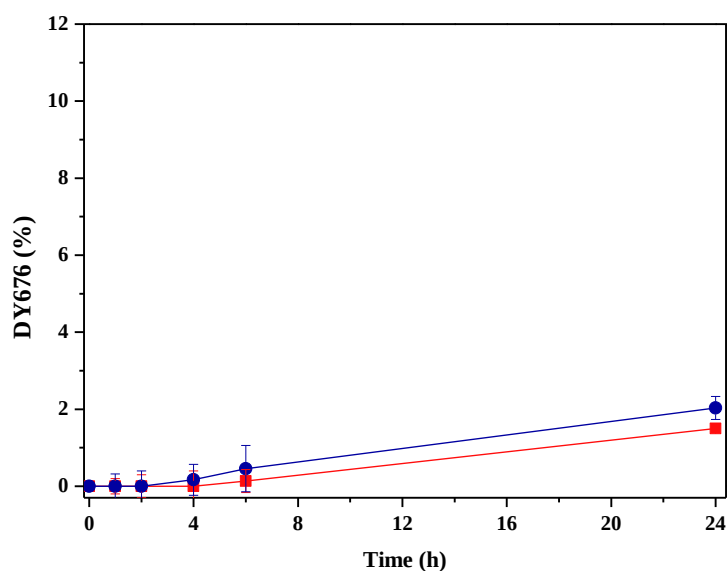


Figura 73. % DY676 rilasciata dalle nanoparticelle di PHEA-g-bAPAE-g-DY676-PLGA incubate a pH 4,5 (blu) e a pH 7,4 (rosso). Dati riportati come media di 3 analisi differenti.

Dal grafico si evince che mentre il copolimero PHEA-g-bAPAE-g-DY676, affine al fluido scelto, rilascia circa l'11% e il 3% di sonda, rispettivamente, a pH 4,5 e 7,4 dopo 24 ore di

incubazione, la sonda rilasciata dalle nanoparticelle, disperse negli stessi mezzi, è inferiore al 2%, rispetto a quella legata, dopo 24 ore di incubazione. Questo dato dimostra che essa è stabilmente legata al polimero e che la incorporazione nelle nanoparticelle riduce la suscettibilità dei legami ammidici all'idrolisi rispetto a quelli presenti sul PHEA-g-bAPAE-g-DY676.

3.4.1.1. Studi di complessazione

Considerati i dati di caratterizzazione finora ottenuti, si evince che il copolimero PHEA-g-bAPAE-g-DY676-PLGA possiede nella sua struttura chimica sia una quantità di PLGA pari a circa il 4% in moli, che una quantità di ammina pari a circa il 35% in moli, pertanto è potenzialmente in grado sia di formare strutture nanoparticellari che di complessare il siRNA. Per questo motivo, è stata valutata la capacità del copolimero sintetizzato di complessazione del siRNA.

Come siRNA modello ne è stato scelto uno in grado di ridurre l'espressione della *Green Fluorescent Protein* (GFP). La GFP, estratta dalla medusa *Aequorea Victoria*, rappresenta un gene *reporter* largamente utilizzato nella ricerca scientifica come marcatore di geni, proteine e cellule.¹²³

Lo studio di complessazione è stato effettuato miscelando due volumi uguali di due dispersioni, una contenente una concentrazione fissa di siRNA e l'altra contenente una concentrazione crescente di copolimero, al fine di ottenere diversi rapporti in peso polimero/siRNA (R), compresi tra 1 e 10. Per valutare la formazione di complessi stabili, è stata poi eseguita un'analisi elettroforetica su gel di agarosio dei complessi ottenuti; i risultati sono riportati in **Figura 74**.

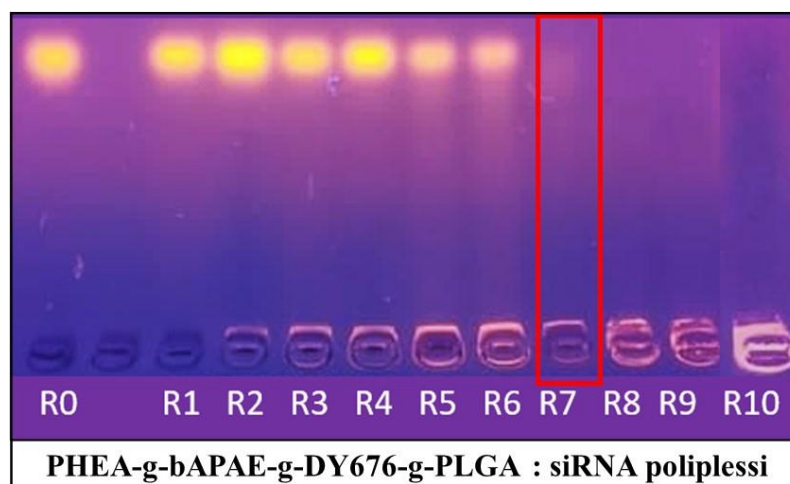


Figura 74. Elettroforesi su gel di agarosio dei poliplessi PHEA-g-bAPAE-g-DY676-g-PLGA: siRNA ottenuti con rapporti in peso copolimero/siRNA (R) compresi tra 1 e 10.

Come si evince, il copolimero PHEA-g-bAPAE-g-DY676-g-PLGA è stato in grado di ritardare la corsa elettroforetica delle molecole di siRNA a partire da un R pari a 7, che corrisponde ad una concentrazione di polimero pari a 0,7 mg/ml. In queste specifiche condizioni, il rapporto in carica azoto/fosforo (N/P) calcolato è risultato pari a circa 3. Generalmente, più basso è il valore di rapporto in carica N/P necessario per ottenere complessi stabili, minore è la tossicità del sistema risultate, in quanto maggiore è il contenuto in polimero cationico, maggiore è il numero di cariche positive che possono indurre tossicità cellulare.

Nel nostro caso, la quantità di copolimero PHEA-g-bAPAE-g-DY676-g-PLGA necessaria per arrestare la corsa elettroforetica del siRNA è risultata piuttosto bassa se confrontata con altri copolimeri sintetici proposti come vettori non virali per la terapia con siRNA.¹¹²

3.4.2. Preparazione e caratterizzazione delle nanoparticelle ibride lipide-polimero (LPHNPs)

Una volta dimostrate le ottime capacità complessanti del copolimero PHEA-g-bAPAE-g-DY676-g-PLGA, a partire da questo sono state preparate delle nanoparticelle ibride lipide-

polimero (LPHNPs), contenenti il siRNA in grado di silenziare la GFP (siGFP), potenzialmente sfruttabili per il trattamento di patologie respiratorie.

I vantaggi associati all'utilizzo di sistemi ibridi lipide-polimero per la veicolazione inalatoria di farmaci sono già stati discussi nel precedente capitolo.¹³⁷

Alla luce di ciò, il copolimero ottenuto è stato utilizzato come materiale costituente il *core* polimerico, rivestito da uno shell fosfolipidico, altamente biocompatibile, costituito da una miscela DPPC e DSPE-PEG₂₀₀₀, potenzialmente in grado di aumentare la stabilità del siRNA complessato all'interno del nucleo polimerico e di limitare l'aggregazione dei nanosistemi in mezzi acquosi.

Mentre il DPPC è il maggior costituente del surfactante polmonare, il DSPE-PEG₂₀₀₀ potrebbe conferire proprietà *stealth* al sistema risultante, evitandone il riconoscimento da parte delle cellule del sistema immunitario e proprietà mucodiffusive, permettendo così il raggiungimento dell'epitelio alveolare.¹⁸⁶

Le LPHNPs caricate con il siRNA (LPHNPs@siGFP), sono state preparate mediante la tecnica di emulsione/evaporazione del solvente, come riportato in letteratura.¹¹⁷

La rappresentazione schematica del processo di produzione delle LPHFNPs è riportata in **Figura 75**.

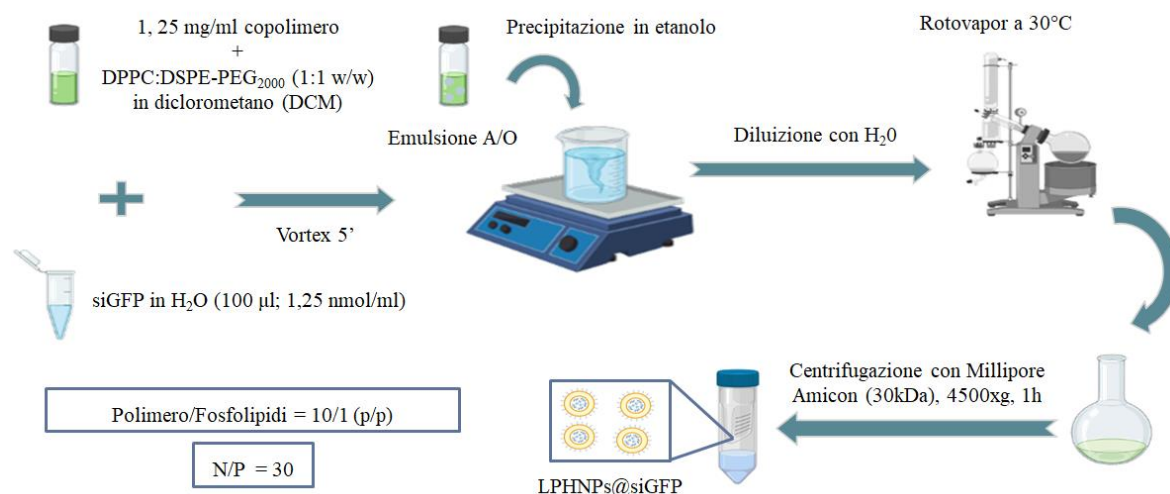


Figura 76. Rappresentazione schematica del processo di produzione delle LPHNPs@siGFP.

In particolare, il processo prevede che dapprima sia preparata una dispersione di copolimero e fosfolipidi in diclorometano, la quale viene poi emulsionata, mediante vortex, con 100 µL di una soluzione acquosa contenente il siGFP (1,25 nmol/ml). In seguito, l'emulsione a/o viene aggiunta goccia a goccia all'etanolo 96% e, dopo agitazione, diluita con uno stesso volume di acqua. Successivamente, il solvente organico è allontanato dalla dispersione di particelle ottenute a pressione ridotta e alla temperatura di 30°C. Le LPHNPs si purificano utilizzando tubi Millipore Amicon (30 kDa) e il pellet ottenuto è disperso in acqua e successivamente liofilizzato senza l'ausilio di crioprotettori.

Studi preliminari di caratterizzazione chimico-fisica e biologica hanno orientato la scelta verso sistemi ibridi ottenuti a partire da una concentrazione iniziale di copolimero pari a 1,25 mg/ml e un rapporto in peso polimero/fosfolipide pari a 10/1 (p/p). Infatti, mantenendo costante la concentrazione di siGFP, partendo da concentrazioni più alte di copolimero rispetto a quella scelta (1,25 mg/ml), sono stati ottenuti dei nanosistemi più citotossici e mucoadesivi mentre, a concentrazioni più basse, non è stato possibile ottenere delle strutture nanoparticellari in mezzo acquoso. Dall'altra parte, mantenendo costanti sia la concentrazione di siGFP che quella del

copolimero di partenza, rapporti in peso polimero/fosfolipide più alti di quello scelto (10/1 p/p) hanno dato luogo a fenomeni di flocculazione in seguito all'evaporazione del solvente, mentre utilizzando rapporti in peso più bassi sono stati ottenuti dei nanosistemi più mucoadesivi e con una maggiore tendenza ad aggregarsi in ambiente acquoso (dati non mostrati).

Pertanto, una volta ottimizzato il processo di produzione, le LPHNPs@siGFP, ottenute con una resa pari a circa il 70% p/p rispetto alla quantità iniziale di tutti i componenti, sono state opportunamente caratterizzate dal punto di vista chimico-fisico e biologico.

In particolare, sono state determinate le dimensioni medie, espresse come *Z-Average*, e la carica superficiale mediante misure di DLS, sia pre- che post- essiccamento mediante un processo di liofilizzazione (**Tabella 17**).

Tabella 17. Valori di dimensione media, PDI, potenziale ζ ed EE% delle LPHNPs@siRNA pre- e post- processo di liofilizzazione. Dati riportati come media di 3 esperimenti differenti.

	Z-average (nm $\pm$ S.D.)	PDI $\pm$ S.D.	ζ Potential (mV $\pm$ S.D.)	EE%
Pre-liofilizzazione/acqua milliQ				
LPHNPs@siGFP	163,5 $\pm$ 1,7	0,10 $\pm$ 0,03	27,3 $\pm$ 8,9	99,12 $\pm$ 0,3
Post-liofilizzazione/acqua milliQ				
LPHNPs@siGFP	213,3 $\pm$ 1,8	0,22 $\pm$ 0,04	28,0 $\pm$ 10,3	98,72 $\pm$ 0,6

Come si evince dalla tabella, il campione ottenuto presenta delle dimensioni di circa 163 nm e una bassa polidispersità, essendo questo valore inferiore a 0,1. L'analisi DLS è stata ripetuta in seguito al processo di liofilizzazione, al fine di valutare come questo influenzi le caratteristiche delle LPHNPs una volta ridisperse in acqua bidistillata. I dati ottenuti suggeriscono che la liofilizzazione determina un incremento delle dimensioni particellari e del PDI, sebbene i valori ottenuti restino pur sempre accettabili, essendo le dimensioni <250nm e il PDI <0,25. Questo

risultato potrebbe essere dovuto alla quantità in eccesso di copolimero utilizzato nella preparazione rispetto a quella dei fosfolipidi (polimero/fosfolipidi = 10/1 p/p).

La carica superficiale delle LPHNPs@siGFP (potenziale ζ riportato in **Tabella 17**) è risultata positiva, vista la presenza della poliammina nella struttura del polimero senza differenze significative tra i valori ottenuti pre- e post-liofilizzazione.

La quantità di siGFP caricata nel sistema ibrido (vedi **Tabella 17**) è stata determinata mediante saggio *RiboGreen*, seguendo un protocollo riportato in letteratura e descritto nella parte sperimentale.¹⁸⁷ Il saggio è stato effettuato mediante analisi spettrofluorimetrica ottenuta a λ di eccitazione di 480 nm e a λ di emissione di 520 nm, quantificando in modo indiretto la quantità di siGFP non complessato durante la produzione delle LPHNPs e presente nel surnatante, ottenuto dopo l'isolamento delle LPHNPs@siGFP per centrifugazione. L'efficacia di incorporazione (*encapsulation efficiency*, EE%), espressa come rapporto in peso tra la quantità effettivamente incorporata di siGFP e quella iniziale utilizzata per la preparazione del campione, è risultata pari a circa il 99% p/p. Questo dato è stato ulteriormente confermato dalla quantificazione diretta di siGFP, effettuata analizzando il pellet liofilizzato di LPHNPs@siGFP previamente trattato con DMSO al fine di estrarre il siRNA dalle nanoparticelle, essendo il valore di EE% ottenuto pari a circa il 98% p/p.

Per determinare il contenuto percentuale di DPPC e DSPE-PEG₂₀₀₀ nel sistema ottenuto, è stato effettuato il saggio colorimetrico dell'ammonio ferrotiocianato, come riportato nel paragrafo 3.3.3.^{137,175}

Il valore ottenuto, espresso come rapporto % in peso tra il contenuto in fosfolipidi e il peso totale del campione analizzato, è risultato essere pari a ~28,4% p/p. Questo valore risulta essere più elevato rispetto a quello teorico (9%), calcolato sulla base del peso di polimero e fosfolipidi

utilizzati per realizzare le LPHNPs@siGFP indicando, nella pratica, un minore inglobamento di polimero nel campione risultante rispetto al valore teorico.

Al fine di ottenere informazioni sulla morfologia del campione ottenuto, è stata effettuata un'analisi mediante l'uso di un microscopio elettronico a trasmissione (TEM) e un'immagine rappresentativa è riportata in **Figura 77**.

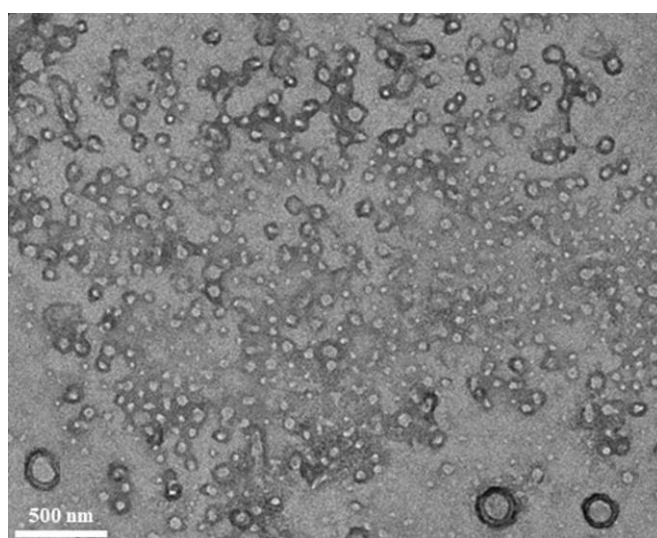


Figura 77. Immagine TEM di LPHNPs@siGFP. La barra rappresenta 500 nm.

Essa evidenzia una morfologia sferica e conferma le dimensioni nanometriche già evidenziate mediante DLS. Inoltre, nell'immagine è possibile individuare una struttura *core-shell*, con un core polimerico, più chiaro, presente nella parte più interna e lo *shell* lipidico scuro, nella parte più esterna, per via dell'aumento di contrasto dato dalla *staining solution*, costituita da acido fosfotungstico (1% p/v), come riportato già per altri sistemi ibridi.^{117,188,189}

3.4.2.1. Valutazione delle interazioni tra LPHNPs@siGFP e mucina

Poiché le LPHNPs prodotte sono state progettate per essere somministrate per via inalatoria, è stata valutata la loro capacità di interagire con la mucina, componente fondamentale del muco presente nelle vie aeree.

In particolare, data la carica negativa della mucina, conferita dalla presenza di residui di acido sialico, questa potrebbe interagire elettrostaticamente con le cariche positive della bAPAE, legata al copolimero che costituisce le LPHNPs, rappresentando un ostacolo alla diffusione di queste ultime per raggiungere le cellule dell'epitelio bronchiale, che rappresentano il target delle principali terapie somministrate al polmone.

Per fare ciò, è stata condotta un'analisi turbidimetrica su dispersioni acquose contenenti mucina (0,08% p/v) e LPHNPs@siGFP (1 mg/ml), e paragonando i valori di assorbanza ottenuti a $\lambda=500$ nm con quelli di dispersioni acquose di sola mucina e di LPHNPs@siGFP da sole (alle stesse concentrazioni utilizzate nella miscela).¹¹⁷

L'analisi turbidimetrica è stata condotta incubando le dispersioni descritte a 25°C per 0, 30 e 60 minuti. I valori di assorbanza ottenuti sono riportati in **Figura 78**.

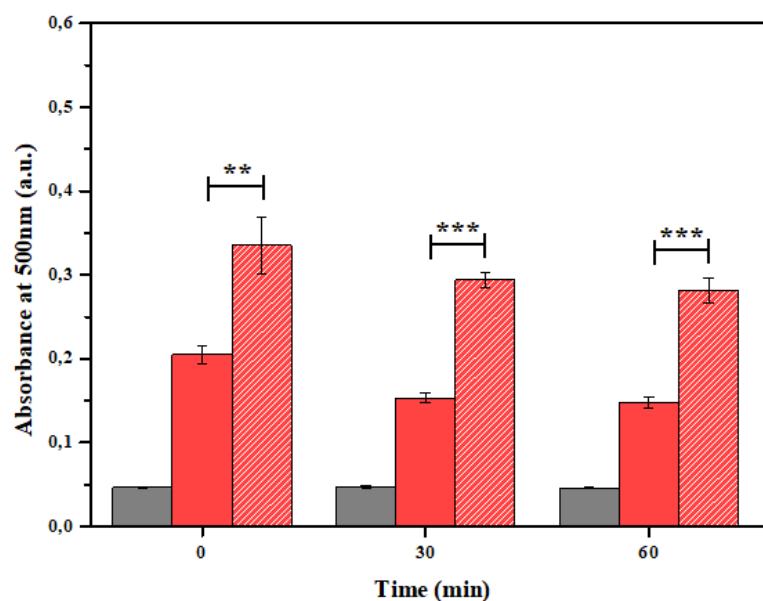


Figura 78. Trasmittanza a 500 nm di dispersioni acquose di mucina da sola (grigio), LPHNPs@siGFP da sole (rosso) e in miscela con la mucina (rosso barrato). Dati riportati come la media di 3 differenti analisi. ($p^{**}<0,01$, $p^{***}<0,001$).

Come si evince dai risultati ottenuti, il sistema LPHNPs@siGFP ottenuto ha mostrato un certo comportamento muco-adesivo, in quanto c'è una differenza significativa in termini di assorbanza in assenza e in presenza di mucina a tutti i tempi di incubazione costante nel tempo, abbastanza prevedibile se consideriamo il valore di potenziale ζ ottenuto. I valori di assorbanza, comunque, sono da considerare bassi essendo al di sotto di 0.2 u.a.

Pertanto, sebbene sia stata confermata la presenza di DPPC e DSPE-PEG₂₀₀₀, aventi rispettivamente carica neutra e negativa, nella struttura ibrida, l'eccesso di copolimero cationico utilizzato per il processo di produzione delle LPHNPs@siRNA è responsabile della formazione di interazioni elettrostatiche con la mucina presente in dispersione acquosa.

3.4.3. Studi di caratterizzazione biologica

Considerando la potenziale applicazione del sistema ibrido LPHNPs@siGFP ottenuto come vettore per la somministrazione polmonare di siRNA, è stata valutata la sua citocompatibilità tramite saggio MTT su cellule di carcinoma polmonare (H1299) a diverse concentrazioni, dopo 24 e 72 ore di incubazione. I risultati sono mostrati nelle **Figura 79 a e b**.

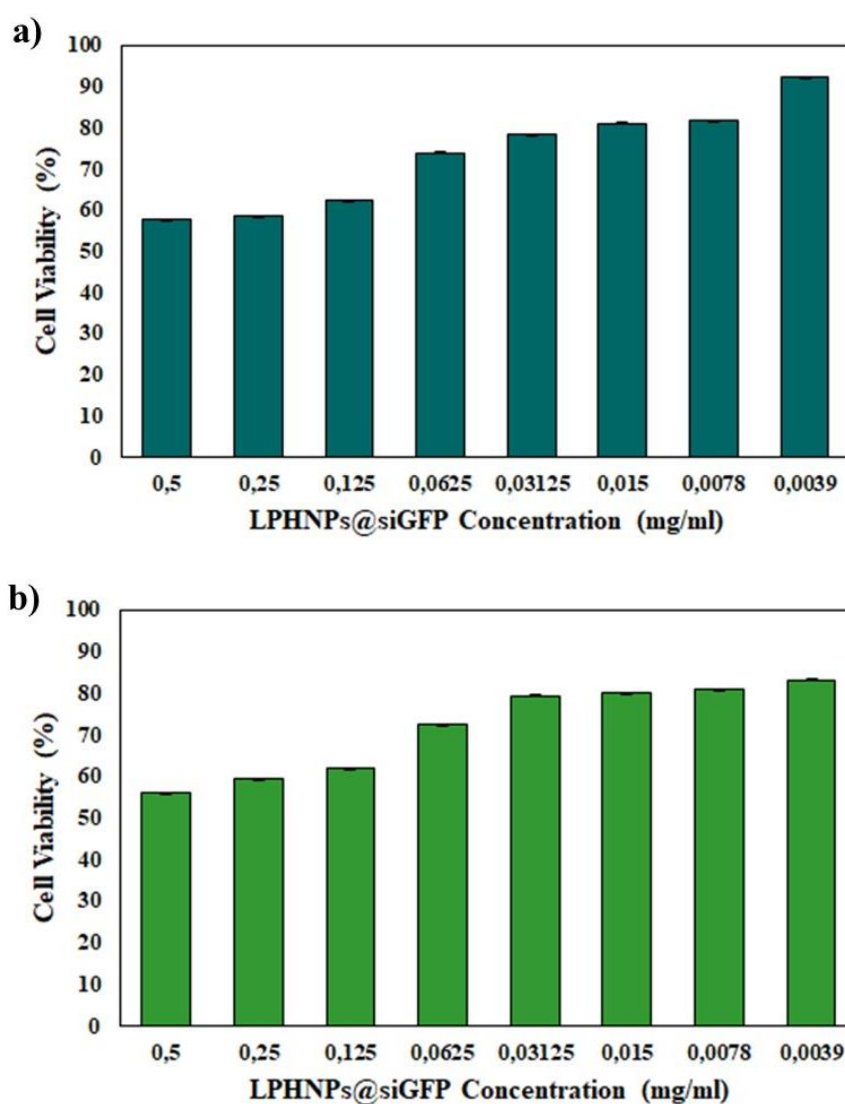


Figura 79. Vitalità cellulare di H1299 dopo **a)** 24 e **b)** 72 ore di incubazione con LPHNPs@siGFP a diverse concentrazioni. Dati riportati come media di 3 esperimenti differenti.

Come si può vedere, dopo 24 ore di incubazione, concentrazioni di particelle ibride superiori alla 0,03125 mg/ml determinano una certa citotossicità sulle cellule H1299, essendo i valori di vitalità ottenuti inferiori all'80% rispetto all'esperimento di controllo, in cui le cellule sono incubate solo con DMEM. Inoltre, non si registra nessuna differenza significativa nei valori di vitalità dopo 72 ore di incubazione.

Poiché gli studi di caratterizzazione finora effettuati hanno dimostrato che il sistema ibrido ottenuto potrebbe essere potenzialmente adatto a una veicolazione polmonare, sia per le sue caratteristiche chimico-fisiche che per le sue capacità di complessare efficacemente il siGFP, lo step successivo è stato quello di valutare la sua capacità di promuovere l'internalizzazione cellulare del materiale genico incorporato.

A tale scopo, sono stati effettuati studi di *uptake* cellulare su cellule H1299, quantificando tramite *Flow Cytometry* l'internalizzazione cellulare sia di un siRNA marcato con la sonda *Alexa Fluor 647* (LPHNPs@siFLUO), incorporato nel nostro sistema seguendo la stessa procedura vista per siGFP, sia delle LPHNPs@siGFP, fluorescenti grazie alla presenza della sonda DY676.

La lipofectamina₂₀₀₀ è stata utilizzata come controllo positivo (siFLUO_LF), mentre il siRNA *naked* 'nudo' (free siFLUO), cioè non complessato, come controllo negativo. I risultati, espressi come intensità di fluorescenza mediana (MFI), sono mostrati in **Figura 80**.

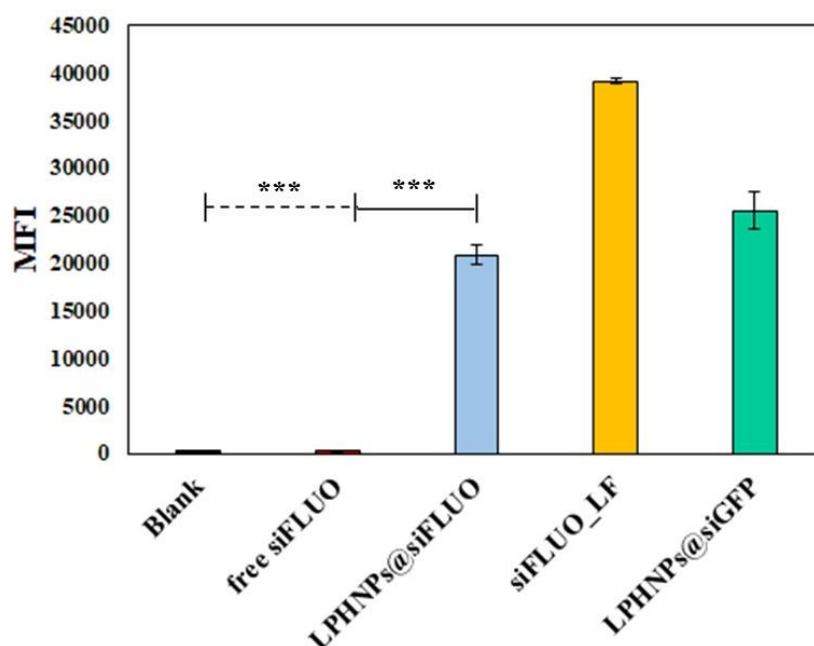


Figura 80. Uptake cellulare di H1299, espresso come MFI, dopo 24 ore di incubazione con LPHNPs@siFLUO e LPHNPs@siGFP (50 pmol siRNA/pozzetto). Free siFLUO e *blank*: controllo negativo; siFLUO_LF: controllo positivo. Dati riportati come media di 3 differenti analisi. ($p^{**}<0,01$, $p^{***}<0,001$).

Come mostrato in **Figura 80**, la MFI relativa al campione LPHNPs@siFLUO, comparabile a quella del campione LPHNPs@siGFP, è significativamente superiore rispetto a quella mostrata dal controllo negativo (*free siFLUO*) e dalle cellule trattate solo con DMEM (*blank*), indicando pertanto una buona internalizzazione del siRNA quando veicolato dal nostro sistema in cellule H1299.

Inoltre, l'uptake cellulare è stato valutato anche qualitativamente mediante *imaging* a fluorescenza. Le immagini registrate, mostrate in **Figura 81**, confermano i risultati ottenuti dall'esperimento di citofluorimetria.

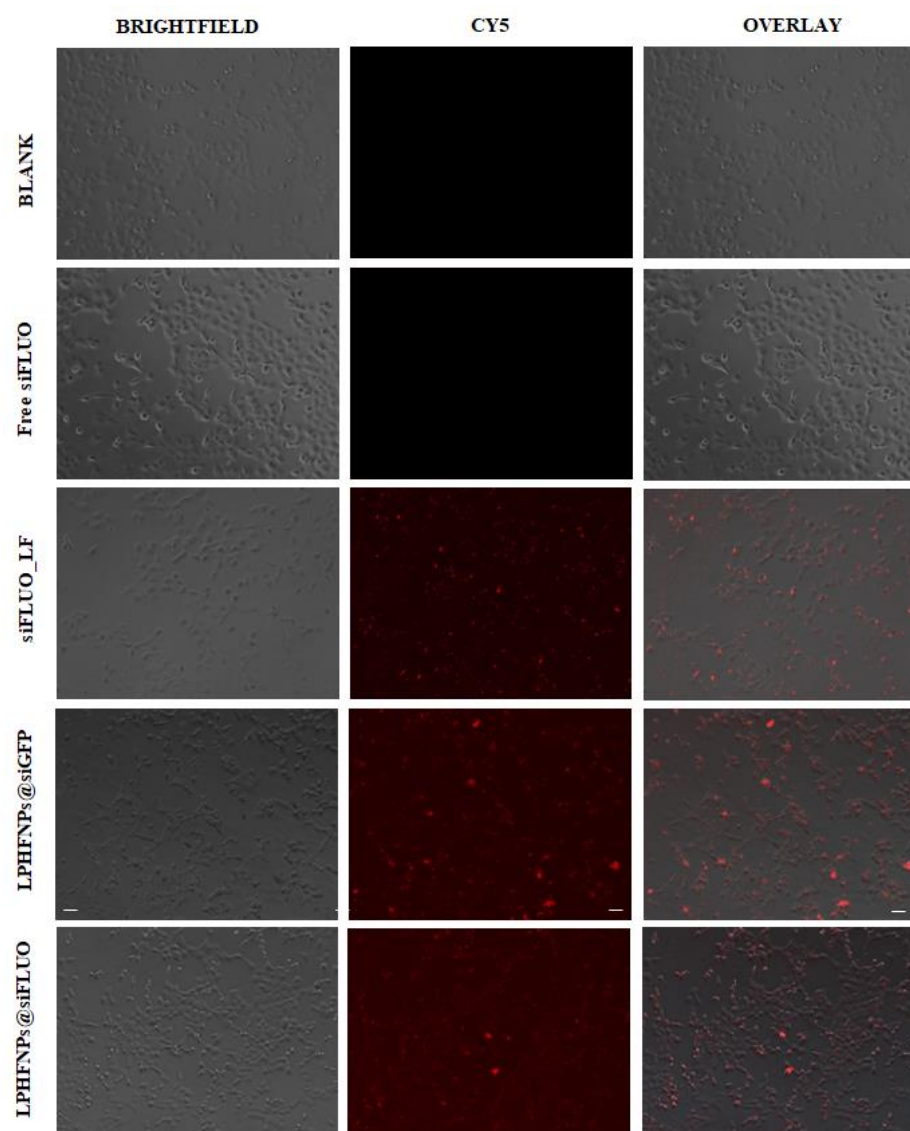


Figura 81. *Uptake* qualitativo in cellule H1299 dopo 24 h di incubazione con LPHNPs@siFLUO e LPHNPs@siGFP, free siFLUO e siFLUO_LF. La barra rappresenta 10 μm .

Una volta dimostrato che il nostro sistema è in grado di essere internalizzato dalle cellule H1299, è stata valutata l'efficacia del silenziamento genico, utilizzando cellule H1299 che esprimono stabilmente il gene *reporter* "enhanced green fluorescent protein" (H1299/eGFP) (eGFP). Le cellule H1299/eGFP sono state trasfettate per 72 ore con LPHNPs@siGFP (formulate con siRNA contro eGFP) e con siRNA *scrambled* (LPHNPs@siNC), quindi non

specifico per la GFP, come controllo negativo. Come controllo positivo, è stata utilizzata la lipofectamina₂₀₀₀. Trascorse le 72 ore, la MFI di eGFP è stata quantificata in ciascun campione tramite *Flow Cytometry*. I risultati ottenuti sono riportati in **Figura 82**.

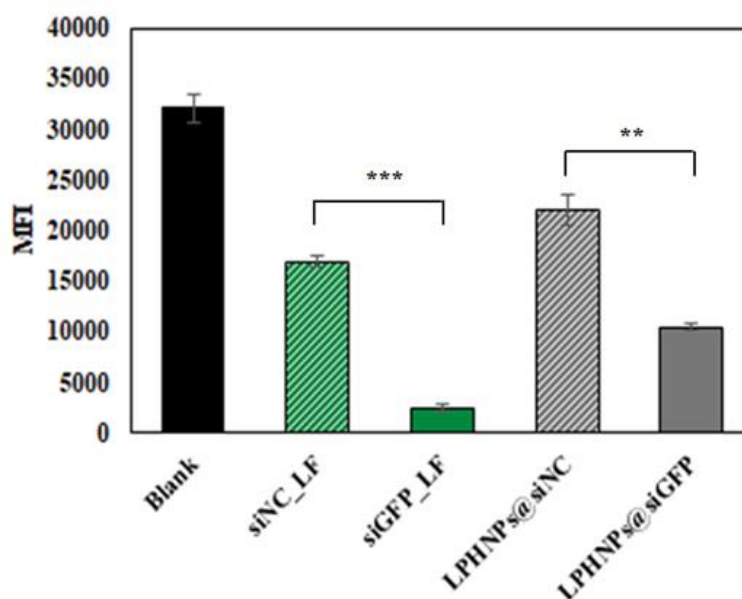


Figura 82. *Gene silencing*, espresso come MFI, nelle cellule H1299/eGFP dopo 72 ore di incubazione con LPHNPs@siFLUO, LPHNPs@siGFP, siNC_LF e siGFP_LF (100 pmol siRNA/pozzetto). Dati riportati come media di 3 differenti analisi. (p**<0,01, p***<0,001).

Come si evince dalla **Figura 82**, il sistema ibrido LPHNPs@siGFP ha determinato un effetto di silenziamento significativo, essendo il valore di MFI significativamente superiore rispetto a quello mostrato da LPHNPs@siNC.

Dai risultati di caratterizzazione biologica ottenuti, possiamo concludere che il sistema ibrido descritto possiede delle ottime potenzialità come vettore per la veicolazione di siRNA.

3.4.4. Formulazione *Nano into Micro* (NiM)

Allo scopo di ottenere una formulazione adatta alla somministrazione polmonare, le LPHNPs@siGFP sono state incorporate all'interno di microparticelle inalabili utilizzando la strategia *Nano in Micro* (NiM).

In particolare, in questo lavoro, le NiM di LPHNPs@siGFP (NiM_LPHNPs@siGFP) sono state ottenute mediante tecnica dello *spray-drying* a partire da una dispersione acquosa di LPHNPs@siGFP contenente trealosio come componente della matrice microparticellare, già ampiamente utilizzato come eccipiente farmaceutico in formulazioni per la somministrazione polmonare di siRNA. È stato già infatti dimostrato che, rispetto ad altri materiali, formulazioni microparticellari a base di trealosio, ottenute tramite processo di *spray-drying*, sono in grado di preservare l'integrità del siRNA, indipendentemente dalla concentrazione dell'eccipiente e dalla temperatura di *out* dello strumento.^{190,191}

Il processo di *spray-drying* è stato ottimizzato al fine di evitare eventuali perdite di siRNA dovute alla sua degradazione termica. I parametri utilizzati sono riportati nella parte sperimentale.

Le NiM_LPHNPs@siGFP ottenute sono state caratterizzate tramite analisi SEM al fine di valutarne la morfologia e le dimensioni (**Figura 83**).

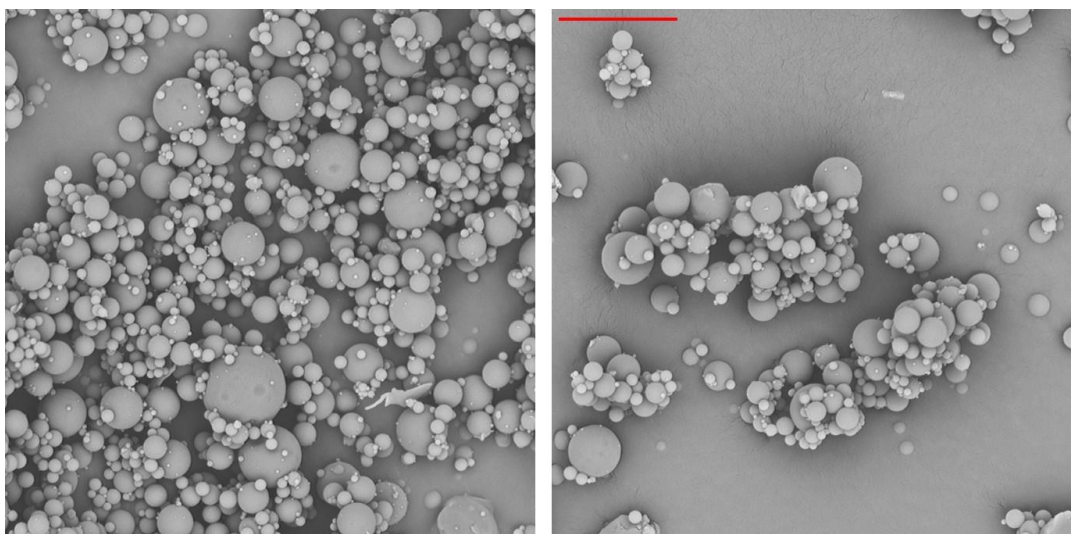


Figura 83. Immagini SEM delle NiM_LPHNPs@siGFP (ingrandimento 6000X; la barra rappresenta 10 μm).

Le NiM mostrano una forma perfettamente sferica e un diametro medio di $3,27 \pm 1,03 \mu\text{m}$, calcolato con l'aiuto del *software ImageJ*, quindi morfologicamente e dimensionalmente adatto per una deposizione polmonare ottimale.

Al fine di valutare se, nelle condizioni operative scelte, il processo di *spray-drying* abbia alterato la stabilità termica di siGFP, ne è stata determinata la quantità, analizzando la polvere di NiM_LPHNPs@siGFP ottenuta con il saggio *RiboGreen*.

I risultati ottenuti mostrano che la quantità di siRNA incorporato nelle NiM_LPHNPs@siGFP, e quindi rimasto integro in seguito al processo di *spray-drying*, espressa come EE%, è risultata pari a circa il 78% p/p; pertanto, rispetto al campione LPHNPs@siGFP, si è verificata una perdita in peso del circa 20% di siGFP a causa della sua degradazione termica, come già riportato altrove.^{190,191}

Al fine di valutare il comportamento aerodinamico della polvere ottenuta, il campione è stato analizzato utilizzando il dispositivo del tipo *dry powder inhaler* (DPI) Handihaler[®] collegato

ad un *Next Generation Impactor* (NGI), secondo procedura riportata nella parte sperimentale.

La deposizione % della polvere negli stadi dell'NGI è riportata in **Figura 84**.

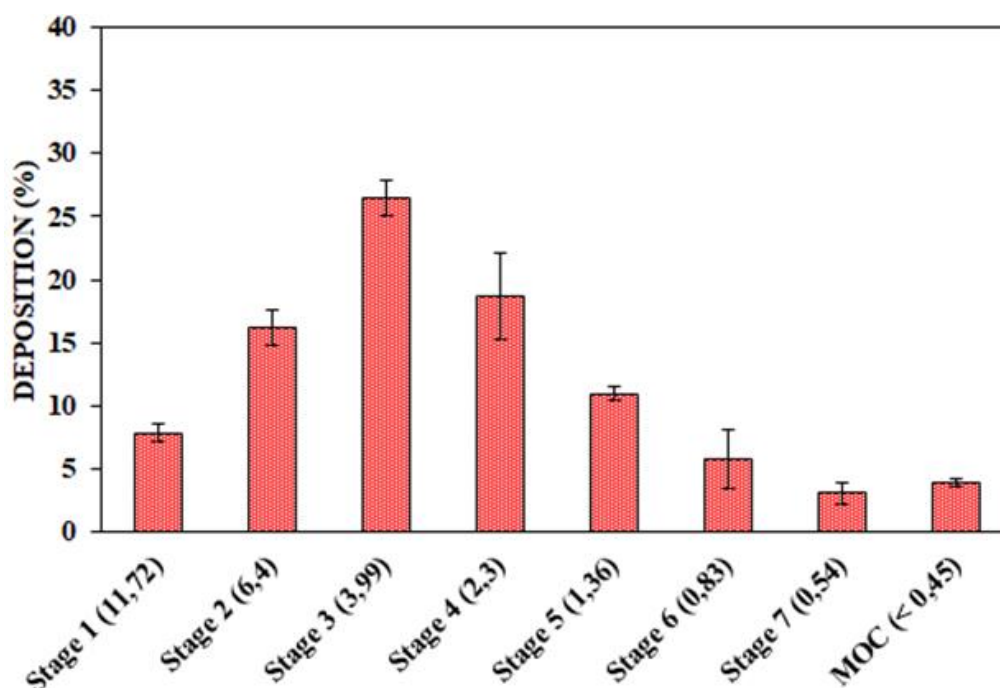


Figura 84. Deposizione% della polvere di NiM di LPHNPs@siGFP negli stage di un NGI, in seguito ad aerosolizzazione tramite Handihaler® con un flusso di 30 L/min. Dati riportati come la media di 3 differenti esperimenti.

Come è possibile notare, la polvere ha mostrato ottime proprietà aerodinamiche, depositandosi principalmente negli stadi intermedi (3 e 4).

Per quanto riguarda i parametri aerodinamici (**Tabella 18**), il campione NiM_LPHNPs@siGFP ha mostrato un'elevata efficienza di aerosolizzazione in termini di ED e FPF, con valori rispettivamente pari a 84 e 64%, e un valore di MMAD, pari a circa 2,96 μm , ottimale per una deposizione nelle parti più profonde del polmone.^{190,191}

Tabella 18. Parametri aerodinamici del campione testato NiM_LPHNPs@siGFP: *emitted dose (ED%)*, *fine particle dose (FPD)*, *fine particle fraction (FPF)*, *mass median aerodynamic diameter (MMAD)*, *geometric standard deviation (GSD)*. Dati riportati come la media di 3 differenti esperimenti.

NiM_LPHNPs@siGFP	
ED%	84,37 ± 2,80
FPD (mg)	3,12 ± 1,50
FPF (%)	64,84 ± 0,43
MMAD (µm)	2,96 ± 0,47
GSD	3,01 ± 0,98

Possiamo pertanto concludere che le NiM di LPHNPs@siGFP mostrano delle caratteristiche morfologiche, dimensionali e di aerosolizzazione adatte ad una somministrazione polmonare.

3.4.5. Conclusioni

In questo quarto lavoro, a partire dal PHEA è stato sintetizzato e caratterizzato un nuovo copolimero cationico anfifilico, il PHEA-bAPAE-g-DY676-g-PLGA, utilizzato come materiale di partenza per la produzione di vettori inalabili per la terapia genica a base di siRNA. La caratterizzazione del copolimero ha evidenziato le ottime capacità complessanti il siRNA, a valori di rapporto in carica azoto/fosforo (N/P) pari a 3.

Successivamente, sono state messe a punto le condizioni per la produzione di nanoparticelle ibride lipide-polimero (LPHNPs), contenenti un siRNA contro la GFP (siGFP), costituite da un core polimerico, ottenuto a partire dal copolimero PHEA-bAPAE-g-DY676-g-PLGA, e da uno shell lipidico costituito da una miscela di DPPC e DSPE-PEG₂₀₀₀ (LPHNPs@siGFP).

Le LPHNPs@siGFP ottenute mostrano dimensioni nanometriche, carica superficiale positiva e sono in grado di incorporare il siRNA efficacemente, con una efficienza di incorporazione percentuale del 98% p/p.

Altre indagini di tipo chimico-fisico hanno evidenziato una morfologia sferica, con una struttura *core-shell*, un contenuto fosfolipidico pari a ~28,4% p/p e proprietà leggermente mucoadesive del sistema.

Studi di caratterizzazione biologica hanno dimostrato una bassa citotossicità del sistema, quando incubato con cellule H1299, buona capacità di essere internalizzato dalle stesse, significativamente più alta rispetto al siRNA *naked* somministrato tal quale, e buone capacità di silenziare il gene eGFP.

Pertanto, possiamo concludere che le LPHNPs@siGFP ottenute soddisfano i criteri necessari per un'efficace somministrazione inalatoria di siRNA in quanto:

- ☞ il siRNA viene contemporaneamente complessato e incorporato in nanoparticelle grazie alle caratteristiche del copolimero; ciò potenzialmente offre una protezione fisica contro l'attività della RNasi e un'elevata stabilità colloidale del sistema;
- ☞ lo shell fosfolipidico, oltre ad attribuire al sistema maggiore stabilità e biocompatibilità, consente alle LPHNPs di essere liofilizzate senza l'utilizzo di alcun crioprotettore, in quanto queste ultime si disperdono nuovamente in un mezzo acquoso dopo essiccamento senza dare aggregati;
- ☞ il siRNA viene efficacemente veicolato dal sistema all'interno delle cellule, dove esplica una buona capacità di silenziamento genico.

Inoltre, le LPHNPs@siGFP possono essere incorporate in matrici micrometriche di trealosio tramite il processo di *spray-drying*, le quali hanno mostrato ottime dimensioni e proprietà di aerosolizzazione, indicandone pertanto un potenziale successo nella somministrazione polmonare.

4. Conclusioni

Considerata la necessità di sviluppare terapie farmacologiche sempre più avanzate per il trattamento di patologie respiratorie croniche, quali la broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO) e la fibrosi cistica (FC), e visti i progressi ottenuti nello sviluppo di formulazioni innovative per la cura delle malattie dell'uomo, nel presente lavoro di dottorato sono stati sviluppati nuovi *pulmonary drug delivery systems* a base polimerica per la somministrazione inalatoria di farmaci per il trattamento delle patologie sopracitate.

In particolare, come polimero di partenza è stata utilizzata l' α,β -poli(N-2-idrossietil)-D,L-aspartammide (PHEA), la quale è stata opportunamente funzionalizzata con molecole di natura idrofila, quali il polietilenglicole (PEG) e l'1,2-bis(3-amminopropilammino)etano (bAPAE), e/o poliesteri idrofobi, quali l'acido polilattico (PLA), l'acido polilattico-co-glicolico (PLGA), il poli- ϵ -caprolattone (PCL), o ancora sonde fluorescenti quali la Rodamina B (RhB) o la DY7676, al fine di ottenere nuovi copolimeri da utilizzare per la realizzazione di differenti carrier di farmaci micro- e nanometrici, potenzialmente in grado di veicolarli al polmone.

Nella prima fase del lavoro sperimentale svolto, sono state realizzate e opportunamente caratterizzate delle microparticelle polimeriche porose aventi proprietà chimico-fisiche e tecnologiche altamente modulabili, per la veicolazione inalatoria della Rapamicina, farmaco recentemente proposto nel trattamento della BPCO.

In particolare, come materiale di partenza è stato utilizzato il copolimero *graft* PHEA-g-RhB-g-PLA, opportunamente processato mediante *spray-drying* (SD). Grazie all'aggiunta di quantità crescenti di bicarbonato di ammonio (AB), sono state ottenute microparticelle altamente biocompatibili con una porosità modulabile in base alla quantità di % di AB utilizzato, ottenendo valori di densità e di diametro aerodinamico adeguati alla deposizione bronchiale.

Le differenze nelle caratteristiche chimico-fisiche sono state evidenziate anche dall'aumento significativo del rilascio di Rapamicina dal campione con una maggiore porosità rispetto a quello con una porosità più bassa.

Nella seconda linea di ricerca, è stato applicato l'approccio *Nano into Micro* (NiM) per incorporare nanoparticelle polimeriche peghilate contenenti un analogo della prostaciclina, l'Iloprost, in microparticelle di mannitolo, potenzialmente utili per la gestione dell'iper-infiammazione associata alla FC.

Per raggiungere tale obiettivo, è stato utilizzato il copolimero *graft* PHEA-g-PLGA-g-PEG come materiale di partenza per produrre nanoparticelle peghilate caricate con Iloprost (NP_PEG+Ilo) mediante nanoprecipitazione. Queste ultime hanno mostrato dimensioni colloidali, carica superficiale leggermente negativa, e capacità di rilasciare in maniera controllata il farmaco intrappolato in un fluido fisiologico simulato. Inoltre, grazie all'elevato grado di peghilaione superficiale, non hanno mostrato alcuna interazione con la mucina.

Al fine di ottenere una formulazione inalabile, è stata applicata la strategia NiM, incorporando le NP_PEG+Ilo in microparticelle a base di mannitolo mediante tecnica dello SD. Le NiM ottenute hanno mostrato caratteristiche chimico-fisiche e tecnologiche adeguate ad una somministrazione polmonare, come forma sferica, dimensioni micrometriche e la capacità delle nanoparticelle peghilate contenenti il farmaco, disperse nelle NiM, di essere rilasciate una volta poste queste ultime a contatto con i fluidi biologici simulati, e di diffondere attraverso il muco artificiale di FC. Infine, la caratterizzazione biologica ha dimostrato che le NP_PEG+Ilo rilasciate dalle microparticelle sono altamente biocompatibili e mostrano un pronunciato effetto antinfiammatorio nei confronti delle cellule CFBE che sovraesprimono il CFTR F508del (CFBE-F508del), in termini di riduzione dell'espressione genica di IL1 β , TNF α , IL-6 e IL-8.

Nella terza parte del lavoro sperimentale, sono state realizzate delle nanoparticelle ibride lipide-polimero (LPHNPs), direzionate ai macrofagi polmonari, come potenziali vettori per la

somministrazione inalatoria del farmaco antiinfiammatorio, il Roflumilast, per il trattamento della BPCO.

Per raggiungere tale obiettivo, nanoparticelle polimeriche fluorescenti caricate con Roflumilast, ottenute per nanoprecipitazione a partire dal derivato anfifilico del PHEA, il PHEA-g-RhB-g-Succ-PCL, e vescicole lipidiche, costituite da una miscela di 1,2-dipalmitoil-sn-glicerolo-3-fosfocolina e 1,2-distearoil-sn-glicerolo-fosfoetanolamina-N-(polietilenglicole)-mannosio, sono state opportunamente combinate con un metodo a due fasi, ottenendo così con successo le nanoparticelle ibride mannosilate fluorescenti caricate con Roflumilast (Man-LPHFNPs@Roflumilast). Queste mostrano dimensioni colloidali, un potenziale ζ negativo, una morfologia di tipo *core-shell* in cui i fosfolipidi rappresentano circa il 50% p/p, e capacità di rilasciare in maniera controllata il farmaco intrappolato in un fluido fisiologico simulato.

L'analisi superficiale ha dimostrato una elevata densità di peghilazione superficiale, la quale conferisce proprietà mucopenetranti ai sistemi risultanti. Le Man-LPHFNPs@Roflumilast mostrano inoltre un'elevata citocompatibilità verso cellule epiteliali bronchiali e macrofagiche e, vengono internalizzate da queste ultime attraverso un processo di *targeting* attivo mediato dal mannosio.

Infine, a partire da queste ultime, sono state realizzate delle NiM a base poli(vinil-alcool)/leucina, tramite SD, aventi caratteristiche chimico-fisiche adeguate alla somministrazione polmonare.

Nell'ultimo lavoro, seguendo sempre l'approccio NiM, sono stati prodotte matrici micrometriche di trealosio, contenenti dei sistemi nanostrutturati ibridi complessanti il siRNA, per una potenziale terapia genica inalatoria.

Per raggiungere tale obiettivo, è stato utilizzato il PHEA-g-bAPAE-g-DY676-g-PLGA come materiale di partenza per la realizzazione di LPHNPs complessanti il siRNA per la *green*

fluorescent protein (LPHNPs@siGFP) mediante il metodo dell'emulsione-evaporazione del solvente.

Le LPHNPs@siGFP mostrano dimensioni colloidali, carica superficiale positiva, e una forma sferica con struttura *core-shell* in cui la porzione fosfolipidica rappresenta circa il 30% p/p. Sono inoltre in grado di incorporare con successo il siGFP ed interagiscono leggermente con la mucina.

Studi di caratterizzazione biologica hanno dimostrato una bassa citotossicità dei sistemi, quando incubati con cellule di carcinoma polmonare umano (H1299), buone capacità di essere internalizzati dalle stesse, significativamente più alta rispetto al siRNA *naked* somministrato tal quale, e buone capacità di silenziare il gene eGFP.

Infine, sono state realizzate delle microparticelle aventi ottime dimensioni e proprietà di aerosolizzazione per una somministrazione polmonare, incorporando le LPHNPs@siGFP in matrici micrometriche di trealosio tramite tecnica dello SD.

In conclusione, il presente lavoro di ricerca ha fornito dei promettenti *pulmonary drug delivery systems* micro- e nanoparticellari, accuratamente studiati e progettati, potenzialmente sfruttabili per il trattamento di patologie infiammatorie polmonari. Questi potrebbero rappresentare una solida base per ricerche future, allargando gli orizzonti anche verso lo sviluppo di terapie combinate, ottenendo così delle sinergie terapeutiche in grado di affrontare i complessi meccanismi molecolari dell'infiammazione.

Inoltre, l'implementazione dei risultati ottenuti, attraverso studi in vivo, potrebbe consentire sia una ottimizzazione tecnologica delle formulazioni ottenute che, consequenzialmente, anche della quantità terapeutica di farmaco da somministrare, allo scopo di sviluppare terapie farmacologiche sempre più efficaci, sicure e mirate.

5. Parte sperimentale

5.1. Sviluppo di microparticelle polimeriche porose inalabili per la veicolazione di Rapamicina per il trattamento della BPCO

5.1.1. Materiali

Sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich (Italia): N, N'-dimetilformammide anidra (DMF-a), etanolo, diclorometano (DCM) 1,1'-carbonildiimidazolo (CDI), rodamina B (RhB), acido D,L-polilattico (PLA Acid Free, $\bar{M}_w = 14$ kDa), ammonio bicarbonato (AB), ossido di deuterio (D_2O) e N,N'-dimetilformammide deuterata (DMF- d_7), metanolo.

Dietilammina (DEA), acetone, etere dietilico, sono stati acquistati dalla Fluka (Italia). Da Accel Pharmatech è stata reperita la Rapamicina.

Le membrane da dialisi sono state acquistate dalla Spectrum Labs (USA).

Tutti i reagenti utilizzati sono di grado analitico.

L' α,β -poli(N-2-idrossietil)-D,L-aspartammide (PHEA) è stata preparata e purificata secondo una procedura messa a punto nel laboratorio dove ho svolto la mia tesi di dottorato e riportata in letteratura.¹⁹² Il peso molecolare medio pesato ($\bar{M}_w$) del PHEA utilizzato in questo studio è di 43.700 Da ($\bar{M}_w/\bar{M}_n=1,45$) ed è stato determinato mediante analisi cromatografica ad esclusione dimensionale (SEC). Per tale analisi è stato utilizzato il sistema SEC equipaggiato con una pompa, due colonne Phenogel (Phenomenex, dimensione particellare di 5 μm , dimensione dei pori 10^3 Å e 10^4 Å) e un rifrattometro differenziale 410 (DRI) come rivelatore, acquistati alla Waters (Mildford, MA, USA). I pesi molecolari sono stati determinati usando i PEG come standard (range 238-969.000 Da), DMF + LiBr 0.05 M come fase mobile, un flusso di 0,8 ml/min, ed una temperatura della colonna di $50 \pm 0,1^\circ C$.

Gli spettri ^1H -NMR sono stati acquisiti con uno spettrometro Bruker Avance II300 (operante a 300 MHz).

5.1.2. Colture cellulari

È stata utilizzata una linea cellulare epiteliale bronchiale normale immortalizzata (16-HBE) (fornita dall'Istituto Zoo-profilattico di Lombardia ed Emilia Romagna). Le cellule 16-HBE sono state mantenute in atmosfera umidificata del 5% di CO₂ in aria a 37°C, coltivata come monostrato aderente in Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM) (EuroClone), integrato con siero bovino fetale al 10% (FBS) (Gibco), 2 mM di l-glutamina (EuroClone), 100 U/ml di penicillina, 100 g/ml di streptomycin e 0,6 g/ml amfotericina B (Sigma – Aldrich, Milano, Italia).

5.1.3. Sintesi e caratterizzazione del copolimero

5.1.3.1. Sintesi e caratterizzazione del PHEA-g-RhB

La derivatizzazione del PHEA con la RhB è stata eseguita utilizzando il CDI come agente attivante le funzioni carbossiliche della RhB. Ad una quantità nota di RhB, solubilizzata in DMF-a alla concentrazione di 8,7 mg/ml, viene aggiunta una quantità opportuna di attivante (CDI) direttamente allo stato solido, in accordo con $R_1=1,25$ essendo $R_1=(\text{moli CDI})/(\text{moli RhB})$.

La soluzione limpida è stata lasciata ad agitare a $40\pm 0,1^\circ\text{C}$ per 4 ore sotto atmosfera di argon e al riparo dalla luce, al fine di attivare i gruppi carbossilici della RhB.

Al contempo, una quantità di PHEA, in accordo con $R_2=0,01$, è stata dispersa in DMF-a ad una concentrazione di 40 mg/ml e posta sotto atmosfera di argon, dove $R_2=(\text{moli RhB})/(\text{moli gruppi ossidrilici del PHEA})$.

Trascorso il tempo stabilito per l'attivazione, alla dispersione di PHEA è stata aggiunta la DEA, con funzione di catalizzatore, ad una concentrazione di 0,73 mg/ml in accordo con $R_3=5$ essendo $R_3=(\text{moli DEA})/(\text{moli RhB})$.

Quindi, la dispersione ottenuta è stata aggiunta lentamente goccia a goccia alla soluzione di RhB attivata. La miscela di reazione è stata lasciata sotto atmosfera di argon ed agitazione continua a $40 \pm 0,1^\circ\text{C}$ per 48 ore. Dopo tale tempo, la miscela di reazione è stata aggiunta goccia a goccia ad un'opportuna quantità di etere dietilico preraffreddato e la sospensione è stata poi centrifugata a 9.800 rpm, a 4°C per 10 minuti, utilizzando una centrifuga Centra MP4R IEC, dotata di un rotore 854 e controllo della temperatura. Il prodotto solido è stato recuperato, lavato due volte con etanolo, al fine di allontanare eventuali tracce di CDI in eccesso, RhB non reagita e imidazolo liberatosi durante l'attivazione. Alla fine, sono stati effettuati quattro lavaggi in acetone per eliminare tracce di RhB non legata. Il prodotto solido ottenuto è in seguito disperso in acqua distillata, dializzato per 24 ore contro acqua distillata utilizzando membrane da dialisi con MWCO di 12-14.000 Da per allontanare le tracce residue di acetone e successivamente la sospensione colloidale ottenuta congelata e liofilizzata. In seguito, il prodotto liofilizzato è stato conservato in freezer (-20°C) per la successiva caratterizzazione. Il copolimero PHEA-g-RhB è stato ottenuto con una resa pari all'85% p/p rispetto alla quantità di PHEA utilizzata inizialmente.

Il copolimero PHEA-g-RhB è stato caratterizzato mediante analisi $^1\text{H-NMR}$ e SEC. Lo spettro $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, D_2O , 25°C) ha evidenziato i seguenti picchi: δ 1,15 (m, 12H_{RhB} $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}$); δ 2,71 (m, 2H_{PHEA} $\text{-CO-CH-CH}_2\text{-CO-NH-}$); δ 3,29 (t, 2H_{PHEA} $\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$); δ 3,58 (t, 2H_{PHEA} $\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$); δ 4,65 (m, 1H_{PHEA} $\text{-NH-CH(CO)CH}_2\text{-}$); δ 8,00-8,50 (m, 10H_{RhB} H-Ar). Il grado di derivatizzazione DD_{RhB} è risultato pari a $0,6 \pm 0,05$ mol%. Il $\bar{M}_w$ del PHEA-g-RhB, determinato mediante analisi SEC nelle condizioni descritte per il PHEA, è risultato pari a 40.200 Da ($\bar{M}_w/\bar{M}_n=1,6$).

5.1.3.2. Sintesi e caratterizzazione del PHEA-g-RhB-g-PLA

La derivatizzazione del PHEA-g-RhB con il PLA è stata effettuata utilizzando il CDI come agente attivante le funzioni carbossiliche terminali del PLA.

Ad una dispersione di PLA (175,6 mg/mL) in DMF anidra è stata aggiunta, lentamente e sotto continua agitazione, una quantità opportuna di CDI solido in modo da avere $R_4 = 2$, essendo $R_4 = (\text{moli CDI})/(\text{moli PLA})$.

La miscela di reazione è stata mantenuta a $40 \pm 0,1^\circ\text{C}$ sotto atmosfera di argon per 4 ore al fine di attivare i residui carbossilici del PLA.

Al contempo, una quantità di PHEA-g-RhB in accordo con $R_5 = 0,06$, è stata solubilizzata in DMF anidra ad una concentrazione di 83,3 mg/ml e posta sotto atmosfera di argon, dove $R_5 = (\text{moli PLA})/(\text{moli gruppi ossidrilici del PHEA-g-RhB})$.

Trascorso il tempo stabilito per l'attivazione, alla dispersione di PHEA-g-RhB è stata aggiunta la DEA, con funzione di catalizzatore, in accordo con $R_6 = 5$ tenendo conto che $R_6 = (\text{moli DEA})/(\text{moli PLA})$.

La dispersione di PHEA-g-RhB ottenuta è stata quindi aggiunta lentamente goccia a goccia alla dispersione di PLA attivato.

La miscela di reazione così ottenuta è stata mantenuta sotto atmosfera di argon ed agitazione continua a $40 \pm 0,1^\circ\text{C}$ per 72 ore. Dopo tale tempo, la miscela è stata aggiunta goccia a goccia a 300 ml di una miscela di solventi costituita da dietilere/DCM (15:1 v/v). La sospensione ottenuta è stata poi centrifugata a 100.000 rpm, 4°C per 15 minuti. Il prodotto è stato recuperato, lavato quattro volte con la medesima miscela, al fine di allontanare eventuali tracce di CDI in eccesso, PLA non reagito e imidazolo liberatosi durante l'attivazione. Infine, il prodotto è stato accuratamente seccato sottovuoto, pestato con l'ausilio di un mortaio, ed è stato conservato in freezer (-20°C) per la successiva caratterizzazione. Il copolimero PHEA-g-RhB-g-PLA è stato ottenuto con una resa pari al 77% (p/p) rispetto alla quantità di PHEA-g-RhB utilizzata inizialmente.

Il copolimero così ottenuto è stato caratterizzato mediante analisi $^1\text{H-NMR}$.

Lo spettro ha evidenziato segnali a: δ 1,15 (m, 12H_{RhB} $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}$); δ 1,30-1,70 (2d, 582H_{PLA} - $\text{O-CO-CH}(\text{CH}_3)\text{-O-}$); δ 2,80 (m, 2H_{PHEA} - $\text{CO-CH-CH}_2\text{-CO-NH-}$); δ 3,30 (t, 2H_{PHEA} - $\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$); δ 3,59 (t, 2H_{PHEA} - $\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$); δ 4,20-4,50 e δ 5,10-5,50 (m, 194H_{PLA} - $\text{O-CO-CH}(\text{CH}_3)\text{-}$); δ 4,80 (m, 1H_{PHEA} - $\text{NH-CH}(\text{CO})\text{CH}_2\text{-}$); δ 7,00-8,00 (m, 10H_{RhB} H-Ar).

Il grado di derivatizzazione DD_{PLA} è risultato pari a $2,0 \pm 0,2\text{mol}\%$.

Il $\bar{M}_w$ del PHEA-g-RhB-g-PLA, determinato mediante analisi SEC nelle condizioni descritte in precedenza per il PHEA, è risultato pari a 156.000 Da ($\bar{M}_w/\bar{M}_n=1,4$).

5.1.4. Preparazione e caratterizzazione delle microparticelle polimeriche porose

Le microparticelle polimeriche (MPs) di PHEA-g-RhB-g-PLA sono state preparate tramite *spray-drying* (SD) con l'utilizzo del *Nano Spray-Dryer B-90 HP* della Büchi (**Figura 85**).



Figura 85. Rappresentazione del *Nano Spray Dryer B-90 HP*, Büchi.

I parametri di processo mantenuti costanti per la produzione di tutti i campioni particellari sono: temperatura di ingresso dell'aria di 60°C , flusso dell'aria compreso tra 100-130 L/min,

pressione nella camera di essiccazione di circa 25 hPa, quantità di fluido nebulizzato (spray) al 78%, flusso di liquido tramite la pompa al 40%.

In primo luogo, per ottenere le MPs sono state preparate dispersioni di PHEA-g-RhB-g-PLA in acetone:H₂O (9,75:0,25 v/v), in modo da avere una concentrazione finale di polimero in dispersione del 3% p/v o dell'1,5% p/v. Le dispersioni risultanti, con un volume totale di 10 ml, sono state filtrate utilizzando filtri in nylon da 5 µm e nebulizzate tramite un nebulizzatore con maglia *large* (gocce dalle dimensioni medie di 8-15 µm) nella camera di essiccazione, sottoposta a flusso di aria deumidificata, preriscaldata ad una temperatura di 60°C. Le polveri composte da microparticelle di polimero sono state isolate tramite un collettore elettrostatico e opportunamente raccolte.

Nel caso di MPs porose ottenute in presenza dell'agente porogeno, quale il bicarbonato di ammonio (AB), esso è stato sciolto nella fase acquosa, che è stata successivamente aggiunta, goccia a goccia, alla dispersione organica, sotto continua agitazione, in modo da avere due dispersioni con Ratio= 0,1 e Ratio=0,2, essendo Ratio= (mg porogeno)/(mg PHEA-g-RhB-g-PLA). Ciascun campione ottenuto è stato analizzato mediante FT-IR, utilizzando uno spettrometro Bruker ALPHA FT-IR (Bruker, Milano, Italia).

Per ottenere i sistemi contenenti Rapamicina, il farmaco è stato aggiunto alla fase organica. Ad una concentrazione pari a 0,08% p/v, durante il processo di SD.

Tutti i campioni sono stati ottenuti con una resa pari a circa il 57% p/p rispetto alla quantità totale di tutti i componenti aggiunti.

5.1.4.1. *Analisi morfologica e distribuzione dimensionale*

La morfologia di tutti i campioni ottenuti è stata esaminata tramite l'uso di un microscopio a scansione elettronica (SEM). Prima dell'esame al microscopio i campioni sono stati posti su un nastro biadesivo precedentemente applicato su uno *stub* di acciaio inossidabile e rivestiti con

oro. Le immagini SEM sono state acquisite attraverso l'uso di un SEM/STEM Fei-ThermoFisher Versa 3D.

L'analisi dimensionale sui fotogrammi ottenuti mediante SEM è stata effettuata utilizzando il software *ImageJ*, attraverso l'analisi di un numero sufficientemente rappresentativo per costituire un dato certo (>1000 particelle).

5.1.4.2. *Analisi con Microscopio a Forza Atomica (AFM)*

L'analisi con microscopio a forza atomica (AFM) è stata condotta mediante l'uso di un Dimention FastScan della Bruker e di una analisi mediante software Nanoscope 9.0.

Ciascun campione particellare è stato disperso in acqua, depositato su di uno *stub* contenente uno strato di mica, ed essiccato in essiccatore con CaCl_2 prima di essere analizzato.

È stata ottenuta una immagine bidimensionale che mostra un'area del campione di $8\ \mu\text{m} \times 8\ \mu\text{m}$, in cui è presente una scala di profondità che permette di apprezzare la tridimensionalità del campione.

Per ottenere maggiori informazioni sulla morfologia e sulla rugosità superficiale delle MPPs è stata selezionata una porzione di superficie di almeno tre particelle (di area $500\ \text{nm} \times 500\ \text{nm}$), alla quale è stata sottratta una superficie polinomiale quadratica, per mimare una stessa particella, ma sferica e liscia. In questo modo sono stati determinati i valori di Rugosità quadratica media (R_q) di ciascun campione, calcolando la media quadratica degli scostamenti verticali dei punti della superficie rispetto allo zero. La R_q fornisce informazioni sul campo di variazione delle altezze del profilo e dà una misura della regolarità dei pori/solchi presenti.

Immaginando di sezionare la superficie secondo un piano ortogonale alla stessa si ottiene il profilo reale (rilevato), ovvero la linea risultante dall'intersezione della superficie reale con il piano tracciato ortogonalmente. La dimensione dei pori/solchi presenti nei campioni di MPs porosi è stata misurata stimando l'estensione laterale entro cui avvengono le fluttuazioni

verticali del profilo rilevato rispetto alla linea media, corrispondente al piano ortogonale (Figura 86).

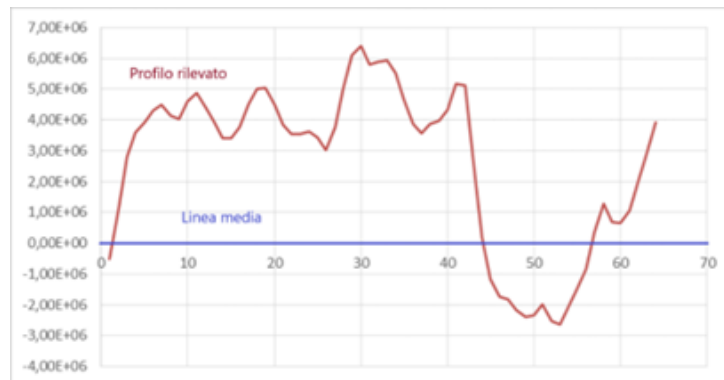


Figura 86. Oscillazioni del profilo rilevato rispetto alla linea media.

5.1.4.3. *Analisi Brunauer-Emmett-Teller (BET)*

L'area superficiale, la distribuzione dimensionale e il volume dei pori presenti nelle MPs porose, sono stati determinati mediante l'uso di una apparecchiatura BET di Quantachrome Instruments Autosorb iQ and ASiQwin, rappresentata in **Figura 87**.¹⁹³



Figura 87. Rappresentazione della strumentazione BET di Quantachrome Instruments Autosorb iQ and ASiQwin.

Le analisi sono state condotte degasando il campione (~50 mg di polvere) per 360 minuti ad una temperatura di 50°C, con un tempo di equilibrio impostato a 20 minuti ed una pressione di 760 bar, e sottoponendolo a N₂ ad una pressione relativa P/P_0 compresa tra 0 e 1 a 77K. In ogni analisi, è stata effettuata la pesata delle polveri prima e dopo l'operazione di degasaggio.

I dati ottenuti sono stati elaborati utilizzando i modelli *Multipoint* BET e Barrett, Joyner e Halenda (BJH). Ogni misura è stata eseguita in triplicato.

5.1.4.4. Densità e diametro aerodinamico teorico

Per ottenere il valore di diametro aerodinamico teorico è stato utilizzato un metodo di calcolo in cui è necessaria in primo luogo la conoscenza del volume della polvere prima (densità apparente, *bulk*) e dopo la compattazione (densità *tapped*). Per determinare questi volumi è stato sfruttato un metodo che prevede l'utilizzo di una siringa graduata.¹⁵²

La densità apparente è stata misurata riempiendo, di polvere secca, una siringa graduata da 1 ml. Il peso della polvere necessario per riempire la siringa graduata da 1 ml è stato registrato per calcolare la densità apparente.

La densità tapped della polvere è stata valutata picchiando la siringa su una superficie piana per 100 colpi per volta, fino all'ottenimento di un valore volumetrico costante. Il volume risultante è stato registrato per calcolare la densità *tapped*. Ogni misurazione è stata eseguita per tutti i campioni ottenuti in triplicato.

Il diametro aerodinamico teorico, per tutte le particelle maggiori di 0,5 μm , può essere approssimato usando la seguente equazione: ^{153,154}

$$d_{\text{aer}} = d_{\text{ps}} \sqrt{\frac{\rho}{\chi \times \rho_0}}$$

dove d_{aer} =diametro aerodinamico, μm

d_{ps} =diametro geometrico, μm

ρ =densità tapped, g/cm^3

χ =fattore di forma (=1 per particelle sferiche)

ρ_0 =densità unitaria (=1)

L'indice di Carr invece è stato determinato secondo la formula: ¹⁵¹

$$\text{Indice di Carr} = (\rho_{\text{tapped}} - \rho_{\text{bulk}}) / \rho_{\text{tapped}}$$

5.1.4.5. Comportamento aerodinamico

Il comportamento aerodinamico di ciascun campione di MPs (MP_NT, MP_AB_10, MP_AB_20) è stato valutato utilizzando l'inalatore di polvere secca (DPI) Breezhaler® collegato ad un *Next Generation Impactor* (NGI, Apparato E, Eur. Ph 10th ed., Copley Scientific

Ltd., Nottingham, Regno Unito) dotato di un pre-separatore (PS) tra lo stadio 1 e la porta di induzione (IP), conformemente alle indicazioni per i test DPI.¹⁵⁴

Per favorire una deposizione ottimale delle particelle in ogni singolo stage durante l'aerosolizzazione della polvere, il PS e le tazze di impattazione di ogni stadio sono stati rivestiti con l'1% (w/v) di *Tween* 80® in etanolo prima dell'uso e lasciati asciugare. La soluzione di rivestimento scelta è stata segnalata come uno degli agenti di rivestimento più promettenti in termini di riproducibilità e caratteristiche di sicurezza.^{194,195} La portata è stata impostata a 90 L/min e controllata con un flussometro (DFM3, Copley Scientific). Tre capsule (dimensione 3) riempite manualmente ($10 \pm 0,1$ mg) sono state scaricate nell'NGI per 2,7 s, in modo da ottenere un volume di passaggio dell'aria di 4 L. La polvere depositata è stata quindi raccolta utilizzando un sistema di controllo della temperatura. La polvere depositata è stata quindi raccolta con una miscela 50:50 (v/v) di metanolo:DMSO e la fluorescenza del copolimero (dovuta al RhB legato) è stata quantificata mediante spettroscopia UV-Vis a $\lambda=562$ nm, utilizzando un lettore multipiastra Synergy 4 (BioTek, Winooski, USA). Per ogni campione, l'esperimento è stato ripetuto almeno tre volte (3 capsule per ogni azionamento) e i dati ottenuti sono stati analizzati per ottenere la dose emessa (ED; farmaco raccolto nel boccaglio, nell'IP, nel PS e nelle coppette di impattazione) e l'ED% (rapporto tra l'ED e la massa iniziale del campione testato). Inoltre, la frazione di particelle fini (FPF%), definita come la percentuale di massa dell'ED con un diametro aerodinamico inferiore a $5,0 \mu\text{m}$, è stata determinata dall'interpolazione della curva di distribuzione del diametro aerodinamico cumulativo tra la fase 1 e la fase 2. La quantità di massa cumulativa di ogni stadio è stata tracciata come percentuale del campione recuperato rispetto al diametro di *cut-off*, escludendo la massa depositata nella porta di induzione a causa dell'indisponibilità di un limite dimensionale superiore preciso per le particelle depositate in questa sezione. Il diametro aerodinamico mediano di massa (MMAD) delle particelle - diametro aerodinamico al quale il 50% delle particelle è più grande e il 50% è più piccolo - è stato poi

estrapolato dal grafico secondo la Eur. Ph. 10th ed., ed è stato determinato il valore della deviazione standard geometrica (GSD). Inoltre, l'indice di disperdibilità (DI) è stato calcolato come il rapporto tra il MMAD e il d_{aer} teorico ottenuto dalla precedente equazione, dove una bassa dispersione a mezz'aria degli aerosol in uscita dall'inalatore è rappresentata da un grande valore di DI.^{196,197}

5.1.5. Microparticelle polimeriche porose contenenti la Rapamicina

5.1.5.1. *Determinazione della Drug Loading (DL%)*

La quantità di Rapamicina caricata è stata determinata mediante HPLC utilizzando un sistema Waters Breex System dotato di un autocampionatore Waters 717 Plus (volume di iniezione 40 μ L) e di un Shimadzu UV-vis rilevatore HPLC in linea con postazione computerizzata. La rapamicina è stata estratta solubilizzando una quantità nota di ciascun campione prima in DMF e, completata la dissoluzione delle nanoparticelle, aggiungendo metanolo (1: 9 v/v, 2,5 mg/ml), lasciando sotto agitazione per quasi 2 ore. La dispersione ottenuta è stata filtrata (0.45 μ m) e quindi iniettata. La temperatura della colonna (Phenomenex Luna 5u C18 100A) è stata mantenuta a 25 C e la lunghezza d'onda del detector UV è stata settata a 277 nm.; le analisi sono state eseguite con una fase mobile costituita da una miscela di metanolo e acqua 70:30 v/v con una velocità di flusso di 1 ml/min. L'area dei picchi ottenuta a 14 min è stata confrontata con una curva di calibrazione ottenuta tracciando le aree rispetto alle concentrazioni della soluzione standard di Rapamicina in metanolo nell'intervallo di 0,1-0,005 mg/ml ($y=136513x$, $R^2 = 0,9994$).

I risultati della DL% sono stati espressi come il rapporto percentuale tra la massa del farmaco quantificato e la massa di sistema essiccata analizzata. L'efficacia dell'intrappolamento (EE%) è stata espressa come il rapporto percentuale in peso tra la quantità di farmaco effettivamente intrappolata nelle particelle e quella teorica.

5.1.5.2. Cinetiche di rilascio

Sui campioni ottenuti sono stati condotti gli studi di rilascio del farmaco in un fluido polmonare simulato, ottenuto a partire da 50 ml di soluzione salina tamponata con fosfato di Dulbecco (DPBS) (soluzione salina contenente: cloruro di potassio, fosfato di potassio monobasico, cloruro di sodio e fosfato di sodio dibasico). Il DPBS è il responsabile del mantenimento del pH al valore di 7,4, ovvero lo stesso del fluido polmonare. Inoltre, al tampone è stato aggiunto il dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) in una quantità corrispondente allo 0,02% p/v della quantità totale di tampone, nel tentativo di ottenere le stesse condizioni ambientali presenti nei polmoni.

Per la preparazione dei campioni, sono stati pesati 5 mg di ciascun lotto di MPs e dispersi in 1 ml di soluzione tampone DPBS. La dispersione così preparata è stata posta in una membrana per dialisi e introdotta interamente in una provetta contenente il fluido simulato (50 ml). È stata utilizzata una membrana per dialisi con peso molecolare 12-14 kD, acquistata da Spectrum Laboratories.

I campioni così preparati sono stati posti in *orbital shaker*, alla temperatura di 37°C e sotto agitazione continua. Sono stati effettuati dei prelievi ad intervalli di tempo selezionati per determinare il rilascio del farmaco. Un campione di 10 ml è stato prelevato dopo 30 minuti, 1 ora, 2 ore, 4 ore, 6 ore e 24 ore. Dopo ogni campionamento, il fluido è stato rinnovato aggiungendo 10 ml del mezzo preparato.

Le aliquote prelevate sono state, infine, congelate e liofilizzate. Dopo completa liofilizzazione, la polvere è stata trattata con 2,5 ml di metanolo, filtrata e iniettata in HPLC per la determinazione dei profili di rilascio del farmaco nel fluido simulato, seguendo la stessa procedura vista per la determinazione della DL%.

5.1.5.3. Test di vitalità cellulare

La vitalità cellulare è stata valutata mediante un saggio MTS su cellule 16-HBE, utilizzando un kit disponibile in commercio (*Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation assay*, Promega) contenente 3-(4,5-dimetiltiazolo-2-il)-5-(3-carbossimetossifenil)-2-(4-solfenil)-2H-tetrazolio (MTS) e fenazina etosolfato. Le cellule 16HBE sono state piastrate su una piastra a 96 pozzetti a una densità cellulare di 15.000 cellule/pozzetto in DMEM contenente il 10% di FBS. Dopo 24 ore di incubazione, il terreno è stato rimosso e le cellule sono state incubate con 200 µl per pozzetto con una dispersione acquosa (DMEM contenente il 10% di FBS) di MPs caricati con Rapamicina a concentrazioni comprese tra 72 µg/mL e 7,2 µg/mL. La vitalità cellulare è stata valutata anche per la Rapamicina libera e per gli MPs vuoti. Dopo 24 ore di incubazione, il surnatante è stato rimosso e ogni piastra è stata lavata con DPBS sterile; successivamente, le cellule in ogni pozzetto sono state incubate con 100 µL di DMEM fresco e 20 µL di soluzione di MTS e le piastre sono state incubate per 2 ore a 37°C. L'assorbanza a 490 nm è stata letta con un lettore di micropiastre (Multiskan Ex, Thermo Labsystems, Finlandia). La vitalità cellulare relativa (percentuale) è stata espressa come $(\text{cellule trattate con Abs490} / \text{cellule di controllo con Abs490}) \times 100$, sulla base di tre esperimenti condotti in multipli di sei. Le cellule incubate con il terreno sono state utilizzate come controllo negativo.

5.1.6. Analisi statistica

Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato. Tutti i dati sono espressi come media $\pm$ deviazione standard. Tutti i dati sono stati analizzati con il t-test di Student. Un valore $p < 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo, mentre un valore $p < 0,01$ o $0,001$ è stato considerato altamente significativo.

5.2. Sviluppo di una formulazione Nano into Micro (NiM) per la somministrazione polmonare di Iloprost per il trattamento dell'iperinfiammazione nella fibrosi cistica

5.2.1. Materiali

Sono stati acquistati dalla Sigma- Aldrich (Italia): N,N'-dimetilformammide anidra (DMF-a), N,N'-dimetilacetammide anidra (DMA-a), acido polilattico co-glicolico (PLGA con gruppo carbossilico terminale, Mw=7.000-17.000 kDa), N,N'-dimetilformammide deuterata (DMF-d₇), O-(2-amminoetile)-O'-metil poli(etilenglicole)₂₀₀₀ (H₂N-PEG₂₀₀₀-OCH₃), dietilammina (DEA), trietilammina (TEA), 1,1'-carbonildiimidazolo (CDI), disuccinimidil carbonato (DSC), etere dietilico, acetone e etanolo, acetonitrile (ACN), diclorometano, acido dietilentriamminopentaacetico (DTPA), soluzione di amminoacidi RPMI 1640 (50x), mucina dallo stomaco di suino, Dulbecco's phosphate buffer saline (DPBS), D-mannitolo, standards di polistirene (70.000-150.000 kDa).

Cloruro di sodio (NaCl) e emulsione di tuorlo d'uovo per microbiologia, sono stati acquistati dalla Fluka (Italia).

Cloruro di potassio (KCl) e idrossietilcellulosa (HEC) sono stati acquistati dalla Carlo Erba (Italia). Le membrane da dialisi sono state acquistate dalla Spectrum Labs (USA).

Il farmaco Endoprost è stato gentilmente fornito da Italfarmaco.

Tutti i reagenti utilizzati sono di grado analitico.

L' α,β -poli(N-2-idrossietil)-D,L-aspartammide (PHEA) è stata preparata e purificata secondo una procedura messa a punto nel laboratorio dove ho svolto la mia tesi di dottorato e riportata in letteratura.¹⁹²

Gli spettri ¹H-NMR sono stati acquisiti con uno spettrometro Bruker Avance II300 (operante a 300 MHz). Le centrifugazioni sono state effettuate tramite una centrifuga International

Equipment Company Centra MP4R, dotata di un rotore 854 e di un sistema per il controllo della temperatura.

5.2.2. Sintesi e caratterizzazione dei copolimeri

5.2.2.1. Sintesi e caratterizzazione del PHEA-g-PLGA

La derivatizzazione del PHEA con il PLGA è stata eseguita utilizzando il CDI come agente attivante la funzione carbossilica libera terminale del PLGA. Ad una quantità nota di PLGA, solubilizzata in DMF-a alla concentrazione di 95 mg/ml, è stata aggiunta una quantità opportuna di CDI, in accordo con $R_2=2$ essendo $R_2=(\text{moli CDI})/(\text{moli PLGA})$.

La dispersione è stata lasciata ad agitare a $40 \pm 0,1^\circ\text{C}$ per 4 ore. Al contempo, una opportuna quantità di PHEA, in accordo con $R_1=0,05$, è stata solubilizzata in DMF-a ad una concentrazione 33,3 mg/ml, essendo $R_1=(\text{moli PLGA})/(\text{moli OH PHEA})$ e 15 minuti prima di aggiungerla alla dispersione di PLGA attivato, a quest'ultima è stata addizionata la DEA come catalizzatore in accordo con $R_3=5$ essendo $R_3=(\text{moli DEA})/(\text{moli PLGA})$.

Quindi, la dispersione ottenuta è stata aggiunta lentamente e goccia a goccia alla dispersione di PLGA attivato e la miscela di reazione ottenuta è stata lasciata sotto agitazione continua a $40 \pm 0,1^\circ\text{C}$ per 48 ore. Dopo tale tempo, la miscela di reazione è stata precipitata in un'opportuna quantità di etere dietilico, e la sospensione è stata poi centrifugata a 9.800 rpm, a 4°C per 15 minuti. Il prodotto solido è stato recuperato, lavato più volte con una miscela di solventi costituita da etere dietilico\diclorometano (rapporto 45:55 v\v), al fine di allontanare eventuali tracce di CDI in eccesso e il PLGA non reagito. Il residuo solido recuperato è stato essiccato per allontanare ulteriori tracce di solvente organico e conservato per la successiva caratterizzazione.

La resa è risultata essere pari al 70% rispetto al PHEA di partenza.

Lo spettro $^1\text{H-NMR}$ in DMF-d_7 (300 MHz, 25°C , TMS) del PHEA-g-PLGA ha evidenziato i seguenti picchi: δ 1,5-1,9 (m, $3\text{H}_{\text{PLGA}} - [\text{OCOCH}(\text{CH}_3)]_{92-}$); δ 2,8 (m, $2\text{H}_{\text{PHEA}} - \text{C}(\text{O})\text{CHCH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}-$); δ 3,5 (t, $2\text{H}_{\text{PHEA}} - \text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$); δ 3,6 (t, $2\text{H}_{\text{PHEA}} - \text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$); δ 5,0 (m, $1\text{H}_{\text{PHEA}} - \text{NHCH}(\text{CO})\text{CH}_2-$); δ 4,2-4,5 and δ 5,4-5,8 ($1\text{H}_{\text{PLGA}} - [\text{OCOCH}(\text{CH}_3)]_{92-}$); δ 5,3 ($2\text{H}_{\text{PLGA}} - [\text{OCOCH}_2]_{92-}$).

5.2.2.2. Sintesi e caratterizzazione del copolimero PHEA-g-PLGA-g-PEG

La derivatizzazione del PHEA- g-PLGA con il $\text{H}_2\text{N-PEG-OCH}_3$ è stata eseguita utilizzando il DSC come agente attivante i gruppi idrossilici del copolimero, in presenza di TEA come catalizzatore. Ad una quantità nota di PHEA-g-PLGA, solubilizzata in DMA-a alla concentrazione di 55,5 mg/ml, è stata aggiunta una quantità opportuna di attivante in accordo con $R_5=0,1$ essendo $R_5=(\text{moli DSC})/(\text{moli OH PHEA})$ e una quantità opportuna TEA in accordo con $R_6=1$ essendo $R_6=(\text{moli TEA})/(\text{moli DSC})$.

La dispersione limpida così ottenuta è stata lasciata ad agitare a $40\pm 0,1^\circ\text{C}$ per 4 ore. Al contempo, una quantità nota di $\text{H}_2\text{N-PEG-OCH}_3$, in accordo con $R_4=0,075$, è stata dispersa in DMF-a ad una concentrazione 16,7 mg/ml, essendo $R_4=(\text{moli H}_2\text{N-PEG-OCH}_3)/(\text{moli OH PHEA})$.

Trascorso il tempo stabilito per l'attivazione, la dispersione PHEA-g-PLGA attivato è stata aggiunta lentamente, goccia a goccia, alla dispersione di PEG. La miscela ottenuta è stata lasciata sotto agitazione continua a $25\pm 0,1^\circ\text{C}$ per 18 ore. Trascorso tale tempo, la miscela di reazione è stata posta in dialisi (MWCO 25 kDa) contro acqua distillata, al fine di allontanare eventuali tracce di DSC in eccesso, il solvente di reazione e il PEG non reagito, e successivamente liofilizzata per recuperare il copolimero ottenuto.

La resa è risultata essere pari al 80% rispetto al PHEA-g-PLGA di partenza.

Lo spettro $^1\text{H-NMR}$ in DMF-d_7 (300 MHz, 25°C , TMS) ha evidenziato i seguenti picchi: δ 1.5-1.9 (m, $3\text{H}_{\text{PLGA}} -[\text{OCOCH}(\text{CH}_3)]_{92}-$); δ 2.8 (m, $2\text{H}_{\text{PHEA}} -\text{C}(\text{O})\text{CHCH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}-$); δ 3.5 (t, $2\text{H}_{\text{PHEA}} -\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$); δ 3.6 (t, $2\text{H}_{\text{PHEA}} -\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$); δ 3,7 ($4\text{H}_{\text{PEG}} -[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}]_{44}-$); δ 5.0 (m, $1\text{H}_{\text{PHEA}} -\text{NHCH}(\text{CO})\text{CH}_2-$); δ 4.2-4.5 and δ 5.4-5.8 ($1\text{H}_{\text{PLGA}} -[\text{OCOCH}(\text{CH}_3)]_{92}-$); δ 5.3 ($2\text{H}_{\text{PLGA}} -[\text{OCOCH}_2]_{92}-$).

5.2.2.3. *Determinazione dei pesi molecolari dei copolimeri mediante Size Exclusion Chromatography*

Il peso molecolare medio ponderale ($\bar{M}_w$) e polidispersità ($\bar{M}_w/\bar{M}_n$) di ciascun copolimero sono stati determinati mediante analisi SEC utilizzando Phenomenex Phenogel 5u $10^3 \text{ \AA}$ e $10^4 \text{ \AA}$ collegati a un sistema GPC/SEC Agilent 1260 Infinity Multi-Detector (Milano, Italia) e a un rivelatore di indice di rifrazione. Le analisi sono state eseguite con una soluzione DMF di LiBr 0,025 M come fase eluente a un flusso di 0,8 ml/min e uno standard di polistirene (70 kDa) per ottenere la curva di calibrazione. La temperatura della colonna è stata impostata a 50°C .

5.2.3. Preparazione e caratterizzazione delle nanoparticelle polimeriche

Le nanoparticelle vuote e caricate con Iloprost sono state prodotte seguendo un metodo di nanoprecipitazione. In particolare, per produrre nanoparticelle vuote, il copolimero *graft* PHEA-g-PLGA o PHEA-g-PLGA-g-PEG è stato solubilizzato in acetone (2% p/v). La dispersione di copolimero ottenuta è stata messa in una buretta e aggiunta a goccia ad acqua bidistillata (fase organica/acquosa pari a 1:4 v/v). La miscela è stata lasciata sotto agitazione per una notte, e l'acetone è stato eliminato a 37°C sotto pressione ridotta con un evaporatore rotante. Le dispersioni di nanoparticelle sono state conservate a 5°C per ulteriori analisi.

Per produrre nanoparticelle caricate con Iloprost, PHEA-g-PLGA o PHEA-g-PLGA-g-PEG (2% p/v) e Iloprost (0,015% p/v) sono stati disciolti in acetone, posti in una buretta, aggiunti

goccia a goccia ad acqua bidistillata (acetone:acqua 1:4 v/v) e tenuti sotto agitazione per una notte. Dopo l'evaporazione dell'acetone, la dispersione di nanoparticelle è stata sottoposta a centrifugazione a 20°C per 15 minuti a 6000 rpm per rimuovere l'Iloprost libero e conservata per ulteriori analisi.

Le nanoparticelle vuote ottenute da PHEA-g-PLGA o a partire da PHEA-g-PLGA-g-PEG sono state denominate rispettivamente NP e NP_PEG, mentre le nanoparticelle caricate con Iloprost ottenute da PHEA-g-PLGA e PHEA-g-PLGA-g-PEG sono state denominate rispettivamente NP+Ilo e NP_PEG+Ilo.

5.2.3.1. *Analisi dimensionale e misure di potenziale ζ*

I valori di dimensione media (nm) e di indice di polidispersità (PDI) di tutti i campioni ottenuti sono stati determinati tramite spettroscopia a correlazione fotonica (PCS), utilizzando uno *Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument, Malvern, UK)*. Le misure sono state effettuate con un angolo fisso di 173°C alla temperatura di 25°C utilizzando una dispersione acquosa di nanoparticelle. Ciascuna dispersione è stata posta in una cuvetta e analizzata in triplicato. I valori di potenziale ζ sono stati misurati utilizzando i principi del laser *Doppler Velocitometry e PhaseAnalysis Light Scattering* (tecnica M3-PALS) mediante uno *Zetasizer Nano ZS (MalvernInstrument, Malvern, UK)*; le analisi sono state effettuate in triplicato.

5.2.3.2. *Determinazione della Drug Loading (DL%)*

La quantità di Iloprost caricata in NP+Ilo e NP_PEG+Ilo è stata determinata mediante analisi cromatografica liquida ad alte prestazioni (HPLC) utilizzando un sistema di cromatografo liquido *Waters Breeze System* dotato di un autocampionatore (volume di iniezione di 40 μ l) e di un rivelatore HPLC UV-vis Shimadzu. Come fase mobile è stata utilizzata una miscela di acetonitrile/acqua acida a pH 3 (50/50 v/v) con una portata di 1 ml/min. La colonna scelta (Luna

C18 100A, 250 X 4,6 mm, Phenomenex) è stata equilibrata a 25°C e il rivelatore UV è stato impostato a 207 nm.

L'Iloprost è stato estratto disperdendo una quantità nota di ciascun campione in 200 µl di acetonitrile a cui sono stati aggiunti 800 µl di metanolo. La dispersione è stata filtrata (filtro PTFE, 0,45 µm) e quindi iniettata nella colonna.

5.2.3.3. *Cinetiche di rilascio*

Il rilascio di Iloprost da NP+Ilo e NP_PEG+Ilo è stato valutato in condizioni *sink* a intervalli di tempo prestabiliti (0, 1, 2, 4, 6, 12 e 24 ore), incubando le dispersioni di nanoparticelle piene peghilate e non in una miscela di PBS (pH 7,4)/etanolo (90/10, v/v) in *horbital shaker* alla temperatura di 37°C ± 0,1. A intervalli di tempo prestabiliti, ogni dispersione è stata sottoposta a ultracentrifugazione a 45000 rpm per 1 ora. Il surnatante è stato recuperato e l'etanolo è stato allontanato a pressione ridotta. Quindi, la fase acquosa residua è stata liofilizzata, trattata con 1,5 ml di acetonitrile e analizzata mediante HPLC, utilizzando le medesime condizioni utilizzate per la DL%.

5.2.3.4. *Analisi chimica di superficie*

Gli spettri XPS sono stati registrati utilizzando una PHI 5000 VersaProbe II (ULVACPHI, Inc., Chigasaki, Giappone) e radiazioni monocromatiche Al-Kα ($h\nu = 1486,6$ eV) da una sorgente di raggi X operante con una dimensione dello spot di 200 µm, una potenza di 50 W e una tensione di accelerazione di 15 kV.

5.2.3.5. *Determinazione della densità di peghilazione superficiale*

La densità di peghilazione superficiale del campione NP_PEG è stata determinata mediante analisi $^1\text{H-NMR}$, considerando la dimensione delle nanoparticelle ottenuta dall'analisi DLS e considerando la densità del PLGA pari a 1,4 g/ml.

Inizialmente, è stato acquisito lo spettro di una soluzione di RhB in D_2O alla concentrazione di 1 mg/ml, usata come standard interno; per tale motivo il valore dell'integrale del segnale compreso nel range δ 8,20-6,40 (m, 10H_{RhB} H-Ar) è stato posto uguale a uno in tutti gli spettri effettuati per questa determinazione.

Al fine di ricavare la retta di taratura riguardante il segnale del PEG ($\bar{M}_w=2.000$ Da) a δ 3,60 (t, 176H_{PEG} , $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$), quantità note di quest'ultimo sono state solubilizzate in D_2O , così da ottenere delle soluzioni a concentrazioni crescenti comprese tra 0,5 e 2 mg/ml, che sono state analizzate in presenza di RhB (4 mg/ml) come standard interno. Infine, una retta di taratura ($y=1,3007x$; $R^2=0,982$) è stata ricavata riportando i valori degli integrali dei picchi del PEG in funzione delle corrispondenti concentrazioni analizzate. A δ 3,60 è presente un picco della RhB oltre a quello del PEG, quindi al valore dell'integrale di entrambi i segnali è stato sottratto quello relativo all'integrale del picco della RhB per ottenere il valore dell'integrale relativo al segnale del PEG. Il valore dell'integrale del picco della sola RhB a δ 3,60 è stato ricavato dallo spettro iniziale della RhB (1mg/ml) in D_2O .

In seguito, una quantità nota di NP_PEG è stata dispersa in D_2O (25 mg/ml) ed analizzata in presenza dello standard interno RhB (4 mg/ml), allo scopo di ottenere i valori degli integrali relativi al segnale del PEG e ricavare la sua concentrazione sulla superficie nanoparticellare attraverso la retta di taratura e sottraendo l'integrale del picco relativo alla RhB, come descritto per le soluzioni di PEG.

Ciascuna analisi è stata effettuata in triplicato. Il campione NP è stato analizzato come controllo.

Inoltre, assumendo che tutte le catene di PEG in superficie abbiano un $\bar{M}_w=2.000$ Da, è stata calcolata la densità di peghilazione superficiale (Γ) rappresentante il numero di catene di PEG in 100 nm^2 di superficie nanoparticellare, dalla seguente equazione: ¹⁶²

$$\Gamma = \left[\frac{M_{\text{PEG}} \times N_A}{W_{\text{NP}} / d_{\text{NP}} / \frac{4\pi}{3} \left(\frac{D}{2}\right)^3} \div 4\pi \left(\frac{D}{2}\right)^2 \right] \times 100$$

dove M_{PEG} rappresenta le moli di catene di PEG presenti in superficie (mol; calcolato dall'analisi $^1\text{H-NMR}$), N_A è il numero di Avogadro (mol^{-1}), W_{NP} è la massa totale del campione (g), d_{NP} è la densità delle nanoparticelle (g/cm^3 ; assumendo che sia uguale a quella del PLA ($1,4 \text{ g}/\text{ml}$)), D è il diametro delle nanoparticelle (nm; ottenuto dall'analisi dimensionale).

Il prodotto al numeratore indica il numero di catene di PEG, mentre i rapporti al denominatore indicano il numero di nanoparticelle, di conseguenza dal rapporto tra il numero di catene di PEG e il numero di nanoparticelle si ricava il numero di catene di PEG presenti sulla superficie di una nanoparticella, che rapportato al valore dell'area di una nanoparticella ci permette di ottenere il numero di catene di PEG presenti in 1 nm^2 di superficie nanoparticellare. Da quest'ultimo si calcola il numero di molecole di PEG in 100 nm^2 di superficie nanoparticellare. Le nanoparticelle hanno un valore di Γ di circa 35 catene di PEG per 100 nm^2 di superficie.

Inoltre, è stato calcolato il numero di molecole di PEG che possono ricoprire 100 nm^2 di superficie (Γ^*) dalla seguente equazione: ¹⁶²

$$\Gamma^* = \frac{100}{\left(\frac{\xi}{2}\right)^2 \pi}$$

dove il denominatore rappresenta l'area superficiale occupata da una singola catena di PEG considerata pari a quella che occupa all'interfaccia una sfera di diametro ξ (nm), calcolato dalla seguente equazione:

$$\xi = 0,76\sqrt{m}$$

dove m è il peso molecolare di una catena di PEG (g/mol). Quindi, il ξ e l'area di una singola catena di PEG sono rispettivamente pari a 3,4 nm e 9,07 nm², assumendo che tutte le catene di PEG in superficie abbiano un $\bar{M}_w=2.000$ Da. Il numero di molecole di PEG che occorrono per ricoprire completamente 100 nm² di superficie delle nanoparticelle (Γ^*) è pari a 11,025.

Inoltre, il rapporto Γ/Γ^* è un indice della densità superficiale di peghilazione delle nanoparticelle e da questo si può desumere anche la conformazione delle catene di PEG sulla superficie nanoparticellare; per cui valori di $(\Gamma/\Gamma^*) < 1$ indicano una bassa densità superficiale di peghilazione che comporta una conformazione *mushroom-like* delle catene di PEG, invece valori di $(\Gamma/\Gamma^*) > 1$ indicano un'alta densità superficiale di peghilazione che comporta una conformazione *brush-like* delle catene di PEG.¹⁶²

5.2.3.6. Analisi turbidimetrica

Le interazioni tra ciascun campione (NP o NP_PEG) e la mucina sono state determinate mediante turbidimetria.¹⁶³ In particolare, le dispersioni di nanoparticelle e la mucina sono state preparate in soluzione PBS a una concentrazione rispettivamente pari a 2 mg/ml e 2 mg/ml. Quindi, una miscela tra ciascuna dispersione di nanoparticelle e mucina è stata preparata a 1:1 v/v e mantenuta sotto agitazione magnetica per 1 minuto. Dopo l'incubazione a 37°C, la torbidità è stata determinata registrando l'assorbanza a $\lambda = 500$ nm di ciascuna dispersione con

uno spettrofotometro UV (UV-1800, Shimadzu, Kyoto, Giappone) ogni 50 min fino a 6 ore.

Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplo.

Come controllo, lo stesso esperimento è stato condotto sulle nanoparticelle ottenute dal solo PLGA.

5.2.4. Formulazione *Nano into Micro* (NiM)

Le formulazioni di NiM sono state preparate utilizzando un Mini Spray Dryer B-290 (Buchi, Milano, Italia) seguendo i seguenti parametri: T di ingresso: 110°C; T di uscita: 60-66°C; aspirazione: 100%; pompa di alimentazione: 10%; ugello atomizzatore: 0,6 mm; gas utilizzato: aria compressa. In dettaglio, per ottenere microparticelle vuote, è stata preparata una soluzione acquosa di mannitolo a una concentrazione del 4% p/v, filtrata con un filtro acetato da 5 µm e nebulizzata per ottenere MP_Mann. Per ottenere formulazioni NiM, il mannitolo è stato disciolto (4% p/v) in una dispersione di nanoparticelle contenente NP, NP_PEG, NP+Ilo o NP_PEG+Ilo. Dopo filtrazione su filtro da 5 µm, ogni dispersione è stata nebulizzata ottenendo rispettivamente NiM_NP, NiM_NP_PEG, NiM_NP+Ilo e NiM_NP_PEG+Ilo.

Il contenuto di Iloprost caricato in NiM_NP+Ilo e NiM_NP_PEG+Ilo è stato determinato mediante HPLC, utilizzando il metodo HPLC per la DL%.

La morfologia delle particelle è stata analizzata mediante microscopia elettronica a scansione (SEM) utilizzando un Phenom ProXSEM. Le polveri di tutti i campioni sono state poste su un nastro biadesivo precedentemente applicato su uno *stub* in acciaio inossidabile e ricoperti di oro prima dell'esame al microscopio. Il diametro medio delle microparticelle è stato determinato utilizzando il programma *ImageJ*, analizzando un numero sufficientemente rappresentativo di particelle (>500 particelle).

5.2.4.1. *Muco artificiale di fibrosi cistica*

Il muco artificiale di fibrosi cistica (CF-AM) è stata preparata secondo procedura riportata in letteratura.⁹⁵ In breve, 500 mg di acido desossiribonucleico (DNA), 250 mg di mucina, 0,295 mg di acido dietilenetriaminepentaacetico (DTPA), 1 mL di soluzione di amminoacidi RPMI 1640, 250 μ L di emulsione di tuorlo d'uovo, 250 mg di NaCl e 110 mg di KCl sono stati miscelati in un volume finale di 50 mL di acqua priva di RNAasi. La dispersione è stata lasciata equilibrare a 25°C per 2 ore.

5.2.4.2. *Analisi reologica*

Le proprietà reologiche di CF-AM da sola o in presenza di NP, NP_PEG, NiM_NP, NiM_NP_PEG e MP_Mann, alle concentrazioni di 2 mg/ml, sono state determinate a 20°C utilizzando un reometro rotazionale (TA Instruments) accoppiato a una piastra parallela di 8 mm di geometria e a una piastra di Peltier controllata, mantenendo una distanza di 300 μ m. In primo luogo, la regione viscoelastica lineare del CF-AM è stata determinata con un test di *strain sweep* da 0,01 a 20%, che è risultato essere nell'intervallo 5-10%. Successivamente, per tutti i campioni è stata eseguita una scansione in frequenza (0,1-2 Hz) a una deformazione costante del 5% per determinare la viscosità complessa (η^*).

Tutte le prove reologiche sono state condotte in triplicato e per l'acquisizione e l'analisi dei dati è stato utilizzato il *software Trios v3.3 TA Instruments*.

5.2.5. Caratterizzazione biologica

5.2.5.1. *Colture cellulari*

Le cellule epiteliali bronchiali della fibrosi cistica (CFBE) che sovraesprimono in modo stabile la CFTR F508del (CFBE-F508del) sono state ottenute dal Dr. D. Gruenert (University of California, San Francisco, CA). Le cellule sono state coltivate a 37°C con il 5% di CO₂ su fiasche in terreno MEM (Costar, Corning, MA, USA) contenente il 10% di FBS (Corning),

l'1% di L-glutamina e l'1% di penicillina/streptomicina (entrambi di Euroclone). 2 µg/ml di puromicina (Sigma-Aldrich) sono stati aggiunti al terreno di coltura.

5.2.5.2. *Test di vitalità cellulare*

La citocompatibilità è stata valutata dopo l'incubazione delle cellule CFBE-F508del con tutte le formulazioni NiM. Le cellule (3×10^4 cellule/pozzetto) sono state seminate in piastre da 96 pozzetti ed esposte a NiM_NP+Ilo e NiM_NP_PEG+Ilo corrispondenti a concentrazioni di Iloprost di 3,5, 35 e 350 nM. I campioni NiM_NP, NiM_NP_PEG e MP_Mann sono stati diluiti in modo da contenere la stessa quantità in peso contenuta nelle formulazioni caricate con Iloprost. 24 ore dopo il trattamento, la vitalità cellulare è stata valutata mediante MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil-tetrazolio bromuro).

La vitalità cellulare è stata calcolata come segue:

% vitalità = $[(\text{densità ottica \{OD\} delle cellule trattate} - \text{OD del bianco}) / (\text{OD del controllo non trattato} - \text{OD del bianco}) \times 100]$,

considerando le cellule non trattate come il 100%. Le cellule trattate con l'1% di Triton X-100 sono state utilizzate come controllo positivo.

5.2.5.3. *Estrazione e quantificazione dell'RNA (qRT-PCR)*

Le cellule CFBE F508del-CFTR sono state co-trattate per 4 ore a 37°C con MEM contenente 10 µg/ml di LPS (Sigma-Aldrich) +/- 35 o 350 nM di Iloprost libero, +/- 35 o 350 nM di NiM_NP +/- Ilo o 35 o 350 nM di NiM_NP_PEG +/- Ilo.

Successivamente le cellule sono state lisate e l'RNA è stato estratto secondo il protocollo del produttore (Qiagen Mini Kit). La sintesi del cDNA è stata eseguita utilizzando la trascrittasi inversa (*iSCRIPT cDNA synthesis kit*, Biorad). La PCR quantitativa è stata eseguita utilizzando

il fluoroforo *EvaGreen* (*Ssofast EvaGreen*, *Biorad*). I set di primer per IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-8 e GAPDH sono stati utilizzati come riportato altrove.¹⁶⁹

5.2.6. Analisi statistica

Tutti gli esperimenti sono stati ripetuti almeno tre volte. Tutti i dati sono espressi come media $\pm$ SD. Il software GraphPad 8.0 è stato utilizzato per l'analisi statistica degli esperimenti di citocompatibilità e di espressione genica. L'ANOVA a una via con il test di confronto multiplo di Dunnett è stata condotta come appropriato con un livello di significatività di $p < 0,05$.

5.3. Sviluppo di sistemi ibridi lipide-polimero per la somministrazione inalatoria di Roflumilast per il trattamento della BPCO

5.3.1. Materiali

I reagenti utilizzati sono tutti di grado analitico. N,N'-dimetilformammide anidra (DMF-a), N,N'- dimetilacetammide anidra (DMA-a), acetonitrile per HPLC (ACN), diclorometano (DCM), cloroformio, 1,1'-carbonildiimidazolo (CDI), poli- ϵ -caprolattone (PCL, $\bar{M}_w$ = 0-18 KDa), N,N'- dimetilformammide deuterata (DMFd7), dietilammina (DEA), etere dietilico, anidride succinica (AS), 4- dimetilamminopiridina (4-DMAP), rodamina B (RhB), acetone, etanolo, tampone fosfato di Dulbecco (DPBS, pH = 7,4), polivinilalcol (PVA, $\bar{M}_w$ = 31-51 KDa), L-leucina, cloruro ferrico esaidrato ($\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$), ammonio tiocianato (NH_4SCN), acido dietilentriamminopentaacetico (DTPA), soluzione di amminoacidi RPMI 1640 (50x), mucina dallo stomaco di suino, sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich (Italia).

Cloruro di sodio (NaCl) e emulsione di tuorlo d'uovo per microbiologia, sono stati acquistati dalla Fluka (Italia).

Cloruro di potassio (KCl) e idrossietilcellulosa (HEC) sono stati acquistati dalla Carlo Erba (Italia).

La 1,2-dipalmitoil-sn-glicerolo-3-fosfocolina (DPPC) è stata acquistata dalla Avanti Polar Lipids (USA).

Il 1,2-distearoil-sn-glicerolo-3-fosfoetanolammina-N-(polietilenglicole₂₀₀₀)-mannosio sale sodico (DSPE-PEG₂₀₀₀-Mannosio) è stato acquistato dalla RuixiBiotech (Cina).

Le membrane da dialisi con MWCO di 3.5 KDa e di 12-14 KDa sono state acquistate dalla Spectrum Labs (USA).

Il Roflumilast è stato ottenuto da abcr GmbH (Karlsruhe, Germania).

L' α,β -poli(N-2-idrossietil)-D,L-aspartammide (PHEA) è stata preparata e purificata secondo una procedura riportata in letteratura.¹⁹² Il peso molecolare medio pesato ($\bar{M}_w$) del PHEA utilizzato in questo studio è di 53.600 Da ($\bar{M}_w/\bar{M}_n=1,45$) ed è stato determinato mediante analisi cromatografica ad esclusione dimensionale (SEC). Per tale analisi è stato utilizzato il sistema SEC equipaggiato con una pompa, due colonne Phenogel (Phenomenex, dimensione particellare di 5 μm , dimensione dei pori 10^3 Å e 10^4 Å) e un rifrattometro differenziale 410 (DRI) come rivelatore, acquistati alla Waters (Mildford, MA, USA). I pesi molecolari sono stati determinati usando i PEG come standard (range 238-969.000 Da), DMF + LiBr 0.05 M come fase mobile, un flusso di 0,8 ml/min, ed una temperatura della colonna di $50\pm 0,1^\circ\text{C}$. Gli spettri $^1\text{H-NMR}$ sono stati acquisiti con uno spettrometro Bruker Avance II300 (operante a 300 MHz).

5.3.2. Sintesi e caratterizzazione del copolimero PHEA-g-RhB-g-Succ-PCL

La sintesi e la caratterizzazione del copolimero PHEA-g-RhB è stata eseguita seguendo la stessa procedura riportata nel paragrafo 4.1.3.1.

Il grado di derivatizzazione DD_{RhB} , ottenuto dall'analisi $^1\text{H-NMR}$ è risultato essere 0.55 ± 0.05 mol%.

Il $\bar{M}_w$ del PHEA-g-RhB utilizzato in questo lavoro è risultato pari a 52.500 Da ($\text{PDI} = 1,6$), determinato mediante analisi SEC nelle condizioni descritte per il PHEA.

Al fine di introdurre nel polimero PCL una funzione carbossilica necessaria alla coniugazione con i gruppi ossidrilici del PHEA è stata effettuata una reazione di succinazione. Il copolimero PCL-Succ è stato preparato facendo reagire il PCL ($\bar{M}_w=10\text{-}18$ kDa), solubilizzato in DMF-a ad una concentrazione di 133,3 mg/ml, con una quantità nota di AS solida, in accordo con $R_4=40$, dove $R_4=(\text{moli AS})/(\text{moli PCL})$.

Alla soluzione risultante è stata anche aggiunta una quantità nota di 4-DMAP solida, con funzione di catalizzatore, in accordo con $R_5 = 1,2$, essendo $R_5 = (\text{moli 4-DMAP})/(\text{moli PCL})$.

La miscela di reazione è stata lasciata ad agitare a $60 \pm 0,1^\circ\text{C}$ per 24 ore, utilizzando una piastra riscaldante ad olio. Successivamente la miscela di reazione è stata precipitata in un'opportuna quantità di etere dietilico preraffreddato, in cui la 4-DMAP è solubile. Per la separazione, la sospensione ottenuta è stata filtrata sottovuoto utilizzando il filtro Büchner. Il prodotto solido è stato recuperato e lavato 4 volte con acqua, per eliminare eventuali tracce di PCL non reagito e tracce di AS in eccesso.

Il prodotto solido recuperato è stato poi solubilizzato in un'opportuna quantità di acetone e posto in dialisi, utilizzando membrane da dialisi con MWCO di 3.500 Da, contro acqua distillata al fine di allontanare il solvente organico. Il prodotto purificato è stato poi congelato e liofilizzato.

In seguito, il prodotto liofilizzato è stato conservato in freezer alla temperatura di -20°C per la successiva caratterizzazione. Il copolimero PCL-Succ. è stato ottenuto con una resa pari all'80% p/p rispetto alla quantità di PCL utilizzata inizialmente.

Il copolimero PCL-Succ è stato caratterizzato tramite analisi FT-IR e SEC. Dallo spettro FT-IR del PCL-Succ sono risultate le seguenti bande caratteristiche: 1169 cm^{-1} (vibrazioni di stretching C-O) e 1721 cm^{-1} (vibrazioni di stretching C=O). Il $\bar{M}_w$ del copolimero è risultato pari a 15 kDa ($\bar{M}_w/\bar{M}_n=1,45$) determinato mediante analisi SEC nelle condizioni descritte per il PHEA. Il grado di succinazione è stato misurato tramite una titolazione in ambiente organico. In particolare, la soluzione da titolare è stata preparata ad una concentrazione di 20 mg/ml, solubilizzando un'opportuna quantità di PCL-Succ in tetraidrofurano (THF). Quest'ultima è stata titolata aggiungendo goccia a goccia la soluzione di titolante di 65 KOH in metanolo ad una concentrazione pari a 35,6 mM. L' indicatore utilizzato consiste in una soluzione di blu di timolo in THF, ad una concentrazione di 5 mg/ml. La percentuale di funzionalizzazione del

PCL in gruppi carbossilici si è ottenuta conoscendo il volume utilizzato di titolante, ed è risultata pari al 100%.

La derivatizzazione del PHEA-RhB con il PCL è stata eseguita utilizzando il CDI come agente attivante le funzioni carbossiliche del PCL-Succ.

Alla soluzione di PCL-Succ in DMF-a, ad una concentrazione di 66,5 mg/ml, è stata aggiunta una quantità nota di CDI solido, in accordo con $R_6=3$ ed essendo $R_6 = (\text{moli CDI})/(\text{moli PCL-Succ})$.

Al fine di attivare i residui carbossilici del PCL-Succ, la soluzione limpida ottenuta è stata lasciata ad agitare a $40 \pm 0,01^\circ\text{C}$ per 5 ore.

Contemporaneamente, una quantità nota di PHEA-g-RhB è stata solubilizzata in DMF-a ad una concentrazione di 33,3 mg/ml e lasciata agitare. La quantità di PHEA-g-RhB è stata calcolata in accordo con $R_7 = 0,12$, dove $R_7 = (\text{moli PCL-Succ})/(\text{moli gruppi ossidrilici del PHEA})$.

Trascorso il tempo stabilito per l'attivazione dei residui carbossilici del PCL-Succ, alla soluzione di PHEA-g-RhB è stata aggiunta la DEA. Quest'ultima ha la funzione di catalizzatore ed è stata utilizzata ad una concentrazione di 0,70 mg/ml in accordo con $R_8=5$, dove $R_8 = (\text{moli DEA})/(\text{moli PCL-Succ})$.

A questo punto, il PHEA-g-RhB è stato aggiunto lentamente goccia a goccia al PCL-Succ attivato e la soluzione ottenuta è stata lasciata ad agitare a $40 \pm 0,1^\circ\text{C}$ per 68 ore.

Trascorso tale tempo, la miscela di reazione è stata prima precipitata in etere dietilico e poi la sospensione ottenuta è stata centrifugata a 9800 rpm, 4°C per 10 minuti. Il prodotto solido, al fine di allontanare eventuali tracce di PCL-Succ non reagito e/o di CDI in eccesso, è stato recuperato e lavato 4 volte in una miscela di etere/diclorometano (rapporto 20:5 v/v).

Il PHEA-g-RhB-g-Succ-PCL così sintetizzato è stato solubilizzato in 20 ml di DMA e posto in dialisi, utilizzando membrane da dialisi con MWCO di 12-14.000 Da contro acqua distillata, al fine di allontanare il solvente organico, e successivamente è stato congelato e liofilizzato. Il

prodotto liofilizzato è stato conservato in freezer alla temperatura di -20°C per la successiva caratterizzazione.

Il copolimero PHEA-g-RhB-g-Succ-PCL è stato caratterizzato mediante analisi $^1\text{H-NMR}$ e SEC. Lo spettro $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMF-d_7 , 25°C , TMS) ha i picchi principali a δ 1,13 (m, 12H_{RhB} CH_3CH_2-); δ 1,5 and 2,1 (m, 6H_{PCL} $-\text{[O(O)CCH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2]_{122}-$); δ 2,5 (2d, 2H_{PCL} $-\text{[O(O)CCH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2]_{122}-$); δ 2,8 (m, 2H_{PHEA} $-\text{C(O)CHCH}_2\text{C(O)NH}-$); δ 3,2 (t, 2H_{PHEA} $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$); δ 3,50 (t, 2H_{PHEA} $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$); δ 4,3 (t, 2H_{PCL} $-\text{[O(O)CCH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2]_{122}-$), and δ 5,0 (m, 1H_{PHEA} $-\text{NHCH(CO)CH}_2-$); δ 7,00–8,00 (m, 10H_{RhB} H-Ar).

Il grado di derivatizzazione molare % in PCL (DD_{PCL}) del copolimero PHEA-g-RhB-g-Succ-PCL è risultato essere $2,5\% \pm 0,3\%$ in moli.

Il $\bar{M}_w$ del copolimero PHEA-g-RhB-g-Succ-PCL è stato valutato pari a 136.000 Da ($\bar{M}_w/\bar{M}_n=1,50$) ed è stato determinato mediante analisi SEC nelle condizioni descritte in precedenza per il PHEA e il PHEA-g-RhB.

5.3.3. Nanoparticelle fluorescenti ibride lipide-polimero (LPHFNPs)

5.3.3.1. Nanoparticelle polimeriche

Le nanoparticelle polimeriche vuote e contenenti il Roflumilast (rispettivamente FNP e FNP@Roflumilast) sono state ottenute utilizzando la tecnica della nanoprecipitazione.

In particolare, è stata preparata una dispersione colloidale di PHEA-g-RhB-g-Succ-PCL al 2% p/v in DMA. Per ottenere nanoparticelle contenenti il Roflumilast, quest'ultimo è stato solubilizzato nella dispersione polimerica ad una concentrazione di farmaco pari a 0,53% p/v.

La dispersione ottenuta (senza farmaco) viene posta in una buretta e lasciata lentamente cadere goccia a goccia in una soluzione di H_2O milli-Q sotto costante agitazione; se invece la

dispersione contiene il farmaco questa viene fatta cadere goccia a goccia in una soluzione di H₂O milli-Q satura di NaCl.

Il rapporto tra la fase dispersa e la fase disperdente è di 3/20 v/v.

La miscela risultante viene lasciata sotto agitazione per 2 ore. Successivamente la dispersione nanoparticellare viene posta in dialisi per due giorni utilizzando membrane da dialisi con MWCO di 12-14.000 Da contro H₂O distillata, al fine di allontanare la DMA e NaCl.

Nel caso dei sistemi pieni, trascorsi i due giorni, la dispersione viene sottoposta a centrifugazione per 15 minuti a 20 °C e 8000 RPM, utilizzando una centrifuga Centra MP4R IEC, dotata di un rotore 854 e controllo della temperatura, per allontanare il farmaco non incorporato.

5.3.3.2. *Liposomi*

I liposomi sono stati preparati mediante il metodo della *Thin Layer Evaporation (TLE)*.

Sono state preparate due differenti miscele di fosfolipidi per produrre due differenti sistemi e metterli a confronto; quelli contenenti solo DPPC e quelli contenenti un secondo fosfolipide peghilato aggiunto al primo contenente anche il direzionante, il DSPE-PEG₂₀₀₀-Mannosio.

In particolare, è stata preparata una soluzione di DPPC allo 0,75% p/v in CHCl₃ per ottenere liposomi costituiti solo da DPPC. Il solvente viene allontanato per evaporazione, utilizzando un Rotavapor, sottovuoto a 4 °C, ottenendo così un film fosfolipidico sulle pareti interne del pallone. Il film viene poi reidratato con 25ml di H₂O milli-Q per ottenere una dispersione di DPPC allo 0,45% p/v e riscaldata sotto agitazione per 30 minuti a 75°C.

Per ottenere liposomi costituiti da DPPC e DSPE-PEG₂₀₀₀-Mannosio, è stata preparata una soluzione contenente DPPC allo 0,69% p/v e DSPE-PEG₂₀₀₀-Mannosio allo 0,25% p/v in CHCl₃. Il solvente è stato allontanato per evaporazione a pressione ridotta a 40°C e ottenendo così un film sulle pareti interne del pallone. Il film viene poi reidratato con 25ml di H₂O milli-Q per

ottenere una dispersione di DPPC allo 0,41% p/v e di DSPE-PEG₂₀₀₀-Mannose allo 0,15% p/v e riscaldata sotto agitazione per 30 minuti a 75°C.

5.3.3.3. *Preparazione delle nanoparticelle ibride lipide-polimero (LPHFNPs)*

Le nanoparticelle fluorescenti ibride lipide-polimero (LPHFNPs), sia vuote che caricate con Roflumilast, sono state preparate con il metodo dell'omogeneizzazione ad alta pressione (HPH), utilizzando un omogeneizzatore EmulsiFlex-C5.

In particolare, la dispersione acquosa di nanoparticelle è stata aggiunta alla dispersione acquosa di liposomi seguendo un rapporto fase polimerica-fase lipidica di 1,5:1 v/v e la miscela fisica è stata sottoposta a 6 cicli di omogeneizzazione ad alta pressione, ad una pressione di 10.000-15.000 Psi.

La dispersione ottenuta è stata poi sottoposta ad ultracentrifugazione per 1 ora a 20°C e 40000 RPM, utilizzando l'ultracentrifuga Optima XPN (Beckman Coulter) con rotore Type 70 Ti Rotor e cuvette da 26,9 mL. Il surnatante è stato allontanato e il pellet costituito da LPHNPs è stato disperso nella minima quantità di H₂O milli-Q, congelato e liofilizzato.

Questa metodica di preparazione è stata utilizzata sia per le LPHNPs costituite da solo DPPC vuote e piene (LPHFNPs and LPHFNPs@Roflumilast rispettivamente), utilizzate come campione di controllo, che per le LPHNPs vuote e piene costituite da DPPC e DSPE-PEG₂₀₀₀-Mannosio (Man-LPHFNPs and Man-LPHFNPs@Roflumilast).

5.3.4. Caratterizzazione delle LPHFNPs

5.3.4.1. *Analisi dimensionale e misure di potenziale ζ*

I valori di dimensione media (nm) e di indice di polidispersità (PDI) delle nanoparticelle, dei liposomi e delle LPHNPs sono stati determinati pre- e post-liofilizzazione tramite spettroscopia

a correlazione fotonica (PCS), utilizzando uno *Zetasizer Nano ZS* (MalvernInstrument, Malvern, UK). Le misure sono state effettuate con un angolo fisso di 173°C alla temperatura di 25°C disperdendo le nanoparticelle, i liposomi e le LPHNPs in soluzioni acquose. Ciascuna dispersione è stata posta in una cuvetta e analizzata in triplicato. I valori di potenziale ζ sono stati misurati utilizzando i principi del *laser Doppler Velocitometry e PhaseAnalysis Light Scattering* (tecnica M3-PALS) mediante uno *Zetasizer Nano ZS* (MalvernInstrument, Malvern, UK); anche in questo caso le nanoparticelle, i liposomi e le LPHNPs pre- e post-liofilizzazione sono state disperse in acqua e analizzate in triplicato. Inoltre, le LPHNPs post-liofilizzazione sono state disperse in soluzione salina di NaCl 10mM e analizzate anch'esse in triplicato.

5.3.4.2. *Analisi morfologica*

La morfologia delle LPHNPs è stata esaminata tramite l'uso di un microscopio elettronico a trasmissione e a scansione (STEM). Ogni campione liofilizzato è stato messo su un nastro biadesivo, precedentemente applicato su uno *stub* in acciaio inossidabile e osservato utilizzando un SEM/STEM Fei-ThermoFisher Versa 3D, con il quale sono state acquisite le immagini.

5.3.4.3. *Quantificazione percentuale del contenuto di fosfolipidi*

Per determinare il contenuto percentuale di DPPC e DSPE-PEG₂₀₀₀-Mannosio nei sistemi LPHNPs ottenuti, è stato effettuato un saggio colorimetrico utilizzando un reattivo preparato solubilizzando in H₂O milli-Q cloruro ferrico esaidrato al 2,7% p/v e tiocianato d'ammonio al 3% p/v ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O} + \text{NH}_4\text{SCN}$).

Per prima cosa è stata calcolata la retta di taratura, analizzando una dispersione in cloroformio della miscela dei due fosfolipidi, preparando delle soluzioni a concentrazioni note, comprese tra 0,1 e 0,005 mg/ml, ed eseguendo il saggio colorimetrico. Sono stati preparati 2 ml di soluzione di ciascun campione e a questa sono stati aggiunti 2 ml di reattivo. Le due fasi

immiscibili sono state miscelate per permettere la formazione del complesso di colore rosso, tra il composto inorganico ferrotiocianato e il fosfolipide, che risulta essere liberamente solubile in CHCl_3 . Si aspetta che le due fasi si separino e si preleva la fase organica che viene analizzata tramite analisi spettroscopica con spettrofotometro UV (Shimadzu) a $\lambda = 488 \text{ nm}$.

La stessa procedura è stata eseguita per analizzare i campioni di LPHNPs, disperdendo una quantità opportuna di sistema LPHNPs in un opportuno volume di CHCl_3 per ottenere una concentrazione pari a 0,05 mg/ml in un volume finale di 2 ml di soluzione e alla dispersione sono stati addizionati 2 ml di soluzione acquosa contenente il reattivo $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O} + \text{NH}_4\text{SCN}$. Una volta analizzata la fase organica, l'assorbanza rilevata dallo strumento è stata interpolata con la retta di taratura ed è stata ricavata la percentuale p/p di DPPC in ciascun campione di LPHFNPs.

Per determinare il contenuto percentuale di DPPC e DSPE-PEG₂₀₀₀-Mannosio nei sistemi Man-LPHFNPs l'assorbanza rilevata dallo strumento è stata interpolata con la retta di taratura ottenuta ed è stato calcolato il contenuto percentuale p/p.

5.3.4.4. *Analisi chimica di superficie*

La composizione superficiale di ciascun campione liofilizzato è stata determinata mediante analisi XPS. Gli spettri XPS sono stati registrati utilizzando un PHI 5000 VersaProbe II (ULVAC-PHI, Inc.) e una radiazione Al-K α monocromatica ($h\nu = 1486,6 \text{ eV}$) da una sorgente di raggi X operante con una dimensione dello spot di 200 μm , una potenza di 50 W e una tensione di accelerazione di 15 kV.

5.3.4.5. *Determinazione della densità di peggilazione superficiale*

La determinazione della densità di peggilazione superficiale è stata condotta seguendo la procedura operativa $^1\text{H-NMR}$ e le operazioni di calcolo già descritti nel paragrafo 4.2.3.5.

In particolare, il sistema ibrido Man-LPHFNPs è stato disperso in D₂O, alla concentrazione di 16,6 mg/ml, ed è stata eseguita l'analisi acquisendo così il relativo spettro. Come controllo, per dimostrare la presenza del PEG, è stata eseguita l'analisi ¹H-NMR anche sul campione LPHFNPs.

Il parametro di densità di peghilazione superficiale (Γ) è stato calcolato considerando le dimensioni delle particelle in questione all'analisi DLS e la densità del PCL (1,145 g/ml).

5.3.4.6. Determinazione della Drug Loading (DL%)

La quantità di Roflumilast incorporato all'interno delle FNPs@Roflumilast, LPHFNPs@Roflumilast e Man-LPHFNPs@Roflumilast è stata valutata mediante analisi HPLC. Quest'ultima è stata eseguita usando una colonna Gemini C18 (μ Bondpack, 5 μ m, 250 x 46 mm i.d., acquistata dalla Waters); come fase mobile è stata utilizzata una miscela di acetonitrile/H₂O acidificata con acido ortofosforico a pH = 3 (60:40 v/v) con un flusso di 1 ml/min, alla temperatura di 25°C, effettuando letture UV alla lunghezza d'onda di 250 nm. Il volume di iniezione è stato di 40 μ l.

Al fine di determinare la *drug loading* (DL%), 5 mg di LPHNPs piene sono state disperse in 200 μ l di DMA e lasciate ad agitare, successivamente è stato aggiunto 1,3 ml di metanolo per HPLC e la dispersione risultante è stata filtrata con un filtro di cellulosa acetato 0,45 μ m e analizzate mediante HPLC.

L'area del picco ottenuta a $t_r=9$ min, corrispondente al Roflumilast incorporato all'interno delle LPHNPs, è stata confrontata con la curva di taratura ottenuta usando soluzioni standard a concentrazione nota di Roflumilast (da 0,1 a 0,025 mg/ml) in acetonitrile. I risultati sono stati espressi come rapporto tra il peso del farmaco e del sistema in toto:

$$DL\% = (\text{mg Roflumilast} / \text{mg totali del sistema}) \times 100$$

5.3.4.7. Cinetiche di rilascio

Per determinare il profilo di rilascio del Roflumilast da parte dei sistemi pieni, questi sono stati dispersi in 1 ml di DPBS, e le dispersioni ottenute poste all'interno di una membrana da dialisi con MWCO di 12-14.000 Da.

Le membrane contenenti le dispersioni sono state immerse in 30 ml di miscela DPBS/Etanolio in rapporto 80/20 v/v, e mantenute a 37°C in un *orbital shaker* per 24 ore. A tempi ben definiti, quali 1, 2, 4, 6 e 24 ore, sono stati effettuati dei prelievi dal mezzo esterno, di un volume pari a 500µl, sostituendolo con lo stesso volume di mezzo fresco.

Al termine dello studio di rilascio, i prelievi sono stati filtrati con filtri di PTFE 0,45 µm e analizzati mediante HPLC, seguendo lo stesso metodo utilizzato per la determinazione della DL%.

I risultati sono stati espressi come rapporto percentuale tra il peso del farmaco rilasciato e il peso del farmaco contenuto nelle LPHNPs di partenza, e a partire da questi è stato costruito un grafico percentuale di farmaco rilasciato cumulativo su tempo.

La stessa procedura è stata eseguita per determinare il profilo di dissoluzione del Roflumilast, preparando una dispersione di farmaco in 1 ml di DPBS, alla stessa concentrazione di farmaco contenuta nei sistemi ibridi.

5.3.4.8. Analisi calorimetrica differenziale a scansione

L'analisi calorimetrica differenziale a scansione è stata effettuata con un DSC 131 Evo (Setaram).

Attraverso il sistema calorimetrico è stata scelta, in modo automatico, la sensibilità massima possibile e il riferimento utilizzato era un crogiolo vuoto. I campioni da analizzare (LPHFNPs, liposomi e NPs, miscela fisica tra i due e Roflumilast) sono stati inseriti all'interno di un crogiolo di alluminio e sottoposti all'analisi DSC per determinare le proprietà dei campioni.

Ogni campione è stato sottoposto a cicli di riscaldamento e raffreddamento nell'intervallo di temperatura tra 25 e 300°C ad una velocità di scansione di 5°C/min per il riscaldamento e una velocità di scansione di 10°C/min per il raffreddamento. Il macchinario dispone di un sistema di termocoppie che rileva i dati di temperatura e costruisce un grafico flusso di calore in funzione della temperatura del campione, mostrando eventuali picchi esotermici o endotermici. Le analisi sono state effettuate su campioni con pesi compresi tra 5 e 10 mg.

5.3.5. Valutazione delle interazioni tra LPHFNPs e mucina

5.3.5.1. *Analisi turbidimetrica*

Le interazioni tra LPHFNPs e mucina sono state studiate mediante analisi turbidimetriche.

Sono state preparate dispersioni di LPHFNPs, Man-LPHFNPs e mucina in DPBS, ad una concentrazione rispettivamente pari a 0,2 mg/ml e 1 mg/ml per i sistemi e 2 mg/ml per la mucina. Successivamente sono state preparate le miscele tra le dispersioni dei sistemi e la mucina, in rapporto 1:1 v/v, ottenendo una concentrazione finale pari a 0,1 mg/ml e 0,5 mg/ml per i sistemi e 1 mg/ml per la mucina e sono state mantenute sotto agitazione magnetica per 1 minuto.

La torbidità di ogni dispersione è stata misurata al tempo 0 e a 50, 100, 150, 200, 250 e 300 minuti, mediante misure di trasmittanza con uno spettrofotometro UV ad una lunghezza d'onda (λ) di 650 nm. I campioni sono stati incubati in un *orbital shaker* sotto agitazione a 37 °C. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato.

5.3.5.2. *Analisi reologica*

L'analisi reologica è stata effettuata disperdendo ciascun campione in muco artificiale all'1,5% p/v di HEC.

Quest'ultimo è stato preparato disperdendo in H₂O milli-Q diversi componenti, quali, idrossietilcellulosa (HEC) in concentrazione pari a 15 mg/ml (1,5% p/v), mucina (5mg/ml), emulsione di tuorlo d'uovo (0,005 ml/ml), miscela di aminoacidi RPMI 1640 (0,02ml/ml), DTPA (0,0059 mg/ml), NaCl (5mg/ml) e KCl (2,2mg/ml).

I sistemi ibridi nanoparticellari LPHFNPs e Man-LPHFNPs, inizialmente, sono stati dispersi in H₂O milli-Q in concentrazione pari a 0,3 mg/ml.

Successivamente, sono state preparate le dispersioni dei sistemi con il muco, diluendo 400 µl di dispersione di sistema con 800 µl di muco, ottenendo una concentrazione finale per i sistemi pari a 0,1 mg/ml e 1% p/v di HEC per il muco.

L'analisi è stata anche effettuata sul muco da solo, che è stato diluito all'1% p/v di HEC con H₂O milli-Q.

Le misure reologiche sono state effettuate alla temperatura di 20°C, utilizzando un reometro DHR-2 TA *Instruments Trios*, utilizzando una geometria a piatti piani paralleli con 20 mm di diametro. Per effettuare un'analisi di *frequency sweep* sui campioni è stato applicato un pre-taglio di 0,1 rad sec⁻¹ per 120 s, mantenendo un gap di 300 micron. Quindi, è stata eseguita una scansione di frequenza (0,1-2 Hz) per tutti i campioni con una deformazione costante del 5% allo scopo di determinare la viscosità complessa (η).

5.3.6. Caratterizzazione biologica

5.3.6.1. *Colture cellulari*

Le cellule epiteliali bronchiali umane (16-HBE) sono state fornite dall'Istituto Zoo-profilattico della Lombardia e dell'Emilia Romagna. La linea di macrofagi murini RAW 264.7 è stata acquistata dall'ATCC (Manassas, VA, USA). Le cellule sono state coltivate in terreno minimo essenziale [Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)] integrato con 10 vol% di siero fetale bovino (FBS), 2 mM di l-glutammina, 100 U/ml di penicillina, 100 µg/ml di

streptomycin e 2,5 µg/ml di amfotericina B (tutti i reagenti sono stati forniti da Euroclone, Milano, Italia) in condizioni standard (95% di umidità relativa, 5% di CO₂, 37°C). Le cellule sono state lasciate crescere fino alla confluenza, tripsinizzate e seminate in piastre a 2,5×10⁴ cellule/cm² (grado di coltura tissutale, 96 pozzetti, fondo piatto) per ogni esperimento di vitalità o assorbimento cellulare.

5.3.6.2. Test di vitalità cellulare

La vitalità cellulare è stata valutata mediante un saggio MTS, utilizzando un kit disponibile in commercio (*CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation assay*, Promega). In particolare, 16-HBE e RAW 264.7 sono stati incubati con 200 µL per pozzetto con una dispersione acquosa (DMEM contenente 10% FBS) di Roflumilast libero o caricato in Man-LPHFNPs (o LPHFNPs come campione di controllo), per ottenere concentrazioni di farmaco comprese tra 0,45 µg/mL e 0,112 µg/ml. La vitalità cellulare è stata valutata anche in presenza di LPHFNPs vuote a concentrazioni corrispondenti a quelle dei sistemi contenenti il farmaco. Tutte le dispersioni sono state sterilizzate mediante filtrazione con un filtro da 220 nm.

Dopo 24 ore di incubazione, il surnatante è stato rimosso e ogni piastra è stata lavata con DPBS sterile; successivamente, le cellule in ogni pozzetto sono state incubate con 100 µL di DMEM fresco e 20 µL di una soluzione di MTS, e le piastre sono state incubate per 2 ore a 37°C. L'assorbanza a 490 nm è stata letta con un lettore di micropiastre (Multiskan Ex, Thermo Labsystems, Finlandia).

La vitalità cellulare relativa (percentuale) è stata espressa come:

$(\text{cellule trattate con Abs}_{490} / \text{cellule di controllo con Abs}_{490}) \times 100$, sulla base di tre esperimenti condotti in multipli di sei. Le cellule incubate con il terreno sono state utilizzate come controllo negativo.

5.3.6.3. Studi di uptake cellulare

Le cellule RAW 264.7 e 16-HBE sono state seminate a $3,0 \times 10^4$ cellule/cm² e trattate dopo 24 ore con 200 µl di dispersione di Man-LPHFNPs (o LPHFNPs come campione di controllo) in DMEM (0,125 mg/ml). Per il saggio di inibizione, al terreno di incubazione è stato aggiunto 10 mM di mannosio prima di aggiungere i campioni. L'esperimento di controllo è stato condotto incubando le cellule con 200 µl di DMEM.

Dopo l'incubazione a 37°C per 4 e 24 ore, le cellule sono state lavate, fissate con paraformaldeide al 4% in PBS a temperatura ambiente e trattate con il colorante fluorescente 4'6-diamidino-2-fenilindolo (DAPI) (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA) per 5 minuti per colorare i nuclei.

Le immagini sono state acquisite con un microscopio invertito a epifluorescenza e analizzate con il software AxioVision. Gli esperimenti sono stati eseguiti in triplo per ogni tempo di incubazione.

5.3.7. Formulazione *Nano into Micro* (NiM)

Le microparticelle NiM sono state preparate mediante processo di spray-drying, utilizzando un Nano Spray Dryer B-90 (Buchi, Italia).

Come liquido di alimentazione è stata preparata una miscela H₂O/EtOH 9:1 contenente come eccipienti Polivinilalcol (PVA, 31.000-51.000 Da) e L-Leucina alla concentrazione del 2,5% p/v, in un rapporto in peso pari a 75:25; a questa miscela sono state aggiunte le Man-LPHFNPs post-liofilizzazione ad una concentrazione pari all'1% p/v.

Dopo preparazione la dispersione è stata filtrata mediante filtro in acetato di cellulosa da 5 µm ed è stata spruzzata attraverso un nebulizzatore con membrana large alla temperatura interna di 92°C. Come gas di essiccazione è stata utilizzata aria filtrata e deumidificata a 92°C.

Le condizioni operative utilizzate durante il processo di *spray-drying* sono state: flusso 112 l/min; frequenza 122 kHz; pressione 37 hPa; pompa al 66% e spray al 78%. I campioni ottenuti sono stati raccolti, ottenendo una resa percentuale di circa il 40% p/p e conservati alla temperatura ambiente in ambiente protetto da umidità prima di essere successivamente analizzati.

5.3.7.1. Caratterizzazione delle NiM

La morfologia delle particelle NiM è stata esaminata tramite l'uso di un microscopio a scansione elettronica (SEM). Prima dell'esame al microscopio i campioni sono stati posti su un nastro biadesivo precedentemente applicato su uno *stub* di acciaio inossidabile e rivestiti con oro. Le immagini SEM sono state acquisite attraverso l'uso di un SEM/STEM Fei-ThermoFisher Versa 3D.

L'analisi dimensionale sui fotogrammi ottenuti mediante SEM è stata effettuata utilizzando il software *ImageJ*.

5.3.8. Analisi statistica

Tutti gli esperimenti sono stati ripetuti almeno tre volte. Tutti i dati sono espressi come medie $\pm$ SD. Tutti i dati sono stati analizzati con il test t di Student. Un valore $P < 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo, un valore $P < 0,001$ è stato considerato altamente significativo, mentre un valore $P > 0,05$ è stato considerato non statisticamente significativo.

5.4. Sviluppo di una formulazione Nano into Micro (NiM) a base di sistemi ibridi lipide-polimero per la veicolazione inalatoria di siRNA nella terapia genica antinfiammatoria

5.4.1. Materiali

Sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich (Milano, Italia): l'N,N'-dimetilformammide anidra (DMF-a), il dimetilsolfossido anidro (DMSO-a) il diclorometano (DCM), l'1,1'-carbonildiimidazolo (CDI), la N,N'- dimetilformammide deuterata (DMFd7), l'ossido di deuterio (D₂O), il deuterio cloruro soluzione al (DCl), l'etere dietilico, il diclorometano, l'acido polilattico co-glicolico (PLGA, con gruppo carbossilico terminale, $\bar{M}_w = 7.000-17.000$ kDa), il 1,2-bis(3-amminopropilammino)etano (bAPAE), l'acetone, l'etanolo, il tampone fosfato di Dulbecco (DPBS, pH = 7,4), HEPES, MES, l'agarosio, etidio bromuro, trealosio, la mucina di tipo II da stomaco suino, mezzo cellulare RPMI-1640, siero fetale bovino (FBS), Penicillina-Streptomicina (P/S), G418 sale disolfato, 0,05% tripsina-EDTA.

Il 1,2-distearoil-sn-glicerolo-3-fosfoetanolamina-N-[metossi(polietilenglicole)-2000] (sale di ammonio) (18:0 PEG₂₀₀₀ PE) e la 1,2-dipalmitoil-sn-glicerolo-3- fosfocolina (DPPC) sono stati acquistati dalla Avanti Polar Lipids (USA). La sonda DY676 acid carboxylic è stata acquistata dalla Dyomics GmbH (Germania). È stata acquistata da Avantor® (Milano, Italia) la Sephadex™ G-25 medium. La membrana da dialisi Pre-wetted RC Turbing con MWCO di 25 kDa e i tubi Amicon *filter* da centrifuga (30kDa) sono stati acquistati dalla Spectrum Labs (USA).

Il siRNA a doppio filamento contro la GFP (siGFP) e il controllo aspecifico *scrambled* (siNC) sono stati acquistati da IDT (Integrated DNA Technologies) (**Tabella 19**). Il siRNA marcato con Alexa Fluor 647 (siFluo) è stato ottenuto labellando un siRNA modificato con ammina (Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgio) con la sonda Alexa Fluor 647 (Life

Technologies, Darmstadt, Germania) secondo procedura riportata dal produttore. Il reagente *Quant-IT RiboGreen*, la lipofectamina₂₀₀₀, *Opti-Mem Medium* sono stati acquistati dalla Thermo Fischer (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA).

L' α,β -poli-(N-2-idrossietil)-D,L-aspartammide (PHEA) è stata preparata e purificata secondo una procedura riportata in letteratura.¹⁹²

Il $\bar{M}_w$ del PHEA utilizzato in questo lavoro è di 49.964 Da, ($\bar{M}_w/\bar{M}_n=1,65$) ed è stato determinato mediante analisi di cromatografia ad esclusione dimensionale (SEC-Size Exclusion Chromatography), eseguita utilizzando la colonna Phenomenex Phenogel 5U 10⁴A di dimensione di 300x7.8 mm (Phenomenex, Stati Uniti) connesse a un sistema GPC/SEC Multi-Detector Agilent 1260 Infinity (Santa Clara, Stati Uniti) e a un rivelatore a indice di rifrazione. Le analisi sono state svolte mediante metodo relativo, utilizzando come fase mobile DMF+LiBr 0,025 M, con un flusso di 0,8 ml/min e polistirene (2 kDa, 20 kDa e 150 kDa) come standard per la calibrazione, una temperatura della colonna a 50°C e una concentrazione del polimero pari a 18 mg/ml.

Tabella 19. Sequenze dei siRNA utilizzati: nt=nucleotidi; GFP=proteina a fluorescenza verde; NC=controllo negativo; A=adenina; C=citosina; G=guanina; U=uracile; T=timina; p=residuo fosfato; lettere minuscole in grassetto=2'-deossiribonucleotidi; lettere maiuscole=ribonucleotidi; lettere maiuscole sottolineate=2'-O-metilribonucleotidi.

	Filamento senso (5'-3')	Filamento antisenso (3'-5')	Lunghezza (nt)	
			Senso	Antisenso
siGFP	pACCCUGAAGUUCAUC UGCACCAC cg	<u>ACUGGGACUUC</u> <u>AGUAG</u> <u>ACGUGGUGGC</u>	25	27
siNC	pCGUUAUAUCGCGUAUA AUACGCGU at	<u>CAGCAAUUAGCGCAU</u> <u>UAU</u> <u>UAUGCGCAU</u> <u>Ap</u>	25	27

5.4.2. Sintesi e caratterizzazione del copolimero

5.4.2.1. Sintesi e caratterizzazione del copolimero PHEA-g-bAPAE

Il PHEA è stato derivatizzato con il bAPAE utilizzando il BNPC. In particolare, 200 mg di PHEA sono stati dispersi in 4 ml di DMF-a; dopo completa solubilizzazione sono stati aggiunti 230 mg di BNPC solido. La soluzione è stata posta ad agitare per 4 ore a $40 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Contemporaneamente 922,71 μl di bAPAE sono stati dispersi in 7 ml di DMF-a. Trascorso il tempo di attivazione, la dispersione di PHEA è stata aggiunta goccia a goccia alla soluzione di bAPAE e la miscela di reazione è stata lasciata ad agitare a $25^\circ\text{C} \pm 0,1$ per 20 ore. Le quantità di ciascun reagente sono state opportunamente determinate in accordo a $R_1 = 0,6$ e $R_2 = 4$; essendo:

$$R_1 = (\text{mmol di bAPAE}) / (\text{mmol di RU funzionalizzabile su PHEA})$$

$$R_2 = (\text{mmol di BNPC}) / (\text{mmol di RU funzionalizzabile su PHEA})$$

Trascorso questo tempo, il polimero è stato isolato dalla miscela di reazione mediante precipitazione in miscela dietilere/diclorometano 2:1 v/v e la sospensione ottenuta è stata centrifugata a 4°C per 10 min a 10.000 rpm. Il prodotto solido è stato recuperato e lavato più volte in acetone, al fine di allontanare la bAPAE non reagita, fino a quando il pH delle acque di lavaggio acetoniche è risultato neutro. Il PHEA-g-bAPAE così ottenuto è stato solubilizzato in acqua bidistillata e posto in dialisi (*SpectraPor Dialysis Tubing*, a MWCO 25 kDa), contro acqua basica, al fine di allontanare il BNPC in eccesso, e successivamente congelato e liofilizzato.

Il copolimero PHEA-g-bAPAE è stato caratterizzato mediante analisi ^1H -NMR in D_2O (pD 5) e SEC.

Dallo spettro ^1H -NMR (300 MHz, D_2O pD 5, 25°C , TMS) sono stati rilevati i seguenti picchi: δ 1,70–2,20 (4H_{bAPAE} , $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$), δ 2,73 (2H_{PHEA} , $-\text{COCH}_2\text{CONH}-$), δ 3,12 (8H_{bAPAE} , $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), δ 3,23 (2H_{PHEA} , $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), δ 3,38 (4H_{bAPAE} , $-\text{CONHCH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), δ 3,54

($2H_{\text{PHEA}}$, $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), δ 4.02 ($2H_{\text{PHEA}}$, $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OCO}-$), δ 4.62 ($1H_{\text{PHEA}}$, $-\text{NHCH}(\text{CO})\text{CH}_2-$).

Il grado di derivatizzazione molare % in bAPAE (DD_{bAPAE}) è risultato essere 35 mol%. Il $\bar{M}_w$ del PHEA-g-bAPAE, determinato mediante analisi SEC, è pari a 20.921 Da ($\text{PDI}=1,41$). L'analisi è stata eseguita utilizzando la colonna PolySep-GFC- P4000 di dimensione di 300x7.8 mm (Phenomenex, Stati Uniti), con stesso sistema di rivelazione utilizzato per l'analisi condotta sul PHEA. È stato utilizzato come eluente il tampone citrato/fosfato 0.15 M +0.1 M NaCl pH 5, con un flusso di 1 ml/min e poli(etilene ossido) (40 kDa) come standard per la calibrazione. La temperatura della colonna è stata fissata a 25°C ed è stata utilizzata per l'analisi una concentrazione del polimero pari a 18 mg/ml.

5.4.2.2. Sintesi e caratterizzazione del copolimero PHEA-g-bAPAE-g-DY676

La derivatizzazione del PHEA-g-bAPAE con la DY676 *acid carboxylic* è stata effettuata utilizzando il CDI, come agente attivante i gruppi carbossilici. In particolare, ad una quantità nota di DY676, solubilizzata in DMSO-a alla concentrazione di 1,2 mg/ml, è stata aggiunta una quantità opportuna di CDI, in accordo con $R_4=3,5$ dove $R_4=(\text{mmol CDI})/(\text{mmol DY676})$. La dispersione è stata posta ad agitare a $40 \pm 0,1^\circ\text{C}$ per 4h.

Contestualmente, una quantità nota di PHEA-g-bAPAE è stata dispersa in DMSO-a ad una concentrazione pari a 41,11 mg/ml, in accordo con $R_3=0,004$, essendo $R_3=(\text{mmol DY676})/(\text{mmol di RU funzionalizzabile su PHEA-g-bAPEA})$.

Trascorso il tempo di attivazione, la soluzione di DY676 è stata aggiunta lentamente goccia a goccia alla dispersione di PHEA-g-bAPAE e la miscela di reazione è stata lasciata sotto continua agitazione a $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$ per 48 ore. Dopo tale tempo, la miscela di reazione è stata precipitata in una miscela di etere dietilico/ diclorometano 2:1 v/v, al fine di allontanare il solvente di reazione e il CDI in eccesso. La sospensione ottenuta è stata centrifugata a 10.000

rpm, per 10 minuti a 4 °C. Il solido è stato recuperato e lavato più volte in etanolo, per allontanare la sonda non legata. I residui di solventi organici, rimasti al termine dei lavaggi, sono stati allontanati sottovuoto; il solido è stato poi solubilizzato in acqua bidistillata e purificato ulteriormente mediante *gel filtration chromatography*, usando, come fase stazionaria, una resina Sephadex G25 medium, con dimensione delle particelle compreso fra 50-150 μm , e, come fase mobile, l'acqua bidistillata. Al termine della purificazione l'aliquota contenente il copolimero, identificata dal colore blu, è stata congelata e liofilizzata. Il copolimero PHEA-g-bAPAE-g-DY676 è stato ottenuto con una resa pari al 60% rispetto al PHEA-g-bAPAE di partenza.

La reazione è risultata quantitativa ed il grado di derivatizzazione % in DY676 (DD_{DY676}), calcolato utilizzando il metodo della dialisi, è risultato pari a 0,4 mol%.

5.4.2.3. Sintesi e caratterizzazione del copolimero PHEA-g-bAPAE-g-DY676-g-PLGA

La derivatizzazione del PHEA-g-bAPAE-g-DY676 con il PLGA è stata effettuata utilizzando il CDI come agente attivante i gruppi carbossilici terminali del PLGA. In particolare, ad una quantità nota di PLGA, solubilizzata in DMSO-a alla concentrazione di 90,22 mg/ml, è stata aggiunta una quantità opportuna di CDI, in accordo con $R_6=1,2$, essendo $R_6=(\text{mmoli CDI})/(\text{mmoli PLGA})$.

La dispersione è stata posta ad agitare a $40\pm 0,1^\circ\text{C}$ per 4 ore. Contestualmente, una quantità nota di PHEA-g-bAPAE-g-DY676 è stata dispersa in DMSO-a ad una concentrazione pari a 33,33 mg/ml, in accordo con $R_5=0,05$, essendo $R_5=(\text{mmoli PLGA})/(\text{mmol di RU funzionalizzabile su PHEA-g-bAPEA})$.

La dispersione ottenuta è stata aggiunta lentamente alla dispersione di PLGA attivata e la miscela di reazione ottenuta è stata lasciata sotto continua agitazione a $40\pm 0,1^\circ\text{C}$ per 48 ore. Dopo tale tempo, la miscela di reazione è stata aggiunta goccia a goccia in una miscela di etere

dietilico/DCM avente rapporto 1:2 v/v e la sospensione ottenuta è stata centrifugata a 10.000 rpm, per 10 minuti a 4°C. Una volta recuperato, il precipitato è stato lavato più volte con una miscela di DCM/etere dietilico 55:45 v/v per allontanare il PLGA non reagito. Il prodotto solido ottenuto è stato infine essiccato a pressione ridotta per allontanare le tracce di solvente organico ed è stato conservato in frigo (4°C) per la successiva caratterizzazione.

La resa è risultata pari a circa il 90% rispetto al PHEA-g-bAPAE-g-DY₆₇₆ e il PLGA di partenza.

Il PHEA-g-bAPAE-g-DY₆₇₆-g-PLGA è stato caratterizzato mediante analisi ¹H-NMR e SEC. Lo spettro ¹H-NMR in DMF-d₇ (300 MHz, 25°C, TMS) ha evidenziato i seguenti picchi: δ 1,5-1,9 (m, 3H_{PLGA} -[OCOCH(CH₃)]₉₂-); δ 2,73 (m, 2H_{PHEA} -COCHCH₂CONH-); δ 3,5 (t, 2H_{PHEA} -NHCH₂CH₂O-); δ 3,6 (t, 2H_{PHEA} -NHCH₂CH₂O-); δ 5 (m, 68 1H_{PHEA} -NHCH(CO)CH₂-); δ 4,2- 4,5 e 5,4-5,8 (1H_{PLGA}, -[OCOCH(CH₃)]₉₂-); δ 5,3 (2H_{PLGA}, -[OCOCH₂]₉₂-).

Il grado di derivatizzazione in PLGA (DD_{PLGA}%) è risultato pari a 4,55 mol%. Il $\bar{M}_w$ del PHEA-g-bAPAE-g-DY₆₇₆-g-PLGA, determinato mediante analisi SEC nelle condizioni descritte per il PHEA, è risultato pari a 195.827 Da (PDI=1,974).

5.4.2.4. Studi di stabilità

Lo studio di stabilità della sonda DY676 è stato effettuato con il metodo della dialisi su una dispersione di copolimero PHEA-g-bAPAE-g-DY676 e di nanoparticelle ottenute dal PHEA-g-bAPAE-g-DY676-g-PLGA, in tampone fosfato, a pH 4,5 e in tampone fosfato di Dulbecco (DPBS) a 7,4, per un tempo massimo di 24 h a 37°C. In particolare, 22 mg/ml di copolimero PHEA-g-bAPAE-g-DY676 sono stati dispersi in ciascun tampone e la dispersione ottenuta è stata posta all'interno di una membrana da dialisi (RC Turbing, MWCO di 25 kDa). Quest'ultima è stata poi inserita in 4 ml di mezzo a pH 4,5 o a pH 7,4. Mediante analisi spettroscopica UV (Shimadzu) a $\lambda=673$ nm, la quantità di sonda eventualmente rilasciata è stata

determinata misurando l'assorbanza del mezzo esterno dopo incubazione a 1, 2, 4, 6, 8 e 24 h. L'assorbanza rilevata dallo strumento è stata interpolata con una retta di taratura, ricavata precedentemente, riportando in un grafico i valori di assorbanza in funzione della concentrazione di soluzioni di DY676 a concentrazioni note, comprese tra 0,0125 mg/ml e 0,000781 mg/ml nel tampone DPBS a pH 7,4, e comprese tra 0,025 mg/ml e 0,000781 mg/ml nel tampone fosfato a pH 4,5. Conoscendo il grado di derivatizzazione in moli % della DY676 rispetto alle moli di unità ripetitive (U.R.) del copolimero PHEA-g-bAPAE-g-DY676, è stata calcolata la % di sonda idrolizzata.

La stessa procedura è stata applicata sulle nanoparticelle ottenute dal copolimero PHEA-g-bAPAE-g-DY676-g-PLGA. Il copolimero è stato solubilizzato in 700 μ l di DMSO, ad una concentrazione di 85,70 mg/ml, la dispersione ottenuta è stata poi inserita in un tubo da dialisi. Una volta allontanato il DMSO è stata valutata l'idrolisi della DY676. È stato utilizzato un volume di mezzo esterno, (a pH 7,4 o 4,5) pari a 3,5 ml. Conoscendo la quantità di sonda legata nel copolimero di partenza è stato possibile risalire alla % di sonda idrolizzata, mediante l'analisi spettroscopica a $\lambda=676$ nm del mezzo esterno a diversi tempi di incubazione e confrontando le assorbanze ottenute con la retta di taratura costruita come descritto in precedenza.

5.4.2.5. Studi di complessazione

La complessazione del siRNA con il copolimero è stata valutata mediante il saggio di ritardo di mobilità elettroforetica (*Electrophoretic mobility shift assay- EMSA*) mediante elettroforesi su gel di agarosio. I poliplessi sono stati ottenuti aggiungendo 10 μ l della dispersione del copolimero PHEA-g-bAPAE-g-DY676-g-PLGA in DMSO, a diverse concentrazioni, ad uno stesso volume di soluzione di siRNA in HEPES privo di nucleasi (20 mM), a pH 7,4, con una

concentrazione fissa, pari a 0,1 mg/ml, al fine di ottenere diversi rapporti in peso polimero/siRNA (R); le miscele sono state emulsionate mediante vortex ed incubate in *orbital shaker* sotto agitazione a 37°C per 30 min, per consentire la completa formazione dei poliplessi. I rapporti in peso polimero/siRNA (R) utilizzati sono stati: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10. Per l'elettroforesi su gel 20 µl di ciascun campione sono stati caricati su un gel di agarosio all'1,5% p/v, contenente 100 µl di EtBr e fatti scorrere a 100 V in tampone trisacetato/EDTA (TAE) a pH 8 per 30 min. Gli spot sono stati visualizzati mediante transilluminatore UV e fotografati utilizzando una fotocamera digitale.

5.4.3. Preparazione e caratterizzazione delle nanoparticelle ibride lipide-polimero

Le nanoparticelle ibride lipide-polimero contenenti il siRNA contro la GFP (LPHNPs@siGFP) sono state preparate mediante la tecnica modificata dell'emulsione/evaporazione del solvente. In particolare, è stata preparata una fase organica disperdendo il copolimero PHEA-g-bAPAE-g-DY676-g-PLGA a una concentrazione iniziale pari a 1,25 mg/ml, e la miscela dei fosfolipidi scelta, costituita da DPPC/DSPE-PEG2000 (1:1 p/p), mantenendo un rapporto in peso fosfolipidi/polimero pari a 1:10, in diclorometano. La dispersione organica ottenuta è stata emulsionata con 100 µl di una fase acquosa, contenente il siGFP (1,25 nmol/ml), attraverso l'uso di un vortex (Velp scientifica Zx3). L'emulsione a/o è stata fatta gocciolare in etanolo 96% (12,5 ml) e la dispersione risultante mantenuta sotto moderata agitazione per 10 minuti. Successivamente, quest'ultima è stata diluita con 12,5 ml di acqua bidistillata e posta sotto agitazione per altri 10 minuti, poi posta a pressione ridotta a 30°C fino a un volume finale di 5 ml. Le LPHNPs@siGFP, sono state isolate mediante centrifugazione (Allegra X-22R beckman counter) a 4500xg per 1 ora a 4 °C, utilizzando tubi Millipore Amicon (cutoff di 30kDa). Il pellet così ottenuto è stato disperso in 1 ml di acqua, congelato e successivamente liofilizzato.

Le LPHNPs@siRNA sono state ottenute con una resa pari al 54% rispetto al peso totale di polimero e fosfolipidi utilizzato.

5.4.3.1. Analisi dimensionale e misure di potenziale ζ

I valori di dimensione media (nm) e di indice di polidispersità (PDI) delle LPHNPs sono stati determinati pre- e post- liofilizzazione mediante la spettroscopia a correlazione fotonica (PCS) mediante uno *Zetasizer Nano ZS* (Malvern Instrument, Malvern, UK). In particolare, le analisi sono state effettuate sul campione LPHNPs@siGFP pre- e post- processo di liofilizzazione, ridisperdendo una quantità nota di LPHNPs in acqua bidistillata.

Ciascuna analisi è stata effettuata ad un angolo fisso di 175°C e alla temperatura di 25°C. I valori di potenziale ζ sono stati misurati sulle stesse dispersioni ricorrendo ai principi del laser *Doppler Velocitometry e PhaseAnalysis Light Scattering* (tecnica M3-PALS) mediante lo stesso strumento. Le misure sono state fatte in triplicato a 25°C.

5.4.3.2. Quantificazione del siRNA

La quantità di siRNA incapsulato è stata determinata sia indirettamente attraverso la quantificazione del siRNA non incapsulato sia direttamente. Brevemente, subito dopo la produzione, le LPHNPs@siGFP sono state raccolte per centrifugazione (4500xg, 1 ora a 4 °C) e il surnatante è stato analizzato per il contenuto di siRNA utilizzando il reagente *Quant-IT RiboGreen* (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) secondo le istruzioni del produttore. Per effettuare l'analisi diretta, una quantità nota di pellet liofilizzato di LPHNPs@siGFP è stata dispersa in DMSO e lasciata agitare per due ore. Trascorso questo tempo è stata diluita con tampone TAE 1X e analizzata con *RiboGreen*.

L'analisi quantitativa è stata eseguita mediante spettrofluorimetria a $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 480 nm/520 nm (lettore di piastre ProMega GloMax, USA).

I risultati sono espressi come efficienza di incapsulamento ($\text{carico effettivo/carico teorico} \times 100$) $\pm$ SD dei valori raccolti da tre diversi lotti.

5.4.3.3. *Analisi morfologica*

La morfologia delle LPHNPs@siGFP è stata valutata mediante una analisi di microscopia elettronica a trasmissione (TEM). In particolare, per la deposizione, una goccia (10 μ l) di una dispersione acquosa di LPHNPs@siGFP è stata posta su una griglia in rame 200 mesh rivestita con film di carbon black e lasciata ad asciugare per 30 minuti. Trascorso tale tempo, una goccia (10 μ l) di una soluzione di acido fosfotungstico (1% p/v) è stata aggiunta sulla stessa griglia, come agente di contrasto, e lasciata asciugare per 10 minuti. Le immagini sono state acquisite utilizzando un microscopio FEI Tecnai G2 200 kV S -TWIN equipaggiato con una camera 4 K (Thermo Fisher Scientific).

5.4.3.4. *Quantificazione percentuale del contenuto di fosfolipidi*

Per determinare il contenuto percentuale di DPPC e DSPE-PEG₂₀₀₀ nel sistema LPHNPs@siGFP ottenuto, è stato effettuato il saggio colorimetrico utilizzando dell'ammonio ferrotiocianato come riportato nel paragrafo 4.3.4.3 della parte sperimentale.

L'assorbanza rilevata dallo strumento è stata interpolata con una retta di taratura, ottenuta a partire da una miscela di fosfolipidi DPPC/DSPEPEG₂₀₀₀ 1:1 p/p a concentrazioni note e comprese tra 0,1 mg/ml e 0,00625 mg/ml, in modo da ricavare la percentuale p/p di fosfolipidi in ciascun campione.

5.4.3.5. Analisi turbidimetrica

Le interazioni tra LPHNPs@siGFP e la mucina sono state studiate mediante l'analisi turbidimetrica. In dettaglio, è stata preparata una dispersione acquosa di mucina ad una concentrazione pari a 0,08% p/v. Questa è stata mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente overnight e successivamente è stata centrifugata (Allegra X-22R beckman counter) a 6000 rcf, a 4 °C per 20 minuti, e il surnatante utilizzato per effettuare il saggio turbidimetrico. Una quantità nota di campione è stata dispersa nella dispersione acquosa di mucina in modo da ottenere una concentrazione finale di particelle pari a 1mg/ml. Mediante analisi spettroscopica UV (Shimadzu), è stata misurata l'assorbanza della miscela di mucina/ LPHNPs e a $\lambda=500$ nm al tempo 0 e dopo incubazione in *orbital shaker* agitazione a 37°C per 30 e 60 minuti. Come assorbanze di riferimento sono state utilizzate la sola dispersione acquosa di mucina e le dispersioni di LPHNPs@siGFP in acqua (1 mg/ml). Gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato ed i risultati sono stati espressi come assorbanza a 500 nm $\pm$ SD nel tempo.

5.4.4. Caratterizzazione biologica

5.4.4.1. Colture cellulari

Le cellule di carcinoma polmonare umano (H1299) sono state coltivate in terreno RPMI 1640 integrato con 10% FBS, 1% P/S. Le cellule sono state passate ogni 3 giorni con 0,05% v/v tripsina e subcoltivate in fiasche da 75 cm².

La linea cellulare di carcinoma polmonare umano che esprime stabilmente la proteina a fluorescenza verde (H1299/eGFP) è stata coltivata in terreno RPMI 1640 integrato con 10% FBS, 1% P/S e 0,4% G418.

Tutte le cellule sono state mantenute in condizioni standard (95% di umidità relativa, 5% di CO₂, 37°C).

5.4.4.2. *Test di vitalità cellulare*

Per il test di vitalità cellulare, le cellule H1299 sono state seminate a $1,5 \times 10^4$ cellule/cm².

Una dispersione acquosa di LPHNPs@siGFP è stata diluita con terreno completo RPMI-1640 in una gamma di concentrazioni da 0,5 a 0,0039 mg/ml, e incubate con cellule H1299 per 24 ore e 72 ore.

Trascorso tale tempo, il surnatante è stato rimosso e ogni piastra è stata lavata con DPBS sterile; successivamente, le cellule in ogni pozzetto sono state incubate con 100 µL di bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), preparato il giorno prima in DBPS sterile (1 ml) e diluito il giorno dell'analisi con terreno RPMI- 1640 privo di siero (0,5 mg/ml) a 37°C per 3 ore.

La soluzione di MTT è stata poi sostituita con DMSO e incubata a temperatura ambiente per 30 minuti. L'assorbanza è stata infine determinata con un lettore di micropiastre (TECAN, Männedorf, Svizzera) a $\lambda=570$ nm.

5.4.4.3. *Studi di uptake cellulare*

Per determinare l'uptake cellulare delle LPHNPs@siGFP, è stato utilizzato il siRNA marcato con Alexa Fluor 647 (siFLUO) per preparare il sistema ibrido (LPHNPs@siFLUO).

Le cellule H1299 sono state seminate in piastre da 24 pozzetti (25.000 cellule per pozzetto) 24 ore prima dell'uso.

Successivamente, le LPHNPs@siFLUO (50 pmol AF647-siRNA per pozzetto), diluite in terreno completo RPMI-1640, sono state incubate con le cellule per 24 ore.

Trascorso tale tempo, il surnatante è stato rimosso e ogni piastra è stata lavata con DPBS sterile; le cellule sono state poi staccate con lo 0,05% di tripsina-EDTA.

Le cellule staccate sono state poi lavate con DPBS sterile altre due volte e analizzate mediante citofluorimetria (Attune NxT Acoustic Focusing Cytometer, Thermo Fisher, Darmstadt, Germania) eccitato con un laser da 638 nm e rilevato con un laser a 670 nm e rilevato con un filtro RL1 (670/14 nm). La lipofectamina₂₀₀₀ è stata utilizzata come controllo positivo, il siFLUO *naked* e le cellule non trattate (*blank*) come controllo negativo.

Le immagini sono state acquisite con un microscopio EVOS M5000 (Thermo Fisher, Darmstadt, Germania) utilizzando il canale CY5. Gli esperimenti sono stati eseguiti in triplo per ogni tempo di incubazione.

5.4.4.4. Studio di silenziamento genico

Le LPHNPs sono state preparate come descritto sopra caricate con siRNA scrambled (LPHNPs@siNC) o siRNA contro GFP (LPHNPs@siGFP).

Per lo studio di silenziamento genico, le cellule H1299/eGFP sono state seminate in piastre da 24 pozzetti (20.000 cellule in 1 ml di terreno per pozzetto) e trasfettate con i nostri sistemi (100 pmol siRNA per pozzetto). La lipofectamina₂₀₀₀ formulata con siNC e siGFP ha rappresentato il controllo positivo.

Trascorse le 72 ore, le cellule trasfettate sono state lavate, staccate e lavate con DPBS per le misure di citofluorimetria (Attune Cytometer, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Germania), con un laser a 488 nm per l'eccitazione e un filtro BL1 (530/30 nm) per la rilevazione.

5.4.5. Formulazione *Nano into Micro* (NiM)

La formulazione di NiM di LPHNPs@siGFP (NiM_LPHNPs@siGFP) è stata preparata utilizzando un Mini Spray Dryer B-290 (Büchi Labortechnik, Flawil, Svizzera) seguendo i seguenti parametri: T di ingresso: 100°C; T di uscita: 56°C; aspirazione: 70%; ugello atomizzatore: 0,6 mm; gas utilizzato: azoto. Sono stati utilizzati dei tubi *Tubo Pumpsil* 1,6

mm×1,6 mm (Watson Marlow Tubing, Falmouth, Regno Unito) con una velocità di pompaggio di 1,4 mL/min.

Una soluzione madre di LPHNPs@siGFP (contenente 30 µg di siRNA) è stata diluita con una soluzione acquosa di trealosio (5% p/v) fino ad un volume di 5 ml. La dispersione così ottenuta è stata filtrata su 5 µm e nebulizzata.

Il contenuto di siGFP caricato in NiM_LPHNPs@siGFP è stato determinato utilizzando il saggio RiboGreen come già visto per l'EE% dei sistemi ibridi (metodo diretto).

La morfologia delle particelle è stata analizzata mediante microscopia elettronica a scansione (SEM) utilizzando un Phenom ProXSEM. Le polveri di tutti i campioni sono state poste su un nastro biadesivo precedentemente applicato su uno *stub* in acciaio inossidabile e ricoperti di oro prima dell'esame al microscopio. Il diametro medio delle microparticelle è stato determinato utilizzando il programma *ImageJ*, analizzando un numero sufficientemente rappresentativo di particelle (>500 particelle).

5.4.5.1. Comportamento aerodinamico

Il comportamento aerodinamico delle NiM_LPHNPs@siGFP è stato valutato utilizzando l'inalatore di polvere secca (DPI) Handihaler® collegato ad un *Next Generation Impactor* (NGI, Apparato E, Eur. Ph 10th ed., Copley Scientific Ltd., Nottingham, Regno Unito) dotato di un pre-separatore (PS) tra lo stadio 1 e la porta di induzione (IP), conformemente alle indicazioni per i test DPI.¹⁵⁴

Per favorire una deposizione ottimale delle particelle in ogni singolo stage durante l'aerosolizzazione della polvere, il PS e le tazze di impattazione di ogni stadio sono stati rivestiti con l'1% (w/v) di *Tween 80*® in etanolo prima dell'uso e lasciati asciugare. La soluzione di rivestimento scelta è stata segnalata come uno degli agenti di rivestimento più promettenti in termini di riproducibilità e caratteristiche di sicurezza.^{194,195} La portata è stata impostata a 30

L/min e controllata con un flussometro (DFM3, Copley Scientific). Tre capsule di metilcellulosa (dimensione 3) riempite manualmente ($40 \pm 0,1$ mg) sono state scaricate tre volte nell'NGI per 5 secondi.

La polvere depositata è stata quindi raccolta con DMSO, gli stage piccoli sono stati riempiti con 2 ml, mentre quelli più grandi con 4 ml.

Tutte le parti sono state agitate con cautela e poste su un agitatore orizzontale per 20 minuti. È stata preparata una curva standard di LPHNPs@siGFP in DMSO. Tutti i campioni sono stati trasferiti in una piastra nera da 96 pozzetti e, dopo l'aggiunta del reagente *Ribogreen* alla diluizione 1:100, le intensità di fluorescenza sono state misurate a una lunghezza d'onda di eccitazione di 480 nm e una lunghezza d'onda di emissione di 525 nm.

Per ogni campione, l'esperimento è stato ripetuto almeno tre volte (3 capsule per ogni azionamento) e i dati ottenuti sono stati analizzati per ottenere la dose emessa (ED; farmaco raccolto nel boccaglio, nell'IP, nel PS e nelle coppette di impattazione) e l'ED% (rapporto tra l'ED e la massa iniziale del campione testato). Inoltre, la frazione di particelle fini (FPF%), definita come la percentuale di massa dell'ED con un diametro aerodinamico inferiore a $5,0 \mu\text{m}$, è stata determinata dall'interpolazione della curva di distribuzione del diametro aerodinamico cumulativo tra la fase 1 e la fase 2. La quantità di massa cumulativa di ogni stadio è stata tracciata come percentuale del campione recuperato rispetto al diametro di *cut-off*, escludendo la massa depositata nella porta di induzione a causa dell'indisponibilità di un limite dimensionale superiore preciso per le particelle depositate in questa sezione. Il diametro aerodinamico mediano di massa (MMAD) delle particelle - diametro aerodinamico al quale il 50% delle particelle è più grande e il 50% è più piccolo - è stato poi estrapolato dal grafico secondo la Eur. Ph. 10th ed., ed è stato determinato il valore della deviazione standard geometrica (GSD).

5.4.6. Analisi statistica

Tutti gli esperimenti sono stati ripetuti almeno tre volte. Tutti i dati sono espressi come medie $\pm$ SD. Tutti i dati sono stati analizzati con il test t di Student. Un valore $P < 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo, un valore $P < 0,001$ è stato considerato altamente significativo, mentre un valore $P > 0,05$ è stato considerato non statisticamente significativo.

6. Bibliografia

1. Netea, M. G. *et al.* A guiding map for inflammation. *Nature Immunology* vol. 18 826–831 Preprint at <https://doi.org/10.1038/ni.3790> (2017).
2. Furman, D. *et al.* Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nat Med* **25**, 1822–1832 (2019).
3. Aghasafari, P., George, U. & Pidaparti, R. A review of inflammatory mechanism in airway diseases. *Inflammation Research* vol. 68 59–74 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00011-018-1191-2> (2019).
4. Whitsett, J. A. & Alenghat, T. Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. *Nature Immunology* vol. 16 27–35 Preprint at <https://doi.org/10.1038/ni.3045> (2015).
5. Barnes, P. J. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nature Reviews Immunology* vol. 8 183–192 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nri2254> (2008).
6. Owen, A. & Rannard, S. Considerations for clinically-relevant nanomedicine therapies for chronic diseases. *Nanomedicine* vol. 10 3103–3107 Preprint at <https://doi.org/10.2217/nnm.15.135> (2015).
7. Naghavi, M. *et al.* Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet* **385**, 117–171 (2015).
8. Lopez, A. D. *et al.* Chronic obstructive pulmonary disease: Current burden and future projections. *European Respiratory Journal* **27**, 397–412 (2006).
9. GLOBAL INITIATIVE FOR CHRONIC OBSTRUCTIVE LUNG DISEASE GLOBAL STRATEGY FOR THE DIAGNOSIS, MANAGEMENT, AND PREVENTION OF CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE (2023 REPORT). www.goldcopd.org (2022).
10. Barnes, P. J. *et al.* Chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Dis Primers* **1**, (2015).
11. Kheradmand, F., Shan, M., Xu, C. & Corry, D. B. Autoimmunity in chronic obstructive pulmonary disease: Clinical and experimental evidence. *Expert Review of Clinical Immunology* vol. 8 285–292 Preprint at <https://doi.org/10.1586/eci.12.7> (2012).
12. Barnes, P. J. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* vol. 138 16–27 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.05.011> (2016).
13. Duvoix, A., Roussel, B. D. & Lomas, D. A. Molecular pathogenesis of alpha-1-antitrypsin deficiency. *Revue des Maladies Respiratoires* vol. 31 992–1002 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2014.03.015> (2014).
14. Barnes, P. J., Shapiro, S. D. & Pauwels, R. A. Chronic obstructive pulmonary disease: Molecular and cellular mechanisms. *European Respiratory Journal* vol. 22 672–688 Preprint at <https://doi.org/10.1183/09031936.03.00040703> (2003).
15. Chung, K. F. & Adcock, I. M. Multifaceted mechanisms in COPD: Inflammation, immunity, and tissue repair and destruction. *European Respiratory Journal* vol. 31 1334–1356 Preprint at <https://doi.org/10.1183/09031936.00018908> (2008).
16. Rahman, I. & MacNee, W. Antioxidant pharmacological therapies for COPD. *Current Opinion in Pharmacology* vol. 12 256–265 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.coph.2012.01.015> (2012).

17. Barnes, P. J. New anti-inflammatory targets for chronic obstructive pulmonary disease. *Nature Reviews Drug Discovery* vol. 12 543–559 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrd4025> (2013).
18. Barnes, P. J. How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture 2005. *British Journal of Pharmacology* vol. 148 245–254 Preprint at <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706736> (2006).
19. Malhotra, D. *et al.* Decline in NRF2-regulated antioxidants in chronic obstructive pulmonary disease lungs due to loss of its positive regulator, DJ-1. *Am J Respir Crit Care Med* **178**, 592–604 (2008).
20. Laddha, A. P. & Kulkarni, Y. A. VEGF and FGF-2: Promising targets for the treatment of respiratory disorders. *Respiratory Medicine* vol. 156 33–46 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2019.08.003> (2019).
21. Bracke, K. R. & Brusselle, G. G. Chronic Obstructive Pulmonary Disease. in *Mucosal Immunology: Fourth Edition* vols 2–2 1857–1866 (Elsevier Inc., 2015).
22. Cosio, M. G., Saetta, M. & Agusti, A. *Immunologic Aspects of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. *N Engl J Med* vol. 360 (2009).
23. Urbanowicz, R. A., Lamb, J. R., Todd, I., Corne, J. M. & Fairclough, L. C. *Enhanced effector function of cytotoxic cells in the induced sputum of COPD patients*. <http://respiratory-research.com/content/11/1/76> (2010).
24. Lee, S. H. *et al.* Anti-elastin autoimmunity in tobacco smoking-induced emphysema. *Nat Med* **13**, 567–569 (2007).
25. Polverino, F., Seys, L. J. M., Bracke, K. R. & Owen, C. A. B cells in chronic obstructive pulmonary disease: moving to center stage. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **311**, 687–695 (2016).
26. Barnes, P. J. Alveolar macrophages as orchestrators of COPD. *COPD* vol. 1 59–70 Preprint at <https://doi.org/10.1081/COPD-120028701> (2004).
27. He, W., Kapate, N., Shields, C. W. & Mitragotri, S. Drug delivery to macrophages: A review of targeting drugs and drug carriers to macrophages for inflammatory diseases. *Advanced Drug Delivery Reviews* vols 165–166 15–40 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.12.001> (2020).
28. Mehta, M. *et al.* Interactions with the macrophages: An emerging targeted approach using novel drug delivery systems in respiratory diseases. *Chemico-Biological Interactions* vol. 304 10–19 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.02.021> (2019).
29. Morales-Nebreda, L., Misharin, A. V., Perlman, H. & Scott Budinger, G. R. The heterogeneity of lung macrophages in the susceptibility to disease. *European Respiratory Review* **24**, 505–509 (2015).
30. Patel, B., Gupta, N. & Ahsan, F. Particle engineering to enhance or lessen particle uptake by alveolar macrophages and to influence the therapeutic outcome. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* vol. 89 163–174 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.12.001> (2015).
31. Arora, S., Dev, K., Agarwal, B., Das, P. & Syed, M. A. Macrophages: Their role, activation and polarization in pulmonary diseases. *Immunobiology* vol. 223 383–396 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2017.11.001> (2018).
32. Adcock, I. M. & Barnes, P. J. Molecular mechanisms of corticosteroid resistance. *Chest* **134**, 394–401 (2008).
33. Ito, K. *et al.* *Decreased Histone Deacetylase Activity in Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. *n engl j med* vol. 352 www.nejm.org (2005).

34. Zuo, H., Cattani-Cavaliere, I., Musheshe, N., Nikolaev, V. O. & Schmidt, M. Phosphodiesterases as therapeutic targets for respiratory diseases. *Pharmacol Ther* **197**, 225–242 (2019).
35. Mulhall, A. M., Droegge, C. A., Ernst, N. E., Panos, R. J. & Zafar, M. A. Phosphodiesterase 4 inhibitors for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease: A review of current and developing drugs. *Expert Opinion on Investigational Drugs* vol. 24 1597–1611 Preprint at <https://doi.org/10.1517/13543784.2015.1094054> (2015).
36. CHMP. 7 *Westferry Circus • Canary Wharf • London E14 4HB • United Kingdom Evaluation of Medicines for Human Use CHMP assessment report*. www.ema.europa.eu (2010).
37. Ito, K., Colley, T. & Mercado, N. Geroprotectors as a novel therapeutic strategy for COPD, an accelerating aging disease. *International Journal of COPD* vol. 7 641–652 Preprint at <https://doi.org/10.2147/COPD.S28250> (2012).
38. Ito, K. & Barnes, P. J. COPD as a disease of accelerated lung aging. *Chest* **135**, 173–180 (2009).
39. Yoo, Y. J., Kim, H., Park, S. R. & Yoon, Y. J. An overview of rapamycin: from discovery to future perspectives. *J Ind Microbiol Biotechnol* **44**, 537–553 (2017).
40. Hua, H. *et al.* Targeting mTOR for cancer therapy. *Journal of Hematology and Oncology* vol. 12 Preprint at <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0754-1> (2019).
41. Romero, Y. *et al.* mTORC1 activation decreases autophagy in aging and idiopathic pulmonary fibrosis and contributes to apoptosis resistance in IPF fibroblasts. *Aging Cell* **15**, 1103–1112 (2016).
42. Zhang, H. *et al.* Rapamycin attenuates Tc1 and Tc17 cell responses in cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Inflammation Research* **68**, 957–968 (2019).
43. Mitani, A., Ito, K., Vuppusetty, C., Barnes, P. J. & Mercado, N. Restoration of corticosteroid sensitivity in chronic obstructive pulmonary disease by inhibition of mammalian target of rapamycin. *Am J Respir Crit Care Med* **193**, 143–153 (2016).
44. Wang, Y. *et al.* MTOR Suppresses Cigarette Smoke–Induced Epithelial Cell Death and Airway Inflammation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *The Journal of Immunology* **200**, 2571–2580 (2018).
45. Savla, R. & Minko, T. Nanotechnology approaches for inhalation treatment of fibrosis. *Journal of Drug Targeting* vol. 21 914–925 Preprint at <https://doi.org/10.3109/1061186X.2013.829078> (2013).
46. Shaughnessy, C. A., Yadav, S., Bratcher, P. E. & Zeitlin, P. L. Receptor-mediated activation of CFTR via prostaglandin signaling pathways in the airway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **322**, L305–L314 (2022).
47. Ratjen, F. *Restoring Airway Surface Liquid in Cystic Fibrosis*. *n engl j med* vol. 354 www.nejm.org (2006).
48. Bansil, R. & Turner, B. S. The biology of mucus: Composition, synthesis and organization. *Advanced Drug Delivery Reviews* vol. 124 3–15 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.09.023> (2018).
49. Turcios, N. L. Cystic fibrosis lung disease: An overview. *Respir Care* **65**, 233–251 (2020).
50. Sawicki, G. S., Chou, W., Raimundo, K., Trzaskoma, B. & Konstan, M. W. Randomized trial of efficacy and safety of dornase alfa delivered by eRapid nebulizer in cystic fibrosis patients. *Journal of Cystic Fibrosis* **14**, 777–783 (2015).
51. CHMP. ANNEX I SUMMARY OF PRODUCT CHARACTERISTICS.

52. Kim, N., Duncan, G. A., Hanes, J. & Suk, J. S. Barriers to inhaled gene therapy of obstructive lung diseases: A review. *Journal of Controlled Release* **240**, 465–488 (2016).
53. Lands, L. C. & Dauletbaev, N. High-dose ibuprofen in cystic fibrosis. *Pharmaceuticals* vol. 3 2213–2224 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ph3072213> (2010).
54. De Boeck, K. & Amaral, M. D. Progress in therapies for cystic fibrosis. *The Lancet Respiratory Medicine* vol. 4 662–674 Preprint at [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(16\)00023-0](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(16)00023-0) (2016).
55. Roesch, E. A., Nichols, D. P. & Chmiel, J. F. Inflammation in cystic fibrosis: An update. *Pediatric Pulmonology* vol. 53 S30–S50 Preprint at <https://doi.org/10.1002/ppul.24129> (2018).
56. Lewis Editor, D. *An Essential Guide to a Complex, Multi-System Disease Cystic Fibrosis in Primary Care*.
57. Freissmuth, M., Gloeckel, C., Koenig, X. & Keuerleber, S. Novel composition for the treatment of cystic fibrosis. (2014).
58. Vane, J. & Corin, R. E. Prostacyclin: A vascular mediator. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* vol. 26 571–578 Preprint at [https://doi.org/10.1016/S1078-5884\(03\)00385-X](https://doi.org/10.1016/S1078-5884(03)00385-X) (2003).
59. Feldman, J., Habib, N., Radosevich, J. & Dutt, M. Oral treprostinil in the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* vol. 18 1661–1667 Preprint at <https://doi.org/10.1080/14656566.2017.1378347> (2017).
60. Dorris, S. L. & Peebles, R. S. PGI 2 as a regulator of inflammatory diseases. *Mediators of Inflammation* vol. 2012 Preprint at <https://doi.org/10.1155/2012/926968> (2012).
61. Raychaudhuri, B. *et al.* The prostacyclin analogue treprostinil blocks NFκB nuclear translocation in human alveolar macrophages. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 33344–33348 (2002).
62. Barst, R. J. *et al.* Beraprost therapy for pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* **41**, 2119–2125 (2003).
63. Strassheim, D., Riddle, S. R., Burke, D. L., Geraci, M. W. & Stenmark, K. R. Prostacyclin Inhibits IFN-γ-Stimulated Cytokine Expression by Reduced Recruitment of CBP/p300 to STAT1 in a SOCS-1-Independent Manner. *The Journal of Immunology* **183**, 6981–6988 (2009).
64. ventavis-epar-scientific-discussion_en.
65. Aulton BPharm FAAPS FSP FRPharmS, M. E. & Taylor BPharm FRPharmS, K. M. *Aulton's Pharmaceuticals: The Design and Manufacture of Medicines. Aulton's Pharmaceuticals* www.konkur.in (2018).
66. Fernández Tena, A. & Casan Clarà, P. Deposition of Inhaled Particles in the Lungs. *Archivos de Bronconeumología (English Edition)* **48**, 240–246 (2012).
67. Tomashefski, J. F. & Farver, C. F. *Anatomy and Histology of the Lung*.
68. Laube, B. L. *et al.* What the pulmonary specialist should know about the new inhalation therapies. *European Respiratory Journal* vol. 37 1308–1331 Preprint at <https://doi.org/10.1183/09031936.00166410> (2011).
69. Smyth, H. D. C. The influence of formulation variables on the performance of alternative propellant-driven metered dose inhalers. in *Advanced Drug Delivery Reviews* vol. 55 807–828 (Elsevier, 2003).
70. Zhang, J., Wu, L., Chan, H. K. & Watanabe, W. Formation, characterization, and fate of inhaled drug nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews* vol. 63 441–455 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.11.002> (2011).
71. He, Y. *et al.* Rational particle design to overcome pulmonary barriers for obstructive lung diseases therapy. *Journal of Controlled Release* **314**, 48–61 (2019).

72. Kurmi, B. D., Kayat, J., Gajbhiye, V., Tekade, R. K. & Jain, N. K. Micro- and nanocarrier-mediated lung targeting. *Expert Opinion on Drug Delivery* vol. 7 781–794 Preprint at <https://doi.org/10.1517/17425247.2010.492212> (2010).
73. Rytting, E. *et al.* In vitro and in vivo performance of biocompatible negatively-charged salbutamol-loaded nanoparticles. *Journal of Controlled Release* **141**, 101–107 (2010).
74. Chow, A. H. L., Tong, H. H. Y., Chattopadhyay, P. & Shekunov, B. Y. Particle engineering for pulmonary drug delivery. *Pharmaceutical Research* vol. 24 411–437 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s11095-006-9174-3> (2007).
75. Thakur, A. K. *et al.* Patented therapeutic drug delivery strategies for targeting pulmonary diseases. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* Preprint at <https://doi.org/10.1080/13543776.2020.1741547> (2020).
76. Chandran, S. M. *Issue 2 | Page 61-68 Subash Chandran M.P, An Overview on Liposomal Drug Delivery System ISSN (Online). International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research* vol. 9 www.eijppr.com (2019).
77. Willis, L., Hayes, D. & Mansour, H. M. Therapeutic liposomal dry powder inhalation aerosols for targeted lung delivery. *Lung* vol. 190 251–262 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00408-011-9360-x> (2012).
78. Suntres, Z. E. Liposomal antioxidants for protection against oxidant-induced damage. *Journal of Toxicology* vol. 2011 Preprint at <https://doi.org/10.1155/2011/152474> (2011).
79. Caimmi, D. *et al.* Positive effect of liposomal amikacin for inhalation on Mycobacterium abscessus in cystic fibrosis patients. *Open Forum Infect Dis* **5**, (2018).
80. Talaat, K. & Xi, J. Computational modeling of aerosol transport, dispersion, and deposition in rhythmically expanding and contracting terminal alveoli. *J Aerosol Sci* **112**, 19–33 (2017).
81. Xu, Y., Liu, H. & Song, L. Novel drug delivery systems targeting oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease: a review. *Journal of Nanobiotechnology* vol. 18 Preprint at <https://doi.org/10.1186/s12951-020-00703-5> (2020).
82. Mishra, B. & Singh, J. Novel drug delivery systems and significance in respiratory diseases. in *Targeting Chronic Inflammatory Lung Diseases Using Advanced Drug Delivery Systems* 57–95 (Elsevier, 2020). doi:10.1016/B978-0-12-820658-4.00004-2.
83. Lehardt, T., Roesler, S., Beck-Broichsitter, M. & Kissel, T. Polymeric nanocarriers for drug delivery to the lung. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* vol. 20 171–180 Preprint at [https://doi.org/10.1016/S1773-2247\(10\)50026-1](https://doi.org/10.1016/S1773-2247(10)50026-1) (2010).
84. Rytting, E., Nguyen, J., Wang, X. & Kissel, T. Biodegradable polymeric nanocarriers for pulmonary drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv* **5**, 629–639 (2008).
85. Todoroff, J. & Vanbever, R. Fate of nanomedicines in the lungs. *Curr Opin Colloid Interface Sci* **16**, 246–254 (2011).
86. Dhanjal, D. S. *et al.* Novel Controlled Release Pulmonary Drug Delivery Systems: Current updates and Challenges. *Modeling and Control of Drug Delivery Systems* 253–272 (2021) doi:10.1016/B978-0-12-821185-4.00001-4.
87. Bose, R. J. C., Lee, S. H. & Park, H. Lipid-based surface engineering of PLGA nanoparticles for drug and gene delivery applications. *Biomaterials Research* vol. 20 Preprint at <https://doi.org/10.1186/s40824-016-0081-3> (2016).
88. Alsaab, H. O. *et al.* PLGA-Based Nanomedicine: History of Advancement and Development in Clinical Applications of Multiple Diseases. *Pharmaceutics* vol. 14 Preprint at <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14122728> (2022).
89. Dailey, L. A., Wittmar, M. & Kissel, T. The role of branched polyesters and their modifications in the development of modern drug delivery vehicles. in *Journal of Controlled Release* vol. 101 137–149 (2005).

90. Jokerst, J. V., Lobovkina, T., Zare, R. N. & Gambhir, S. S. Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. *Nanomedicine* vol. 6 715–728 Preprint at <https://doi.org/10.2217/nmm.11.19> (2011).
91. Milton Harris, J. & Chess, R. B. Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nature Reviews Drug Discovery* vol. 2 214–221 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrd1033> (2003).
92. Yoncheva, K., Gómez, S., Campanero, M. A., Gamazo, C. & Irache, J. M. Bioadhesive properties of pegylated nanoparticles. *Expert Opinion on Drug Delivery* vol. 2 205–218 Preprint at <https://doi.org/10.1517/17425247.2.2.205> (2005).
93. Yang, M. *et al.* Biodegradable nanoparticles composed entirely of safe materials that rapidly penetrate human mucus. *Angewandte Chemie - International Edition* **50**, 2597–2600 (2011).
94. Suk, J. S. *et al.* The penetration of fresh undiluted sputum expectorated by cystic fibrosis patients by non-adhesive polymer nanoparticles. *Biomaterials* **30**, 2591–2597 (2009).
95. Porsio, B., Craparo, E. F., Mauro, N., Giammona, G. & Cavallaro, G. Mucus and Cell-Penetrating Nanoparticles Embedded in Nano-into-Micro Formulations for Pulmonary Delivery of Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis. *ACS Appl Mater Interfaces* **10**, 165–181 (2018).
96. Mukherjee, A. *et al.* Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a nextgeneration drug delivery platform: State of the art, emerging technologies, and perspectives. *International Journal of Nanomedicine* vol. 14 1937–1952 Preprint at <https://doi.org/10.2147/IJN.S198353> (2019).
97. Dave, V. *et al.* Lipid-polymer hybrid nanoparticles: Synthesis strategies and biomedical applications. *Journal of Microbiological Methods* vol. 160 130–142 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.03.017> (2019).
98. Mandal, B. *et al.* Core-shell-type lipid-polymer hybrid nanoparticles as a drug delivery platform. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* vol. 9 474–491 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.nano.2012.11.010> (2013).
99. Wu, B. *et al.* Codelivery of doxorubicin and triptolide with reduction-sensitive lipid-polymer hybrid nanoparticles for in vitro and in vivo synergistic cancer treatment. *Int J Nanomedicine* **12**, 1853–1862 (2017).
100. Tahir, N. *et al.* Microfluidic fabrication and characterization of Sorafenib-loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles for controlled drug delivery. *Int J Pharm* **581**, (2020).
101. Chikuma, K. *et al.* The potential of lipid-polymer nanoparticles as epigenetic and ROS control approaches for COPD. *Free Radic Res* **54**, 829–840 (2020).
102. Vilos, C. & Velasquez, L. A. Therapeutic strategies based on polymeric microparticles. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* vol. 2012 Preprint at <https://doi.org/10.1155/2012/672760> (2012).
103. Zhou, M., Shen, L., Lin, X., Hong, Y. & Feng, Y. Design and pharmaceutical applications of porous particles. *RSC Advances* vol. 7 39490–39501 Preprint at <https://doi.org/10.1039/c7ra06829h> (2017).
104. Ghosh Dastidar, D., Saha, S. & Chowdhury, M. Porous microspheres: Synthesis, characterisation and applications in pharmaceutical & medical fields. *International Journal of Pharmaceutics* vol. 548 34–48 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.06.015> (2018).
105. Chang, H. & Jang, H. D. Controlled synthesis of porous particles via aerosol processing and their applications. *Advanced Powder Technology* vol. 25 32–42 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.appt.2013.11.004> (2014).
106. Zhang, L. *et al.* Optimization of budesonide-loaded large-porous microparticles for inhalation using quality by design approach. *J Drug Deliv Sci Technol* **53**, (2019).

107. Poelma, D. L. *et al.* A common pathway for the uptake of surfactant lipids by alveolar cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **30**, 751–758 (2004).
108. Patel, B., Gupta, N. & Ahsan, F. Particle engineering to enhance or lessen particle uptake by alveolar macrophages and to influence the therapeutic outcome. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* vol. 89 163–174 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.12.001> (2015).
109. Vlahos, R. & Bozinovski, S. Role of alveolar macrophages in chronic obstructive pulmonary disease. *Frontiers in Immunology* vol. 5 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00435> (2014).
110. Gorabi, A. M. *et al.* Prospects for the potential of RNA interference in the treatment of autoimmune diseases: Small interfering RNAs in the spotlight. *J Autoimmun* **114**, 102529 (2020).
111. Koli, U., Krishnan, R. A., Pofali, P., Jain, R. & Dandekar, P. SiRNA-based therapies for pulmonary diseases. *Journal of Biomedical Nanotechnology* vol. 10 1953–1997 Preprint at <https://doi.org/10.1166/jbn.2014.1928> (2014).
112. Cavallaro, G., Sardo, C., Craparo, E. F., Porsio, B. & Giammona, G. Polymeric nanoparticles for siRNA delivery: Production and applications. *Int J Pharm* **525**, 313–333 (2017).
113. Nichols, D. P. & Chmiel, J. F. Inflammation and its genesis in cystic fibrosis. *Pediatric Pulmonology* vol. 50 S39–S56 Preprint at <https://doi.org/10.1002/ppul.23242> (2015).
114. Venkatakrishnan, A. *et al.* Exaggerated Activation of Nuclear Factor- κ B and Altered I κ B-Processing in Cystic Fibrosis Bronchial Epithelial Cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol* vol. 23 www.atsjournals.org (2000).
115. Bañuls, L. *et al.* Gene therapy in rare respiratory diseases: What have we learned so far? *Journal of Clinical Medicine* vol. 9 1–29 Preprint at <https://doi.org/10.3390/jcm9082577> (2020).
116. Barnes, P. J. Targeting cytokines to treat asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nature Reviews Immunology* vol. 18 454–466 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0006-6> (2018).
117. Conte, G. *et al.* Hybrid Lipid/Polymer Nanoparticles to Tackle the Cystic Fibrosis Mucus Barrier in siRNA Delivery to the Lungs: Does PEGylation Make the Difference? *ACS Appl Mater Interfaces* **14**, 7565–7578 (2022).
118. Ungaro, F. *et al.* PEI-Engineered Respirable Particles Delivering a Decoy Oligonucleotide to NF- κ B: Inhibiting MUC2 Expression in LPS-Stimulated Airway Epithelial Cells. *PLoS One* **7**, (2012).
119. Sah, D. W. Y. Therapeutic potential of RNA interference for neurological disorders. *Life Sci* **79**, 1773–1780 (2006).
120. Akhtar, S. & Benter, I. F. Nonviral delivery of synthetic siRNAs in vivo. *Journal of Clinical Investigation* vol. 117 3623–3632 Preprint at <https://doi.org/10.1172/JCI33494> (2007).
121. Jes´, J., Gil, J. & Esteban, M. Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): Mechanism of action. *Apoptosis* vol. 5 (2000).
122. Kumar, M. & Carmichael, G. G. Antisense RNA: Function and Fate of Duplex RNA in Cells of Higher Eukaryotes. *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS* vol. 62 <https://journals.asm.org/journal/membr> (1998).
123. Merkel, O. M., Rubinstein, I. & Kissel, T. siRNA Delivery to the lung: What’s new? *Adv Drug Deliv Rev* **75**, 112–128 (2014).

124. Ubale, R. V., Shastri, P. N., Oettinger, C. & D'Souza, M. J. Pulmonary Administration of Microparticulate Antisense Oligonucleotide (ASO) for the Treatment of Lung Inflammation. *AAPS PharmSciTech* **19**, 1908–1919 (2018).
125. Mitchell, M. J. *et al.* Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery* vol. 20 101–124 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0090-8> (2021).
126. Rao, J. P. & Geckeler, K. E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science (Oxford)* vol. 36 887–913 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.01.001> (2011).
127. Craparo, E. F. *et al.* Hepatocyte-targeted fluorescent nanoparticles based on a polyaspartamide for potential theranostic applications. *Polymer (Guildf)* **70**, 257–270 (2015).
128. Triolo, D. *et al.* Polymeric drug delivery micelle-like nanocarriers for pulmonary administration of beclomethasone dipropionate. *Colloids Surf B Biointerfaces* **151**, 206–214 (2017).
129. Craparo, E. F., Cavallaro, G., Bondi, M. L., Mandracchia, D. & Giammona, G. PEGylated nanoparticles based on a polyaspartamide. Preparation, physico-chemical characterization, and intracellular uptake. *Biomacromolecules* **7**, 3083–3092 (2006).
130. Craparo, E. F. *et al.* Inhalable polymeric microparticles as pharmaceutical porous powder for drug administration. *Int J Pharm* **628**, (2022).
131. Cavallaro, G. *et al.* PHEA-PLA biocompatible nanoparticles by technique of solvent evaporation from multiple emulsions. *Int J Pharm* **495**, 719–727 (2015).
132. Craparo, E. F., Porsio, B., Mauro, N., Giammona, G. & Cavallaro, G. Polyaspartamide-Polylactide Graft Copolymers with Tunable Properties for the Realization of Fluorescent Nanoparticles for Imaging. *Macromol Rapid Commun* **36**, 1409–1415 (2015).
133. Craparo, E. F. *et al.* Mpeg-plga nanoparticles labelled with loaded or conjugated rhodamine-b for potential nose-to-brain delivery. *Pharmaceutics* **13**, (2021).
134. Yang, Y., Tsifansky, M. D., Shin, S., Lin, Q. & Yeo, Y. Mannitol-Guided delivery of ciprofloxacin in artificial cystic fibrosis mucus model. *Biotechnol Bioeng* **108**, 1441–1449 (2011).
135. Wedzicha, J. A., Calverley, P. M. & Rabe, K. F. Roflumilast: A review of its use in the treatment of COPD. *International Journal of COPD* vol. 11 81–90 Preprint at <https://doi.org/10.2147/COPD.S89849> (2016).
136. Lea, S. *et al.* The modulatory effects of the PDE4 inhibitors CHF6001 and roflumilast in alveolar macrophages and lung tissue from COPD patients. *Cytokine* **123**, (2019).
137. Craparo, E. F., Cabibbo, M., Scialabba, C., Giammona, G. & Cavallaro, G. Inhalable Formulation Based on Lipid-Polymer Hybrid Nanoparticles for the Macrophage Targeted Delivery of Roflumilast. *Biomacromolecules* **23**, 3439–3451 (2022).
138. Chapman, R. W. *et al.* Effect of inhaled roflumilast on the prevention and resolution of allergen-induced late phase airflow obstruction in Brown Norway rats. *Eur J Pharmacol* **571**, 215–221 (2007).
139. Craparo, E. F., Drago, S. E., Giammona, G. & Cavallaro, G. Production of polymeric micro- and nanostructures with tunable properties as pharmaceutical delivery systems. *Polymer (Guildf)* **200**, (2020).
140. Parra, E. & Pérez-Gil, J. Composition, structure and mechanical properties define performance of pulmonary surfactant membranes and films. *Chemistry and Physics of Lipids* vol. 185 153–175 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2014.09.002> (2015).

141. Hatami, E. *et al.* Mannose-decorated hybrid nanoparticles for enhanced macrophage targeting. *Biochem Biophys Rep* **17**, 197–207 (2019).
142. Costa, A., Sarmento, B. & Seabra, V. Mannose-functionalized solid lipid nanoparticles are effective in targeting alveolar macrophages. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **114**, 103–113 (2018).
143. Kaku, Y. *et al.* Overexpression of CD163, CD204 and CD206 on alveolar macrophages in the lungs of patients with severe chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One* **9**, (2014).
144. Craparo, E. F., Drago, S. E., Mauro, N., Giammona, G. & Cavallaro, G. Design of new polyaspartamide copolymers for siRNA delivery in antiasthmatic therapy. *Pharmaceutics* **12**, (2020).
145. Craparo, E. F., Porsio, B., Sardo, C., Giammona, G. & Cavallaro, G. Pegylated Polyaspartamide-Polylactide-Based Nanoparticles Penetrating Cystic Fibrosis Artificial Mucus. *Biomacromolecules* **17**, 767–777 (2016).
146. Arpagaus, C. Pharmaceutical Particle Engineering via Nano Spray Drying - Process Parameters and Application Examples on the Laboratory-Scale. *Int J Med Nano Res* **5**, (2018).
147. Arpagaus, C. A Novel Laboratory-Scale Spray Dryer to Produce Nanoparticles. *Drying Technology* vol. 30 1113–1121 Preprint at <https://doi.org/10.1080/07373937.2012.686949> (2012).
148. Baugh, O. F., Barrett, E. P., Joyner, L. G. & Halenda, P. P. *THE VOLUME AND AREA DISTRIBUTIONS IN POROUS SUBSTANCES*. (1951).
149. Thommes, M. *et al.* Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* **87**, 1051–1069 (2015).
150. Ni, R. *et al.* Exploring polyvinylpyrrolidone in the engineering of large porous PLGA microparticles via single emulsion method with tunable sustained release in the lung: In vitro and in vivo characterization. *Journal of Controlled Release* **249**, 11–22 (2017).
151. Kaleem, M. A., Alam, M. Z., Khan, M., Jaffery, S. H. I. & Rashid, B. An experimental investigation on accuracy of Hausner Ratio and Carr Index of powders in additive manufacturing processes. *Metal Powder Report* **76**, S50–S54 (2021).
152. Healy, A. M., McDonald, B. F., Tajber, L. & Corrigan, O. I. Characterisation of excipient-free nanoporous microparticles (NMPs) of bendroflumethiazide. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **69**, 1182–1186 (2008).
153. Di, A. *et al.* Microfluidic spray dried and spray freeze dried uniform microparticles potentially for intranasal drug delivery and controlled release. *Powder Technol* **379**, 144–153 (2021).
154. Carvalho, S. R., Watts, A. B., Peters, J. I. & Williams, R. O. *3 Dry Powder Inhalation for Pulmonary Delivery: Recent Advances and Continuing Challenges*. (2015).
155. Yang, Y. *et al.* Development of highly porous large PLGA microparticles for pulmonary drug delivery. *Biomaterials* **30**, 1947–1953 (2009).
156. Craparo, E. F., Drago, S. E., Quaglia, F., Ungaro, F. & Cavallaro, G. Development of a novel rapamycin loaded nano- into micro-formulation for treatment of lung inflammation. *Drug Deliv Transl Res* (2022) doi:10.1007/s13346-021-01102-5.
157. Kankala, R. K. *et al.* Supercritical Fluid-Assisted Decoration of Nanoparticles on Porous Microcontainers for Codelivery of Therapeutics and Inhalation Therapy of Diabetes. *ACS Biomater Sci Eng* **4**, 4225–4235 (2018).
158. Garland, K. M. *et al.* Microparticle Depots for Controlled and Sustained Release of Endosomolytic Nanoparticles. *Cell Mol Bioeng* **12**, 429–442 (2019).

159. Park, K. *et al.* Formulation composition, manufacturing process, and characterization of poly(lactide-co-glycolide) microparticles. *Journal of Controlled Release* **329**, 1150–1161 (2021).
160. Pourcelle, V., Devouge, S., Garinot, M., Pr  at, V. & Marchand-Brynaert, J. PCL-PEG-based nanoparticles grafted with GRGDS peptide: Preparation and surface analysis by XPS. *Biomacromolecules* **8**, 3977–3983 (2007).
161. Ebbesen, M. F., Whitehead, B., Ballarin-Gonzalez, B., Kingshott, P. & Howard, K. A. Surface analysis of PEGylated nano-shields on nanoparticles installed by hydrophobic anchors. *Pharm Res* **30**, 1758–1767 (2013).
162. Xu, Q. *et al.* Scalable method to produce biodegradable nanoparticles that rapidly penetrate human mucus. *Journal of Controlled Release* **170**, 279–286 (2013).
163. Amore, E. *et al.* Mucoadhesive solid lipid microparticles for controlled release of a corticosteroid in the chronic obstructive pulmonary disease treatment. *Nanomedicine* **12**, 2287–2302 (2017).
164. Torge, A., Gr  tzmacher, P., M  cklich, F. & Schneider, M. The influence of mannitol on morphology and disintegration of spray-dried nano-embedded microparticles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **104**, 171–179 (2017).
165. Kleemann, E. *et al.* Iloprost-containing liposomes for aerosol application in pulmonary arterial hypertension: formulation aspects and stability. *Pharm Res* **24**, (2007).
166. Jain, P. P. *et al.* Liposomal nanoparticles encapsulating iloprost exhibit enhanced vasodilation in pulmonary arteries. *Int J Nanomedicine* **9**, 3249–3261 (2014).
167. Cristallini, C. *et al.* Biodegradable microparticles designed to efficiently reach and act on cystic fibrosis mucus barrier. *Materials Science and Engineering C* **95**, 19–28 (2019).
168. Patarin, J. *et al.* Rheological analysis of sputum from patients with chronic bronchial diseases. *Sci Rep* **10**, (2020).
169. Di Gioia, S. *et al.* Cationic polyaspartamide-based nanocomplexes mediate siRNA entry and down-regulation of the pro-inflammatory mediator high mobility group box 1 in airway epithelial cells. *Int J Pharm* **491**, 359–366 (2015).
170. Cazzola, M., Calzetta, L., Rogliani, P. & Matera, M. G. The discovery of roflumilast for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Expert Opin Drug Discov* **11**, 733–744 (2016).
171. Craparo, E. F. *et al.* Rapamycin-loaded polymeric nanoparticles as an advanced formulation for macrophage targeting in atherosclerosis. *Pharmaceutics* **13**, (2021).
172. Thevenot, J., Troutier, A. L., David, L., Delair, T. & Ladavi  re, C. Steric stabilization of lipid/polymer particle assemblies by poly(ethylene glycol)-lipids. *Biomacromolecules* **8**, 3651–3660 (2007).
173. Troutier, A. L., Delair, T., Pichot, C. & Ladavi  re, C. Physicochemical and interfacial investigation of lipid/polymer particle assemblies. *Langmuir* **21**, 1305–1313 (2005).
174. Clogston, J. D. & Patri, A. K. Zeta potential measurement. *Methods Mol Biol* **697**, 63–70 (2011).
175. Charles, J. & Stewart, M. *Colorimetric Determination of Phospholipids with Ammonium Ferrothiocyanate*. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY* vol. 104 (1980).
176. Dong, W. *et al.* Chitosan based polymer-lipid hybrid nanoparticles for oral delivery of enoxaparin. *Int J Pharm* **547**, 499–505 (2018).
177. Rose, F. *et al.* A strong adjuvant based on glycol-chitosan-coated lipid-polymer hybrid nanoparticles potentiates mucosal immune responses against the recombinant Chlamydia trachomatis fusion antigen CTH522. *Journal of Controlled Release* **271**, 88–97 (2018).

178. Dave, V. *et al.* Lipid-polymer hybrid nanoparticles: Development & statistical optimization of norfloxacin for topical drug delivery system. *Bioact Mater* **2**, 269–280 (2017).
179. Boucher, R. C. Muco-Obstructive Lung Diseases. *New England Journal of Medicine* **380**, 1941–1953 (2019).
180. He, H. *et al.* Development of mannose functionalized dendrimeric nanoparticles for targeted delivery to macrophages: use of this platform to modulate atherosclerosis. *Translational Research* **193**, 13–30 (2018).
181. Wang, Y., Kho, K., Cheow, W. S. & Hadinoto, K. A comparison between spray drying and spray freeze drying for dry powder inhaler formulation of drug-loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles. *Int J Pharm* **424**, 98–106 (2012).
182. Cavallaro, G. *et al.* Galactosylated polyaspartamide copolymers for siRNA targeted delivery to hepatocellular carcinoma cells. *Int J Pharm* **525**, 397–406 (2017).
183. Craparo, E. F., Drago, S. E., Mauro, N., Giammona, G. & Cavallaro, G. Design of new polyaspartamide copolymers for siRNA delivery in antiasthmatic therapy. *Pharmaceutics* **12**, (2020).
184. Deissler, V. *et al.* Fluorescent liposomes as contrast agents for in vivo optical imaging of edemas in mice. *Small* **4**, 1240–1246 (2008).
185. Marques, M. R. C., Loebenberg, R. & Almukainzi, M. Simulated biological fluids with possible application in dissolution testing. *Dissolution Technologies* vol. 18 15–28 Preprint at <https://doi.org/10.14227/DT180311P15> (2011).
186. Wauthoz, N. & Amighi, K. Phospholipids in pulmonary drug delivery. *European Journal of Lipid Science and Technology* vol. 116 1114–1128 Preprint at <https://doi.org/10.1002/ejlt.201300368> (2014).
187. Walsh, C. *et al.* Microfluidic-based manufacture of siRNA-lipid nanoparticles for therapeutic applications. in *Methods in Molecular Biology* vol. 1141 109–120 (Humana Press Inc., 2014).
188. Liang, J. *et al.* Chitosan-functionalized lipid-polymer hybrid nanoparticles for oral delivery of silymarin and enhanced lipid-lowering effect in NAFLD. *J Nanobiotechnology* **16**, (2018).
189. Sengel-Turk, C. T. & Hascicek, C. Design of lipid-polymer hybrid nanoparticles for therapy of BPH: Part I. Formulation optimization using a design of experiment approach. *J Drug Deliv Sci Technol* **39**, 16–27 (2017).
190. Keil, T. W. M. *et al.* Impact of Crystalline and Amorphous Matrices on Successful Spray Drying of siRNA Polyplexes for Inhalation of Nano-in-Microparticles. *Adv Ther (Weinh)* **4**, (2021).
191. Zimmermann, C. M. *et al.* Spray drying siRNA-lipid nanoparticles for dry powder pulmonary delivery. *Journal of Controlled Release* **351**, 137–150 (2022).
192. Mendichi, R., Schieroni, A. G., Cavallaro, G., Licciardi, M. & Giammona, G. Molecular characterization of α,β -poly(N-2-hydroxyethyl)-DL-aspartamide derivatives as potential self-assembling copolymers forming polymeric micelles. *Polymer (Guildf)* **44**, 4871–4879 (2003).
193. Beach, B. CONTACT INFORMATION Quantachrome Instruments 1900 Corporate Drive. www.quantachrome.com.
194. Ahookhosh, K., Yaqoubi, S., Mohammadpourfard, M., Hamishehkar, H. & Aminfar, H. Experimental investigation of aerosol deposition through a realistic respiratory airway replica: An evaluation for MDI and DPI performance. *Int J Pharm* **566**, 157–172 (2019).

195. Hamishehkar, H., Khalili, S. F., Ghanbarzadeh, S., Nokhodchi, A. & Hamishehkar, H. *The effect of different coating materials on the prevention of powder bounce in the next generation impactor. Research in Pharmaceutical Sciences* vol. 13 (2018).
196. Yu, H., Teo, J., Chew, J. W. & Hadinoto, K. Dry powder inhaler formulation of high-payload antibiotic nanoparticle complex intended for bronchiectasis therapy: Spray drying versus spray freeze drying preparation. *Int J Pharm* **499**, 38–46 (2016).
197. Casula, L. *et al.* Pulmonary delivery of curcumin and beclomethasone dipropionate in a multicomponent nanosuspension for the treatment of bronchial asthma. *Pharmaceutics* **13**, (2021).