



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato in Biologia Cellulare e Scienze e Tecnologie del Farmaco
Indirizzo Tecnologie delle Sostanze Biologicamente Attive.
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche
(STEBICEF).
Settore Scientifico Disciplinare CHIM 09.

SINTESI E CARATTERIZZAZIONE DI COPOLIMERI A BASE POLISACCARIDICA E POLIAMMINOACIDICA PER APPLICAZIONI BIOMEDICHE.

IL DOTTORE
CARLA SARDO

IL COORDINATORE
Preg.ma PROF.SSA P. DIANA

IL TUTOR
Preg.ma PROF.SSA G. CAVALLARO

IL REFERENTE DELL'INDIRIZZO
Preg.mo PROF. G. GIAMMONA

CICLO XXV.
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2015.

INDICE

1. Introduzione	pag. 1
1.1. <i>La funzionalizzazione di polimeri per applicazione biomedica</i>	pag. 1
1.1.1. Il grafting from: Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP)	pag. 2
1.1.2. Grafting onto: le reazioni di coupling chemoselettive	pag. 9
1.1.3. Reazioni catalizzate dalle microonde	pag. 17
1.2. <i>Polimeri naturali e sintetici per applicazioni biomediche</i>	pag. 20
1.2.1. Poliesteri alifatici	pag. 20
1.2.2. Poliamminoacidi	pag. 24
1.2.3. I polisaccaridi	pag. 28
1.3. <i>I biopolimeri nella veicolazione di farmaci a base di acidi nucleici</i>	pag. 30
1.3.1. Farmacocinetica	pag. 33
1.3.2. Direzioneamento passivo e attivo	pag. 34
1.3.3. La transfezione	pag. 36
1.4. <i>Sistemi polimerici per la veicolazione polmonare di antibiotici</i>	pag. 48
1.4.1. Nanoparticelle mucopenetranti	pag. 55
1.4.2. Sistemi microparticellari mucoadesivi	pag. 58
1.4.3. Microparticelle porose	pag. 61
1.5. <i>Biopolimeri per la progettazione di superfici antibatteriche</i>	pag. 65
1.5.1. Rivestimento di superfici	pag. 67
1.5.2. Funzionalizzazione di superfici	pag. 68
2. Scopo della tesi	pag. 70

3. Risultati e Discussione	pag.72
<i>3.1. Derivati cationici dell' inulina per la veicolazione di farmaci a base di acidi nucleici (NABD)</i>	pag. 72
3.1.1. Copolimero Inulina-Spermina (INU-Spm) per la veicolazione di NABD	pag. 73
3.1.2. Copolimero Inulina-Dietilenetriamina (INU-DETA) per la veicolazione di NABD	pag. 88
3.1.3. Conclusioni	pag. 105
<i>3.2. Derivati polianionici e peghilati del PHEA per la produzione di sistemi particellari per la veicolazione polmonare di tobramicina in fibrosi cistica</i>	pag. 107
3.2.1. Conclusioni	pag. 119
<i>3.3. Funzionalizzazione di superfici di PLA con un derivato antibatterico del PHEA</i>	pag. 120
3.3.1. Conclusioni	pag. 130
4. Parte Sperimentale	pag. 131
<i>4.1. Materiali</i>	pag. 131
<i>4.2. Sintesi dei biomateriali</i>	pag. 133
4.2.1. Sintesi dei derivati dell'inulina	pag. 133
4.2.2. Sintesi dei derivati dell' α,β -poli(N-2-idrossietil)-D,L-aspartammide (PHEA)	pag. 136
4.2.3. Preparazione delle superfici antibatteriche	pag. 141
<i>4.3. Caratterizzazione chimico-fisica dei biomateriali</i>	pag. 142
4.3.1. Spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare ^1H NMR	pag. 142

4.3.2. Determinazione del peso molecolare mediante size exclusion chromatography (SEC)	pag. 144
4.3.3. Valutazione della funzionalizzazione delle superfici di PLA propargilato	pag. 145
4.3.4. Titolazione acido-base dei derivati cationici dell'inulina per la determinazione della capacità tamponante	pag. 145
4.4. <i>Poliplessi a base di derivati cationici dell' inulina per la veicolazione di farmaci a base di acidi nucleici</i>	pag. 147
4.4.1. Metodi per la preparazione e la caratterizzazione dei poliplessi	pag. 147
4.4.2. Metodi per la caratterizzazione biologica del copolimero INU-Spm e dei poliplessi INU-Spm/siGL3: citocompatibilità e transfezione	pag. 149
4.4.2. Metodi per la caratterizzazione biologica del copolimero INU-DETA e dei poliplessi INU-DETA/siRNA: studi di citocompatibilità, uptake, transfezione e determinazione del meccanismo di endocitosi	pag. 151
4.5. <i>Sistemi polimerici microparticellari a base di derivati del PHEA per la veicolazione polmonare di tobramicina</i>	pag. 154
4.5.1. Preparazione dei sistemi micro particellari	pag. 154
4.5.2. Caratterizzazione delle microparticelle: dimensioni, morfologia, proprietà in dispersione	pag. 155
4.5.3. Determinazione del contenuto e dei profili di rilascio del farmaco dalle micro particelle	pag. 156
4.5.4. Studi di citocompatibilità dei sistemi PHEA-IB-pMAN ⁺ /TOB e PHEA-PEG-IB-pMANa ⁺ /TOB	pag. 158

4.6. <i>Funzionalizzazione di superfici di PLA con un derivato antibatterico del PHEA</i>	pag. 159
4.6.1. Metodi per la valutazione dell'attività antibatterica	pag. 159
4.6.2. Studi di citotossicità e proliferazione fibroblastica	pag. 160
5. Bibliografia	pag. 161

1. INTRODUZIONE

I polimeri costituiscono materiali altamente versatili poiché, grazie alle loro diverse caratteristiche chimico-fisiche, sono in grado di soddisfare importanti necessità per l'impiego in differenti aree applicative.

I polimeri per applicazioni in ambito biomedico costituiscono una classe di composti estremamente importanti in quanto tali macromolecole rappresentano soluzioni tecnologicamente avanzate per diverse applicazioni, dal rilascio e direzionamento di farmaci all'ingegneria tissutale. I polimeri, per essere utilizzati in tale ambito, devono essere in generale chimicamente inerti, non tossici, non cancerogeni, non teratogeni, immunocompatibili, non allergenici, biodegradabili e/o bioeliminabili. Inoltre, essi devono essere stabili quando sottoposti a processi e metodologie necessari alla produzione dei sistemi di veicolazione di molecole farmacologicamente attive, come ad esempio l'omogenizzazione o la sterilizzazione, necessaria alla produzione di sistemi per uso parenterale.

Sia i polimeri sintetici che naturali sono ampiamente utilizzati come materiali per applicazioni biomediche. Tra i polimeri sintetici troviamo principalmente poliesteri alifatici, poliammidi, polianidridi, poliortoesteri, polifosfazeni e polifosfoesteri. Tra i polimeri naturali vi sono principalmente i polisaccaridi, i polipeptidi e le proteine.

1.1. La funzionalizzazione di polimeri per applicazione biomedica.

Oltre alle generali proprietà appena discusse, i polimeri per uso biomedico e farmaceutico possono essere modificati chimicamente in modo da introdurre funzionalizzazioni specifiche e opportuni gruppi funzionali utili per conferire agli stessi nuove proprietà, al fine di rendere idoneo il loro impiego per una specifica applicazione, come ad esempio per una particolare via di somministrazione, oppure per il conferimento di sensibilità ad uno specifico stimolo, cioè la proprietà di variare solubilità, conformazione, polarità, composizione o carica al variare delle condizioni ambientali (temperatura, pH, luce, potenziale redox o elettrico) [T. Huayu et al., 2012].

Gli approcci chimici che possono essere utilizzati per funzionalizzare i polimeri sono riconducibili alla polimerizzazione o copolimerizzazione di monomeri precedentemente funzionalizzati, oppure alla post-funzionalizzazione chimica di un polimero preformato.

La funzionalizzazione dei monomeri che costituiranno un polimero avviene nella maggior parte dei casi mediante il legame di gruppi funzionali protetti che verranno deprotetti in seguito a polimerizzazione; tale funzionalizzazione ha solitamente lo scopo di introdurre particolari gruppi reattivi in catena laterale al polimero che ne consentiranno la post-funzionalizzazione.

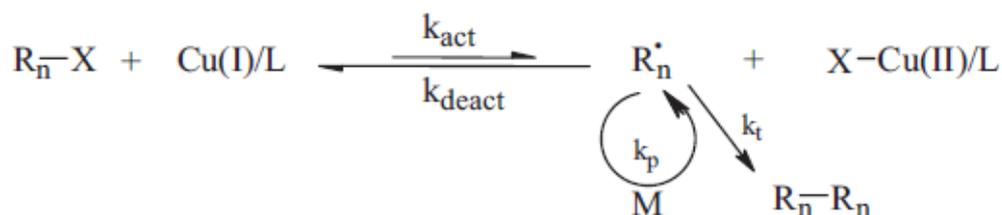
Per quanto concerne la post-funzionalizzazione chimica di un polimero preformato, essa può avvenire con (1) molecole biologicamente attive (farmaci; molecole direzionanti); (2) molecole o macromolecole che assolvono ad una specifica funzione (modulazione della solubilità; introduzione di gruppi carichi positivamente o negativamente; gruppi reattivi specifici per post funzionalizzazioni mediante reazioni chemoselettive; etc) o (3) con una seconda componente polimerica allo scopo di ottenere copolimeri o omopolimeri con una specifica composizione e architettura (a blocchi; a pettine; ramificata; iper-ramificata o dendronica).

Per produrre copolimeri a partire da una catena polimerica preesistente si possono utilizzare le tecniche di *grafting onto* e *grafting from*. La tecnica del "*grafting onto*", ampiamente utilizzata, consiste nel legame di catene oligomeriche o polimeriche preformate in catena laterale al backbone di un polimero. La tecnica del "*grafting from*", o "*growing from*", invece, consiste nella polimerizzazione di monomeri direttamente in catena laterale al backbone polimerico di partenza.

1.1.1. Il *grafting from*: Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP).

Ad oggi i metodi sintetici di *grafting from* maggiormente sfruttati per ottenere copolimeri con composizione, architettura e funzionalizzazione ben definita, risultano essere riconducibili ad un gruppo di reazioni di polimerizzazione radicalica che differiscono dalla polimerizzazione radicalica convenzionale per il grande controllo ottenibile sugli elementi chiave del processo di polimerizzazione. Questi metodi

prendono complessivamente il nome di Polimerizzazioni Radicaliche Controllate, (Controlled Radical Polymerization, CRP). L'inconveniente principale della polimerizzazione radicalica convenzionale è infatti quello di fornire polimeri con polidispersità generalmente elevata, cioè con una ampia distribuzione dei pesi molecolari. Tra le CRP, la polimerizzazione radicalica a trasferimento atomico (*Atom Transfer Radical Polymerization*, ATRP) ha avuto e continua ad avere un enorme successo grazie alla sua applicabilità a numerosi tipi di monomeri e grazie al suo valore sintetico e tecnologico, in quanto permette di sintetizzare, in maniera versatile e con condizioni di reazione moderate, copolimeri con composizione eterogenea e con diversa topologia che trovano una sempre maggiore applicazione nel campo della ricerca in ambito biomedico. Una ATRP è una polimerizzazione radicalica controllata, effettuata in presenza di specie in grado di reagire in modo reversibile con il radicale della catena crescente. Il controllo sulla polimerizzazione radicalica è basato su due principi. Il primo riguarda la rapidità del processo di iniziazione, che determina un numero costante di catene polimeriche in accrescimento. In secondo luogo, la maggior parte delle catene polimeriche in accrescimento esistono come specie dormienti che conservano però la capacità di crescere grazie all'equilibrio dinamico che si instaura con il radicale di propagazione [V. Coessens et al., 2001]. Il meccanismo che sta alla base di una reazione di ATRP è illustrato nello **Schema 1**.



Schema 1 Schema generale di una ATRP

Il sistema di reazione è multicomponente ed è composto dal monomero, da un iniziatore R_n-X ($X =$ alogeno) e da un catalizzatore, costituito da un complesso di un metallo di transizione, Cu(I) (il rame è uno dei più efficaci), con un opportuno ligando, L. Inizialmente il radicale, la specie attiva, viene generato attraverso un processo di ossido-riduzione reversibile catalizzato dal metallo di transizione complessato. Dopo la prima reazione di inizio, il radicale presente sulla catena polimerica (radicale di propagazione $R_n\cdot$) può reagire con il monomero, e quindi propagare la polimerizzazione, oppure con la specie $X-M_t^{n+1}/L$ e formare la specie dormiente R_n-X . Quest'ultima può liberare nuovamente il radicale (si tratta infatti di uno step reversibile) che potrà quindi reagire nuovamente con il monomero e proseguire così la polimerizzazione. In questo modo quello che si ottiene è la protezione della specie attiva e la conseguente drastica diminuzione della probabilità che essa possa dare reazioni di trasferimento o terminazione di catena, come avverrebbe invece in una polimerizzazione radicalica convenzionale. La costante di attivazione (k_{act}) è molto più piccola rispetto a quella di deattivazione (k_{deact}) e questo permette la diminuzione della velocità delle reazioni di terminazione. Questo meccanismo di “attivazione-deattivazione” produce delle catene polimeriche mediate di lunghezza uguale che danno origine ad un polimero con peso molecolare controllato, con bassa polidispersità, dando la possibilità di progettare copolimeri con composizione e topologia varie e controllate come schematizzato in **Figura 1 e 2** [P. Król et al., 2014].

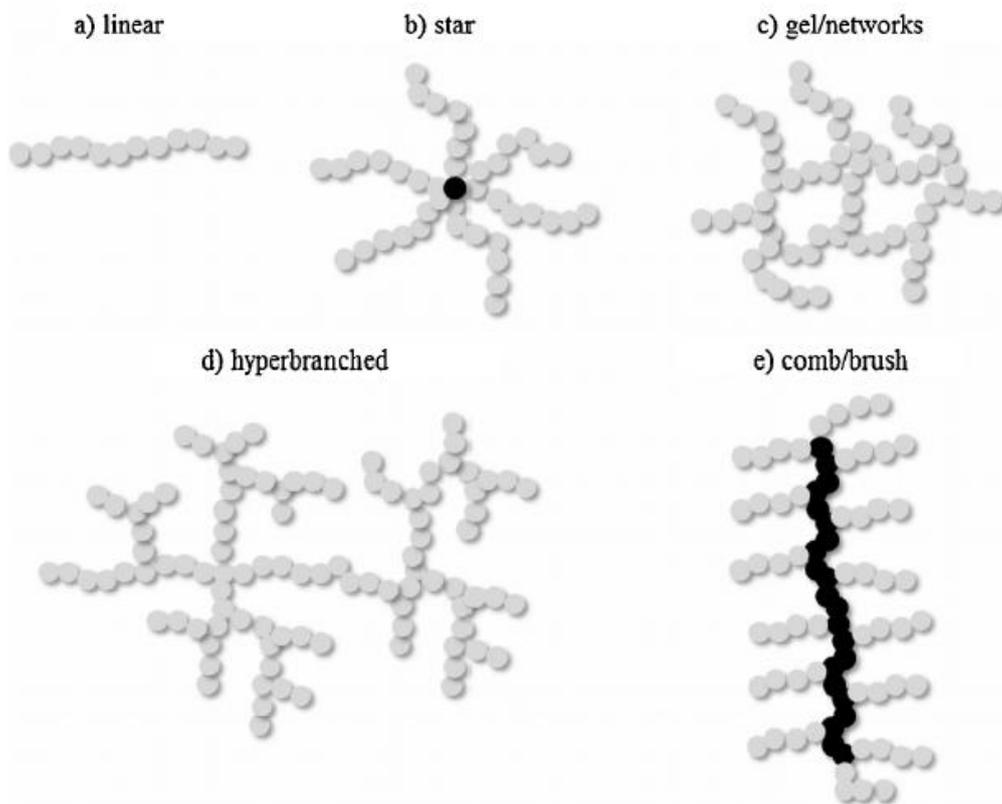


Figura 1. Esempi di polimeri con topologia controllata ottenibili mediante ATRP [P. Król et al., 2014].

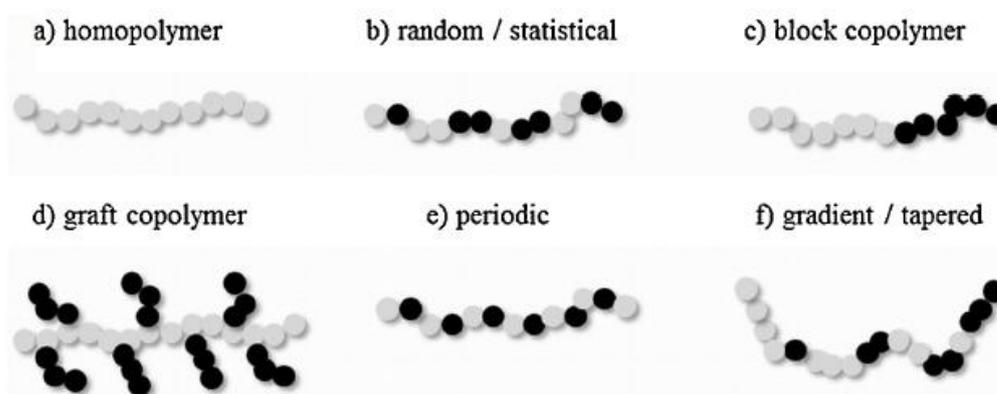


Figura 2. Esempi di polimeri con differente composizione ottenibili mediante ATRP [P. Król et al., 2014].

La versatilità dell'ATRP è dimostrata dalla grande varietà di *monomeri* polimerizzati con successo mediante questa tecnica. I monomeri più reattivi nei confronti dell'ATRP sono i metacrilati, ma sono note polimerizzazioni che sfruttano anche la reattività di altri sistemi quali stireni sostituiti [W. Jakubowski et al., 2006], alchil-acrilati [F. Stoffelbach et al., 2003], glicidil acrilati, acrilonitrili, 4-vinilpiridine e metacrilamidi [Y.-H. Yu et al., 2013]. A parità di condizioni di polimerizzazione e con lo stesso catalizzatore, ciascun monomero presenta una propria capacità di trasferimento atomico, definita dalla costante K_{eq} . In particolare, per un dato monomero, il prodotto della K_{eq} e della K_p (costante di polimerizzazione del processo di ATRP) determina la velocità di polimerizzazione; quindi se la K_{eq} è molto bassa, la reazione procede molto lentamente, al contrario, se la K_{eq} è troppo elevata, porta ad un maggior numero di terminazioni a causa della elevata concentrazione del radicale e dello spostamento dell'equilibrio verso la formazione del metallo di transizione in forma ossidata [P. Król et al., 2014].

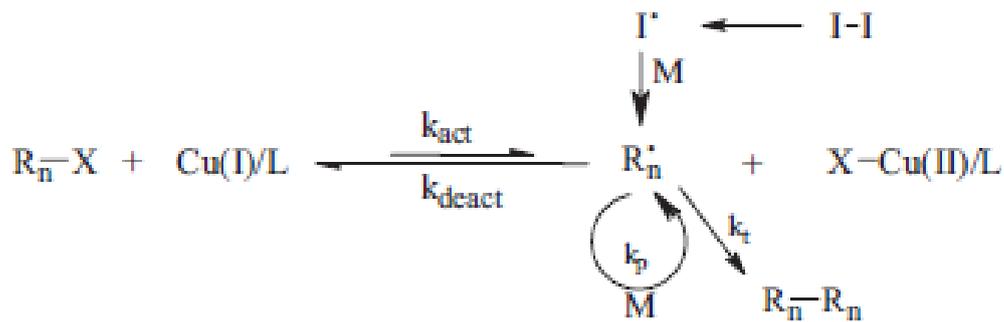
Il numero di catene polimeriche in accrescimento è determinato dall'*iniziatore*. I principali iniziatori utilizzati nell'ATRP sono alogenuri alchilici con un sostituito attivante sul carbonio α , come un gruppo arilico, carbonilico o allilico, composti polialogenati e composti che presentano un debole legame R-X, come N-X, S-X e O-X; anche alcuni pseudo alogenuri, in particolare tiocianati e tiocarbammati sono stati impiegati con successo come iniziatori nella polimerizzazione di stireni e acrilati [M.R.J. Scherer, 2013]. L'uso di alchil ioduri richiede particolari precauzioni per via della loro instabilità alla luce, dal momento che essi possono formare complessi metallo-ioduro scarsamente solubili e che il legame R-I può essere rotto eteroliticamente. Per questi motivi, bromuri e cloruri sono gli alogenuri maggiormente impiegati. Questi permettono inoltre una migrazione rapida e selettiva dell'alogeno tra la catena in accrescimento ed il complesso del metallo di transizione, essenziale per la formazione di polimeri ben definiti con ristretta distribuzione di peso molecolare. In genere viene usato lo stesso alogeno nell'iniziatore e nel sale del metallo (es.: R-Br e CuBr).

Quando il processo di ATRP sfrutta come iniziatore una macromolecola a cui sono state coniugate covalentemente una o più molecole che fungono da siti di iniziazione veri e propri, si parla di "*macroiniziatori*", che possono essere mono o multifunzionali in

relazione alla presenza sulla catena macromolecolare di uno o più siti su cui iniziare la polimerizzazione.

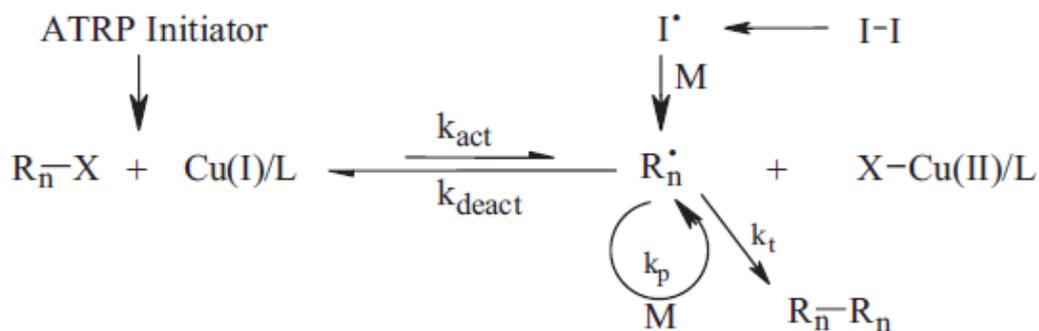
Scegliere un appropriato *sistema catalitico* (metallo + ligando) assicura il controllo del processo in quanto contribuisce in maggior misura a determinare la posizione dell'equilibrio di trasferimento atomico e la dinamica dello scambio tra specie dormiente e radicale di propagazione [F. di Lena et al., 2010]. Inoltre il ligando promuove la solubilizzazione del sale del metallo di transizione nel mezzo organico e, più in generale, conferisce al sistema catalitico una appropriata reattività e dinamica per il trasferimento atomico. Nonostante il Cu sia il catalizzatore metallico maggiormente impiegato nelle reazioni di ATRP [R. Gong et al., 2008; C. Hou et al., 2008; C. Fiorica et al., 2013; G. Cavallaro et al., 2014], anche composti del ferro [Z. Xue et al., 2007; J. Jiang et al., 2008; M. Xiong et al., 2008], considerati generalmente meno tossici, possono essere impiegati, specialmente per applicazioni biomediche. Anche altri metalli sono stati impiegati come catalizzatori per ATRP, tra cui Ru [F. Ding et al., 2014], Ni [A. De Roma et al., 2011], Ti [M. Ouchi et al., 2009], Re [Y. Kotani et al., 2000], Mo [F. Stoffelbach et al., 2003], Co [X. Luo et al., 2008] e Os [W.A. Braunecker et al., 2005].

Più recentemente all'ATRP convenzionale si sono affiancati nuovi metodi sviluppati per superare alcuni limiti, come ad esempio, la sensibilità all'aria e ad altri agenti ossidanti del catalizzatore. Per superare tale problema, il gruppo di Matyjaszewski ha sviluppato la tecnica di ATRP inversa o "reverse ATRP" [W. Jakubowski et al., 2006], il cui meccanismo è riassunto nello **Schema 2**. Nella ATRP inversa il radicale di propagazione, R_n^{\cdot} , viene generato per reazione con un iniziatore termico (I-I), come ad esempio il benzoin perossido (BP) o l'azobisisobutirronitrile (AIBN) [J.-S. Wang et al., 1995; G.D.C. Pizarro et al., 2013; Y. Wu et al., 2012]. Il metallo di transizione complessato con il ligando viene aggiunto nel suo stato di ossidazione più alto, ad esempio come complesso Cu(II)/L, e dopo deossigenazione della miscela, la polimerizzazione è iniziata dalla reazione del Cu(II) con il radicale R_n^{\cdot} , già generato dalla decomposizione termica dell'iniziatore I-I [K. Min et al., 2009].



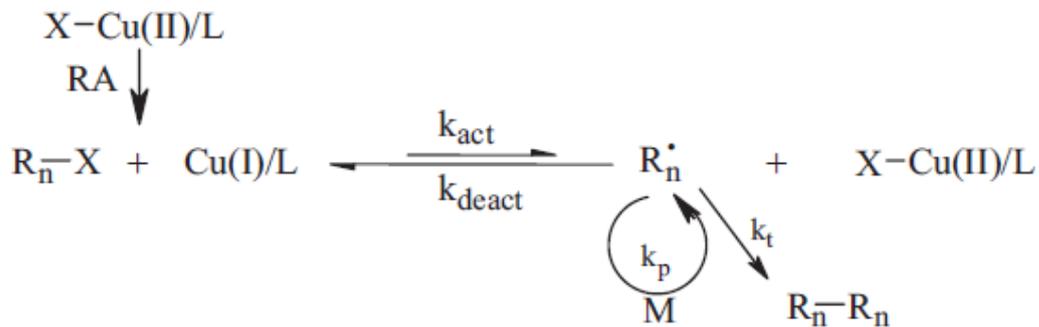
Schema 2. Rappresentazione schematica del processo di ATRP inversa.

In uno sviluppo della tecnica reverse ATRP, “Simultaneous Reverse and Normal Initiation ATRP” (SR&NI ATRP) (**Schema 3**), gli iniziatori, del tipo convenzionale o macroiniziatori, vengono aggiunti alla reazione insieme all’iniziatore termico I-I. Tale metodo ha il vantaggio di poter utilizzare una minore quantità di catalizzatori senza sacrificare il controllo sulla polimerizzazione, in quanto entrambi tali componenti contribuiscono al mantenimento dell’equilibrio di trasferimento atomico [K. Matyjaszewski, 2012].



Schema 3. Rappresentazione schematica del processo di SR&NI ATRP.

Nonostante il vantaggio di ridurre le component di catalisi, la SR&NI mostra un limite nell'applicazione sintetica di copolimeri a blocchi, in quanto genera una frazione di piccole catene omopolimeriche polimerizzate dall'iniziatore termico, che riducono l'efficienza del processo sintetico e costituiscono un'impurezza [K. Matyjaszewski, 2012]. Al fine di risolvere tale limite e preparare copolimeri a blocchi estremamente puri, in assenza di contaminazione da omopolimeri, è stata sviluppata una tecnica di iniziazione denominata "Activators Generated by Electron Transfer" (AGET). In questo approccio, invece di un iniziatore convenzionale (I-I) viene impiegato un agente riducente (RA), in modo da poter generare il metallo di transizione nella sua forma attiva ridotta Cu(I)/L, senza il coinvolgimento di radicali organici e soprattutto senza possibilità di formazione di catene omopolimeriche (**Schema 4**) [C.J. Cheng ET AL., 2013; Y. Kwak ET AL., 2009].



Schema 4. Rappresentazione schematica del processo di AGET ATRP.

1.1.2. Grafting onto: le reazioni di coupling chemoselettive.

Come ampiamente illustrato mediante l'approccio dell'ATRP, la tecnica del grafting from può fornire un elevato controllo sulla densità di grafting; di contro, la tecnica di *grafting onto* risulta spesso meno uniforme e in generale porta a più basse densità di funzionalizzazione. Tuttavia, i suoi principali vantaggi consistono nella possibilità di preparare polimeri con una varietà di architetture e grafting utilizzando condizioni più

semplici rispetto alle condizioni di polimerizzazione, il che è vantaggioso quando si tratta con polimeri di natura degradabile [Katoa K et al., 2003; Galvin C.J et al., 2012].

Tra gli approcci utilizzati per modificare in modo covalente polimeri mediante la tecnica del grafting onto, le reazioni di coupling chemoselettive, solitamente indicate come reazioni "click", hanno ricevuto elevato interesse per applicazioni biomediche. Le reazioni di click chemistry devono soddisfare molti importanti requisiti per poter essere considerate tali; questi requisiti, esplicitati per la prima volta da Sharpless e collaboratori nel 2001, comprendono un'elevata efficienza in condizioni di reazione moderate (a temperatura e pressione normali), assenza o minima quantità di prodotti secondari, elevata efficienza, regio e stereo selettività e selettività chimica, cioè assenza di reazioni secondarie con altri gruppi funzionali [H.C. Kolb et al., 2001]. L'ultima caratteristica risulta essere particolarmente vantaggiosa nel caso dell'applicazione di tali approcci di sintesi sui biomateriali, a cui spesso vengono coniugate macromolecole attive naturali come acidi nucleici, peptidi o proteine, dotate di gruppi funzionali diversi che potrebbero essere coinvolti nelle reazioni di coniugazione con i polimeri.

Nel 2001, sia Sharpless che Meldal riportarono un elevatissimo incremento nella velocità della reazione di ciclo addizione di Huisgen, tra azidi e alchini, quando si utilizzava un catalizzatore metallico a base di rame. Questa nuova reazione prese il nome di ciclo addizione azide-alchino rame catalizzata, e da allora è nota come il primo e più noto esempio di reazione click [H.C. Kolb et al., 2001; M. Meldal 2008]. In **Figura 3** è schematizzata una selezione di reazioni che secondo la letteratura meglio rispondono ai criteri "click" e maggiormente utilizzate in ambito della ricerca biomedica.

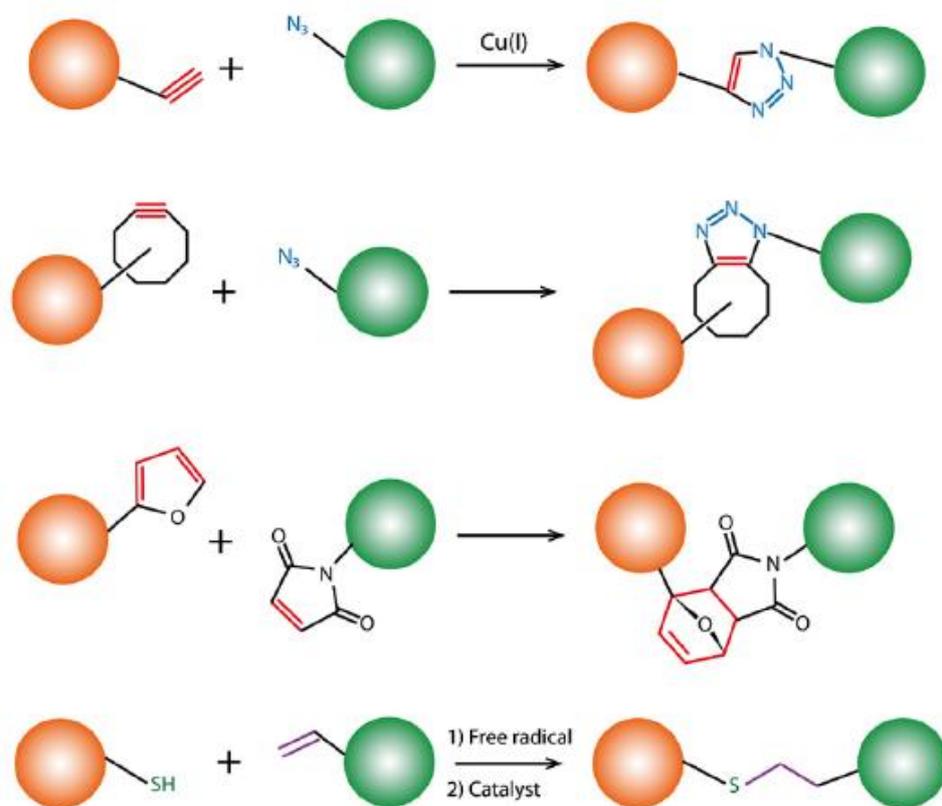


Figura 3. Principali reazioni che rispondono ai requisiti di click chemistry.

Una significativa attenzione è stata riservata, negli ultimi anni, alla reazione “*tiolo-ene*”, reazione di addizione che coinvolge un tiolo ed un alchene con l’ottenimento di un tioetere, come schematizzato in **Figura 3**, e che può avvenire con meccanismo radicalico o ionico. Tale reazione è nota sin dagli inizi del XX secolo, ma solo nell’ultimo decennio essa è stata nuovamente esplorata e introdotta tra le reazioni click. Nonostante ciò, si osserva che, a causa della elevata reattività del gruppo tiolico per una gamma di funzionalità, la reazione “*tiolo-ene*” non è puramente selettiva [C.E. Hoyle et al., 2010]. Pertanto, le condizioni di reazione devono essere scelte con cura per controllare la possibilità che reazioni collaterali non interferiscono con il sistema. Se le condizioni sono controllate e adeguatamente messe a punto, la reazione “*tiolo-ene*”, oltre a possedere tutti i vantaggi di una reazione click, può offrirne alcuni supplementari, come l’assenza dell’utilizzo di catalizzatori metallici, che possono in qualche modo produrre tossicità residua del prodotto ultimo, e la velocità molto elevata della reazione rispetto ad altre click, che risiede nell’elevata reattività del gruppo tiolico

(elevati gradi di conversione possono essere raggiunti in meno di 10 secondi) [C.E. Hoyle et al., 2010].

In termini di efficienza generale possono essere fatte le seguenti considerazioni:

(1) la reattività di alcheni in condizioni radicali-mediate varia notevolmente a seconda della natura elettronica del legame C=C, per cui doppi legami elettron-ricchi (ad esempio vinil eteri) o substrati in cui il doppio legame è incluso in un ciclo, che conferisce una significativa tensione all'anello (ad esempio norborneni), risultano particolarmente reattivi;

(2) reazioni secondarie di polimerizzazione in condizioni radicali-mediate, sono possibili in presenza di doppi legami C=C elettron-deficienti quali acrilati, mentre, l'impiego di condizioni in cui la reazione avviene via formazione dell'anione tiolato piuttosto che per via radicalica, condotta impiegando catalizzatori come fosfine o amine, minimizza la possibilità di tali reazioni di polimerizzazione secondarie;

(3) doppi legami C=C terminali mostrano una reattività significativamente superiore rispetto a quelli interni ed inoltre l'addizione segue una stereochimica anti-Markovnikov mentre, l'addizione ad alcheni interni può essere accompagnata da un processo di isomerizzazione cis-trans del radicale tiolico che può avere un impatto importante sulla cinetica di reazione.

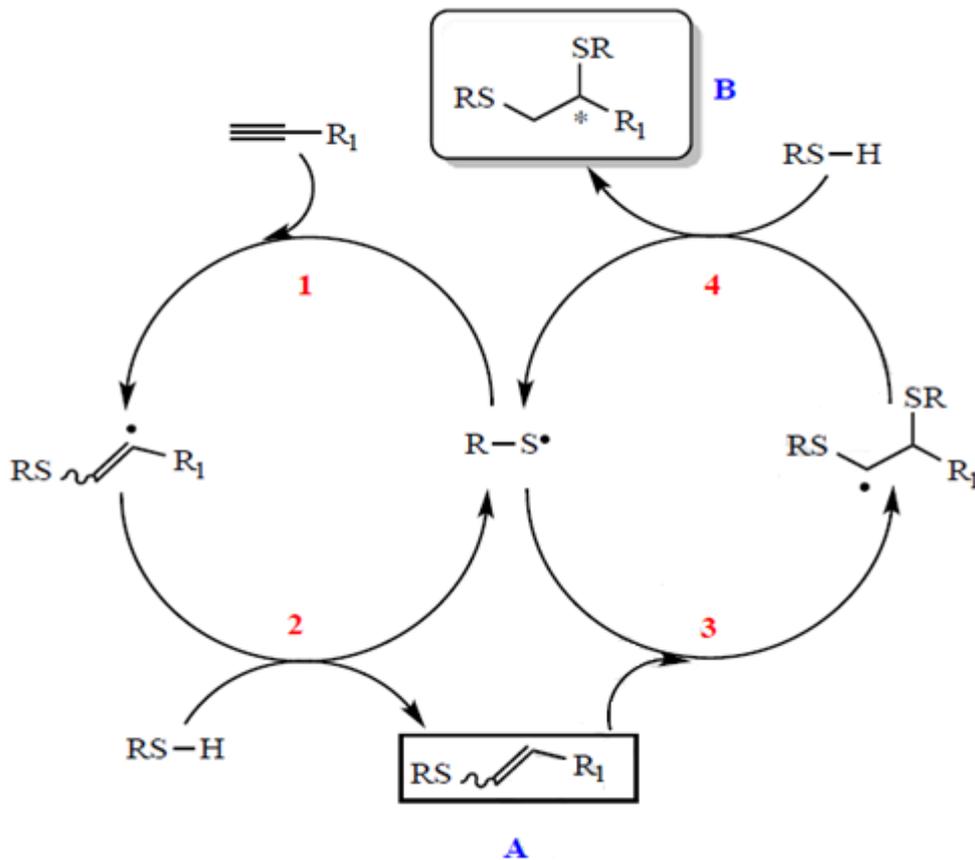
Per avviare la reazione tiolo-ene per via radicalica possono essere utilizzati metodi differenti, fotochimici, termici o redox. Tuttavia, l'impiego della fotocatalisi, cioè dell'irraggiamento UV, in presenza o meno di un fotoiniziatore, è risultato particolarmente interessante, in quanto permette sia il controllo temporale che spaziale sopra l'avanzamento della reazione.

Analogamente alla reazione tiolo-ene, l'addizione radicalica di un tiolo a un alchino, la reazione tiolo-ino, ha suscitato ampio interesse ed'è stata impiegata nel campo della sintesi di biopolimeri e come metodo click nella modifica chimica di polimeri preformati [A.B. Lowe, 2014].

Il prodotto di addizione 1,2- (**B** in **Schema 5**) è facilmente ottenuto in condizioni radicaliche con due, o più, equivalenti di tiolo, ed è a questa reazione specifica e al suo

prodotto associato che comunemente ci si riferisce come reazione tiolo-ino (in contrapposizione alla formazione di addotti di mono-addizione o ditioacetali). Il meccanismo di addizione per dare il prodotto generale di addizione 1,2- è simile a quello di una reazione radicalica tiolo-ene.

Il meccanismo generalmente accettato è riportato nello **Schema 5**: il radicale tiile, $RS\cdot$, generato termicamente, fotochimicamente (con o senza fotoiniziatori) etc, in presenza di un alchino si addiziona al triplo legame $C\equiv C$ per dare l'intermedio radicalico viniltioetereo (step **1**). La reazione prosegue con un trasferimento di catena tra l'intermedio radicalico e un tiolo ulteriore per dare l'intermedio viniltioetereo, **A**. Quest'ultimo essendo molto reattivo nei confronti del radicale tiile, $RS\cdot$, reagirà con esso per dare un ulteriore radicale capace di innescare un secondo trasferimento di catena, step **4**, producendo il prodotto di bis addizione finale 1,2-ditioetere, **B**.



Schema 5. Meccanismo di addizione radicalica di un tiolo ad un alchino.

L'addizione del tiolo all'intermedio viniltioetere è circa tre volte più veloce dell'addizione del tiolo all'alchino, dunque, durante la reazione, concentrazioni significative di viniltioetere non dovrebbero accumularsi, tranne in casi in cui non si lavori in presenza di un eccesso di alchino [A.B. Lowe, 2014]. È da notare che tale reazione si traduce anche nella generazione di un centro chirale che, mentre meno importante nella chimica dei polimeri, risulta fondamentale nella sintesi di piccole molecole, specialmente se di interesse biologico.

Nonostante in letteratura siano presenti molti casi in cui non si rende necessario l'utilizzo di un fotoiniziatore nelle reazioni tiolo-ene e tiolo-ino, nella maggior parte delle reazioni foto catalizzate di questo tipo il fotoiniziatore è una componente fondamentale.

Tipicamente, un *fotoiniziatore*, è una molecola che assorbe la radiazione UV incidente, che genera uno stato elettronico eccitato da cui si ha la produzione di una specie reattiva, radicalica o cationica. È fondamentale quindi, un elevato e adatto coefficiente di assorbimento da parte del fotoiniziatore e una buona resa quantica di inizio, oltre ad un adeguato intervallo spettrale di assorbimento. Altri criteri importanti sono che l'iniziatore, o i suoi frammenti generati fotochimicamente, non reagiscano mediante trasferimenti di catena o altre reazioni generanti prodotti secondari indesiderati, e che esso sia solubile nella miscela irradiata [W. Rutsch et al., 1996]. I fotoiniziatori radicalici rispondono a due diversi processi fotochimici: il processo di fotoscissione e la reazione di estrazione di idrogeno: nel primo, molecole del tipo alchil o aril chetoni, producono radicali attraverso un meccanismo di rottura omolitica noto come reazione di Norrish di tipo I; nel secondo un radicale di tipo chetile viene generato attraverso la foto riduzione di uno stato di tripletto in presenza di una molecola donatrice di idrogeno, come il THF, alcoli o amine. Questo secondo meccanismo è noto come reazione Norrish di tipo 2 [J. Seguro et al., 1999].

Molti fotoiniziatori sono basati su un cromoforo benzilico: sostituendo i gruppi legati al cromoforo è possibile ottenere una grande varietà di fotoiniziatori, i più comunemente impiegati dei quali sono riportati in **Figura 4**.

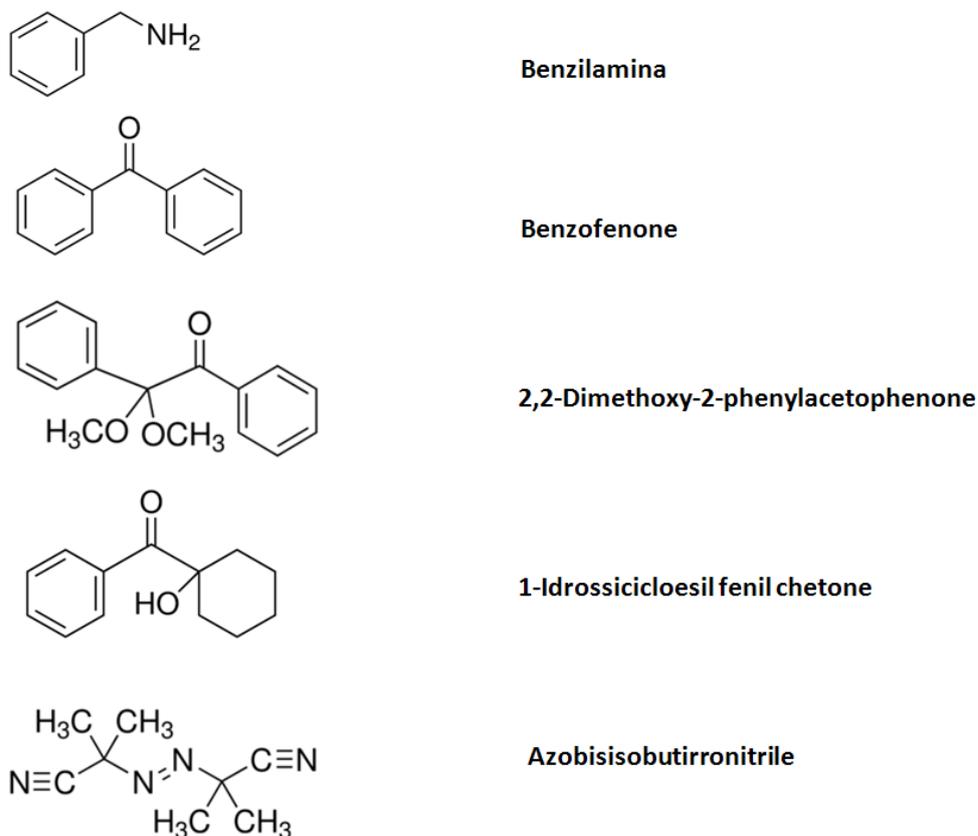
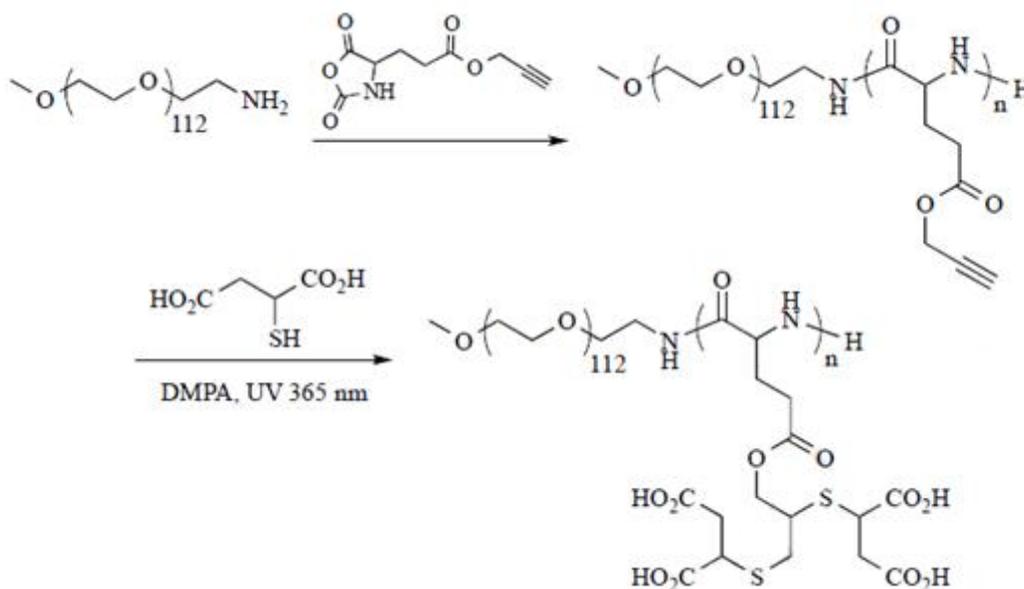


Figura 4. Struttura chimica dei più comuni fotoiniziatori utilizzati nelle reazioni click tiolo-ene e tiolo-ino fotocatalizzate.

Nell'ambito della scienza dei polimeri per applicazione biomedica, sia la reazione tiolo-ene che la reazione tiolo-ino sono state impiegate per la preparazione di sistemi nanostrutturati come micelle e polimerosomi, nanoparticelle polimeriche, dendrimeri e macromolecole iper-ramificate, ma anche idrogeli, film e scaffolds per l'ingegneria tissutale [A.B. Lowe, 2014].

In un interessante esempio, Li e collaboratori, hanno riportato la preparazione di polimerosomi ottenuti dalla complessazione in mezzo acquoso di un copolimero polianionico con il farmaco antitumorale cationico doxorubicina cloridrato (DOX-HCl) [M. Li et al., 2013]. Il copolimero carico negativamente è stato sintetizzato come riportato nello **Schema 6**, mediante ROP, utilizzando come iniziatore della

polimerizzazione un PEG amino-funzionalizzato e come monomero una carbossianidride ciclica funzionalizzata con un gruppo alchilico. Il copolimero a due blocchi risultante è stato poi posto a reagire con un eccesso (10 volte) di acido mercaptosuccinico in presenza del fotoiniziatore 2,2-dimetossi-2-fenilacetofenone, irradiando la miscela di reazione a una lunghezza d'onda di 365 nm, e ottenendo una completa funzionalizzazione di tutti i gruppi alchilici, come dimostrato dalla scomparsa del segnale relativo a tale gruppo nello spettro FTIR.



Schema 6. Esempio di applicazione della reazione tiolo-ino per la funzionalizzazione di biopolimeri.

I polimerosomi ottenuti hanno mostrato un diametro pari a circa 34 nm come determinato utilizzando l'analisi Dinamic Light Scattering e la microscopia a trasmissione elettronica. Gli autori hanno inoltre dimostrato che i nanocomplessi possono essere internalizzati da cellule A549, esibendo un'augmentata induzione della apoptosi rispetto alla stessa quantità di DOX-HCl somministrata in forma non complessata.

1.1.3. Reazioni catalizzate dalle microonde.

La funzionalizzazione chimica dei polimeri deve, in generale, essere orientata verso l'utilizzo di tecniche vantaggiose sotto più aspetti, tra i quali l'applicabilità del processo su larga scala e l'ottenimento di buone rese, in tempi di reazione ridotti. Inoltre, la necessità sempre crescente di minimizzare le fonti inquinanti, richiede di ridurre al minimo l'utilizzo di reattivi, solventi e catalizzatori. Inoltre, è opportuno prendere in considerazione la termosensibilità dei biopolimeri nel momento in cui si sceglie la tecnica di funzionalizzazione.

La mancanza di riproducibilità, il difficile e costoso scaling-up e la standardizzazione di un processo sintetico sono le principali difficoltà per la produzione su scala industriale di polimeri sintetici e semisintetici per applicazioni biomediche [A. Sosnika et al., 2011]. Processi sintetici di lunga durata e che richiedono un enorme impiego di energia (spesso con l'utilizzo di solventi organici volatili, infiammabili e/o tossici), pur risultando applicabili se realizzati su scala ridotta in laboratorio, risultano spesso non convenienti dal punto di vista dei costi e della sostenibilità ambientale quando sono realizzati su scala industriale a causa dell'impatto che tali processi avrebbero sul costo finale del prodotto e sulla necessità di garantire la sicurezza per l'ambiente e per il consumatore finale. Questo è uno dei motivi per cui l'utilizzo di nuovi biomateriali nella pratica clinica può incontrare degli ostacoli ed essere ritardato anche di molti anni rispetto alla messa a punto dei primi prototipi.

Nella sintesi organica convenzionale, i reagenti possono essere attivati con una fonte di calore esterna. Questo approccio permette il passaggio di energia attraverso le pareti del recipiente di reazione fino a raggiungere i reagenti e il solvente all'interno, ovvero per sola conduzione termica. Il processo risulta spesso poco efficiente, in quanto non assicura che tutta la miscela venga sottoposta a riscaldamento in maniera omogenea e simultanea, e spesso lungo, della durata anche di giorni, il che aumenta enormemente la possibilità di ottenere prodotti di reazione secondari che abbattano le rese e rendono più complesso il processo di purificazione.

La "green chemistry" ovvero la chimica sostenibile, è emersa come nuova filosofia con lo scopo di (1) minimizzare l'utilizzo di fonti non rinnovabili; (2) limitare l'utilizzo di

solventi organici; (3) ridurre al minimo i prodotti di “scarto” secondari di un processo sintetico; (4) abbassare il livello di emissioni di gas e di consumo energetico [J.L. Tucker, 2010].

L'uso di irradiazione a microonde è stata sfruttata negli ultimi due decenni per ridurre le limitazioni nella sintesi di numerosi nuovi materiali. L'irradiazione con microonde riduce significativamente l'uso di solventi tossici, e anche il tempo di reazione per quasi tutte le reazioni, garantendo rese più elevate e maggiore presenza del prodotto desiderato rispetto alle miscele di prodotti ottenuti [D. Stuerger et al., 1993].

Le microonde comprendono radiazioni elettromagnetiche in un range di frequenze compreso tra 300 MHz e 300 GHz, anche se sono di uso convenzionale apparecchiature la cui frequenza di utilizzo è pari a 2.45 GHz in quanto questa non genera delle interferenze con i comuni apparecchi che generano campi elettromagnetici. A seguito di esposizione alle microonde, composti carichi o che possiedono dipoli permanenti tendono ad allinearsi con la direzione del campo elettrico generato, che rapidamente inverte la propria direzione ad una velocità di $2.4 \cdot 10^9/s$ (a 2.45 GHz di frequenza). Nel momento in cui tali molecole impiegano un tempo superiore per l'allineamento, esse collidono provocando delle frizioni molecolari che generano grandi quantità di calore [S.A. Galema, 1997].

Le reazioni catalizzate dalle microonde possono essere eseguite in soluzione o in assenza di un solvente [A. Loupy, 2004]. Nelle reazioni condotte in assenza di un solvente, dal momento che l'intima miscelazione tra le molecole reagenti non può essere ottenuta allo stato solido per semplice miscelazione, la distribuzione delle microonde non avviene in maniera totalmente omogenea e si generano così delle zone, chiamate “punti caldi” o “hotspots” in cui la temperatura è più elevata della temperatura in bulk della miscela. In tali zone, che possono avere una estensione da 900 a 1000 μm , l'incremento della temperatura rispetto a quella in bulk può raggiungere i 100–200 K [X. Zhang et al., 1999] causando un drastico aumento della velocità e della efficienza della reazione, rispetto alla stessa condotta in soluzione.

Confrontando però rese ed efficienza di reazioni condotte sotto irraggiamento con microonde e reazioni condotte convenzionalmente alla stessa temperatura, si osservano

differenze che non possono essere spiegate ricorrendo esclusivamente agli effetti termici. In letteratura si parla infatti di “*specific microwave effects*”, cioè di effetti specifici delle microonde nell’aumentare l’efficienza di una reazione, che non può essere ricondotto alla temperatura della miscela e/o alla velocità con cui essa viene raggiunta con l’irradiazione [N. Kuhnert, 2002].

Nelle prime reazioni effettuate impiegando le microonde l’irraggiamento avveniva utilizzando forni a microonde domestici, in cui l’irradiazione era controllata semplicemente da cicli di accensione e spegnimento. Anche se questi dispositivi erano popolari grazie alla loro facile accessibilità e basso costo, il loro uso è stato presto scoraggiato a causa dei problemi di sicurezza e in quanto hanno un controllo insufficiente sulla temperatura e la pressione di reazione. I moderni reattori a microonde disponibili in commercio progettati per sintesi chimica presentano: agitatori magnetici incorporati, sonde in fibra ottica o sensori IR per il controllo diretto della temperatura della miscela di reazione e softwares per il controllo on-line di temperatura, pressione e potenza delle microonde [A. Sosnika et al., 2011]. Queste caratteristiche permettono il controllo delle condizioni di reazione con maggiore affidabilità e accuratezza, portando a una migliore riproducibilità dei risultati e anche ad un più facile scaling-up delle reazioni. Sebbene, i reattori monomodali siano già da tempo utilizzati nella sintesi di piccole molecole organiche, solo di recente tali tecniche sono state utilizzate per la sintesi di biopolimeri.

Sono state proposte due metodiche per la applicazione di microonde. Una consiste nella *Conventional Microwave Synthesis* (CMS), in cui l’intensità delle microonde è massima all’inizio della sintesi e permette quindi di portare il sistema al valore di temperatura desiderato istantaneamente [B.L. Hayes, 2002]; dopo il raggiungimento della temperatura stabilita, l’intensità delle microonde decresce o si annulla in modo da mantenere e non superare la temperatura ottenuta. La reazione verrà quindi successivamente condotta senza le microonde, con l’approccio classico della conduzione termica. Ciò comporta però rese minori, in quanto le microonde in questo caso vengono adoperate solo per aumentare la temperatura e nel momento in cui esse non vengono più applicate non risulterà più possibile garantire alcun “*specific microwave effect*”.

L'Enhanced Microwave Synthesis (EMS) rappresenta un'ulteriore tecnica più vantaggiosa rispetto alla CMS, in quanto l'applicazione delle microonde risulta costante durante tutta la durata della reazione. Questa procedura prevede la refrigerazione del recipiente di reazione in maniera simultanea all'irradiazione con microonde, con l'ausilio di aria compressa raffreddata o con fluidi refrigeranti a circolazione: ciò permette di raggiungere la temperatura voluta rapidamente e in maniera omogenea, ma senza superarla, e inoltre sotto la continua somministrazione di microonde, che assicura una maggiore attivazione cinetica, e non solo termica, di tutte le molecole reagenti, garantendo l'eventuale spicific microwave effect per tutta la durata della reazione.

Oltre ad un minore tempo di reazione e un minore impiego di sostanze quali reattivi, solventi e catalizzatori, l'EMS ha mostrato in molti casi un aumento delle rese. L'EMS permette inoltre di funzionalizzare i gruppi presenti nella struttura di biopolimeri in modo rapido e riproducibile senza che i polimeri subiscano una consistente degradazione dovuta ad eccessivi incrementi di temperatura [B. L. Hayes, 2004].

1.2. Polimeri naturali e sintetici per applicazioni biomediche.

1.2.1. Poliesteri alifatici.

I *poliesteri alifatici*, quali l'acido polilattico (PLA), l'acido poliglicolico (PLG), il poli- ϵ -caprolattone (PCL) e i loro copolimeri come l'acido polilattico-poliglicolico (PLGA), le cui strutture sono graficamente rappresentate in **Figura 5**, sono stati e continuano ad essere ampiamente utilizzati come materiali per applicazioni biomediche grazie alla loro biodegradabilità, biocompatibilità e bioriassorbibilità, cioè la capacità del materiale inserito in un ambiente biologico di essere rimosso grazie all'attività cellulare del tessuto circostante.

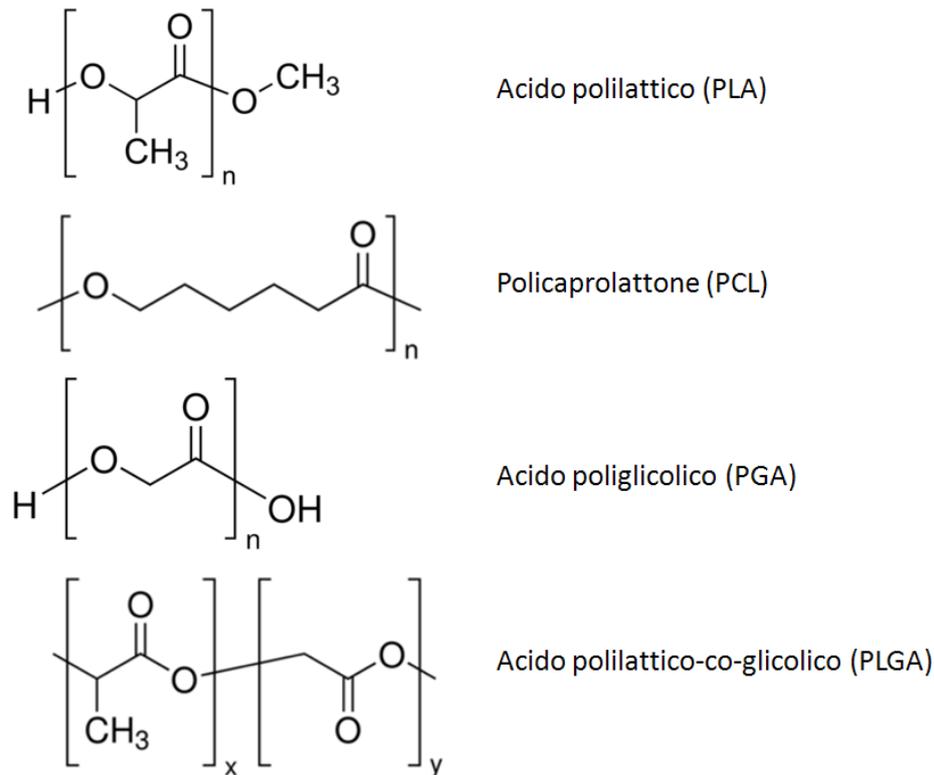
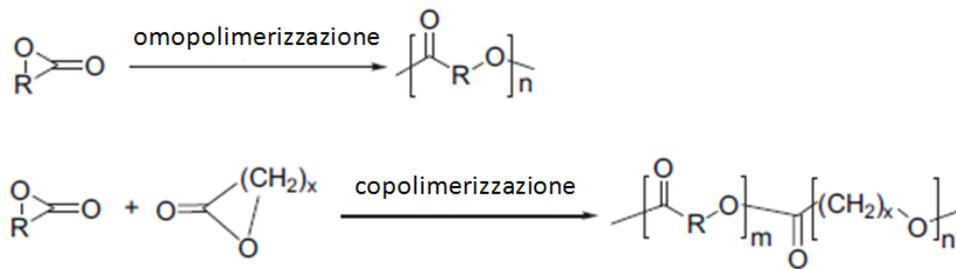


Figura 5. Struttura dei poliesteri alifatici.

I poliesteri alifatici presentano però alcuni inconvenienti, quali la loro elevata cristallinità, l'idrofobicità e la mancanza di gruppi reattivi, in catena laterale al backbone polimerico, che ne impedisce la facile funzionalizzazione allo scopo di modularne le proprietà fisico-chimiche come l'idrofilia, la capacità di bioadesione, il legame di porzioni bioattive o di molecole direzionanti o il legame di altri polimeri per l'ottenimento di copolimeri anfifilici utilizzabili per applicazioni biomediche.

Poliesteri alifatici portanti gruppi funzionali reattivi in catena laterale possono essere sintetizzati a partire da monomeri ciclici contenenti gruppi funzionali protetti o non, quali carbossili, idrossili, amine, doppi e tripli legami C-C, alogenuri alchilici, etc, mediante la tecnica di “*Ring Opening Polymerization*” (ROP) (**Schema 7**). Tali poliesteri possono essere poi modificati utilizzando un approccio di post-funzionalizzazione.



R: gruppi reattivi protetti o non, contenenti carbossili, amine, alogeni, chetali, ossidril, doppi legami C-C, ecc

Schema 7. Sintesi di poliesteri alifatici funzionalizzati.

In un recente ed interessante esempio, il copolimero m-PEG-b-PCL-Br è stato sintetizzato mediante ROP a partire da un monomero ciclico contenente una funzione 2-bromo-2-metil propionica [W. Wanga et al., 2014]. Tale copolimero, contenente una catena di PEG (5000 Da) per macromolecola e atomi di alogeno in catena laterale al backbone, è stato successivamente utilizzato come macroiniziatore per reazioni di ATRP al fine di introdurre in catena laterale al poliestere catene poli-perfluorobutiliche, utilizzando come monomero il 2-(perfluorobutil)metil metacrilato (PPFEMA). Il copolimero risultante m-PEG-b-PCL-g-PPFEMA, grazie alla sua anfifilicità, conferita dalla presenza di una porzione altamente idrofila (PEG), sia di componenti idrofobiche (PCL e PPFEMA), segrega in ambiente acquoso a formare nanostrutture autoassemblanti, di tipo micellare. Inoltre, grazie alla immiscibilità tra le due porzioni idrofobiche, il core micellare risulta costituito da due compartimenti separati, come è possibile osservare dalle immagini di microscopia elettronica a trasmissione proposte in **Figura 6**.

Questo tipo di struttura permetterebbe la veicolazione simultanea di sostanze scarsamente solubili in acqua incompatibili tra loro chimicamente. Gli autori riportano inoltre come tali micelle siano candidabili per la somministrazione parenterale, grazie alla bassa concentrazione di aggregazione critica ($0.56 \cdot 10^{-3}$ M) e l'elevata citocompatibilità, in vitro dopo 48h di incubazione, su 2 diverse linee cellulari (3T3 e THP-1).

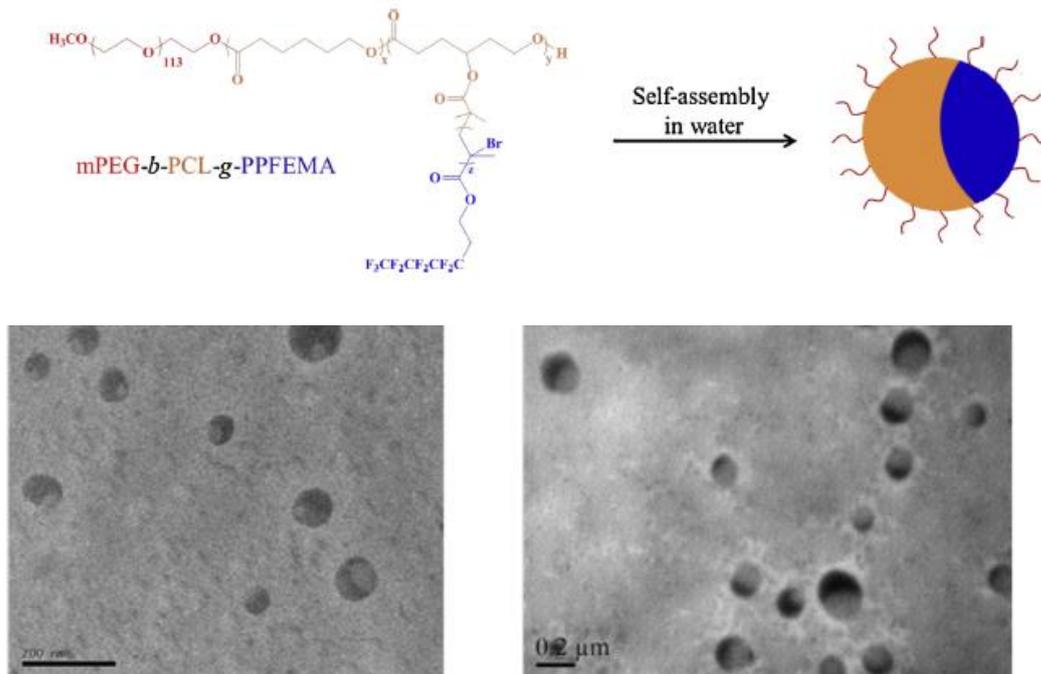


Figura 6. Struttura del copolimero m-PEG-b-PCL-g-PPFEMA e immagini TEM dei nanosistemi ottenuti [W. Wanga et al., 2014].

Una seconda tipologia di approccio per la funzionalizzazione di poliesteri alifatici comprende il trattamento al plasma [K. Bazaka et al., 2009], il foto-grafting [K. Ishihara et al., 2010] e la modificazione chimica per amminolisi o idrolisi [E. Kiss et al., 2010; S. G. Wang et al., 2005; F.J. Xu et al., 2010; F. J. Xu et al., 2011]. Queste tecniche sono state largamente impiegate ai fini della modificazione di superfici polimeriche di poliesteri in eterofase. Esse, tuttavia, incorrono in un problema fondamentale, dovuto alla natura degradabile dei poliesteri, che non possono essere modificati senza tenere conto della loro relativa fragilità, soprattutto nei casi di amminolisi o idrolisi.

La ricerca è quindi orientata negli ultimi anni verso lo sviluppo di metodi alternativi. In un interessante lavoro pubblicato da El Habnoui et al., la reazione "click" azide-alchino rame catalizzata è stata utilizzata per conferire proprietà antibatteriche e antibiofilm a superfici di PLA per immobilizzazione di catene poliquaternarie [S. El Habnoui et al., 2011]. In questo lavoro, le superfici di PLA propargilate sono state

ottenute mediante reazioni in eterofase, attivando le catene di PLA superficiali, in presenza di litio di-isopropil ammina (LDA), e trattando successivamente con bromuro di propargile (**Figura 7**).

Tale modifica di superficie fornisce una piattaforma generale, stabile per specifiche post-funzionalizzazioni attraverso reazioni chemoselettive che coinvolgono tripli legami C-C, senza, come dimostrato dagli autori, interferire con l'integrità del polimero e le proprietà in bulk del materiale.

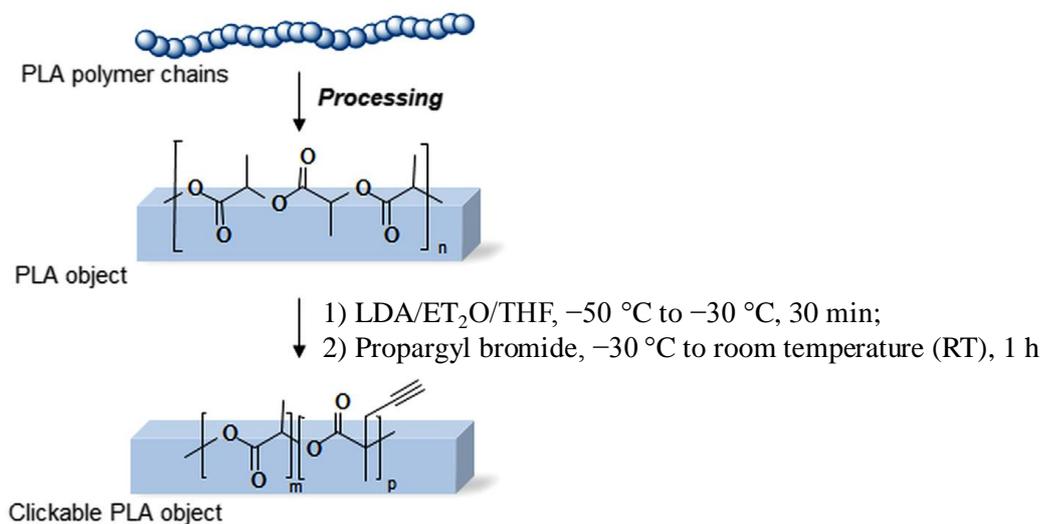


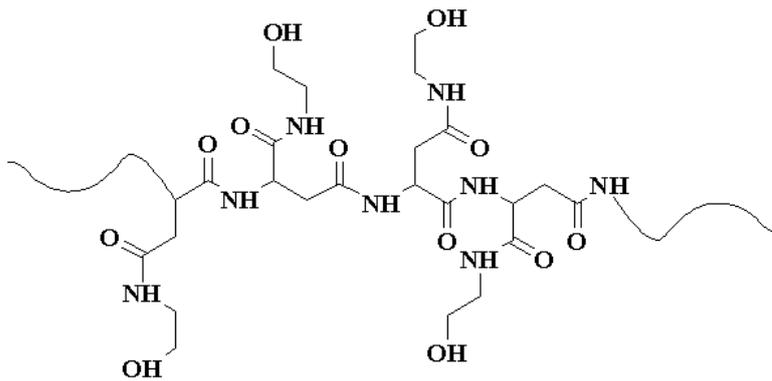
Figura 7. Preparazione delle superfici di PLA propargilato [El Habnoui et al., 2011].

1.2.2. Poliamminoacidi.

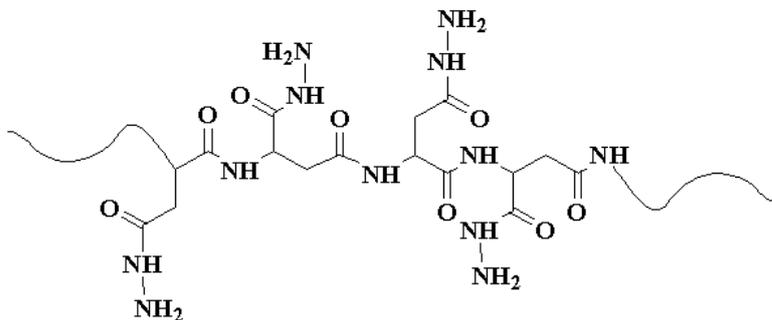
I *poliamminoacidi*, come ad esempio l'acido poligluttammico (PLG), l'acido poliaspartico (PAsp), la poli-L-lisina (PLL), la poliarginina (PArg) e la poli-L-istidina (PLHis), rappresentano una importante classe di biopolimeri sintetici e sono stati studiati ampiamente per l'impiego in diverse applicazioni biomediche. L'impiego dei poliamminoacidi nella formazione di nuovi *drug delivery systems* si attribuisce alle loro interessanti proprietà strutturali, in quanto possiedono una struttura proteino-simile e possono essere considerati un giusto compromesso tra macromolecole naturali e sintetiche, essendo biocompatibili e potenzialmente biodegradabili come le prime, ma

con il vantaggio di possedere un arrangiamento più regolare e una varietà di residui amminoacidici più piccola rispetto alle proteine naturali. Grazie alle tecniche di polimerizzazione può essere progettata e sintetizzata una grande varietà di poliamminoacidi con opportuno peso molecolare, biodegradabili o contenenti specifici gruppi funzionali utili per eventuali funzionalizzazioni chimiche al fine di preparare derivati dotati di specifiche proprietà. La maggior parte di questi composti è insolubile in acqua o solubile in dipendenza dal pH, il che in alcuni casi può limitarne fortemente l'impiego.

Poli-amminoacidi sintetici derivati della polisuccinimide, quali l' α,β -poli-N²-idrossietil-DL-aspartammide (PHEA) e l' α,β -poliaspartilidrazide (PAHy), le cui strutture sono rappresentate in **Figura 8**, sono polimeri altamente solubili in acqua, ampiamente caratterizzati, biocompatibili, non immunogenici, non antigenici e posseggono inoltre in catena laterale, per ciascuna unità ripetitiva, dei gruppi funzionali, rispettivamente ossidrilici e idrazinici, che ne permettono la funzionalizzazione con un gran numero di molecole e macromolecole.



α,β -poli-N2-idrossietil-DL-aspartammide (PHEA)



α,β -poliaspartilidrazide (PAHy)

Figura 8. Poliaminoacidi sintetici derivati della polisuccinimide.

Entrambi questi biopolimeri sono stati sintetizzati dal gruppo di ricerca presso cui ho svolto il dottorato di ricerca [G. Giammona et al., 1987; G. Giammona et al., 1994], e sono stati variamente funzionalizzati e proposti come biomateriali per diverse applicazioni quali, drug delivery and targeting [M. Licciardi et al., 2013], veicolazione di acidi nucleici [G. Cavallaro et al., 2006; M. Licciardi et al., 2006; M. Ogris et al., 2007], scaffold per l'ingegneria tissutale [G. Pitarresi et al., 2010;], profarmaci macromolecolari [G. Cavallaro et al., 2004; G. Giammona et al., 1999; G. Cavallaro et al., 2006], hydrogels [G. Pitarresi et al., 2002; G. Pitarresi et al., 2007].

La funzionalizzazione di tali polimeri per le applicazioni sopracitate si è basata su tecniche sintetiche diverse, dalle tecniche di polimerizzazione radicalica controllate, come l'ATRP, a metodiche di coniugazione utilizzando attivanti quali il carbonil-diimidazolo (CDI), il bis-paranitro fenilcarbonato (PNFC), carbodiimmidi, etc,

dimostrando la facilità di manipolazione chimica di questi polimeri e la possibilità di ottenere derivati funzionali senza alterarne la elevata biocompatibilità.

Una caratteristica molto importante, che accomuna molti poliamminoacidi, è quella di possedere pH-sensibilità, proprietà che permetterebbe a nanosistemi costituiti a partire da tali polimeri un rilascio delle molecole bioattive in siti specifici (organi, tessuti infiammati, tumori solidi, compartimenti intracellulari) grazie a variazioni conformazionali e di solubilità, prodotti dal grado di protonazione dei gruppi ionizzabili appartenenti alla struttura del copolimero, al variare del pH [S. Manchunet al., 2012].

Molti poliamminoacidi, quali l'acido poligluttammico, l'acido poliaspartico, la poliistidina, la poli-L-lisina e la poliarginina, possiedono tale proprietà. Tra questi, l'acido poligluttammico e l'acido poliaspartico sono poliamminoacidi acidi mentre gli altri sono basici. L'acido poligluttammico e la poliistidina sono i poliamminoacidi pH-sensibili maggiormente impiegati per studi in vivo in quanto il loro range di sensibilità alla variazione di pH ricade nel range fisiologico che va da 7.4 a 5.1 [H. Tian et al., 2012]. Inoltre è stato dimostrato che l'acido poligluttammico è in grado di cambiare la sua conformazione al variare del pH, da una conformazione ad α -elica, a pH acidi, ad una "random" che in qualche modo mima il naturale riarrangiamento conformazionale delle proteine in soluzione a pH 7 o superiore [C. Krejtschiet al., 2011]

La poliistidina contiene gruppi imidazolici che, venendo rapidamente protonati a pH 6.5–5.0, portano alla formazione di un policatione. Il pKa di tali biopolimeri può essere modulato introducendo più di un tipo di monomero nella struttura, e generando un copoliamminoacido, oppure introducendo altri gruppi carichi o ancora funzionalizzando il poliamminoacido di partenza con porzioni idrofobiche. Ad esempio, Kim et al. Hanno sintetizzato il copolimero a due blocchi poli[(1-istidina)-co-(1-fenilalanina)]-block-poli(etilene glicole) (PHF-b-PEG) al fine di ottenere micelle polimeriche pH-sensibili [G.M. Kim et al., 2005]. Gli autori riportano come, il pKa, e quindi il range di pH-sensibilità del copolimero, possa essere controllato modulando il rapporto tra la porzione poli-istidinica e quella poli-fenilalaninica nella struttura del copoliamminoacido e modulandone il peso molecolare complessivo.

1.2.3. I polisaccaridi.

I polisaccaridi sono definiti come strutture polimeriche carboidrate composte da unità ripetitive monosaccaridiche legate tra loro attraverso legami glicosidici. I polisaccaridi formano una importante classe di polimeri naturali che possono essere ottenuti da risorse di facile reperibilità quali alghe (ad es. l'alginato), piante (ad es. pectine, cellulosa, ciclodestrine, inulina), microorganismi (ad es. destrano, pullulano) e animali (ad es. chitosano, acido ialuronico) [Z. Liuet al., 2008]. I polisaccaridi posseggono strutture e composizione chimica molto eterogenei, ed è possibile distinguere tra polisaccaridi ad alto e basso peso molecolare, neutri o carichi, lineari o ramificati e con diversi gradi di idrofilia. In generale, per la loro origine naturale, i polisaccaridi sono descritti come biodegradabili e altamente biocompatibili, qualità che risultano, come già detto, fondamentali per applicazioni biomediche. Per questo motivo, i polisaccaridi sono spesso impiegati in strutture ibride per ridurre la tossicità di materiali sintetici.

La biodistribuzione in vivo di questi materiali ibridi può essere marcatamente influenzata dalla presenza di uno specifico polisaccaride. Molti polisaccaridi, come il chitosano, l'alginato e l'acido ialuronico, sono eccellenti materiali bioadesivi, e per questo possono essere impiegati nel campo dell'ingegneria tissutale e nella veicolazione di farmaci a livello mucosale [P. Matricardi et al., 2013].

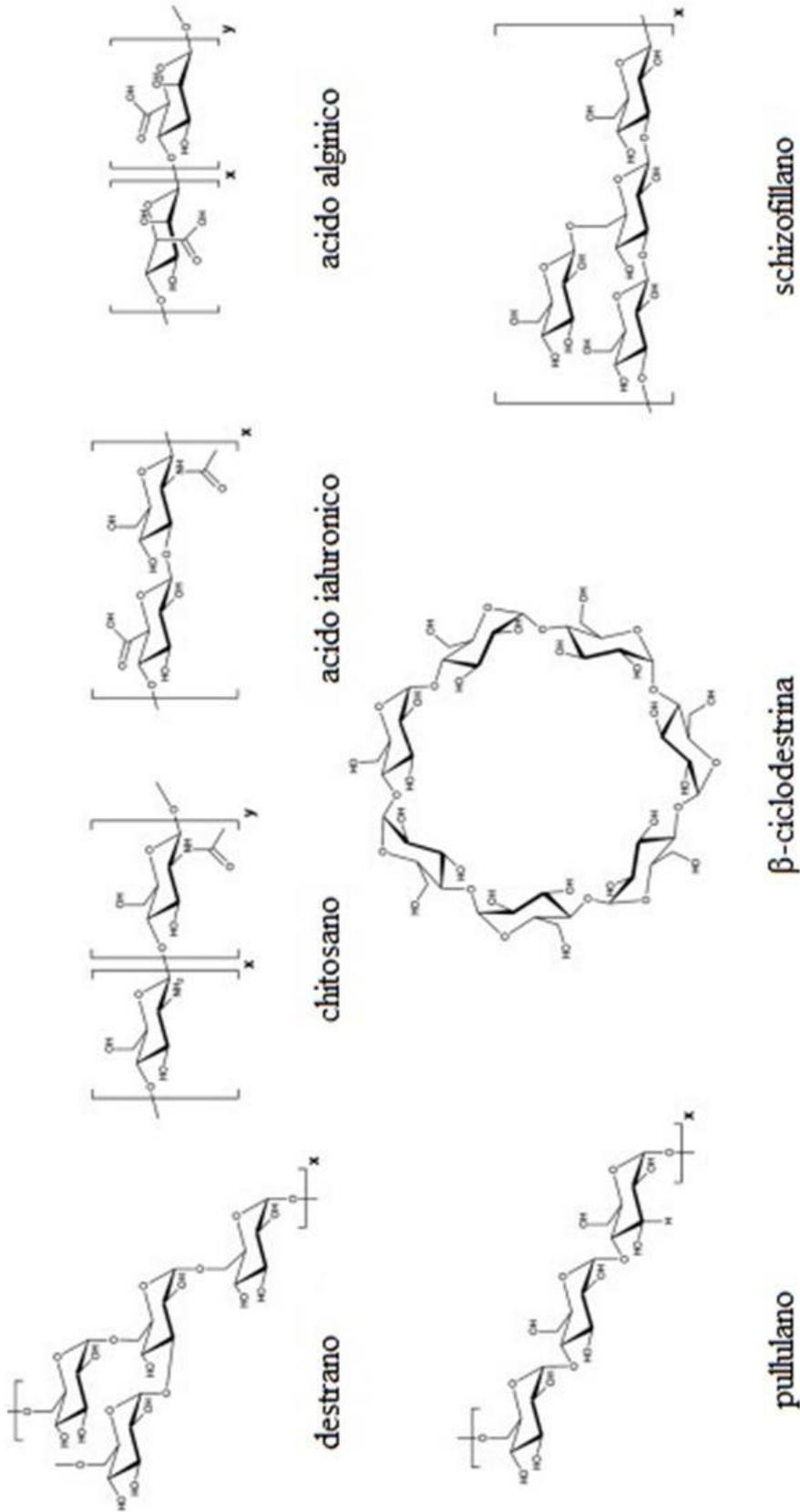


Figura 9. Struttura di alcuni tra i più comuni polisaccaridi.

In altri casi la presenza di un denso strato polisaccaridico altamente idrofilico sulla superficie di un nanosistema può agire incrementandone il tempo di circolazione nel flusso sanguigno, riducendo l'opsonizzazione e il riconoscimento da parte del sistema macrofagico dell'organismo [C. Lemarchand et al., 2004]. Inoltre, la capacità di alcune porzioni polisaccaridi che di interagire specificatamente con recettori presenti sulla superficie cellulare, consente l'utilizzo di polisaccaridi (ad es. l'acido ialuronico) o oligosaccaridi (ad es. porzioni galattosidiche) come agenti direzionanti per la veicolazione selettiva di farmaci o acidi nucleici verso specifici tessuti [H.L. Zhang et al., 2010; J. Lesley et al., 2000]. Un altro vantaggio, legato alla struttura dei polisaccaridi, risiede nella facilità di modificazione chimica, grazie alla presenza di vari gruppi funzionali (idrossili, ammine, acidi carbossilici) presenti nelle unità glicosidiche dei polisaccaridi.

1.3. I biopolimeri nella veicolazione di farmaci a base di acidi nucleici.

La terapia genica utilizza gli acidi nucleici come farmaci per curare difetti genetici e una grande varietà di malattie ad essi associate [C. Sholz et al., 2012].

La terapia genica riguardò inizialmente l'utilizzo di molecole di DNA di grandi dimensioni, come i plasmidi (pDNA), codificanti per geni che non vengono espressi correttamente dalle cellule bersaglio della terapia [C. Sholz et al., 2012].

La recente scoperta che oltre che attraverso il trasferimento di interi geni, anche porzioni oligonucleotidiche possono agire come farmaci, con un effetto biologico che può influenzare la biochimica cellulare, ha portato a una nuova dimensione nel campo della terapia genica e cioè quella dei farmaci a base di acidi nucleici o Nucleic Acid Based Drugs (NABD). Questa nuova classe di bio-macromolecole, che include siRNA, decoyODN, oligonucleotidi antisenso, etc, basa la sua attività sulla capacità di riconoscere in maniera sequenza-specifica un bersaglio che a seconda del tipo di NABD può essere un acido nucleico (per esempio un mRNA) o essere di natura proteica (per esempio un fattore di trascrizione). Attraverso il legame che si forma, il NABD induce la distruzione o la inibizione del bersaglio. In linea di principio potrebbe essere

possibile sottoregolare specificamente, indirettamente o direttamente, la funzione di proteine che hanno effetti deleteri per le cellule [Grassi M. et al., 2010].

Sebbene siano stati fatti molti passi avanti nell'identificazione di strutture bersaglio per la cura di patologie su base genetica e la produzione di acidi nucleici su larga scala sia diventata attuabile, il progresso nella veicolazione di tali sostanze è principalmente ostacolato dalla mancanza di un sicuro ed efficiente sistema di veicolazione [H. Akita et al., 2011].

Infatti, tali acidi nucleici non possono essere somministrati come tali a causa in prima istanza di una breve emivita plasmatica causata dalla degradazione da parte di nucleasi sieriche. In secondo luogo, essendo macromolecole di elevate dimensioni e peso molecolare, nonché cariche negativamente, non sono in grado di attraversare la membrana delle cellule, normalmente caricata negativamente per la presenza di glicoproteine, proteoglicani e glicerofosfati.

Dal punto di vista del delivery, i NABD hanno dei vantaggi rispetto al DNA plasmidico utilizzato nella gene therapy convenzionale. Infatti, affinché la gene therapy sia efficace è necessario che il DNA raggiunga il nucleo, invece il target dei NABD si trova all'interno del compartimento citoplasmatico e questo è sicuramente un vantaggio in quanto, come è noto, l'ingresso all'interno del nucleo è un processo estremamente inefficiente. Inoltre, per la loro grandezza, i pDNA sono in grado di indurre una risposta immunitaria da parte delle cellule, cosa che invece non succede per i NABD come i siRNA che sono invece costituiti da 21-23 pb [K.-W. Lam J. Et al., 2012].

I vettori per il delivery di acidi nucleici sono essenzialmente riconducibili a due categorie: *vettori virali* e *vettori non virali*.

I *vettori virali* [S. Huang et al., 2013], prevalentemente utilizzati per la veicolazione di pDNA o di precursori per l'induzione dell'RNA interference (shRNA), comprendono retrovirus, adenovirus e virus adenoassociati e sono caratterizzati da una elevata efficienza di penetrazione e nell'introduzione del loro materiale nucleico all'interno delle cellule ospiti. Nonostante ciò questi sistemi biologici presentano molti rischi per la salute dati dall'alta immunogenicità, soprattutto in seguito a ripetute somministrazioni. Altri inconvenienti associati all'utilizzo dei vettori virali sono la loro potenziale

oncogenicità dovuta a mutagenesi inserzionale e la limitata quantità di acidi nucleici che può essere trasportata [S. Huang et al., 2013].

I *vettori non virali*, specialmente quelli di tipo polimerico, hanno il merito di possedere bassa immunogenicità, bassi costi di produzione e una maggiore riproducibilità. I vettori polimerici possono veicolare anche grandi quantità di acidi nucleici e possono inoltre essere derivatizzati chimicamente per costruire sistemi specificamente orientati verso particolari tessuti bersaglio [S. David et al., 2010].

Alla luce di queste considerazioni, è chiaro come un sistema idoneo alla veicolazione di NABDs di tipo polimerico debba avere caratteristiche appropriate, sia intrinseche di natura chimico-fisiche che estrinseche di interazione con l'organismo soggetto a terapia genica. In particolare è necessario che il delivery system abbia: (1) stabilità plasmatica, per garantire un tempo di emivita sufficiente a raggiungere il tessuto bersaglio; (2) capacità di proteggere gli acidi nucleici dalla degradazione durante il trasporto nel torrente circolatorio; (2) opportune dimensioni, per consentire l'attraversamento delle barriere cellulari; (3) capacità di trattenere gli acidi nucleici fino al sito d'azione, sia esso il nucleo (nel caso di DNA plasmidico) o il citoplasma (nel caso degli oligonucleotidi quali siRNA), evitando la sua degradazione all'interno di vescicole lisosomiali; (4) biocompatibilità ed (5) assenza di immunogenicità.

I polimeri utilizzati nella veicolazione di materiale genetico hanno generalmente carattere policationico. Tale caratteristica gli consente di interagire con le numerose cariche negative degli acidi nucleici, conferite dalla presenza dei gruppi fosfato, formando così dei complessi, grazie ad interazioni reversibili di tipo elettrostatico, chiamati *poliplessi*. La **Figura 10** rappresenta la formazione dei poliplessi.

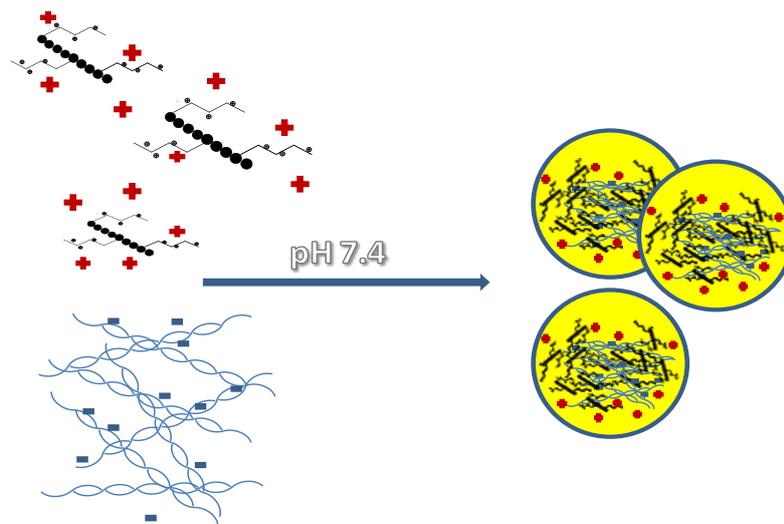


Figura 10. Formazione dei poliplessi: i vettori polimerici utilizzati nel gene delivery hanno spesso carattere policationico. Tale caratteristica consente l'interazione con le numerose cariche negative degli acidi nucleici.

1.3.1. Farmacocinetica.

Nella formazione dei poliplessi, al variare della quantità di policatione usato e quindi del rapporto tra cariche positive dello stesso e cariche negative dei fosfati, è possibile modulare la carica superficiale e quindi il potenziale zeta dei poliplessi stessi; si va pertanto da valori negativi, quando piccole quantità di policatione sono usate e le cariche del NABD non sono ancora state neutralizzate, a valori positivi quando è utilizzato un eccesso di policatione, ovvero il rapporto tra cariche positive e cariche negative è > 1 . Poliplessi stabili, ovvero aventi un potenziale zeta sufficientemente alto da impedirne l'aggregazione, sono ottenuti utilizzando una quantità di policatione tale da avere un potenziale zeta lievemente positivo. I poliplessi così ottenuti, somministrati per via sistemica, possono presentare numerosi problemi di tipo farmacocinetico.

Il principale problema associato a questo tipo di vettori è la loro carica cationica superficiale, che porta a numerose interazioni aspecifiche con le componenti cellulari del sangue, dell'endotelio dei vasi e con le proteine plasmatiche; per i complessi con

un'elevata carica positiva di superficie queste interazioni riducono notevolmente il tempo di emivita plasmatica [S. David et al., 2010].

La formazione di aggregati nel sangue tra poliplessi e componenti plasmatiche, siano esse cellule circolanti o proteine, influenza la biodistribuzione. In particolare, subito dopo l'iniezione l'80-90 % della dose si trova accumulata nel polmone, poi, a causa della scarsa stabilità degli aggregati, i complessi vengono nuovamente rilasciati in circolo, dando luogo a una ridistribuzione secondaria che porta a un'alta concentrazione dei complessi nelle cellule di Kupffer del fegato. Significative quantità di complesso sono inoltre accumulate dai tessuti di altri organi, quali per esempio la milza o il midollo osseo, ed organi che si trovano vicino al sito di iniezione [H. Akita et al., 2011]. Ciò riduce il tempo di emivita e rende inattuabile il direccionamento verso specifici tessuti, risultando quindi in una limitata possibilità di applicazione terapeutica.

Una soluzione che consente di aumentare il tempo di permanenza dei complessi in circolo è quella di schermare la carica superficiale creando ad esempio una barriera sterica e altamente idrofila. Questo è attuabile legando in maniera covalente ai poliplessi un polimero idrofilico, quale ad es. (poli)etilene glicole (PEG), (poli)idrossilpropil metacrilamide (pHPMA) o (poli)vinil pirrolidone (PVP) [M. Ogris et al., 2002], o rivestendo i poliplessi con catene polisaccaridiche, per esempio utilizzando acido ialuronico, o altri biopolimeri carichi negativamente e estremamente idrofili, formando complessi ternari. Tali strategie possono impedire l'aggregazione dei sistemi e l'interazione, per esempio, con albumina, fattori del complemento, eritrociti [M. Lee et al., 2005; H. Petersen et al., 2002].

1.3.2. Direccionamento passivo e attivo.

Una volta che il nanosistema si trova nel torrente circolatorio, esso deve raggiungere le cellule o i tessuti in cui l'azione terapeutica è necessaria. Quando tali cellule o tessuti sono cellule del sistema monocito-macrofagico o tessuti tumorali i nanosistemi possono accumularsi per riconoscimento da parte del sistema macrofagico stesso oppure, per quanto riguarda i tumori, essi possono accumularsi passivamente mediante un fenomeno noto come "*Enhanced Permeability and Retention effect*" (EPR). Tale accumulo si basa

sulle peculiari caratteristiche della vascolatura in prossimità del sito tumorale, che differisce sostanzialmente da quella nei tessuti normali. Tali caratteristiche sono: (1) elevata densità di vasi, dovuta all'aumentata angiogenesi; (2) permeabilità aumentata, sia a causa della elevata concentrazione di mediatori vascolari, sia a causa di difetti nell'architettura vascolare. A questi fattori che aumentano drasticamente la permeabilità del tessuto tumorale si aggiunge una diminuzione della clearance linfatica di tali tessuti, che promuove la ritenzione di biomolecole, metaboliti, ma anche dei nano sistemi, a livello interstiziale [H. Maeda, 2012]. Un effetto di tale tipo, si osserva per nano sistemi sufficientemente grandi e già a partire da macromolecole maggiori di 40 kDa [S.S. Hsieh et al., 2000], in quanto piccole molecole ritornano facilmente al circolo sistemico per retrodiffusione, senza che si abbia un reale accumulo. Tra i tessuti che mostrano una permeabilità alterata vi sono inoltre i tessuti infiammati e/o in cui è in corso una infezione e organi quali la milza e i linfonodi.

Oltre a sfruttare il direccionamento passivo, per favorire l'accumulo dei nanosistemi in siti specifici, può essere adottata una strategia di tipo attivo, coniugando al sistema diversi tipi di ligandi (molecole glicosilate, peptidi, proteine o anticorpi, piccole molecole) che riconoscono macromolecole specifiche (solitamente di natura proteica, quali recettori di membrana) presenti esclusivamente nel tessuto bersaglio o sovraespressi in essi. Ad esempio, i recettori per le asialoglicoproteine (ASGPR), recettori tessuto-specifici in quanto presenti sulla membrana degli epatociti, riconoscono ligandi quali mannosio e galattosio; anche i recettori per il mannosio sono tessuto-specifici, per macrofagi e cellule dendritiche. I recettori per la transferrina o per il folato non sono tessuto-specifici ma vengono sovraespressi da molte cellule tumorali, così come le integrine, recettori eterodimerici che mediano l'adesione cellulare e risultano sovraespressi dalle cellule endoteliali della vascolatura tumorale. Queste ultime riconoscono peptidi contenenti il motivo arginina-glicina-acido aspartico (RGD) e la coniugazione di tali peptidi ai nanosistemi è un approccio di targeting ampiamente sfruttato [S. David et al., 2010].

Anche anticorpi e frammenti anticorpali possono essere impiegati come ligandi per il targeting attivo [E. Song et al., 2005; D. Peer et al 2007]. Mentre gli anticorpi risultano molto costosi, hanno un peso molecolare elevato, possono risultare altamente instabili

alla manipolazione chimica e possono essere prodotti solamente utilizzando cellule di mammifero, i frammenti anticorpali (Fab, Fv, scFv) risultano più vantaggiosi, in quanto possono essere prodotti utilizzando colture batteriche o attraverso proteolisi a partire da anticorpi, e possiedono inoltre una specificità maggiore in quanto, rispetto agli anticorpi, è minore la loro capacità di interazione con cellule “non-Target”. Essi risultano anche più stabili ed hanno un peso molecolare molto inferiore (da circa 150 KDa di un anticorpo a circa 6-15 KDa per un frammento anticorpale).

Tali ligandi per il direccionamento attivo sono spesso legati covalentemente all'estremità delle catene di PEG in sistemi a lunga circolazione, in quanto questo aumenta la probabilità di riconoscimento del target, riducendo la quantità di ligando necessario [M. Wang et al., 2010].

1.3.3. La transfezione.

La più importante barriera fisica che deve essere superata dai nanosistemi per la veicolazione intracellulare degli acidi nucleici è la membrana plasmatica, che rappresenta uno degli ostacoli che il sistema deve oltrepassare per ottenersi un'adeguato livello di “*transfezione*”, ovvero il processo di internalizzazione del materiale biologico esogeno che andrà a svolgere la sua funzione terapeutica raggiungendo efficacemente e in concentrazione sufficiente il sito d'azione intracellulare. In **Figura 11** sono schematizzati i momenti principali della transfezione.

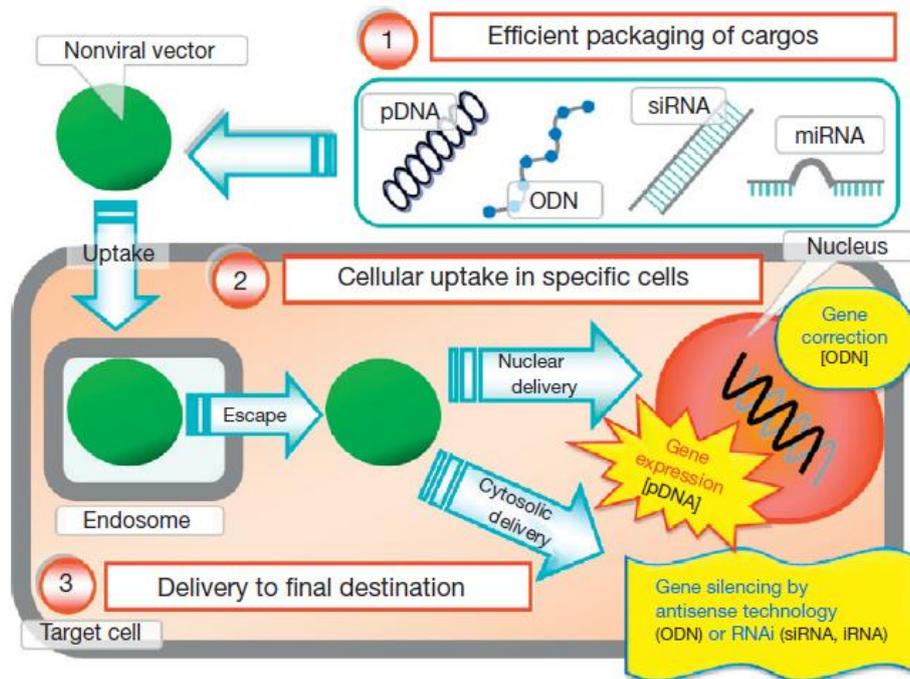


Figura 11. Rappresentazione schematica dei momenti principali della transfezione [H. Akita et al., 2011].

L'endocitosi rappresenta il percorso di ingresso naturale per le macromolecole nella cellula [G.J. Doherty et al., 2009]. La membrana plasmatica forma delle invaginazioni o delle sporgenze, che possono circondare e racchiudere tali sostanze. In seguito, il carico si trova all'interno del lume delle vescicole appena formate, generalmente chiamate *endosomi*.

Le cellule dei mammiferi mostrano diverse tipologie di percorsi endocitotici, localizzati in regioni differenti della membrana plasmatica e ciascuno caratterizzato da un apparato endocitotico distinto, che regola il trafficking intracellulare delle sostanze in entrata. Molti agenti infettivi biologici, come tossine o virus, si sono adattati per penetrare all'interno delle cellule tramite uno o più di questi meccanismi endocitotici che portano alla loro localizzazione in distretti sub-cellulari in cui possono esercitare la loro attività patogena o tossica [J. Mercer et al., 2010; K. Sandvig et al., 2004].

Le vie endocitotiche possono essere distinte in fagocitosi e pinocitosi (**Figura 12**). La pinocitosi può a sua volta essere distinta in macropinocitosi, endocitosi clatrina dipendente (ECD) e endocitosi clatrina indipendente (ECI).

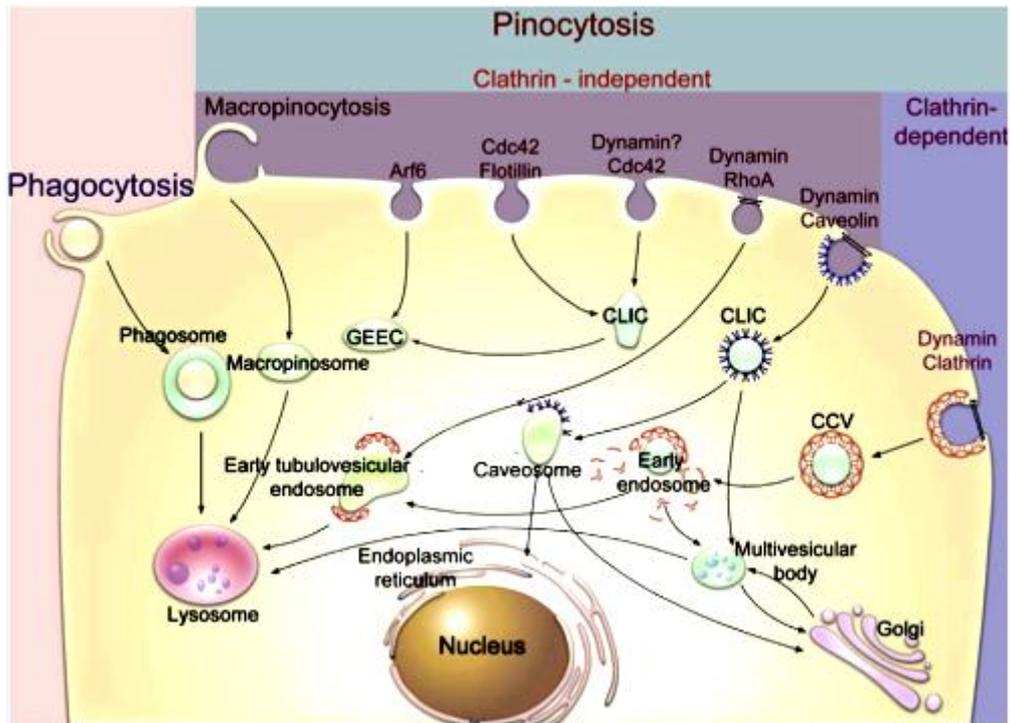


Figura 12. Rappresentazione dei processi endocitotici. Abbreviazioni: CCV, clathrin coated vesicles; CLIC, clathrin-independent carriers; GEEC, GPI-anchored protein-enriched compartment; GPI, glycosylphosphatidylinositol; MVB, multivesicular body [G. Sahay et al., 2010]

La fagocitosi è definita come l'inglobamento da parte delle cellule, di microorganismi e particelle solide di grandi dimensioni. Tale processo è tipico di cellule specializzate, fagocitiche, come macrofagi, monociti, neutrofili e cellule dendritiche [J.A. Swanson et al., 2008]. La fagocitosi costituisce un meccanismo naturale di difesa contro sostanze esogene in un ampio range dimensionale (da 25 nm a molti micron di diametro). La fagocitosi da parte dei macrofagi avviene tipicamente a seguito di un processo di opsonizzazione delle particelle da parte di anticorpi IgG o di proteine del complemento

nel circolo sanguigno. Le particelle vengono riconosciute da recettori presenti sulla superficie delle cellule fagocitiche, capaci di legare i fattori del complemento, ma anche lectine, lipoproteine cariche negativamente e residui di mannosio/fruttosio, qualora tali sostanze si trovino adsorbite sulla superficie del sistema di veicolazione [A. Aderem et al., 1999]. Il fagosoma che si forma, si fonde, dopo 30-60 minuti dall'inizio del processo di fagocitosi, con gli endosomi e lisosomi all'interno della cellula. Il fagolisosoma risultante contiene perossidasi, prodotti di riduzione dell'azoto, esterasi e catepsina, sostanze in grado di degradare il carico fagocitato [J.P. Luzio et al., 2007]. Anche altri citotipi, quali fibroblasti, cellule endoteliali e cellule epiteliali possono, in certi casi, mostrare attività fagocitica, nel caso per esempio in cui essi si trovino a contatto con patogeni quali *Yersinia*, *Shigella*, *Salmonella* o *Listeria*. In questo caso la fagocitosi di tali patogeni è mediata dai recettori per la fibronectina e per la laminina oppure dall'eparan solfato esposto sulla membrana cellulare [M. Rabinovitch et al., 1995].

La macropinocitosi (MP) è definita come un processo transiente di internalizzazione in bulk che è tipicamente caratterizzato dalla formazione di “membrane ruffles” e dall'intrappolamento di grandi volumi di fluido extracellulare all'interno di vescicole che possono arrivare a 10 µm di diametro, note come macropinosomi. Contrariamente alla fagocitosi, la macropinocitosi può anche essere attiva spontaneamente, in assenza di particelle o sostanze esogene. I macropinosomi possono, infatti, formarsi spontaneamente o in risposta a fattori di crescita o “cell penetrating peptides” [A.T. Jones, et al., 2007]. La loro formazione può anche essere stimolata dalla presenza di patogeni (ad es. *Shigella*, *Salmonella*), corpi apoptotici, cellule necrotiche e virus (ad es. adenovirus, HIV di tipo I) [J. Mercer et al., 2009]. Alcuni tipi di cellule, come i macrofagi e le cellule dendritiche immature, mostrano una macropinocitosi costitutiva non selettiva attraverso la quale sono in grado di setacciare costantemente il loro intorno e difenderlo dalla presenza di patogeni e sostanze estranee. Il meccanismo molecolare della macropinocitosi risulta ad oggi ancora poco chiaro essendo stati identificate solamente poche molecole in grado di regolare il processo, rispetto a quelle coinvolte, ad esempio, nella fagocitosi. Comunque, in un recente studio sono state identificate alcune proteine che sembrerebbero essere coinvolte in tale processo, come ad esempio la proteina brefeldina A-ADP ribosilata (BARS), che sembrerebbe svolgere un ruolo

essenziale nella chiusura del macropinosoma in formazione [S. Dharmawardhane et al., 2000].

L'endocitosi clathrina dipendente (ECD), è caratterizzata dalla formazione di cavità rivestite da clatrina [F.R. Maxfield et al., 2004] tipicamente del diametro medio di 120 nm che si formano grazie all'azione della dinamina, una piccola GTPasi che polimerizza attorno al collo della porzione di membrana invaginata e si contrae in maniera energia dipendente. A seguito della formazione della vescicola rivestita di clatrina, l'involucro viene rapidamente depolimerizzato in modo da permettere la fusione dell'endosoma con altre vescicole.

L'endocitosi clatrina indipendente (ECI) è responsabile di più del 70% dell'uptake complessivo di molte cellule [M.T. Howes et al., 2010]. L'ECI include diversi meccanismi endocitotici, tutti dipendenti dalla presenza sulle membrane cellulari di domini idrofobici ricchi di colesterolo e glicosfingolipidi, noti come zattere lipidiche o "lipid rafts" [S. Mayor et al., 2007]. Si pensa che tali lipid rafts fungano da microdomini di membrana dinamici a cui sono associati recettori specifici per l'endocitosi e recettori cellulari di trasduzione del segnale. A questa classe di meccanismi endocitotici appartiene l'endocitosi mediate dalle caveolae (CavME) [L. Pelkmans et al., 2002], l'endocitosi mediata dalla flotillina (FlotME) [O.O. Glebov et al., 2006], e l'endocitosi Arf6- dipendente [H. Radhakrishna et al., 1997], meccanismi ancora non del tutto chiariti e in fase di studio.

Si pensa che la CavME abbia origine da lipid rafts di 80-100 nm, note come caveolae, arricchite da caveoline, una famiglia di proteine che legano il colesterolo, e stabilizzate dalla cavina. La presenza delle caveolae sulla membrana è dipendente dal tipo di cellula; infatti le caveolae sono abbondanti nelle cellule endoteliali (ricoprendo il 20% della loro superficie), nelle cellule epiteliali, nei fibroblasti e negli adipociti, ma sono assenti in leucociti e cellule neuronali. Oltre ad essere dipendente dal colesterolo, la CavME, è un meccanismo dinamina-dipendente, e mediato da recettori [I.S. Zuhorn et al., 2002]. Alcuni recettori localizzati sulle caveolae, come recettori per l'insulina e per fattori di crescita possono mediare la CavME. Le vescicole che si formano dall'invaginazione delle caveole, degli endosomi contenenti caveolina-1, prendono il nome di caveosomi [I.S. Zuhorn et al., 2002]. Il destino intracellulare dei caveosomi

differisce da quello degli endosomi formati nel processo mediato dalle clatrine. Rispetto alla EMC, la CvME è generalmente considerata una via di internalizzazione non-acidica e non digestiva, il che significa che essa non prevede il processo di acidificazione a seguito della fusione con i lisosomi, e la maggior parte delle sostanze endocitate vengono direttamente trasportate al Golgi o in prossimità del reticolo endoplasmatico, evitando così la normale degradazione lisosomiale [K. de Bruin et al., 2007]. Nonostante questo avvenga nella maggior parte dei casi, nel 2009, Kiss et al. riportarono degli studi nei quali si supporta l'ipotesi che in certi casi i caveosomi possono intraprendere il classico percorso, fondendosi con i lisosomi. Tale aspetto risulta comunque ancora dibattuto [G. Sahay et al., 2010].

La FlotME è stata descritta per la prima volta come percorso endocitico indipendente nel 2006, quando fu dimostrato che si trattava di un processo indispensabile per l'internalizzazione di varie proteine e glicoproteine [O.O. Glebov et al., 2006]. Le flotilline sono proteine di membrana ubiquitarie coinvolte in vari processi tra cui il signalling dell'insulina e dell'EGFR, l'attivazione delle cellule T, la fagocitosi, e processi actina-mediati come la motilità cellulare [C. Neumann-Giesen et al., 2004]. La FlotME può avvenire sia in maniera dinamica dipendente che in maniera dinamica indipendente e procede attraverso l'assemblamento della flotillina-1 e della flotillina-2 a formare etero-oligomeri.

Tra le ECI sono inoltre classificate la *endocitosi RhoA-dipendente*, coinvolta nell'internalizzazione dei recettori che riconoscono l'interleuchina-2, e l'*endocitosi Arf6- dipendente*, specializzata nell'uptake della maggior parte delle proteine del complesso di istocompatibilità di classe I e delle integrine [C. Lamaze et al., 2001].

Anche l'internalizzazione cellulare di nanosistemi non virali può avvenire attraverso diversi percorsi endocitotici. Pertanto, è importante comprendere il coinvolgimento dei meccanismi endocitotici per un dato nano sistema, per verificare se l'ingresso e il percorso intracellulare di tali biomateriali sono analogamente differenziati come quelli dei materiali biologici e, se attraverso opportune modifiche delle caratteristiche chimico-fisiche del sistema, è possibile orientare il trafficking verso una specifica destinazione intracellulare.

TABELLA 1: Sistemi per la veicolazione di acidi nucleic per cui è riportato il meccanismo di endocitosi

Sistema di veicolazione	Endocitosi	Linea cellulare	Bibliografia
PLGA	ECI, CavME	Cellule di epitelio congiuntivale	[M.G. Qaddoumi, 2003]
PLA	ECD, MP	HeLa	[O. Harush, 2007]
Alginato/ chitosano	ECD CavME	293T, COS7, CHO	[S.K. Lai, 2007]
DOTAP	ECD	HeLa, A549	[J. Rejman, 2005]
Lipofectamina	ECD	CHO	[A.W. Wong, 2007]
SAINT2/DOPE	ECD	COS-7	[I.S. Zuhorn, 2002]
DMRIE-C	CavME	CHO	[A.W. Wong, 2007]
His-pLL	ECD, MP	HepG2	[C. Concavales, 2004]
R8-EPC/Chol	MP	NIH3T3	[I.A. Khalil, 2006]
R10-PEG	MP	HeLa, CHO	[I. Nakase, 2007]
Amphiphile I	ECD	KB e PC-3 tumour cells CHO	[T. Izumisawa, 2011;
	ECD, MP		X.X. Zhang, 2011]
PLL-PEG	MP	COS-7	[M. Walsh, 2006]
bPEI	ECD, ECI	HeLa	[J. Rejman, 2005; K.
	CavME	HeLa	Von Gersdorff, 2006]
IPEI	ECD, RME	HUH-7	[K. Von Gersdorff,
	ECD, CavME	COS-7	2006; M. van der Aa]
pDMAEMA	ECD, CavME	COS-7	[M. van der Aa]
SS-pAA	FlotME, fagocitosi	ARPE-19	[D. Vercauteren, 2011]
G3L2 PAMAM	ECD, CavME, MP	HT-29	[A. Saovapakhiran, 2009]
G3 PAMAM	CavME, MP	HT-29	[A. Saovapakhiran, 2009]
Chitosano	ECD	293T, COS-7	[S.K. Lai, 2007]

	CavME	CHO	
Pullalan/spermi ne	ECD, ECI	T24	[I. Kantani, 2006]
PEG-g-PLL	CIE, MP	COS-7	[Y. Luhmann, 2008]

I metodi attualmente più utilizzati per determinare la via endocitotica e il destino intracellulare di un nanosistema consistono in: (1) colocalizzazione dei nanosistemi con specifici markers o (2) esclusione di meccanismi endocitotici attraverso l'utilizzo di inibitori specifici o linee cellulari mutate [D. Vercauteren, 2012]

Nel caso degli studi di colocalizzazione possono essere utilizzati diversi markers. Ad esempio, negli esperimenti chiamati di “pulse-chaise”, proteine come la transferrina o la tossina B del colera, il cui meccanismo di ingresso all'interno delle cellule è noto, vengono incubate con le cellule, simultaneamente o prima del nanosistema (“pulse”) e la loro inclusione o esclusione dallo stesso tipo di vescicola viene monitorata a diversi tempi (“chase”). Il monitoraggio avviene grazie alla coniugazione di sonde fluorescenti al nanosistema e al marker proteico che permette l'analisi della distribuzione dei colori in fluorescenza o del trasferimento dell'energia per risonanza della fluorescenza. Il trasferimento di energia per risonanza (FRET, dall'inglese Fluorescence Resonance Energy Transfer o Förster Resonance Energy Transfer) è un fenomeno di trasferimento energetico tra fluorofori. Si sfrutta per la determinazione delle strutture molecolari di molecole biologiche (come proteine, lipidi o acidi nucleici) in rapporto tra loro. La tecnica spettroscopica che utilizza questo fenomeno permette di individuare e caratterizzare con estrema precisione la distanza tra due molecole. Il meccanismo sfrutta la presenza di due molecole fluorescenti, dette donatore e accettore. Il donatore può essere eccitato ad una specifica lunghezza d'onda. Tale molecola emette energia che, a sua volta, può essere trasmessa all'accettore, in grado di conseguenza di emettere una fluorescenza visualizzabile dall'operatore. Tale processo avviene in modo ottimale solo se le due molecole sono a distanza ragionevolmente ristretta [D. Vercauteren, 2012]. Il vantaggio di questo approccio risiede nella possibilità di effettuare le misure su colture cellulari vive utilizzando un microscopio confocale. La tecnica inoltre è molto precisa e i risultati nella maggior parte dei casi sono esenti da artefatti generati dalla tecnica

stessa. Lo svantaggio è che i marcatori molecolari raramente risultano altamente selettivi, e la loro affidabilità dipende dal tipo di linea cellulare utilizzata.

Un approccio alternativo all'utilizzo di tali marcatori è l'impiego di proteine che risiedono in vescicole endocitotiche o compartimenti intracellulari specifici, come la caveolina-1, l'N-acetilgalattosaminitransferasi, l'E1 alfa-piruvato deidrogenasi, l'actina, la tubulina, ecc. Possono essere utilizzati, inoltre, anticorpi monoclonali, coniugati a sonde fluorescenti, che riconoscono le proteine specifiche sopra indicate [D. Vercauteren et al., 2012].

Oltre alla microscopia confocale a fluorescenza, anche la microscopia elettronica e la microscopia a forza atomica possono essere impegnate in molti casi per studiare ad esempio l'interazione dei nanosistemi con le membrane cellulari o per visualizzare la distribuzione di nanosistemi coniugati con sonde elettrone-dense all'interno di diversi organelli [D. Vercauteren et al., 2012].

Il secondo approccio, che consiste in studi di esclusione di specifici processi cellulari, costituisce la tecnica più diffusa, e può prevedere l'utilizzo di inibitori chimici, biologici, o di linee cellulari geneticamente modificate, come ad esempio i fibroblasti caveolae-deficienti. Esempi di inibitori chimici includono la *metil-beta-ciclodestrina* e altri *agenti di deplezione del colesterolo* per processi mediati da raft lipidici e colesterolo, quali processi *clatrina-indipendenti*; *ossido di fenilarsina* per l'*endocitosi mediata dalle clatrine* e *wortmannina* per la *macropinocitosi*. Uno svantaggio relativo a questa tecnica è che in alcuni casi e a seconda della linea cellulare utilizzata tali inibitori possono influire su processi multipli, e risultare, così, poco selettivi. Inoltre, l'inibizione di una specifica via endocitotica può talvolta sovrastimolare l'uptake cellulare mediante le vie non inibite [D. Vercauteren et al., 2012].

Più recentemente, per indagare sui processi endocitotici coinvolti nell'internalizzazione dei nanosistemi è stata utilizzata la tecnica del *particle tracking*, in cui viene monitorata la mobilità dei singoli oggetti, la velocità, la posizione nel tempo e il coefficiente di diffusione apparente [D. Vercauteren et al., 2012].

Sulla base di quanto riportato in letteratura, si può concludere che carica, forma, composizione del materiale, e la chimica di superficie sono parametri critici nel

determinare l'ingresso cellulare dei nanosistemi attraverso un percorso endocitotico e che i nanosistemi possono seguire un percorso differente in citotipi differenti.

Studi recenti suggeriscono, inoltre, che i nanosistemi possono anche influenzare il signaling cellulare, interagendo con micro-domini di membrana (recettori, attivatori di segnali specifici, trasduttori).

Per tutti questi motivi un approccio multidisciplinare che spazia dalla biologia alla scienza dei materiali costituisce un utile supporto allo studio e alla conoscenza dei processi endocitotici dei nano sistemi al fine di formare input innovativi per la loro applicazione in campo biomedico.

A seguito dell'internalizzazione attraverso uno dei possibili meccanismi sopra descritti, il contenuto delle vescicole endocitotiche può essere considerato ancora fuori dalla cellula, in quanto il nanosistema contenente gli acidi nucleici veicolati non ha libero accesso al compartimento citoplasmatico o ad altri organelli quali il nucleo. Tali vescicole endocitotiche possono, inoltre, essere reciclate, dopo aver espulso il contenuto nuovamente fuori dalla cellula. Dunque, un altro step, successivo all'internalizzazione mediante endocitosi, essenziale per il successo della veicolazione è la sua fuoriuscita dal compartimento endolisosomiale.

Molto importanti a tal proposito, sono quei sistemi che possono “sfuggire” all'endosoma mediante un fenomeno chiamato “*spugna protonica*” o “*proton sponge effect*”, ipotizzato da Behr e colleghi per la prima volta [J P. Behr et al., 1997]: si basa sulla capacità tamponante di molti polimeri cationici, per lo più contenenti amine primarie e/o secondarie, che una volta dentro l'endosoma provocano un aumento dell'influsso di protoni e ioni cloruro durante la fase di acidificazione dell'endosoma stesso. Ciò si traduce in un incremento della pressione osmotica intravesicolare che causa il richiamo di acqua per diffusione passiva dall'ambiente citosolico. Il conseguente swelling della vescicola porta all'indebolimento o alla rottura dell'endosoma stesso che riversa il suo contenuto nel citoplasma. Questo è stato dimostrato per polimeri come la polietilenimina (PEI), che contiene gruppi aminici protonabili agenti da base debole in mezzo acido [O. Boussif et al., 1995].

Grazie alla sua protonabilità a pH 6, l'anello imidazolico dell'istidina (pKa 6) si è dimostrato un utile promotore del proton sponge effect qualora venisse inserito nella struttura di un copolimero. Ne sono esempi: la polilisina istidilata (HPK) [M.B. Roufaï et al., 2001] e il chitosano imidazol-modificato [T.H. Kim et al., 2003].

Un'ulteriore meccanismo di fuga endosomiale è la formazione di pori di membrana indotta da alcuni peptidi. Tali peptidi possono derivare da virus, come quello derivato dalla sequenza N-terminale della sub unità HA-2 dell'emagglutinina del virus dell'influenza, o essere sintetizzati, come il peptide GALA (WEAALAEALAEALAEHLAEALAEALEALAA) o il KALA (WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKA) [Z. M. Qian et al., 2002; S. Simoes et al., 1999]. I peptidi porogeni cambiano la loro conformazione durante la variazione di pH da quello citosolico a quello endosomiale, interagendo con e perturbando la membrana endosomiale.

Un'ulteriore approccio per promuovere la fuga endosomiale di nanosistemi polimerici per la veicolazione di acidi nucleici è l'utilizzo di agenti lisosomotropici, come ad esempio la cloroquina. L'utilizzo di tali sostanze è però accompagnato da effetti citotossici, il che limita il loro utilizzo a indagini in vitro ma ne esclude la possibilità d'impiego per applicazioni terapeutiche [K. Ciftci et al., 2001].

Sistemi polimerici per la veicolazione di acidi nucleici richiedono dunque uno spettro di proprietà tali da renderli adatti a questa specifica applicazione, dovendo considerare la necessità di disporre nello stesso sistema biopolimerico di specie monomeriche differenti ciascuna delle quali apporti al vettore risultante una caratteristica specifica: porzioni oligomeriche che contengono gruppi carichi positivamente o protonabili; porzioni idrofili che in grado di conferire al sistema proprietà stealth, e quindi la capacità di rimanere in circolo per un tempo opportunamente lungo; porzioni direzionanti in grado di promuovere l'accumulo del sistema verso specifici tessuti/cellule target; porzioni in grado di promuovere uno specifico percorso endocitotico e/o la fuoriuscita dalle vescicole endofitiche. Va inoltre tenuta in considerazione l'influenza della struttura dei polimeri (architettura e topologia) sulla loro abilità a condensare gli acidi nucleici e sulle proprietà chimico fisiche del vettore risultante.

1.4. Sistemi polimerici per la veicolazione polmonare di antibiotici.

Ottenere sistemi di rilascio a base di biopolimeri, biocompatibili, con proprietà chimico-fisiche idonee alla somministrazione topica al polmone, offre molti vantaggi e costituisce un campo di ricerca fortemente attuale.

La somministrazione di antibiotici per via inalatoria è di recente interesse. Confrontata alla via orale o parenterale, essa permette il raggiungimento di una maggiore concentrazione polmonare di farmaco. Questa via non invasiva elude il metabolismo di primo passaggio epatico e la tossicità sistemica. Il beneficio terapeutico di alcuni farmaci somministrati per via inalatoria attualmente in commercio è spesso di breve durata. Quindi c'è una crescente necessità di prolungare la durata dell'azione terapeutica di farmaci già noti e ottenere un'idonea formulazione per nuovi farmaci. Una formulazione inalatoria ideale dovrebbe garantire un effetto prolungato riducendo la frequenza di somministrazione e aumentando di conseguenza l'accettabilità della terapia da parte del paziente.

Il tema è pertanto di particolare interesse nella ricerca di un sistema terapeutico per malattie infiammatorie croniche, quali la Bronco Pneumopatia Cronica Ostruttiva (BPCO), e genetiche, quali la Fibrosi Cistica (FC), in cui le manifestazioni polmonari risultano particolarmente gravi e in una larga percentuale dei casi evolvono nel decesso della persona affetta da tali patologie.

La Fibrosi Cistica (FC) è una patologia autosomica recessiva e rappresenta la malattia genetica più comune tra la popolazione caucasica. Si tratta di una patologia multisistemica che coinvolge in modo esteso il processo secretorio degli epitelii di molti organi. La causa principale della malattia è stata riscontrata nella mutazione a carico di un gene, localizzato nel braccio lungo del cromosoma 7, che codifica per una proteina trans-membrana, il regolatore della conduttanza transmembrana della fibrosi cistica (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator CFTR), che ha come funzione principale, ma non unica, il trasporto ionico attivo, essendo un canale transepiteliale per il cloro. Il difetto a livello genetico si ripercuote in una anomala regolazione del trasporto epiteliale dello ione cloruro, che risulta in un problematico aumento della viscoelasticità delle secrezioni mucose, dovuto alla mancata o ridotta secrezione dello

ione sul versante apicale della cellula: per il mantenimento dell'equilibrio omeostatico ne consegue un deficit di secrezione di sodio e bicarbonato che si traduce nella disidratazione e nell'ispessimento dei secreti [M.N. Sheppard et al., 2002].

In **Figura 13** è riportata una schematizzazione dell'effetto della mutazione sulla funzionalità del CFTR.

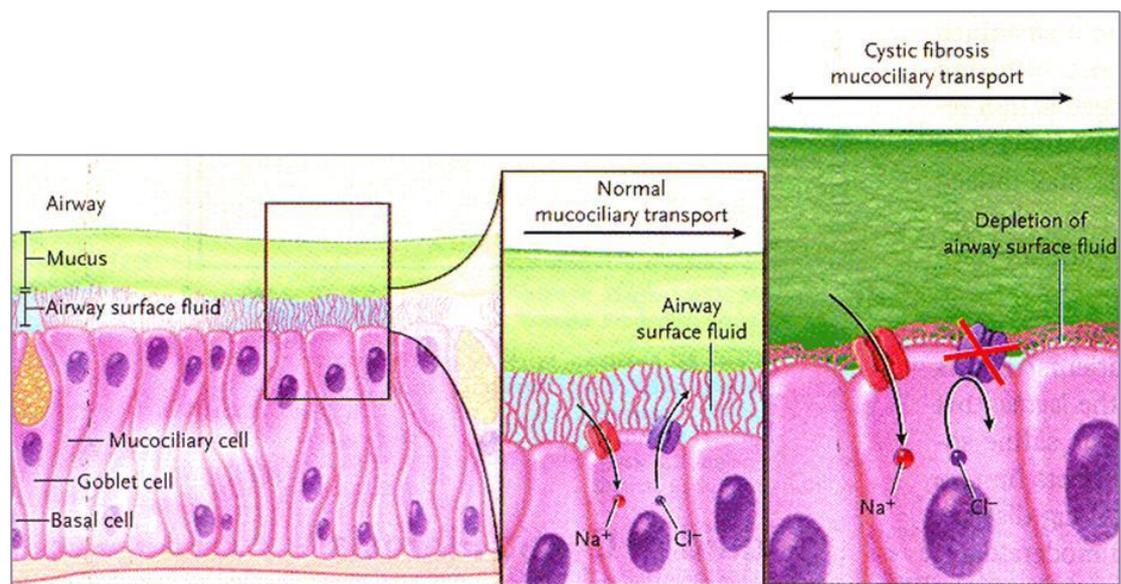


Figura 13. Rappresentazione schematica della proteina transmembranaria CFTR normale e in FC.

Nonostante la patologia colpisca molteplici organi, la maggior parte dei pazienti muore per malattia polmonare. L'accumulo di muco viscoso nelle vie aeree favorisce lo sviluppo di infezioni batteriche, provocate in particolare dal batterio *Pseudomonas aeruginosa* (P.aer), e una risposta infiammatoria eccessiva, mediata da neutrofili ed esacerbata dall'infezione, che peggiora il danno al tessuto. Le vie aeree vengono quindi cronicamente colonizzate da batteri che non possono essere eradicati e che provocano bronchiti, bronchiectasie e infine fibrosi polmonare con insufficienza respiratoria.

La sopravvivenza di pazienti con FC è aumentata gradualmente negli anni, grazie alla terapia antibiotica e ad una correzione della disfunzione pancreatica e dei disturbi a carico degli altri organi colpiti.

La terapia antibiotica contro le infezioni da P.aer rappresenta la base del trattamento delle alterazioni a carico del polmone nei pazienti affetti da FC [S. Kumar et al., 2014].

Uno dei principali motivi per cui, fino ad oggi, nessuna strategia antibiotica ha avuto successo nell'eradicazione dell'infezione cronica delle vie aeree causata da P. aer, risiede sostanzialmente nella capacità di tali batteri di formare biofilm. Un biofilm è definito come un aggregato di cellule microbiche adese a una superficie e circondate da una matrice polimerica extracellulare, costituita prevalentemente da alginati, che esse stesse producono [Moreau-Marquis et al., 2008]. La crescita in biofilm gioca un ruolo essenziale nella capacità del batterio di resistere all'eradicazione da parte della risposta immune dell'ospite o della terapia antibiotica. La **Figura 14** mostra i meccanismi predominanti che governano la resistenza del biofilm alla terapia antibiotica.

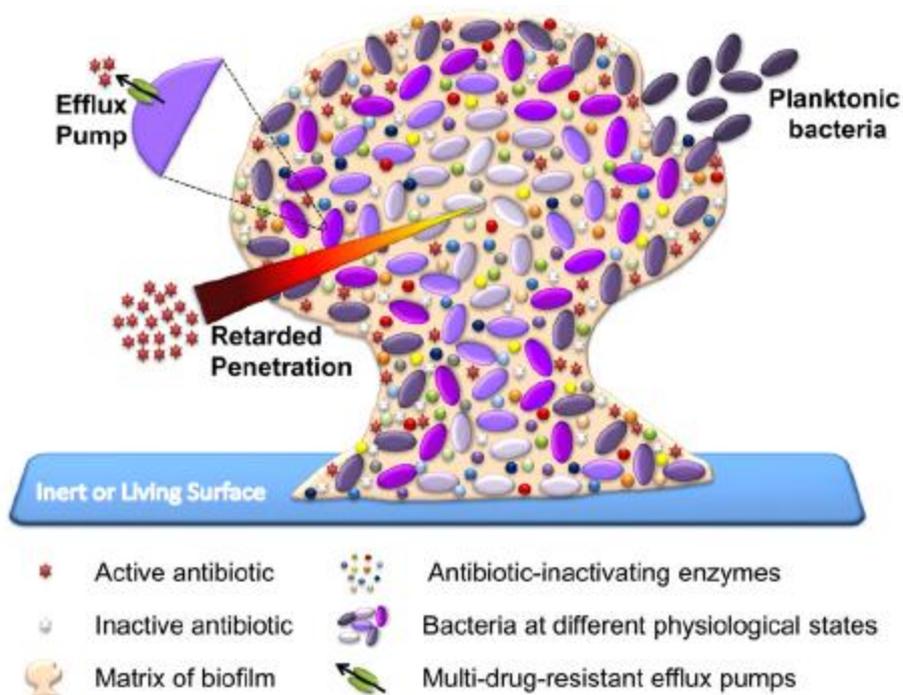


Figura 14. Meccanismi di difesa dei biofilm dagli antibiotici [Xiong et al., 2014]

In specifiche condizioni, il biofilm rilascia una frazione di batteri, detta di “cellule planctoniche”, che contribuiscono alla riacutizzazione costante dell’infezione e alla resistenza dei biofilm. Inoltre, dati in vivo suggeriscono che la matrice esopolisaccaridica possa impedire il corretto funzionamento della risposta immunitaria innata, impedendo la diffusione delle molecole da cui essa è mediata, riducendo la chemiotassi delle cellule polimorfonucleate, inibendo l’attivazione del complemento, e riducendo la fagocitosi da parte di neutrofili, macrofagi e linfociti [CF Foundation, 2007]. Inoltre, alte densità di cellule microbiche possono degradare o inattivare gli antibiotici tramite attività metaboliche o enzimatiche: *P. aer* può raggiungere livelli che vanno da 10^7 a 10^8 CFU per grammo di espettorato in pazienti affetti da FC, ed è in grado di secernere β -lattamasi nell’ambiente circostante, ovvero enzimi capaci di degradare alcune classi di antibiotici.

Anche le caratteristiche chimico-fisiche e la composizione delle secrezioni nelle vie aeree in FC possono ostacolare l’azione degli antibiotici. Infatti, il muco presente nel tratto respiratorio dei pazienti con FC rappresenta una importante barriera che si oppone all’effetto terapeutico, non solo degli antibiotici, ma di tutti gli agenti terapeutici che, per il trattamento sintomatico della patologia, vengono somministrati per via inalatoria.

In condizioni fisiologiche, il muco respiratorio ricopre l’epitelio dal tratto nasale fino ai bronchioli terminali e si trova stratificato sopra l’estremità delle ciglia a loro volta immerse in uno strato più fluido e idratato che prende il nome di liquido periciliare. Il materiale inalato è catturato dallo strato di muco e insieme, muco e materiale esogeno, vengono trasportati dal movimento delle ciglia verso l’esofago. Le proprietà chimico-fisiche del muco respiratorio determinano l’efficacia di questo sistema difensivo. La velocità di flusso del muco è di circa 5mm/min, e lo strato luminale di muco del tratto respiratorio è rigenerato approssimativamente ogni 10-20 min, portando alla clearance dei particolati inalati [Ali et al., 2007].

Nelle malattie polmonari caratterizzate da un muco compatto con una viscoelasticità elevata, come la FC, la clearance mucociliare è invece molto ridotta e l’eliminazione del muco avviene attraverso espettorazione e tosse [Deneuille et al., 1997]. Nonostante sia difficile da determinare in vivo, è stato riportato che, mentre in condizioni non patologiche lo spessore del muco varia da 10 a 30 μ m nella trachea e da 2 a 5 μ m nei

bronchi, nel tratto polmonare di soggetti affetti da FC lo strato di muco risulta essere molto più spesso e può raggiungere i 260 μm .

I principali costituenti del muco sono le mucine, complesse macromolecole secrete da cellule caliciformi e ghiandole sottomucose [Thornton et al., 2004], organizzate in una struttura reticolata tridimensionale tramite la formazione di legami crociati [Lethem et al., 1993]. Le mucine, la cui struttura è schematizzata in **Figura 15**, hanno un peso molecolare tra i 2 e i 16 MDa, e sono costituite da 4-5 subunità tenute insieme da legami disolfuro [Lamblim et al., 1992]. Le subunità, che hanno una lunghezza di circa 500 nm, sono formate da catene proteiche glicosilate (monomero in **Figura 15**), separate da porzioni non glicosilate [Carlstedt et al., 1985]. Le catene glicosidiche sono costituite da 1 a 20 monosaccaridi uniti da legami O-glicosidici e sono ancorate alle catene di mucina attraverso legami covalenti che coinvolgono la N-acetilgalattosammina e residui di serina o treonina della sequenza aminoacidica della mucina. Tali catene, per la presenza di acido sialico e monosaccaridi solforati rendono le mucine cariche negativamente [Lamblim et al., 1992].

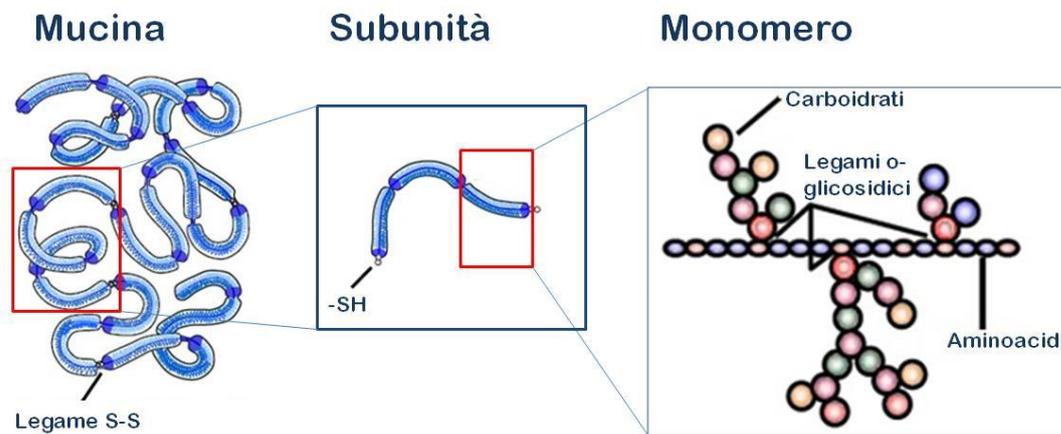


Figura 15. Rappresentazione schematica della struttura delle mucine presenti nel muco respiratorio umano.

In FC la secrezione del muco è notevolmente aumentata e la composizione è alterata rispetto a quella del muco di pazienti sani. Il contenuto d'acqua nel muco di pazienti

affetti da FC è di circa il 90%, mentre in condizioni fisiologiche esso contiene circa il 95% d'acqua. Oltre a mucine e acqua, il muco contiene anche lipidi, proteoglicani, elettroliti e proteine [Mrsny et al., 1996], tra cui le più abbondanti sono albumina, proteasi, immunoglobuline, lisozimi e lactoferrina [Jacquot et al., 1992].

Le secrezioni respiratorie tipiche della FC contengono anche un'ingente quantità di DNA e actina, assenti nelle secrezioni di soggetti sani. Questi biopolimeri derivano da neutrofili, cellule epiteliali e patogeni che muoiono e successivamente rilasciano il loro contenuto intracellulare nel muco. Il DNA e l'actina hanno, come le mucine, un elevato peso molecolare e possono contrarre dei legami tra loro [Broughton-Head et al., 2007] e con gli altri costituenti del muco, fisicamente (tramite aggrovigliamenti) e chimicamente (tramite legami a idrogeno e interazioni elettrostatiche) [Broughton-Head et al., 2007], aumentandone drasticamente la viscoelasticità. E' stata inoltre riportata la formazione di legami tra le mucine e le componenti lipidiche presenti nel muco dei soggetti affetti da FC, che rendono le catene di mucina in grado di dare interazioni idrofobiche che incrementano ulteriormente la viscoelasticità del muco [Houdret et al., 1986]. La composizione e le proprietà viscoelastiche dell'espettorato dei pazienti con FC sono riportati nella **Tabella 2**.

E' stato riportato che l'efficacia in vitro degli amminoglicosidi sembra essere completamente inibita dalla presenza di espettorato, permettendo la crescita microbica anche quando la concentrazione di antibiotico è 10 volte superiore alla CMI (Concentrazione Minima Inibente) [Levy et al., 1986], un fenomeno probabilmente dovuto al legame degli amminoglicosidi alle mucine e al DNA [Hunt et al., 1995]. Solamente elevate dosi ripetute di antibiotici possono saturare i siti di legame [Hunt et al., 1995], permettendo di raggiungere le quantità terapeutiche.

Quindi, sono numerosi gli ostacoli posti dalla barriera mucosa alla permeazione e all'efficacia di sistemi farmaceutici precludendo così la possibilità di una terapia farmacologica efficace a dosaggi non tossici.

Al fine, pertanto, di sfruttare i vantaggi della terapia inalatoria, per la somministrazione di antibiotici nel trattamento delle infezioni persistenti e ricorrenti in pazienti affetti da FC, l'interesse della tecnologia farmaceutica si è rivolto verso sistemi particellari di

opportune dimensioni (micro e/o nanometriche), costituite da polimeri, naturali o sintetici, biocompatibili e biodegradabili, in grado di veicolare in maniera efficiente i farmaci antibatterici attraverso lo strato di muco che ricopre le vie aeree di questi pazienti [Oh et al., 2008]. Questi sistemi potrebbero offrire la possibilità di rilasciare alte concentrazioni di farmaco direttamente al sito di infezione, riducendo la tossicità e migliorando le proprietà terapeutiche degli agenti antimicrobici esistenti [Islam et al., 2012], in quanto potenzialmente in grado di proteggere il farmaco dall'inattivazione e dall'eliminazione. Inoltre, le nano e le microparticelle polimeriche, grazie ad un rilascio controllato di farmaco al polmone, potrebbero permettere la riduzione delle dosi e della frequenza di somministrazione e aumentare di conseguenza la compliance del paziente, riducendo al contempo gli effetti secondari e indesiderati [Ong et al., 2011].

A seconda delle caratteristiche chimico-fisiche del sistema (dimensioni, composizione e carica superficiale) e del polimero di partenza (solubilità, peso molecolare, proprietà mucoadesive, capacità di formare sistemi autoassemblanti), tali sistemi particellari possono promuovere la penetrazione attraverso lo strato mucoso per il raggiungimento dell'epitelio (Sistemi Mucopenetranti), o consentire l'adesione del sistema terapeutico al muco, aumentando il tempo di permanenza e il rilascio controllato del farmaco attivo nel sito dell'infezione, che si trova maggiormente localizzata all'interno dello strato di muco (Sistemi Mucoadesivi).

La **Figura 16** riassume i principali vantaggi derivanti dall'utilizzo di particelle polimeriche, impiegate come carriers di antibiotici, per il superamento delle barriere tissutali.

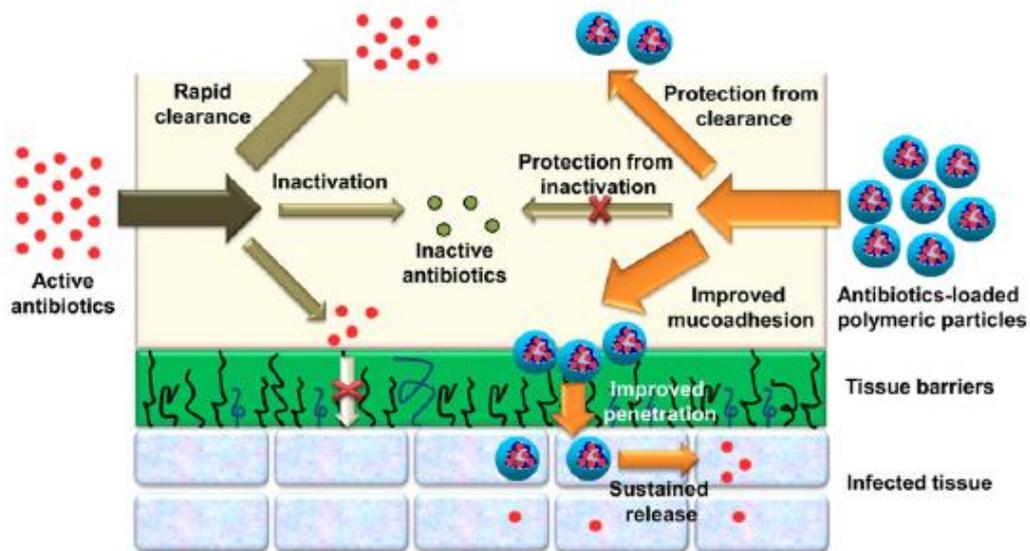


Figura 16. Meccanismi delle particelle polimeriche utilizzate nella veicolazione di antibiotici per il superamento delle barriere tissutali [Xiong et al., 2014].

1.4.1. Nanoparticelle mucopenetranti.

Le vie respiratorie nella FC rappresentano un sistema complesso, dove popolazioni microbiche, difese dell'ospite e terapia antibiotica interagiscono in un ambiente chimico-fisico alterato.

Un approccio per incrementare l'efficacia terapeutica di un sistema di rilascio basato su particelle polimeriche è quello di progettare sistemi che abbiano proprietà mucopenetranti.

Diversi fenomeni possono impedire che le nanoparticelle inalate penetrino all'interno dello strato di muco per raggiungere il sito in cui è localizzata l'infezione. Prima di tutto, il reticolo biopolimerico che costituisce il muco può ostacolare la diffusione delle nanoparticelle per ingombro sterico o attraverso la formazione di legami con la superficie particellare. In secondo luogo, le macromolecole che non sono implicate nella formazione di legami crociati, e sono quindi disperse all'interno delle maglie del muco, possono aderire alla superficie delle nanoparticelle causandone l'aggregazione, che può

impedire la loro capacità di muoversi attraverso i pori del gel e ridurre inoltre il rilascio del farmaco incorporato al loro interno.

Quindi la progettazione accurata di sistemi nanoparticellari al fine di ottenere dimensioni e proprietà di superficie idonee, gioca un ruolo cruciale nel renderle adatte ad attraversare lo strato di muco.

La **Figura 17** mostra il destino di particelle mucopenetranti: queste penetrano prontamente lo strato mucoso luminale e accedono al sottostante strato di muco aderente all'epitelio.

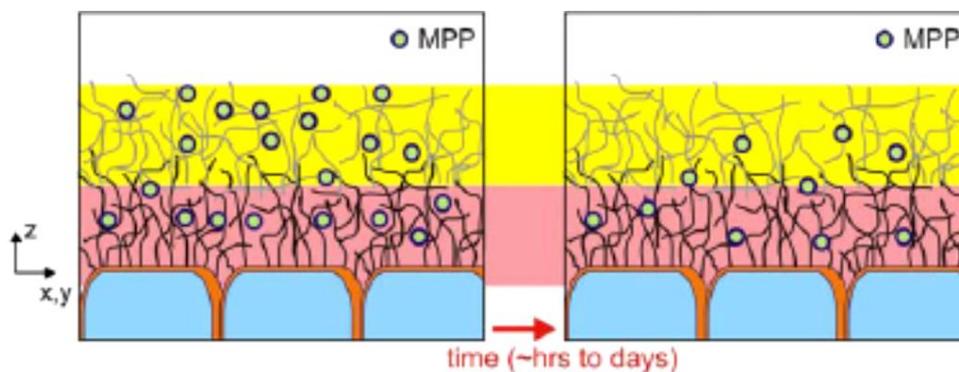


Figura 17. Destino delle particelle mucopenetranti [Lai et al., 2009]

Le nanoparticelle per attraversare velocemente almeno gli strati più esterni del muco, devono possedere dimensioni adeguate, tali da evitare l'intrappolamento dovuto ad ingombro sterico da parte del denso reticolo di fibre.

Rytting et al. hanno studiato il trasporto di nanoparticelle di polistirene cariche negativamente attraverso il muco di FC, attraverso un modello in vitro, e hanno ipotizzato che per particelle con un diametro inferiore o uguale a 120 nm l'ostacolo principale all'attraversamento del muco è rappresentato dalla distanza che le particelle devono percorrere, cioè dallo spessore dello strato di muco, e dal loro coefficiente di diffusione, in quanto la maggior parte delle maglie che costituiscono il complesso gel biopolimerico hanno un diametro non superiore ai 300 nm. Per particelle aventi un

diametro compreso tra 200 e 400 nm il trasporto sarebbe influenzato sia dai precedenti fattori, sia dall'impedimento sterico da parte delle maglie del muco. Infine, a causa della scarsa presenza di maglie con un diametro pari o superiore a 500 nm, particelle con un diametro di 400 nm o più risulterebbero incapaci di attraversare il muco in quantità accettabili. E' stato di contro dimostrato che nanoparticelle grandi circa 500 nm, se adeguatamente rivestite con un polimero che conferisca loro capacità mucopenetranti, cioè inerzia nei confronti dei costituenti del network biopolimerico, possono rapidamente attraversare il muco fisiologico con una diffusività così alta che è inferiore soltanto di 4 volte rispetto a quella in acqua [Lai et al., 2007].

La diffusività di solito è ridotta da un coefficiente di ripartizione o/w elevato, conseguentemente alle interazioni tra porzioni idrofobiche del sistema e domini idrofobici del muco. Nonostante ciò, molecole di dimensioni molto piccole non sono in grado di instaurare interazioni adesive con il gel mucoso e riescono quindi ad attraversare il muco agevolmente.

Le proprietà di superficie rivestono quindi un ruolo fondamentale: le nanoparticelle che meglio si prestano all'attraversamento del muco, cioè nanoparticelle con proprietà mucopenetranti, devono essere anioniche o neutre ma anche altamente idrofiliche [Rytting et al, 2008]. Particelle prive di carica netta di circa 200 nm di diametro sembrerebbero attraversare l'espettorato in FC più rapidamente di quelle anioniche.

Da recenti studi, emerge che l'utilizzo di polimeri idrofili, come chitosano e PVA, è essenziale per ottimizzare la dimensione e le proprietà farmacocinetiche di nanoparticelle contenenti Tobramicina, mentre l'uso di alginato facilita il caricamento di tale antibiotico nelle nanoparticelle e ne consente il rilascio nell'arco di un mese.

Il polietilenglicole (PEG), **Figura 18**, è un polimero privo di carica usato tipicamente in campo farmaceutico per migliorare la circolazione sistemica e minimizzare l'opsonizzazione [Allen et al., 2004].

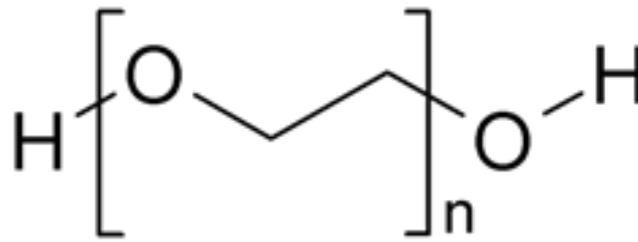


Figura 19. Polietilenglicole (PEG)

Il PEG, polimero comunemente considerato come avente proprietà mucoadesive per la sua capacità di interdiffondere attraverso il reticolo mucoso [Serra et al., 2006] e formare legami a idrogeno [Lele et al., 2000], sembrerebbe ridurre le interazioni con il muco [Bures et al., 2001], qualora il suo peso molecolare sia abbastanza basso e in particolare inferiore a 10 KDa, e la sua densità sulla superficie del nanosistema sia sufficientemente alta da schermare efficacemente la carica superficiale o porzioni idrofobiche dello stesso. La PEGylazione di nanoparticelle può anche amplificare la loro stabilità nel muco, prevenendone l'aggregazione.

1.4.2. Sistemi microparticellari mucoadesivi.

Una ulteriore strategia per la somministrazione inalatoria di farmaci è l'uso di sistemi di rilascio microparticellari che incorporino intrinsecamente un agente mucoadesivo nella formulazione. La mucoadesione è comunemente definita come la capacità dei sistemi polimerici di aderire allo strato mucoso. Il meccanismo può essere suddiviso in due fasi, una iniziale di contatto e una successiva di instaurazione delle interazioni adesive [Smart et al., 2005].

Gli agenti mucoadesivi sono solitamente molecole ad alto peso molecolare che possono interagire con lo strato di mucina dell'epitelio respiratorio attraverso legami a idrogeno, elettrostatici, idrofobici o interazioni di Van der Waals. Tra questi, oltre al PEG di peso molecolare superiore a 10 KDa sopra menzionato, si possono annoverare l'idrossipropilcellulosa [Sakagami et al., 2002], il chitosano [Ventura et al., 2008],

l'acido polilattico [Muttill et al., 2007], l'acido poli(D,L-lattico-co-glicolico) [Emami et al., 2009], il carbomer [Alhusban et al., 2009] e la sodio carbossimetilcellulosa [Mishra et al., 2010]. La **Figura 19** schematizza i processi di interpenetrazione polimero-mucina.

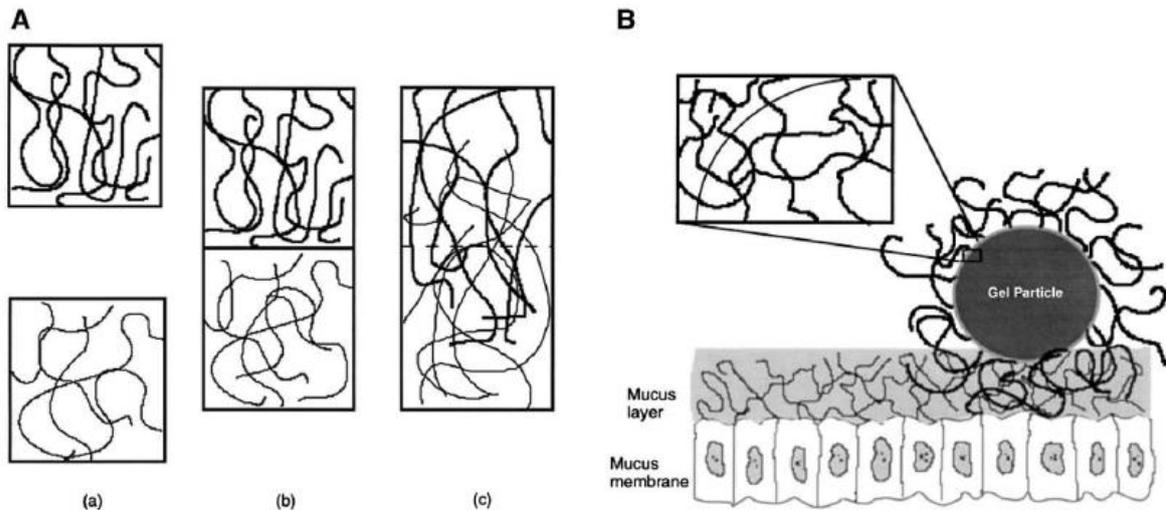


Figura 19 Rappresentazione schematica di (A) interdiffusione dei polimeri messi a contatto e (B) interpenetrazione tra le catene legate alla superficie delle particelle e le catene di mucina [Huang et al., 2000].

Le microparticelle mucoadesive idonee all'impiego mediante sistemi inalatori devono avere dimensioni comprese tra 1-5 μm . Le polveri con diametro maggiore si depositano nell'inalatore, nell'orofaringe, nella laringe, mentre polveri più piccole di 1 μm sono esalate [Patton et al., 2007]. La **Figura 20** mostra il destino delle polveri nel tratto respiratorio.

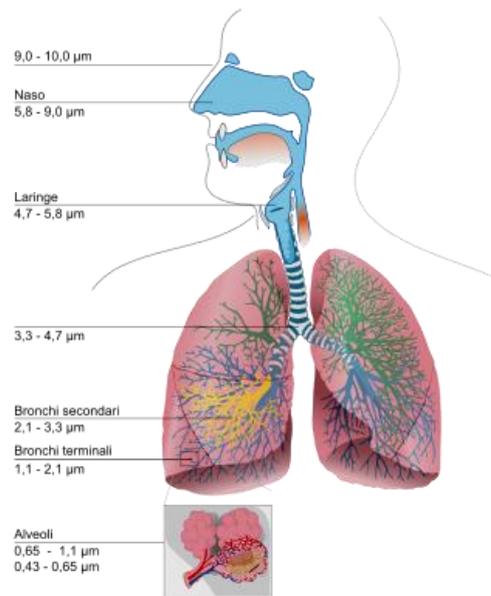


Figura 20 Penetrazione delle polveri nell'apparato respiratorio

Inoltre, è importante evitare la fagocitosi da parte dei macrofagi alveolari, a meno che i gli stessi non siano il bersaglio cellulare intenzionale per il rilascio del farmaco, in quanto il range dimensionale ottimale per l'inalazione lo è anche per la fagocitosi [Coates et al., 2006]. L'incorporazione degli antibiotici nelle matrici polimeriche ne modifica le proprietà farmacocinetiche aumentando il tempo di residenza nei polmoni. [Pinto-Alphandary et al., 2000].

Sebbene la mucoadesione sia un approccio promettente per aumentare la biodisponibilità dei farmaci veicolati ai tessuti mucosali, ci sono delle grosse limitazioni. Visto che i sistemi mucoadesivi sono legati allo strato mucoso attraverso interazioni con le catene di mucina, il tempo di transito è determinato dal tempo di turnover dello strato di muco [Bernkop-Schnurch et al., 2005]. I sistemi mucoadesivi aderiscono efficacemente al muco, quindi sono prevalentemente incapaci di penetrare attraverso lo strato mucoso e raggiungere l'epitelio sottostante. Tali sistemi sono quindi solitamente inadatti alla veicolazione di un farmaco che richiede un direccionamento intracellulare.

1.4.3. Microparticelle porose.

Microparticelle altamente porose, caratterizzate da un diametro geometrico elevato ma densità e diametro aerodinamico bassi [Edwards et al., 1998], esibiscono un profilo di deposizione polmonare ideale [Coates et al., 2006] e mostrano inoltre una bassa tendenza all'agglomerazione dovuta a fenomeni di interazione superficiale [Edwards et al., 1998].

Le microparticelle possono essere prodotte tramite differenti metodi. Lo spray-drying è comunemente usato in quanto permette l'impiego di diversi eccipienti con proprietà aerodinamiche favorevoli, come la dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) e l'albumina [Vanbeve et al., 1999]. Anche il metodo della doppia emulsione viene impiegato, di solito con procedure addizionali o eccipienti per aumentare la porosità e le dimensioni di solidi e piccole microparticelle polimeriche. Per esempio, una struttura porosa può essere prodotta trattando microparticelle solide con CO_2 supercritica [Koushik et al., 2004], che penetra la matrice polimerica amorfa e si espande formando pori per depressurizzazione isoterma. Alternativamente, soluzioni acquose di osmogeni [Kwon et al., 2007] o porogeni oleosi [Arnold et al., 2007] vengono aggiunte alla fase interna come agenti formanti pori. Con gli osmogeni, si generano strutture porose quando l'acqua nella fase esterna si muove verso la fase interna a causa della pressione osmotica, mentre con i porogeni oleosi si formano particelle porose quando la fase oleosa viene estratta nella fase acquosa.

Sebbene questi metodi possano fornire particelle con proprietà fisiche favorevoli all'inalazione, esistono ancora molte limitazioni, specialmente se si desidera ottenere un rilascio sostenuto di farmaco al polmone. Le particelle ottenute con spray-drying, contenenti farmaco, zuccheri, proteine e DPPC, non controllano il rilascio di farmaco abbastanza bene da garantire un rilascio sostenuto. La dissoluzione dello zucchero e delle proteine in ambiente acquoso può infatti essere responsabile del rilascio immediato di farmaco. Invece l'uso di osmogeni e porogeni oleosi può compromettere l'efficacia di incapsulazione del farmaco [Lee et al., 2007], perché i processi di formazione dei pori dipendono dallo scambio diffusionale di massa tra la fase discontinua (goccioline di polimero) e quella continua (fase esterna acquosa).

Sono state studiate microparticelle a base di polimeri biodegradabili, come l'acido polilattico-co-glicolico (PLGA) altamente porose, al fine di ottenere idoneità all'inalazione, unitamente ad un'efficiente incapsulazione di farmaco e a un rilascio sostenuto al sito bersaglio. Per la loro preparazione, è stato utilizzato bicarbonato d'ammonio (ABC) come porogeno effervescente. In soluzione acida o ad alta temperatura esso si decompone ad ammoniaca e biossido di carbonio [Nam et al., 2000]. E' stato ipotizzato che ABC formi strutture porose quando i suoi prodotti gassosi fuoriescono dalla matrice polimerica, senza provocare perdita di farmaco, dal momento che la formazione di pori dipende in questo caso più dall'effervescenza che dallo scambio diffusionale di massa, amplificando grandemente l'efficienza di incapsulazione.

Il principale obiettivo di tale approccio è quello di aumentare la porosità delle particelle e ridurre la densità, diminuendo così il diametro aerodinamico medio della massa (MMDA) e di aumentarne il diametro geometrico fino a 10 μm o ancora superiore, per evitare la fagocitosi da parte dei macrofagi.

Le PulmoSphere rappresentano un nuovo sistema di polveri da somministrare per via inalatoria come aerosol per il rilascio di Tobramicina a livello polmonare (TIP: Tobramycin Inhalation Powder). Si tratta di particelle sferoidali altamente porose, caratterizzate da un diametro geometrico medio di 1.7-2.7 μm e un diametro aerodinamico medio 4 μm [Haynes et al., 2010]. Questo range dimensionale è ideale per la somministrazione delle polveri per inalazione ai siti di infezioni provocate da *P. aeruginosa* nelle vie aeree.

Le PulmoSphere sono prodotte tramite un processo di spray-drying a partire da un'emulsione [Weers et al., 2007]. Il processo di spray-drying può essere diviso in 4 sottoprocessi: preparazione della materia prima, atomizzazione, essiccamento e raccolta, come mostrato in **Figura 21**.

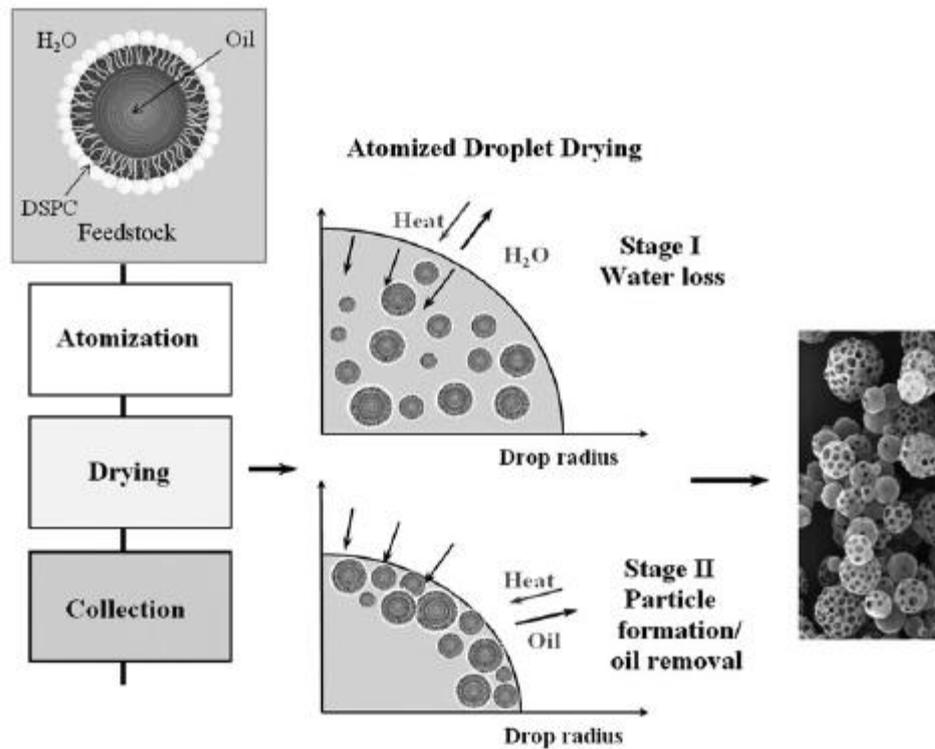


Figura 21 Metodo di produzione delle PulmoSphere [Geller et al., 2011]

Un'emulsione olio in acqua contenente goccioline di dimensioni sub-micrometriche è ottenuta dalla omogenizzazione ad alta pressione di perfluoroottil bromuro (Perflubron) in una fase acquosa [Krafft et al., 1998], nella quale sono presenti in soluzione il principio attivo (la Tobramicina) e il cloruro di calcio come stabilizzante dell'emulsione per impedire fenomeni di flocculazione e sedimentazione. Le goccioline di olio disperse sono ulteriormente stabilizzate da un monostrato di un fosfolipide a lunga catena, la distearilfosfatidilcolina o DSPC. Il materiale risultante viene nebulizzato da un doppio ugello contro un getto d'aria calda e quindi atomizzato. Ogni goccia così ottenuta contiene al suo interno un gran numero di goccioline di emulsione più piccole. Durante le fasi iniziali del processo di essiccamento, la fase acquosa continua inizia ad evaporare determinando una riduzione del diametro delle gocce atomizzate. Man mano che la goccia atomizzata si rimpicciolisce, le piccole goccioline di emulsione disperse all'interno di essa migrano all'interfaccia con l'aria, mentre la Tobramicina diffonde

verso la zona centrale. In questo modo, si forma alla superficie della goccia un rivestimento, costituito dagli eccipienti presenti nell'emulsione.

Dopo un ulteriore essiccamento, il Perflubron evapora, lasciando dei pori nelle particelle. Infine, le particelle sono separate dal getto d'aria tramite un separatore a ciclone.

Visto il breve tempo di essiccamento (dell'ordine di millisecondi), la Tobramicina è presente come solido amorfo nelle particelle ottenute.

Peraltro, nonostante i fosfolipidi contribuiscano solamente per il 14% alla composizione in massa delle particelle, approssimativamente il 90% della superficie contiene DSPC. L'arricchimento in DSPC della superficie è critico per ridurre l'energia di superficie delle particelle e per diminuire le forze coesive interparticellari.

Tali caratteristiche fanno sì che venga migliorata l'efficienza nella somministrazione polmonare, con il 60% della dose nominale di farmaco rilasciato ai polmoni [Weers et al., 2010]. La variabilità inter-paziente nella deposizione polmonare è del 10-20% contro il 30-50% per le miscele di farmaco micronizzate [Borgström et al., 2006] e anche la variabilità del dosaggio tra un'inalazione e l'altra risulta notevolmente ridotta [Duddu et al., 2009]. Inoltre per generare un aerosol dalle PulmoSphere è necessario uno sforzo inspiratorio basso rispetto alle formulazioni di generazione precedente.

1.5. Biopolimeri per la progettazione di superfici antibatteriche.

I batteri costituiscono la più antica forma di vita sul nostro pianeta e attraverso milioni di anni hanno sviluppato efficienti meccanismi adattativi per la colonizzazione di superfici [A.M. Kraigsley et al., 2009]. La colonizzazione da parte dei batteri inficia negativamente la funzione di tutte le superfici, in ambiti anche molto diversi, come oleodotti, prodotti tessili, lenti a contatto e materiali per l'implantologia [K. Bazaka et al., 2012; C.R. Arciola et al., 2012].

I biomateriali utilizzati in chirurgia per le protesi e per il loro impianto sono soggetti a gravi infezioni batteriche. In particolare i dispositivi medici biorassorbibili, costituiti da poliesteri alifatici, presentano un tasso di infezione alto. Più in generale, gli studi clinici hanno messo in evidenza il fatto che a seconda della loro tipologia, dal 10 al 50% degli impianti sono infettati ad un certo punto del loro ciclo di vita e che i batteri si trovano in circa il 90% di tutti i siti di impianto già immediatamente dopo l'intervento [D. Campoccia et al., 2006].

Queste infezioni nosocomiali postoperatorie possono ritardare la guarigione e causare gravi complicazioni anche molto tempo dopo l'impianto, e in ultima analisi richiedere la rimozione del materiale. La procedura convenzionale è quella di somministrare antibiotici per via endovenosa durante l'intervento, eventualmente seguita da terapia antibiotica sistemica post-operatoria. Purtroppo, queste misure potrebbero non essere sufficienti nel momento in cui si forma un biofilm batterico sulla superficie dell'impianto. Per evitare la formazione di biofilm, un'alternativa interessante, possibilmente complementare al trattamento antibiotico per via sistemica, è quella di utilizzare biomateriali che possiedono superfici antibatteriche.

Le superfici antibatteriche possono essere distinte in *battericide* e “*antibiofouling*” o *antiproliferative*, a seconda dell'effetto che esse hanno sui sistemi microbiologici con cui esse vengono a contatto. Superfici antibatteriche con proprietà antibiofouling, prevengono l'adesione cellulare grazie alla presenza di una topografia o di una composizione chimica superficiali sfavorevoli per i microorganismi. Le superfici battericide generano, invece, un danno irreversibile e causano la morte dei batteri.

In certi casi le superfici antibatteriche possono possedere entrambe le proprietà. Ad esempio, è stato recentemente riportato in letteratura uno studio riguardante una superficie con capacità di cambiare reversibilmente le proprie caratteristiche in modo da possedere in maniera alternata entrambe le proprietà al variare dell'intorno in cui si trova il sistema: la superficie possiede nel suo rivestimento l'*N,N*-dimetil-2-morfolinone, capace di inattivare i batteri quando la superficie si trova allo stato secco, e una carbossibetaina switterionica che a contatto con una fase che bagna la superficie impedisce l'adesione dei batteri [Z. Cao et al., 2012].

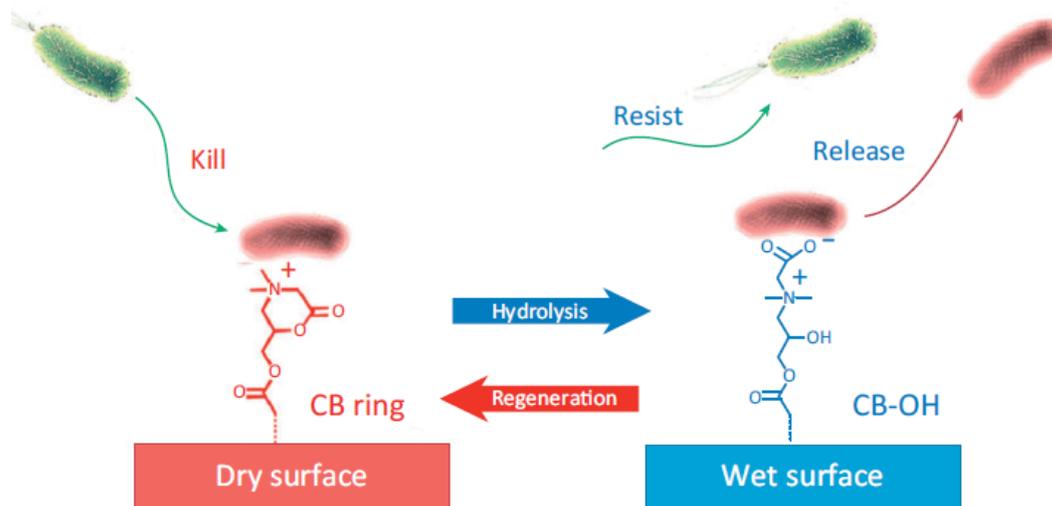


Figura 22. Transizione della superficie da battericida a batteriostatica [Z. Cao et al., 2012]

Una superficie antibatterica può essere ottenuta mediante tecniche di rivestimento (“surface coating”) o di modificazione chimica (polimerizzazione, funzionalizzazione e derivatizzazione) o fisico-meccanica (approcci meccanici e di “surface structuring” come l’ablazione laser) [E. Fadeeva et al., 2011; A. Muñoz-Bonilla et al., 2012].

1.5.1. Rivestimento di superfici.

Questo è uno degli approcci più frequentemente utilizzati per la preparazione di superfici antibatteriche in ambito biomedico. Il surface coating o rivestimento di superficie può essere definito come la formazione di uno strato di materiale con caratteristiche antibatteriche che ricopre fisicamente una superficie substrato avente diversa composizione [J. Hasan et al., 2013]. Il rivestimento può agire causando tossicità alle cellule batteriche una volta che queste si trovano a contatto con la superficie, oppure rilasciando nel mezzo circostante un agente antibatterico [J.C. Tiller et al., 2001].

Tale approccio include l'impiego di rivestimenti a base di farmaci antibiotici, argento, titanio, idrossiapatite, fluoruri e tecniche di miscelazione [J.S. Price et al., 1996; J. Hasan et al., 2013].

I rivestimenti a base di argento sono stati ampiamente utilizzati in implantologia, e la loro efficacia deriva dal rilascio di ioni d'argento dal coating che risultano battericidi sia per batteri Gram-negativi che Gram-positivi [E.P. Ivanova et al., 2011; J.C. Tiller et al., 2001].

In modo simile, l'idrossiapatite (HA), che spesso è utilizzata come materiale di rivestimento per protesi in titanio, ha lo svantaggio di possedere scarsa resistenza meccanica, e difficilmente è possibile ottenere un rivestimento con densità e spessore uniformi. È stato dimostrato inoltre, a seguito di studi di stabilità, che i rivestimenti antibatterici a base di idrossiapatite non hanno spesso una durata sufficiente a garantirne l'efficacia [S. Lazarinis et al., 2011]. Recentemente, sono state sviluppate tecnologie che prevedono la combinazione di differenti agenti antibatterici come ad esempio argento e sali di ammonio quaternario; ferro e titanio, argento e titanio, argento e HA.

L'utilizzo del rivestimento superficiale come tecnica per l'ottenimento di superfici antibatteriche e in particolare l'impiego di rivestimenti a rilascio di farmaci, ha rivelato alcuni inconvenienti: tali rivestimenti, infatti, portano intrinsecamente alla perdita di attività dopo l'eluizione del principio attivo e possono inoltre, favorire il rischio di multifarmaco resistenza [O. Guillaume et al., 2011].

1.5.2. Funzionalizzazione di superfici.

Superfici funzionalizzate con policationi contenenti gruppi ammonici quaternari hanno mostrato di possedere proprietà antibatteriche ed in particolare battericide. Ad esempio, il polivinil-N-esilpidirinio (esil PVP), un polimero idrofobico contenente gruppi ammonici quaternari, ha mostrato di conferire proprietà battericide quando legato a diversi tipi di superficie come il polietilene, il polipropilene, il nylon, polietilene tereftalato e vetro.

Superfici contenenti sali di ammonio o gruppi ammonici quaternari hanno mostrato di possedere la capacità di danneggiare le membrane sia di batteri Gram-positivi che Gram-negativi [J.C. Tiller et al., 2001]: l'atomo di azoto carico positivamente interagisce con i gruppi di testa dei fosfolipidi che compongono la membrana cellulare batterica, carichi negativamente, causando perturbazioni e indebolimento del doppio strato che la costituisce. Questo porta al rilascio di elevate quantità di ioni potassio, che provoca irreversibilmente scompensi nella regolazione osmotica e in altre funzioni. È stato riscontrato che l'attività battericida dei gruppi ammonici quaternari risulta fortemente dipendente dalla lunghezza delle catene alchiliche legate all'atomo di azoto. Per esempio, gruppi ammonici quaternari contenenti catene alchiliche composte da 14-16 atomi di carbonio mostrano attività contro batteri Gram-positivi, mentre, gruppi ammonici quaternari contenenti catene alchiliche composte da 12-14 atomi di carbonio risultano essere più efficaci contro batteri Gram-negativi [H. Murata et al., 2007]. È stato inoltre riportato che gruppi ammonici quaternarizzati con catene alchiliche composte da meno di 4 e da più di 18 atomi di carbonio risultano, in alcuni casi, poco efficienti nell'esplicare azione antibatterica [P. Gilbert ET AL., 2005]. L'attività antibatterica di tali superfici funzionalizzate, inoltre, aumenta all'aumentare della densità dei gruppi ammonici quaternari. [H. Murata et al., 2007].

Oltre ai polimeri ad attività antimicrobica, esistono una serie di enzimi la cui attività può portare ad una netta riduzione nella formazione di biofilm [B. Thallinger et al., 2013]. Ad esempio, enzimi proteolitici, come la subtilina, sono in grado di idrolizzare proteine batteriche, risultando in un effetto battericida o antibiofouling [B. Thallinger et al., 2013]. Anche enzimi che hanno come substrato certi polisaccaridi, come le amilasi e

il lisozima, sono in grado di svolgere una consistente attività antibatterica contro microorganismi sia gram positivi che gram negativi [E.R. Kenawy et al., 2011].

Una nuova ed emergente classe di polimeri sintetici, strutturalmente correlati a peptidi antimicrobici, come ad esempio la magainina o la defensina, hanno mostrato di possedere elevata attività antibatterica e contemporaneamente di mantenere un elevato profilo di biocompatibilità. Tali molecole, conosciute come “*Synthetic Mimics of Antimicrobial Peptides*” (SMAPs), sono polimeri di natura anfifilica e causano la distruzione della parete cellulare dei batteri [L. Timofeeva ET AL., 2011].

L'applicazione di tali biopolimeri nel design di superfici antibatteriche potrebbe notevolmente migliorare la performance di materiali per applicazioni biomediche già in uso nella pratica clinica, come poliesteri, metalli e ceramiche.

2. SCOPO DELLA TESI

E' ormai da alcuni decenni consolidato il principio secondo cui l'efficacia di un sistema terapeutico, che prevede l'utilizzo di un farmaco, può essere notevolmente migliorata ricorrendo all'impiego di nuove tecnologie farmaceutiche.

In particolare, i polimeri per applicazione in ambito biomedico costituiscono una classe di composti estremamente importanti per lo sviluppo di nuovi sistemi in grado di superare gli attuali inconvenienti riscontrati nella pratica clinica, in quanto tali macromolecole rappresentano soluzioni tecnologicamente avanzate per diverse applicazioni, dal rilascio e direzionamento di farmaci all'ingegneria tissutale.

Pertanto tale lavoro di tesi ha riguardato essenzialmente la progettazione, realizzazione e caratterizzazione chimico-fisica e biologica di sistemi tecnologici innovativi per la veicolazione e il rilascio modificato di farmaci convenzionali e a base di acidi nucleici (NABDs), a partire da nuovi copolimeri a base poliamminoacidica (PHEA) e polisaccaridica (Inulina), sfruttando tecniche sintetiche e metodi di preparazione fortemente studiati nella ricerca attuale in tale ambito, come l'ATRP, e la sintesi catalizzata dalle microonde.

Sono stati ottenuti due nuovi copolimeri dell'inulina, INU-Spm e Inu-DETA, con carattere policationico ed è stata valutata la loro potenzialità per applicazione nella veicolazione di NABDs ed in particolare di siRNA. I poliplessi ottenuti dalla complessazione dei copolimeri con i NABD sono stati caratterizzati in termini di proprietà di superficie e dimensioni ed è inoltre stato approfondito il loro comportamento in vitro utilizzando dei modelli di cellule tumorali e non, con particolare attenzione alla loro citocompatibilità ed efficienza di transfezione.

Sono stati inoltre preparati dei sistemi microparticellari per la somministrazione polmonare e il rilascio modificato del farmaco aminoglicosidico Tobramicina, farmaco fondamentale nel trattamento delle infezioni da *Pseudomonas aeruginosa* che si instaurano a livello polmonare nei soggetti affetti da Fibrosi Cistica.

Tali sistemi sono stati ottenuti utilizzando un derivato polianionico del PHEA, il PHEA-IB-pMANA⁺, grazie alla capacità di questo di dare interazioni elettrostatiche con specie

cariche positivamente, quali la tobramicina. Inoltre, al fine di ottenere sistemi capaci di interagire con lo strato mucoso dell'epitelio bronchiale aumentando il tempo di permanenza e permettendo una penetrazione nello strato più interno del muco, dove è prevalentemente localizzata l'infezione batterica, è stato sintetizzato un derivato peghilato del copolimero PHEA-IB-pMANA⁺, il PHEA-IB-PEG₂₀₀₀-pMANa⁺, mediante ATRP a partire dal copolimero PHEA-PEG₂₀₀₀ [Craparo et al., 2006], utilizzato anch'esso per preparare microparticelle caricate con tobramicina. I sistemi, peghilato e non, sono stati caratterizzati dal punto di vista chimicofisico e ne è stata saggiata la capacità di rilasciare il farmaco in ambiente simulante le secrezioni polmonari in FC e la citocompatibilità in vitro su una linea cellulare modello.

Infine, sono stati prodotti e caratterizzati sistemi polimerici tridimensionali a base di PLA la cui superficie è stata modificata chimicamente, mediante reazioni chemioselettive tiolo-ino, con un nuovo copolimero policationico e tiolato del PHEA, il PHEA-EDA-CPTA-LA, allo scopo di conferire al sistema proprietà antibatteriche.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1. POLIPLESSI A BASE DI DERIVATI CATIONICI DELL' INULINA PER LA VEICOLAZIONE DI FARMACI A BASE DI ACIDI NUCLEICI.

L'inulina è un polisaccaride naturale, costituito da unità ripetitive di fruttosio, e rappresenta un ottimo polimero di partenza per la sintesi di un materiali per applicazioni biomediche. Infatti, si tratta di una macromolecola dal peso molecolare medio di 5000 Da, che possiede nella sua struttura molti gruppi ossidrilici (3 per unità ripetitiva, di cui uno primario e due secondari) che la rendono altamente idrofila e manipolabile chimicamente. L'inulina, grazie alla sua elevata biocompatibilità, alla facile estrazione da fonti vegetali e alle sue eccellenti proprietà è stata impiegata nell'industria alimentare come alimento funzionale, fonte di fibre e "fat substitute". Inoltre, essa è stata variamente funzionalizzata per diversi scopi tra cui lo sviluppo di prodotti industriali quali plasticizzanti, tensioattivi, additivi per la produzione cartiera e di vernici [C.V. Stevens et al., 2001].

Rispetto ad altri polisaccaridi, l'inulina ad oggi è stata insufficientemente utilizzata come biomateriale di partenza per lo sviluppo di sistemi per applicazione biomedica. Nonostante ciò, alcune ricerche descritte in letteratura dimostrano le enormi potenzialità dell'inulina in tale campo, per ottenere sistemi dalle interessantissime proprietà. Ad esempio, sono stati sviluppati idrogeli a base di inulina come piattaforma per il rilascio di farmaci al colon [F. Castelli et al., 2008; G. Pitarresi et al., 2012] e derivati macromolecolari dell'inulina con una buona capacità di complessare cationi metallici, dotati di potenzialità per il trattamento della carenza di ferro tipico dell'anemia [G. Pitarresi et al., 2008]. Recentemente, è stato inoltre sviluppato un derivato anfifilico dell'inulina, in grado di formare micelle, proposto come sistema nanostrutturato per la veicolazione di farmaci antitumorali [M. Licciardi et al., 2014].

Grazie al basso peso molecolare, l'inulina rappresenta un candidato ideale per lo sviluppo di policationi impiegabili nella veicolazione di farmaci a base di acidi nucleici. È stato infatti riportato che policationi con un basso peso molecolare mostrano una minore tossicità a livello cellulare e una migliore capacità di rilasciare il carico una volta che il sistema è stato endocitato [J.G. Cai et al., 2011].

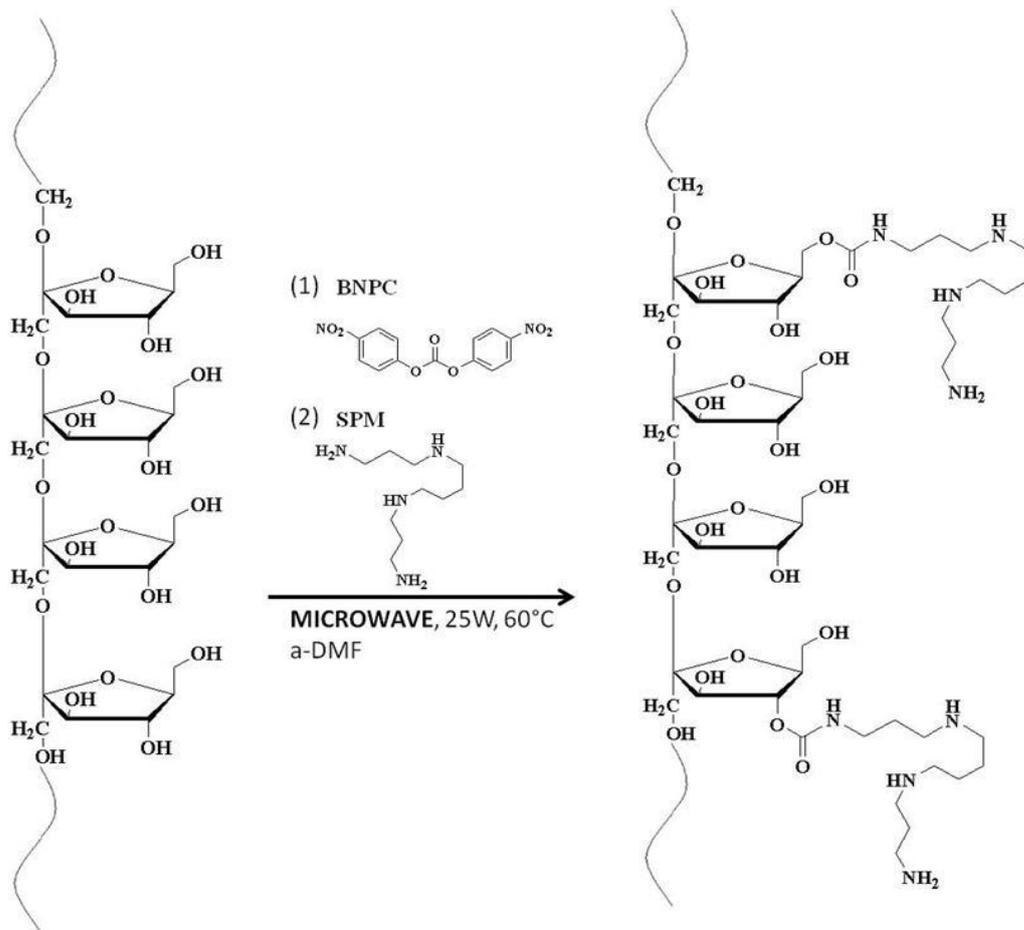
Per questi motivi, nel mio lavoro di tesi mi sono occupata della sintesi e caratterizzazione di derivati cationici a base di inulina per la veicolazione di farmaci a base di acidi nucleici.

In particolare, l'inulina è stata funzionalizzata con molecole di spermina (Spm) o di dietileneetriammina (DETA), oligoammine contenenti rispettivamente 4 e 3 gruppi amminici, aventi un pKa tale da risultare cariche positivamente in mezzi acquosi a pH fisiologico, ottenendo i derivati INU-Spm e INU-DETA.

3.1.1. Copolimeri INU-Spm per la veicolazione di NABD.

La spermilazione è un metodo già noto in letteratura per la produzione di sistemi per la veicolazione di NABD. Infatti, è stata riportata la coniugazione della spermina al backbone di polimeri, sia di sintesi che naturali, compresi polisaccaridi quali il destrano []. I risultati ottenuti dall'impiego del derivato Destrano-Spermina enfatizzano l'importanza della spermina nella tranfezione, probabilmente dovuta alle proprietà complessanti e alla capacità tamponante che l'oligoammina ha nel range di pH compreso tra 7.4 e 5.1. Nonostante questo è stato riportato che i complessi ottenuti coniugando la spermina al destrano risulterebbero instabili in presenza di componenti del siero, con una riduzione dell'efficienza di tranfezione dell'80% [T. Azzam et al., 2004].

Nella sintesi del copolimero INU-Spm, graficamente rappresentata nello **Schema 3.1**, l'oligoammina è stata legata ai gruppi ossidrilici dell'inulina mediante la formazione di un legame uretanico tra un gruppo aminico primario della spermina e un gruppo ossidrilico del polisaccaride, previamente attivato con PNFC. Lo step di attivazione e quello di funzionalizzazione sono stati condotti utilizzando la tecnica EMS, cioè somministrando al sistema energia sottoforma di microonde e contemporaneamente mantenendo la temperatura costante mediante un sistema di raffreddamento ad aria compressa.



Schema 3.1. Sintesi dei copolimeri INU-Spm.

Questa tecnica consente di sfruttare l'aumento di reattività conferito dalle microonde per tutta la durata della reazione senza lavorare però in condizioni di alte temperature che potrebbero degradare l'inulina.

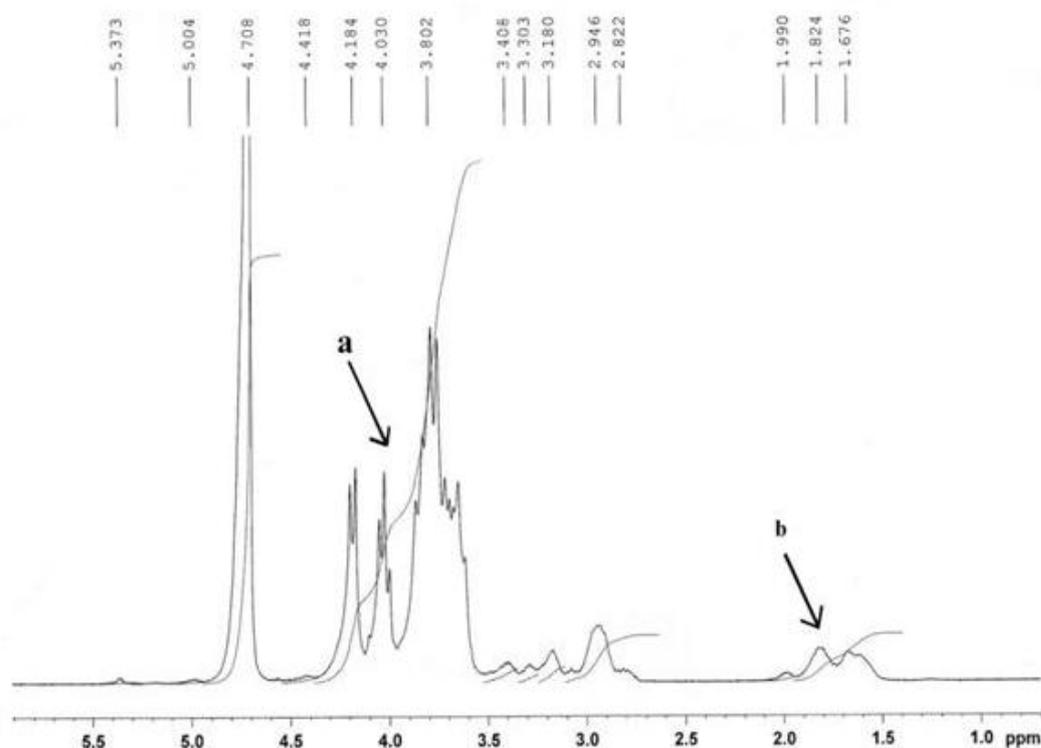


Figura 3.1. Tipico spettro ^1H NMR del copolimero INU-Spm in D_2O . **a**: segnali dei protoni $-\text{OCH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}(\text{O})-\text{CH}_2(\text{OH})$ appartenenti all'unità ripetitiva dell'Inulina; **b**: segnali dei protoni $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ appartenenti alla Spermina.

I prodotti ottenuti dopo purificazione sono stati analizzati mediante analisi ^1H NMR in D_2O (**Figura 3.1**) e FT-IR, al fine di confermare l'avvenuta coniugazione e la struttura del derivato, e calcolare il grado di derivatizzazione molare (DDmol%) in spermina, definito come il rapporto percentuale tra le moli di spermina legata rispetto alle unità ripetitive di fruttosio dell'inulina. Il DDmol% è stato calcolato paragonando l'integrale dei segnali relativi ad 8 protoni della spermina, compresi tra δ 1,5 e δ 2 ppm, con l'integrale dei segnali relativi ai 7 protoni dell'unità ripetitiva di fruttosio dell'inulina, compresi tra δ 3,5 e δ 4,25 ppm.

Sono stati effettuati numerosi tentativi di reazione variando le condizioni operative e in particolare sono state eseguite sia reazioni con metodica convenzionale sia reazioni con metodica EMS. Nella **Tabella 3.1** sono riportate le condizioni delle reazioni eseguite e i risultati ottenuti in termini di resa (p/p, rispetto al peso dell'inulina di partenza) e DDmol%.

Come si osserva, in condizioni di reazione classiche la funzionalizzazione dell'inulina è bassa sia a 40°C che a 25°C, essendo il DDmol% pari a 2.6 e 0.8% rispettivamente. La tecnica EMS provoca, invece, un aumento della reattività del sistema ed in particolare durante lo step di attivazione. Infatti, incrementando il tempo di attivazione da 20 minuti a 1 ora e mantenendo costanti le condizioni di coniugazione della Spm (reazioni INU-Spm5 e INU-Spm4 in **Tabella 3.1**), si osserva un incremento del DDmol% dall'1.7% all'8%. D'altra parte, mantenendo le stesse condizioni di attivazione e modificando le condizioni di coniugazione della Spm, cioè prolungando il tempo di reazione a 4h a temperatura ambiente (reazioni INU-Spm3 e INU-Spm5 in **Tabella 3.1**), il DDmol% non differisce significativamente. È stato inoltre osservato che, incrementando il rapporto molare tra la Spm e il PNFC da 2 a 5, si ottiene un effetto rilevante sul DDmol% (reazioni INU-Spm4 e INU-Spm6 in **Tabella 3.1**).

Tabella 3.1. Condizioni di reazione per la sintesi dei copolimeri INU-Spm e relative caratteristiche.

Reazione	R ₁ ⁽¹⁾	R ₂ ⁽²⁾	Attivazione con PNFC	Coniugazione della Spm	Resa % (p/p)	DD _{mol} %
Inu-Spm1	0.5	2	4h, 40°C	24h, 25°C	24.5%	2.6%
Inu-Spm2	0.5	2	4h, 40°C	24h, 40°C	41.5%	0.8%
Inu-Spm3	0.5	2	20', 60°C, 25W	1h, 60°C, 15- 18W	53.5%	3.7%
Inu-Spm4	0.5	2	1h, 60°C, 25W	1h, 60°C, 25W + 4h, T _{amb}	71.7%	8.0%
Inu-Spm5	0.5	2	20', 60°C, 25W	1h, 60°C, 25W + 4h, T _{amb}	40.0%	1.7%

Inu-Spm6	0.5	5	1h, 60°C, 25W	1h, 60°C, 25W + 4h, T _{amb}	67.0%	16.0%
⁽¹⁾ : R ₁ = mmol BNPC/mmol of fructose units of inulin						
⁽²⁾ : R ₂ = mmol Spm/mmol BNPC						

I derivati ottenuti con vari gradi di derivatizzazione sono stati analizzati mediante cromatografia a esclusione dimensionale (SEC) per valutare il peso molecolare medio pesato e la polidispersità del polimero ottenuto, nonché la variazione del peso molecolare rispetto all'inulina non funzionalizzata di partenza. I pesi molecolari ottenuti, riportati in **Tabella 3.2**, sono in accordo con i gradi di derivatizzazione ottenuti mediante ¹H NMR: ad esempio i pesi molecolari teorici previsti per INU-Spm4 e INU-Spm6, rispettivamente pari a 6842 e 8685 Da, risultano in buono accordo con il valore ottenuto mediante SEC, uguale rispettivamente a 6471 e 8708 Da (Mw/Mn =1.3).

Tabella 3.2. Caratteristiche molecolari dei copolimeri INU-Spm.

copolimero	DDmol%	Mw (Da)	PD (Mw/Mn)
Inulina	0.0%	4881	1.5
Inu-Spm1	2.6%	5990	1.4
Inu-Spm2	0.9%	5926	1.4
Inu-Spm3	3.7%	6139	1.4
Inu-Spm4	8.0%	6471	1.3
Inu-Spm5	1.8%	5223	1.5
Inu-Spm6	16%	8708	1.3

Inoltre, dall'analisi non emergono frazioni a basso peso molecolare e i valori di polidispersità sono in tutti i casi inferiori a 1.5, il che dimostra l'assenza di fenomeni importanti di degradazione dell'inulina durante la funzionalizzazione nelle condizioni sperimentali utilizzate.

Considerando il DDmol% e il peso molecolare, le indagini successive sono state condotte sui derivati INU-Spm4 e INU-Spm6. Per tali derivati, considerando il numero di monomeri per catena di inulina pari a 36, come riportato nelle specifiche tecniche fornite dal produttore, e considerando il loro DDmol%, si può assumere che tali derivati contengono un numero medio di molecole di spermina per catena pari rispettivamente a 3 e 6.

Buffering capacity.

Uno degli step più importanti del processo di transfezione è la fuga endo-lisosomiale dei nanosistemi prima che si instaurino processi degradativi o che il contenuto vescicolare venga esocitato. Il rilascio dal compartimento endo-lisosomiale dei polimeri è notoriamente influenzato dalla loro capacità di tamponare l'ambiente intravesicolare durante il processo di acidificazione e cioè dalla capacità di buffering intrinseca del materiale.

Per determinare la capacità di buffering dei derivati INU-Spm4 e INU-Spm6, sono stati condotti degli esperimenti di titolazione di soluzioni dei copolimeri, in un range di pH compreso tra 10 e 2.

La **Figura 3.2**, mostra le curve ottenute registrando il valore di pH dopo successive aggiunte di acido cloridrico diluito a soluzioni di INU-Spm4, INU-Spm6, inulina (controllo negativo) e PEI (controllo positivo).

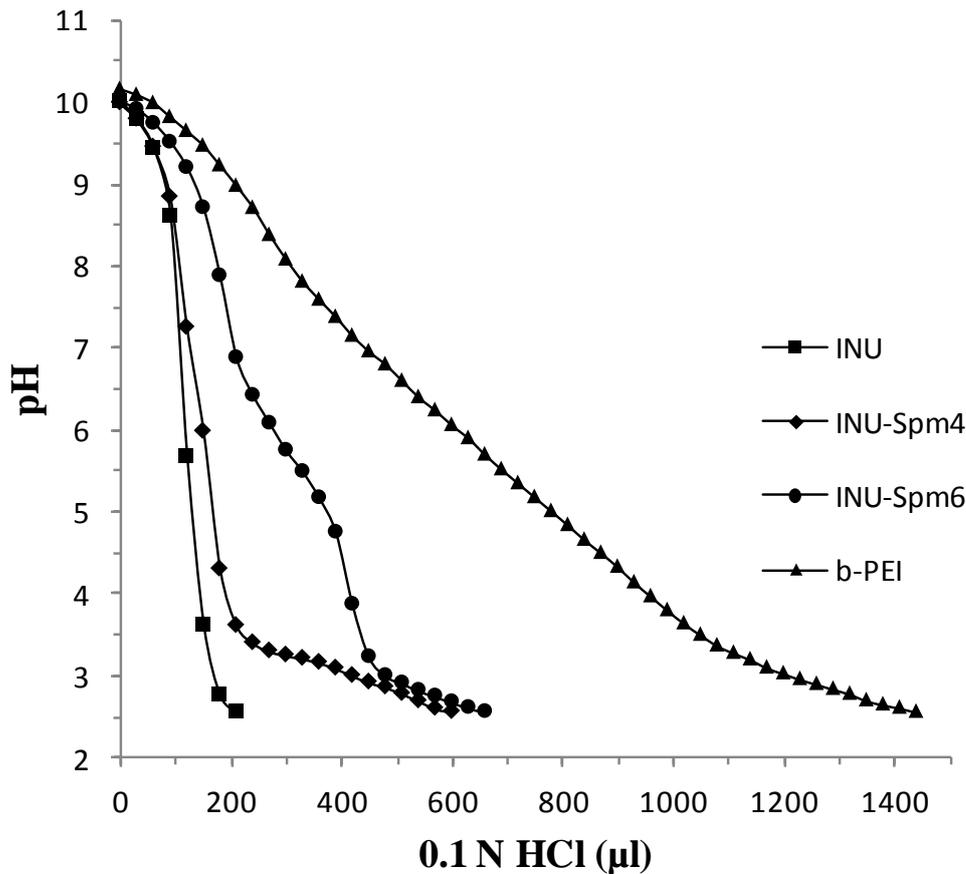


Figura 3.2. Titolazione acido base dei copolimeri INU-Spm4 e INU-Spm6.

Come si può osservare, mentre l'inulina non mostra alcuna resistenza alla variazione di pH durante l'acidificazione, dovuta alla mancanza nella sua struttura di gruppi protonabili, le soluzioni contenenti i due derivati hanno richiesto crescenti volumi di HCl per variare il pH da 7.4 a 5.1, grazie alla presenza di crescenti quantità di spermina. Le capacità di buffering relative (%), calcolate come riportato nella sezione sperimentale della tesi, sono risultate essere maggiori rispetto a quella determinata per la PEI, polimero che notoriamente possiede elevate capacità di fuga endo-lisomiale mediante l'effetto tampone, comunemente definito di spugna protonica. I valori ottenuti per INU-Spm4, INU-Spm6 e PEI sono risultati essere pari a 58, 74 e 27% rispettivamente.

Studi di complessazione.

L'abilità dei copolimeri ottenuti ad agire come NABD delivery systems, è stata valutata mediante elettroforesi su gel d'agarosio all'1.5% p/v. In particolare, è stata valutata la capacità dei copolimeri INU-Spm4 e INU-Spm6, aventi un DDmol% in spm dell'8 e del 16% rispettivamente, di ritardare la corsa elettroforetica di un oligonucleotide a base di DNA costituito da 21 pb utilizzato come modello di NABD. I complessi sono stati formati in HBG per un tempo di 30 minuti, aggiungendo a una quantità fissa di DNA uguali volumi di soluzioni di copolimero variamente concentrate in modo da ottenere rapporti in peso copolimero/DNA (R) crescenti, nel range tra 1 e 30 nel caso di INU-Spm4 e tra 1 e 5 per INU-Spm6.

Come si può osservare in **Figura 3.3**, la capacità di migrazione del DNA decresce gradualmente al crescere dell'R per entrambi i copolimeri, fino ad arrestarsi completamente quando la quantità di copolimero è sufficiente a complessare completamente il NABD. In particolare mentre per il copolimero INU-Spm4 il rapporto in peso copolimero/DNA al quale si ha la complessazione del NABD è risultato pari a 7, per il copolimero INU-Spm6 tale rapporto è inferiore, pari a 3, il che suggerisce che l'efficacia di complessazione aumenta all'aumentare del DDmol%.

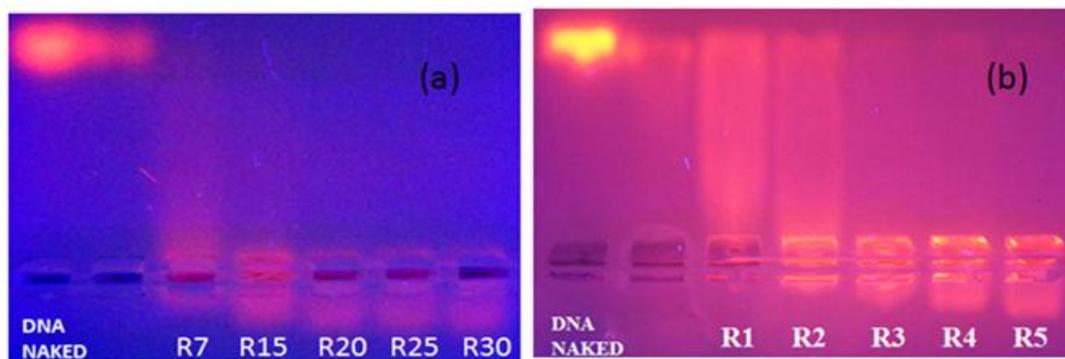


Figura 3.3. Elettroforesi su gel d'agarosio dei poliplessi INU-Spm4/DNA (a) e INU-Spm6/DNA (b).

Proprietà biofisiche: dimensioni carica superficiale e morfologia dei poliplessi.

Le proprietà biofisiche dei poliplessi, quali dimensioni, morfologia e carica superficiale, ricoprono un ruolo molto importante in quanto determinano la loro interazione con le componenti dell'ambiente biologico e il superamento delle barriere che esso comprende ed in particolare hanno un ruolo fondamentale nella transfezione, ovvero possono essere dei fattori discriminanti per l'internalizzazione e per il destino intracellulare, così come avviene per altri fattori quali la composizione del materiale e il tipo di cellula.

Anche se molti metodi (come DLS, AFM, NTA, FCS, TEM) possono essere impiegati con successo per determinare le proprietà biofisiche di nanoparticelle omogenee, per i poliplessi, costituiti spesso da popolazioni eterogenee e derivanti da polimeri solubili in mezzo acquoso per interazione elettrostatica con componenti altrettanto solubili di carica opposta, l'utilizzo di una singola tecnica porta spesso a una non chiara descrizione delle reali caratteristiche, e dunque ad una non corretta interpretazione dei risultati. Per questo motivo, è stata utilizzata una combinazione di 2 metodiche, una basata sull'analisi microscopica diretta, la Microscopia a Trasmissione Elettronica (TEM), e una tecnica basata sull'osservazione indiretta dell'intensità della luce scatterata dal sistema in dispersione, il Dynamic Light Scattering (DLS).

I dati ottenuti mediante DLS, riportati in **Tabella 3.3**, rivelano che il copolimero INU-Spm4 forma, ai rapporti in peso copolimero/DNA considerati, nanostrutture con una distribuzione dimensionale nel range tra circa 200 e 550 nm mentre, il copolimero INU-Spm6 forma con il DNA complessi con un diametro medio compreso tra 260 e 390 nm circa.

Tabella 3.3. Dynamic Light Scattering dei poliplessi

INU-Spm/DNA		
INU-Spm4/DNA		
C/DNA	Diam.(nm)	PDI
3	548	0.58
7	266	0.53
15	237	0.67
20	196	1.00
INU-Spm6/DNA		
C/DNA	Diam.(nm)	PDI
3	396	1.00
6	249	0.26
9	268	0.58

Tenendo in considerazione i valori dell'indice di polidispersità (PDI), che appaiono elevati, si può affermare che nelle condizioni sperimentali utilizzate avvengono fenomeni di aggregazione dei poliplessi. Questo è stato ulteriormente dimostrato dall'analisi TEM, di cui immagini rappresentative sono riportate in **Figura 3.4**, che rivela la coesistenza di un'ampia popolazione di poliplessi le cui dimensioni si aggirano intorno ai 50 nm, insieme ad aggregati di dimensioni maggiori, paragonabili a quelle ottenute dall'analisi DLS. In entrambi i casi comunque, le dimensioni dei poliplessi non superano i 500 nm di diametro, che risulta piccolo abbastanza da poter considerare per la somministrazione tutte le vie, compresa quella endovenosa.

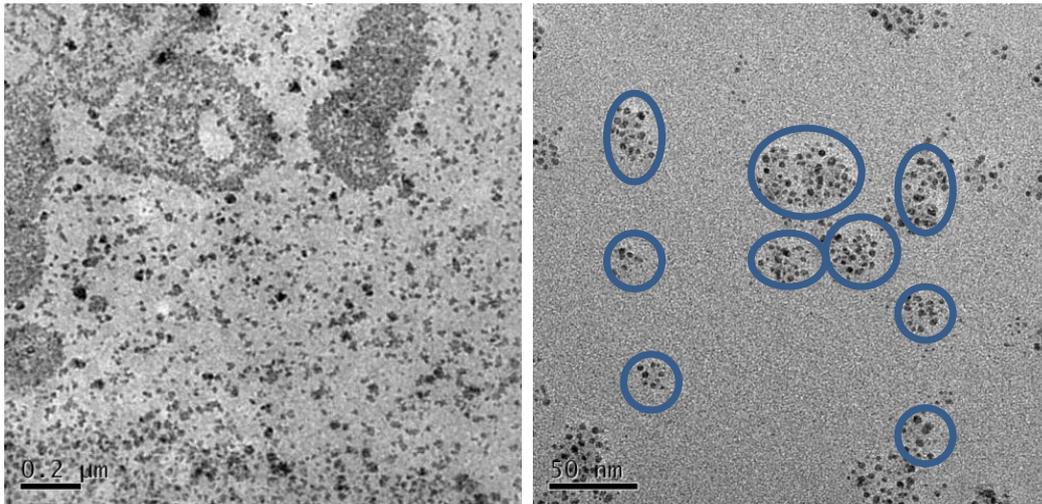


Figure 3.4. Immagini TEM rappresentative dei poliplessi INU-Spm6/siRNA ($R=6$). Magnification: 10000X (immagine a sinistra); 60000X (immagine a destra).

Dalle misure di mobilità elettroforetica, per estrapolazione dall'equazione di Smoulowski, si osserva che, incrementando il rapporto in peso copolimero/DNA, il potenziale ζ dei poliplessi aumenta. Le curve dell'andamento del potenziale ζ in funzione di R sono riportate in **Figura 3.5**.

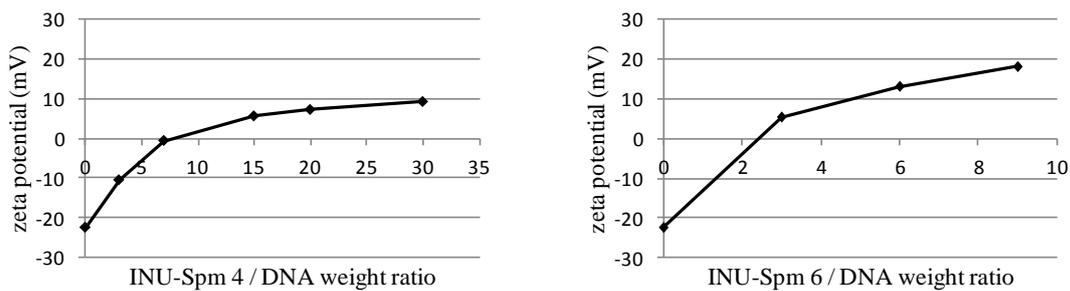


Figura 3.5. Andamento del potenziale ζ dei poliplessi in funzione del rapporto in peso copolimero/DNA.

In particolare, partendo da un valore di -22 mV relativo al DNA non complessato, il potenziale si annulla ad $R=7$ per i poliplessi INU-Spm4/DNA e circa a $R=3$ per i poliplessi INU-Spm6/DNA. Tali dati sono in accordo con i risultati degli esperimenti di elettroforesi e con i dati dimensionali, in cui maggiori dimensioni e polidispersità sono relative a poliplessi con una carica superficiale vicina alla neutralità.

Stabilità dei poliplessi INU-Spm/siRNA.

I polimeri utilizzati nella veicolazione di NABD hanno l'importante ruolo di proteggerli dalla degradazione ad opera di enzimi, quali le nucleasi sieriche, ruolo che è mantenuto fintanto che il NABD si trova nello stato complessato. Il disassemblamento prematuro dei complessi può essere causato dall'azione di macromolecole cariche negativamente che si trovano disperse nel torrente circolatorio e che possono spiazzare il NABD dall'interazione con il policatione e sostituirsi ad esso. Una di queste macromolecole e la più rappresentativa è certamente l'albumina, la componente proteica più abbondante del sangue [A. Aied et al., 2013].

Al fine di determinare la stabilità allo scambio polianionico dei poliplessi INU-Spm6/siRNA, è stato condotto uno studio in vitro in cui i complessi appena formati sono stati incubati con una dispersione di albumina sierica bovina per un tempo di 4 h, dopo le quali è stato valutato l'eventuale spiazzamento del siRNA dai poliplessi mediante elettroforesi su gel d'agarosio.

Come è possibile notare dalla **Figura 3.6**, l'albumina non è in grado, nelle condizioni sperimentali utilizzate di produrre uno spiazzamento dell'oligonucleotide dal poliplesso, dimostrando che in un tempo complessivo di 4h i complessi rimangono integri e il siRNA è ancora protetto all'interno della struttura del poliplesso.

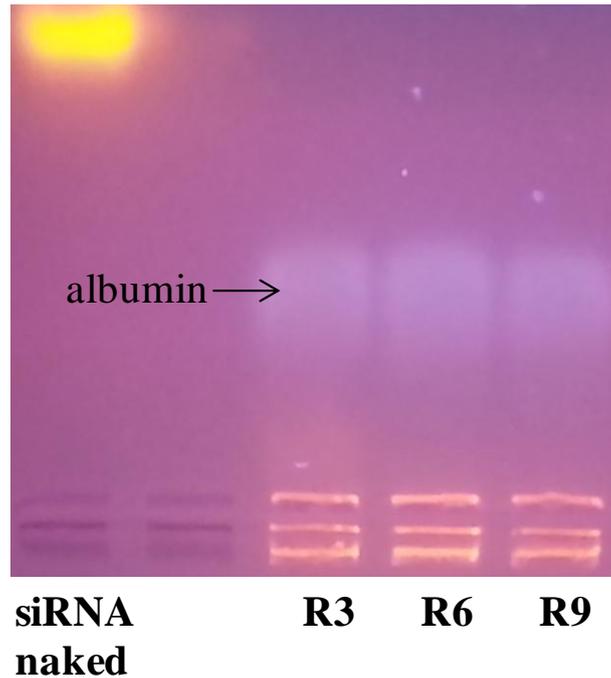


Figure 3.6. Elettroforesi su gel d'agarosio dei poliplessi of INU-Spm6/siRNA a vari rapporti in peso copolimero/siRNA (R) dopo 4 h di incubazione con albumina.

Studi di citocompatibilità in vitro.

Anche se i polimeri per la veicolazione di acidi nucleici risultano vantaggiosi rispetto ai vettori virali dal punto di vista della capacità di produzione su larga scala e della bassa risposta immunitaria e sicurezza a seguito di somministrazione, la tossicità a livello cellulare di tali sostanze rappresenta ancora un ostacolo frequente [B. Ballarín-González et al., 2012; H. Lv et al., 2006].

I copolimeri INU-Spm4 and INU-Spm6 ed i poliplessi da essi ottenuti mediante complessazione di un siRNA modello (siGL3) sono stati testati in vitro per valutarne gli effetti sulla vitalità di cellule non tumorali, di epitelio bronchiale umano (16HBE). In seguito ad incubazione per 4h e 24h dei complessi a vari rapporti in peso copolimero/siRNA la vitalità cellulare è stata valutata mediante il saggio MTS. Questo saggio colorimetrico sfrutta la riduzione, da parte delle cellule biologicamente attive, del composto tetrazolico MTS (3-(4,5-dimetiltiazolo-2-il)-5-(3-carbossimetossifenil)-2-(4-solfifenil) 2H- tetrazolio) nel prodotto formazano colorato. Il sale, metabolizzato

dalle deidrogenasi mitocondriali di cellule metabolicamente attive, viene rilasciato nel terreno di coltura e l'assorbanza del prodotto colorato può essere misurata a 490 nm, avendo così una stima delle cellule vitali presenti in coltura. I risultati del saggio MTS sono riportati in **Figura 3.7**. Sono stati inoltre testati i copolimeri INU-Spm4 and INU-Spm6 a concentrazioni pari a $65 \cdot 10^{-3}$ e $39,15 \cdot 10^{-3}$ mg/ml rispettivamente, che corrispondono alle più alte concentrazioni dei copolimeri presenti nei poliplessi ai rapporti testati. I risultati mostrano che sia i poliplessi contenenti INU-Spm4 ed INU-Spm6 sia i copolimeri tal quali non hanno una apprezzabile tossicità sulla linea cellulare utilizzata, confermando la possibilità di utilizzare tali sistemi per la veicolazione di NABD.

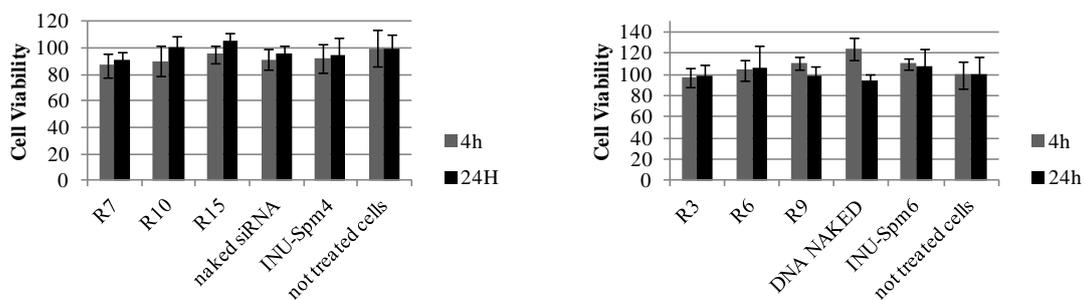


Figure 3.7. Citocompatibilità in vitro dei copolimeri INU-Spm4 (grafico a sinistra) e INU-Spm6 (grafico a destra) e dei poliplessi da essi ottenuti per complessazione con il siGL3 a vari rapporti in peso copolimero/siRNA (R).

Studi di transfezione.

Al fine di valutare l'efficacia dei nuovi sistemi di agire come NABD delivery systems, sono stati condotti studi di transfezione in vitro, utilizzando i poliplessi ottenuti dal copolimero INU-Spm6, in considerazione del suo più elevato grado di funzionalizzazione e della stabilità dei poliplessi da esso ottenuti. L'efficienza di transfezione è stata valutata mediante un saggio per valutare la regolazione dell'mRNA che codifica per la luciferasi, enzima capace di catalizzare la reazione di conversione del

suo substrato, la luciferina, in ossiluciferina ed energia sottoforma di radiazione luminosa.

A tal scopo, cellule 16HBE sono state transfettate con un plasmide che codifica per la luciferasi (pGL3), utilizzando un transfettante commerciale, il Turbofect (TF), e successivamente tali cellule sono state trattate con i poliplessi costituiti dal copolimero INU-Spm6 e dal siRNA siGL3, il cui bersaglio è l'mRNA specifico della luciferasi. I risultati di tale studio sono mostrati in **Figura 3.8**. L'efficienza nella riduzione dell'espressione della proteina target, la luciferasi, aumenta all'aumentare del rapporto in peso copolimero/siRNA, a parità della concentrazione di siRNA utilizzata, giungendo per R=9 a una riduzione significativa di circa il 70% dell'espressione, comparata alla luminescenza osservata per cellule esprimenti il 100% della luciferasi, ovvero cellule transfettate solamente con il complesso pGL3/TF e non ulteriormente trattate con siRNA, nudo o complessato. Tale effetto può essere spiegato ipotizzando che per i complessi contenenti una quantità maggiore di copolimero carico positivamente si abbia una maggiore interazione del sistema con le cellule e una conseguente maggiore internalizzazione.

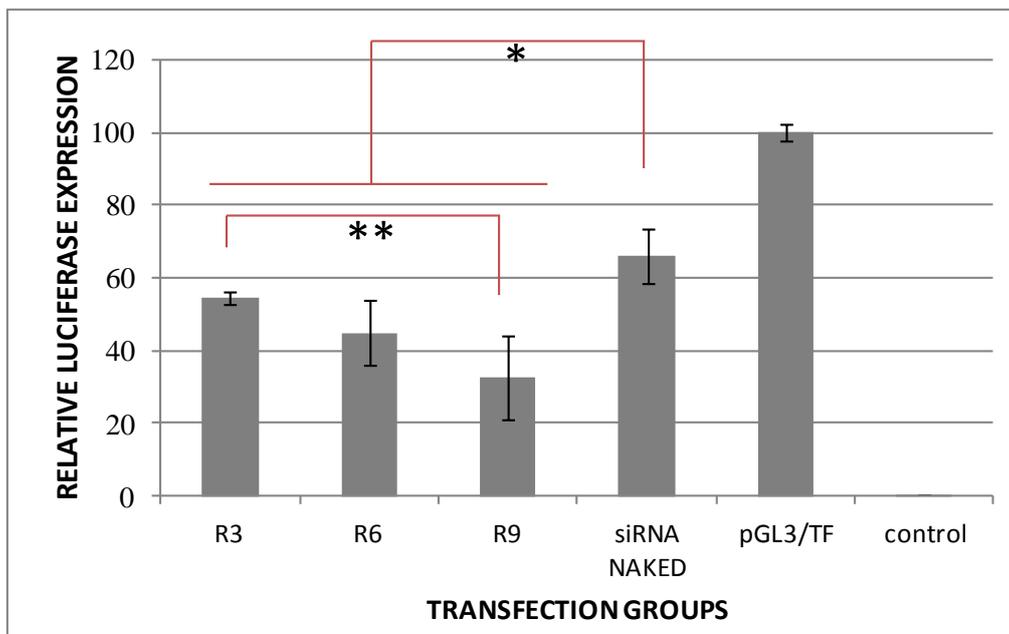


Figura **3.8**. Studi di transfezione in vitro, su cellule 16HBE, dei poliplessi INU-Spm6/siGL3 a vari rapporti in peso copolimero/siRNA (R). (* $p \leq 0,03$; ** $p = 0,05$).

3.1.2. Copolimeri INU-DETA per la veicolazione di NABD.

La dietilenetriammina (DETA) è una molecola contenente 3 gruppi amminici, di cui uno secondario e due primari, il cui pKa è compreso tra 4.7 (gruppo amminico secondario) e 9-10 (gruppi amminici primari) [E.J. Montemayor, 2008]. Quando tale oligoammina è legata ad un backbone polimerico attraverso uno dei suoi gruppi amminici primari, la porzione 1,2-diaminoetano, che risulta libera in catena laterale, possiede interessanti proprietà, attribuibili al pKa dei gruppi amminici e alla lunghezza della porzione carboniosa. In pratica, la porzione 1,2-diamminoetano subisce una protonazione a due step, passando da un pH neutro ad un pH acido pari a 5, accompagnata da una variazione conformazionale da *gauche*, per la forma monoprotionata a pH 7.4, ad *anti*, per la forma diprotionata a pH 5. Le due forme interagiscono in maniera differente con le membrane cellulari: la forma diprotionata in conformazione *anti* risulterebbe infatti in grado di interagire e destabilizzare le membrane biologiche, a differenza della forma monoprotionata in conformazione *gauche* che invece non sarebbe in grado di interagire con le membrane e di perturbarne l'integrità.

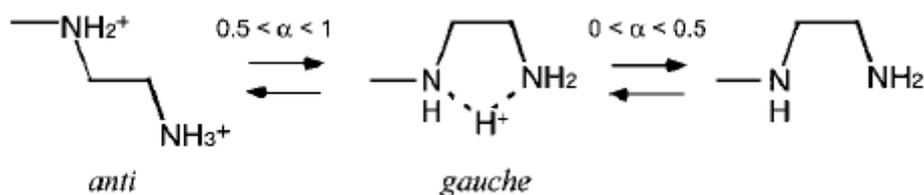
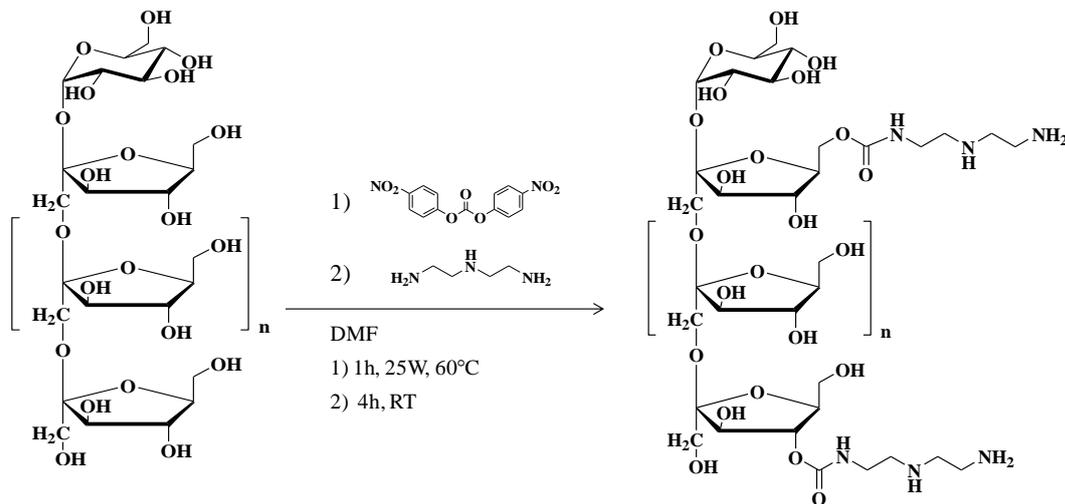


Figura 3.9. Struttura della porzione 1,2-diamminoetano e conformazioni anti e gauche assunte nei due differenti stati di protonazione [K. Miyata et al., 2008].

Questo suggerisce che, una volta legata, la DETA non solo conferirebbe le caratteristiche di policatione alla struttura del copolimero risultante rendendolo un potenziale materiale idoneo alla formazione di poliplessi ma, dopo internalizzazione del sistema, sarebbe in grado di produrre un'indebolimento della membrana a livello endolisomiale durante il processo di acidificazione (pH 5.1), indebolimento che non avverrebbe a livello della membrana citoplasmatica in condizioni normali (pH 7.4), portando al successo della transfezione senza compromettere l'integrità della membrana plasmatica e la vitalità cellulare. [K. Miyata et al., 2008].

La sintesi del copolimero Inulina-Dietilentriammina (Inu-DETA) (Schema1) è stata condotta attivando i gruppi ossidrilici dell'Inulina con il PNFC utilizzando la tecnica dell'Enhanced Microwave Synthesis (EMS). L'inulina attivata è stata immediatamente funzionalizzata con molecole di DETA in assenza di irradiazione alle microonde, e senza isolare l'intermedio attivato dell'inulina.



Schema 3.2. Sintesi del copolimero Inulina-Dietilentriammina (INU-DETA).

Il prodotto ottenuto dopo purificazione è stato analizzato mediante analisi ^1H NMR in D_2O (**Figura 3.10**), al fine di confermare l'avvenuta coniugazione e la struttura del derivato, e calcolare il grado di derivatizzazione molare (DDmol%) in DETA, paragonando l'integrale dei segnali relativi ad 8 protoni della DETA, compresi tra δ 2.68 e δ 3.2, con l'integrale dei segnali relativi ai 7 protoni dell'unità ripetitiva di fruttosio dell'inulina, compresi tra δ 3,5 e 4,5. Il DDmol% in DETA è risultato pari al 28 mol %.

Il copolimero Inu-DETA, analizzato mediante analisi SEC, ha riportato un peso molecolare medio pesato (M_w) pari a 5913 Da ($M_w/M_n = 1.31$). L'ottenimento di un peso molecolare superiore a quello dell'Inulina di partenza (5280 Da) e compatibile con la funzionalizzazione ottenuta, supporta l'ipotesi che l'impiego della tecnica EMS nelle condizioni utilizzate e la reazione di funzionalizzazione del polisaccaride con la DETA non implicino fenomeni degradativi a carico delle molecole di Inulina.

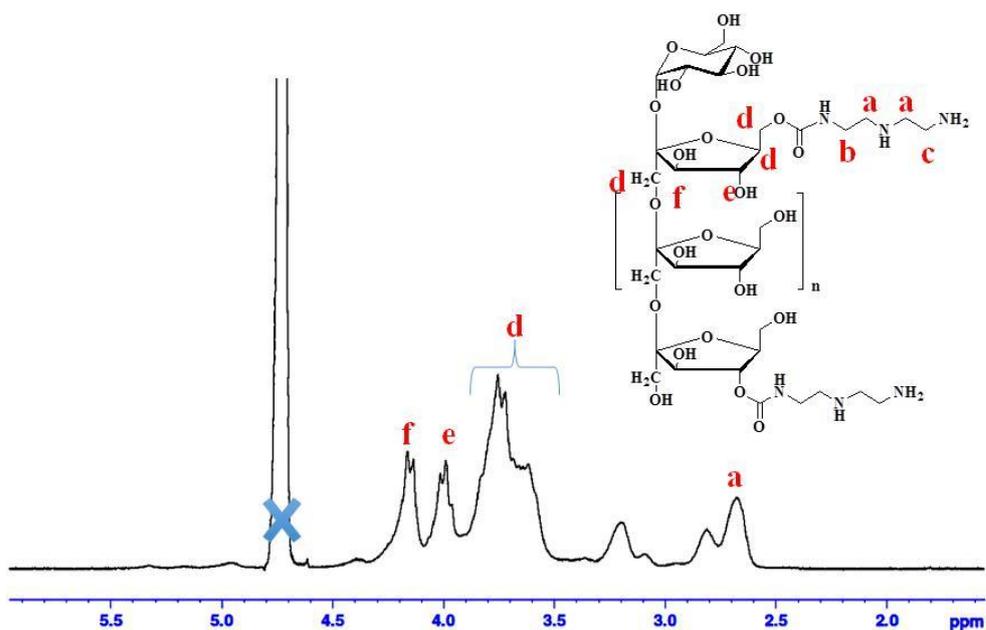
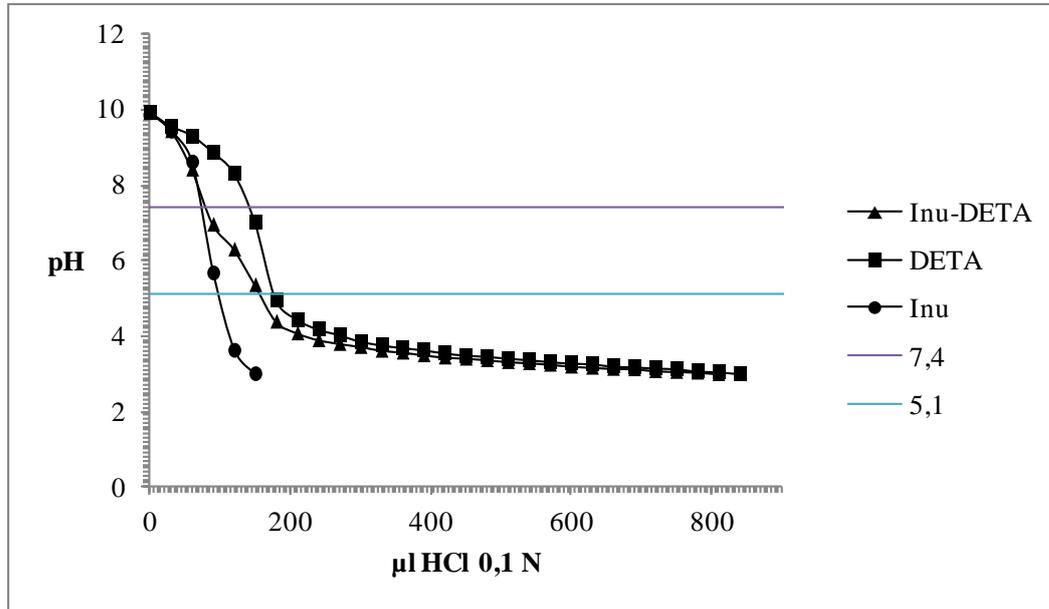


Figura 3.10. Spettro $^1\text{H-NMR}$ del copolimero INU-DETA.

Capacità tamponante.

Al fine di valutare il possibile coinvolgimento del proton sponge effect nel funzionamento del copolimero Inu-DETA come vettore di siRNA, è stata valutata la capacità tampone di una soluzione acquosa di Inu-DETA mediante titolazione acido-base. Sono stati presi in considerazione, inoltre, la capacità tamponante di una soluzione di DETA, contenente una quantità di DETA uguale a quella legata al polimero Inu-DETA, nonché le proprietà tamponanti di una soluzione di sola Inulina. I dati ottenuti sono riportati in **Figura 3.11**. Dal confronto si evince che la curva risultante per Inu-DETA presenta una pendenza meno ripida di quella dell'Inulina. Si può quindi affermare che il legame di questa ammina all'Inulina aumenta le proprietà tamponanti del polisaccaride di partenza nel range di pH compreso tra 7.4 e 5.1. Ciò rappresenta un vantaggio nella terapia con siRNA, in quanto una maggiore capacità tamponante in tale range di pH risulta fondamentale per permettere al sistema vettoriale di evadere le barriere intracellulari, quali gli endosomi, rilasciare il siRNA nel citosol e indurre il meccanismo di interferenza.



Properties of Inulin, Inu-DETA and DETA

Compound	pKa	pH ^b	Relative Buffering capacity ^c	Mw (Mw/Mn) ^d
Inulin	12,03 (fructose)	5.60	/	5218 (1.46)
Inu-DETA	/	8.92	53%	5913 (1.31)
DETA	9.94; 9.23; 4.78 ^(a)	9.54	13%	103.17

a. in water at 25 °C

b. in water at 25 °C, at a concentration of 0.2 mg/ml

c. $(\Delta V_{HCl_{7.4-5.1}} \cdot 0,1M) \cdot 100/Nmol$

d. Determined by aqueous SEC analysis (pullulan standards calibration)

Figura 3.11. Valutazione capacità tamponante di Inulina, DETA e del copolimero Inu-DETA .

Studi di complessazione del copolimero Inu-DETA con il siRNA e caratterizzazione dei poliplessi.

La capacità del copolimero Inu-DETA di complessare il siRNA è stata valutata mediante analisi elettroforetica su gel d'agarosio. Confrontando la migrazione del siRNA tale quale con quella dei poliplessi (**Figura 3.12A**) si evince che il copolimero Inu-DETA blocca in maniera efficiente la corsa elettroforetica del siRNA a rapporti

copolimero/siRNA maggiori o uguali a 7. Come si può notare, al rapporto inferiore, pari a 5, il copolimero è ancora in grado di interagire con il siRNA, formando una popolazione di complessi, probabilmente polidispersi, che rallentano la corsa del siRNA verso il polo positivo.

Sono stati inoltre condotti studi per la determinazione del potenziale ζ dei poliiplessi Inu-DETA/siRNA formati in DPBS, a rapporti in peso polimero/siRNA compresi tra 3 e 50. I valori di potenziale ζ , riportati nella **Figura 3.12B**, mostrano che incrementando la quantità in peso di copolimero utilizzato per la formazione dei poliiplessi, il potenziale ζ aumenta; in particolare, partendo da un valore di -30 mV relativo al siRNA non complessato, il potenziale ζ diventa positivo a un rapporto in peso pari a 7, raggiungendo un massimo di circa 40 mV a R=40.

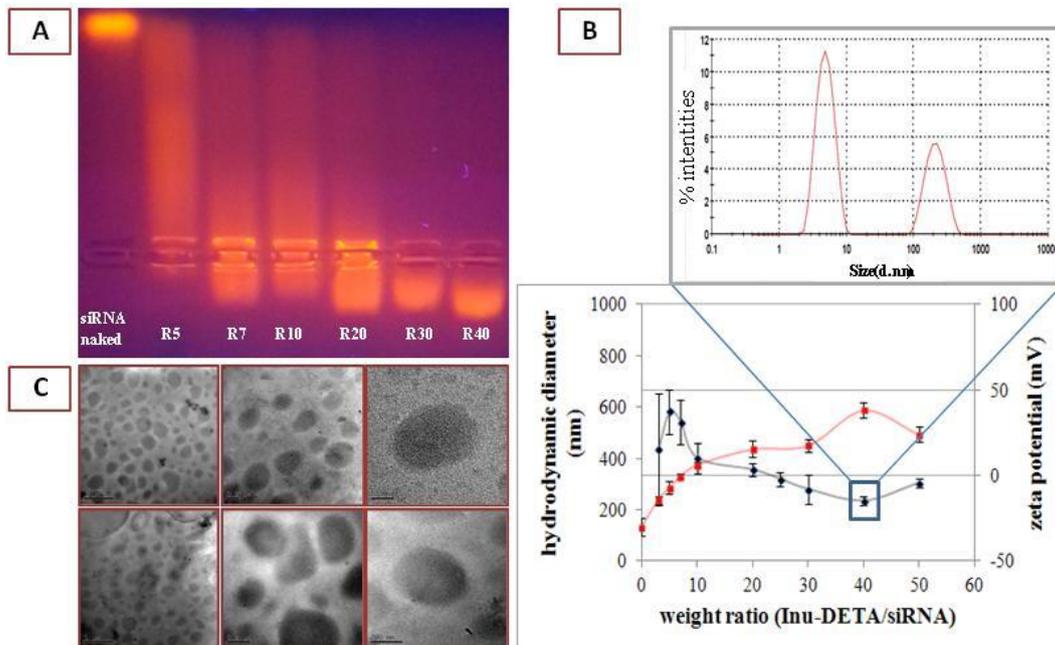


Figura 3.12. Caratterizzazione dei poliiplessi INU-DETA/siRNA. (A) elettroforesi su gel d'agarosio dei poliiplessi a vari rapporti in peso copolimero/siRNA (R); (B) andamento delle dimensioni (indicatori neri) e del potenziale ζ (indicatori rossi) al variare di R; (C) immagini TEM rappresentative dei poliiplessi a R 20.

I dati ottenuti risultano, quindi, concordanti con quelli ottenuti dall'elettroforesi su gel d'agarosio. Le dimensioni dei poliiplessi nello stesso range di rapporti in peso

copolimero/siRNA, 3 e 50, è stata valutata mediante misure di DLS. I dati ottenuti mostrano come, intorno a $R=7$ i poliplessi abbiano dimensioni più elevate e siano più eterogenei, mentre, all'aumentare del rapporto copolimero/siRNA oltre $R=10$, diminuiscono le dimensioni dei poliplessi, che rimangono tra 200-400 nm. Le maggiori dimensioni dei poliplessi tra $R=5$ ed $R=7$, per i quali i valori di potenziale ζ sono vicini alla neutralità, suggeriscono che in tali condizioni si verifichino per i sistemi analizzati dei fenomeni di aggregazione. Tali fenomeni diminuiscono, e quindi le dimensioni degli oggetti osservati in dispersione mediante DLS si riducono, utilizzando valori di R maggiori di 7, condizioni in cui il potenziale diventa positivo.

Le dimensioni sono state inoltre confermate dall'analisi di Microscopia a Trasmissione Elettronica, di cui immagini rappresentative sono riportate in **Figura 3.12C**.

Stabilità dei poliplessi INU-DETA/siRNA.

Al fine di valutare la stabilità dei poliplessi Inu-DETA/siRNA allo scambio polianionico, è stata impiegata l'albumina, in ragione della sua abbondanza nel siero umano e della sua carica negativa. L'elettroforesi dopo 4 e 8h di incubazione dei poliplessi con l'albumina (**Figura 3.13**), mostrano che i complessi anche a bassi rapporti in peso copolimero/siRNA mostrano una buona stabilità.

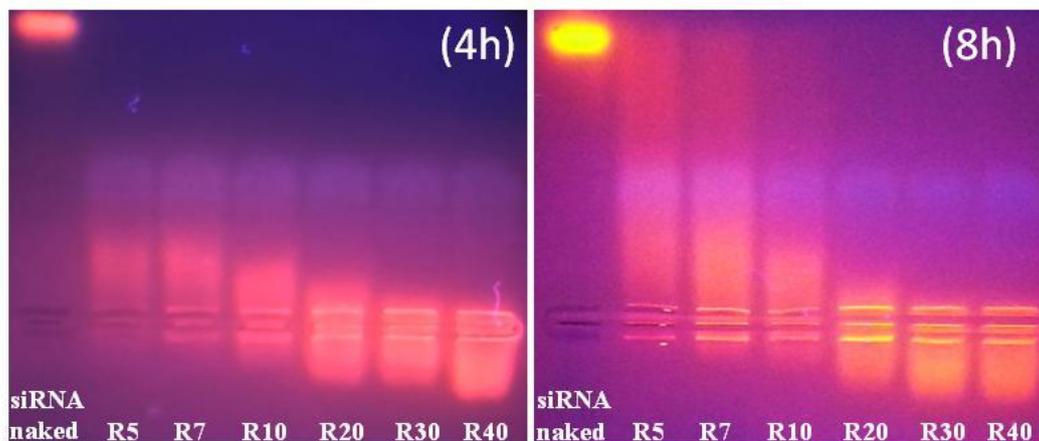


Figura 3.13. Stabilità dei poliplessi INU-DETA/siRNA a vari rapporti in peso copolimero/siRNA (R) in presenza di albumina dopo 4 e 8 h di incubazione.

Studi di citocompatibilità in vitro.

Il copolimero Inu-DETA, il siRNA tal quale, i poliplessi ottenuti dall'interazione tra il copolimero e il siRNA, sono stati testati su cellule 16HBE e JHH6, al fine di valutarne i possibili effetti citotossici dopo 4, 24 e 48 h. La vitalità cellulare percentuale delle cellule trattate sia con il copolimero sia con i complessi è, per l'intero range di concentrazioni, compresa tra l'85 e il 100%, su entrambe le linee cellulari. I risultati sono mostrati in **Figura 3.14 e 3.15.**

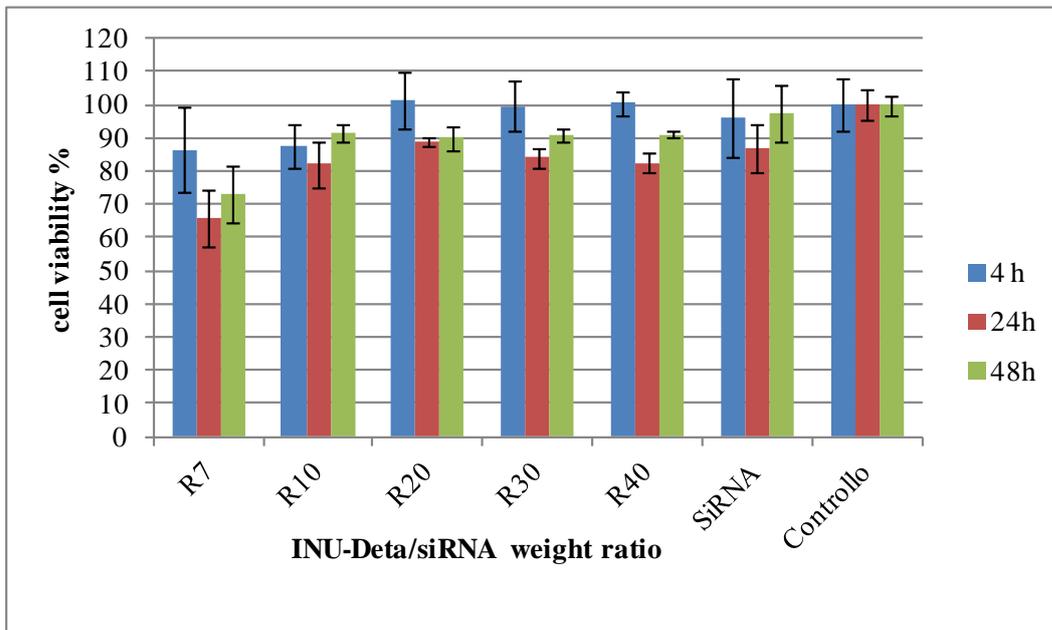
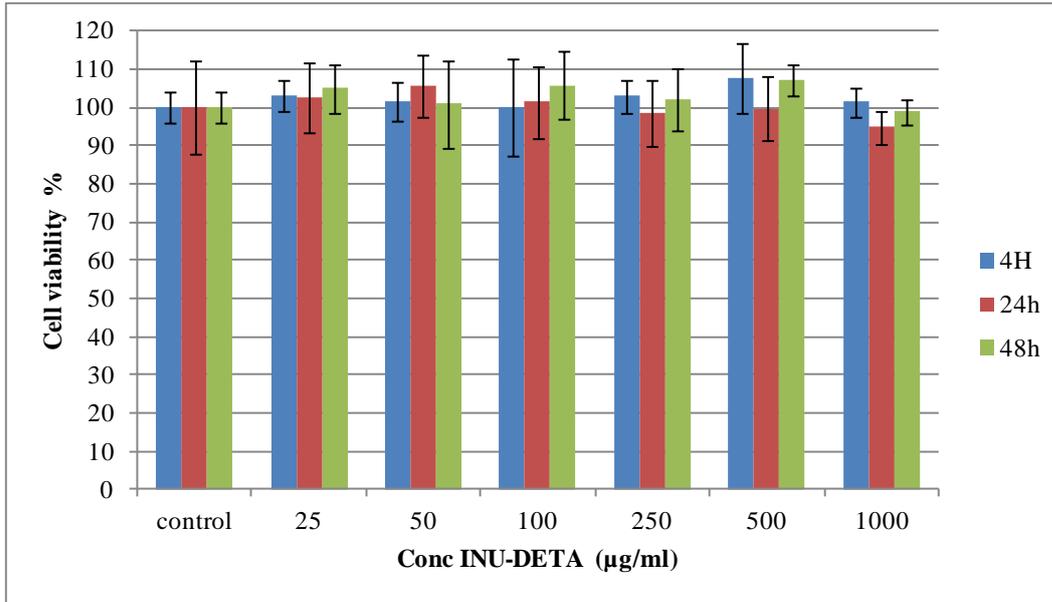


Figura 3.14. Studi di citocompatibilità di INU-DETA e dei poliplessi INU-DETA/siRNA su cellule JHH6.

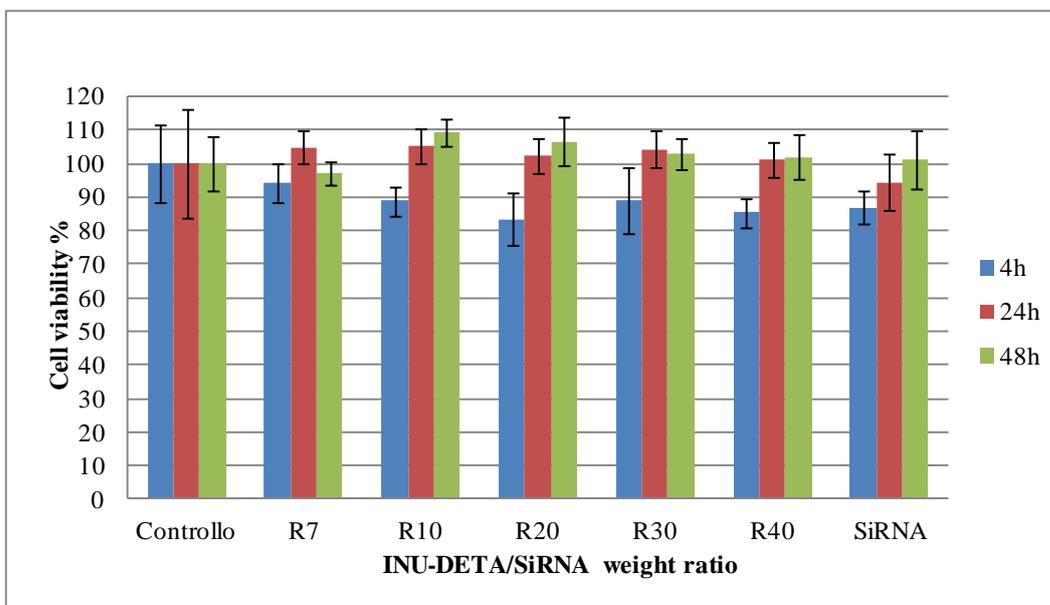
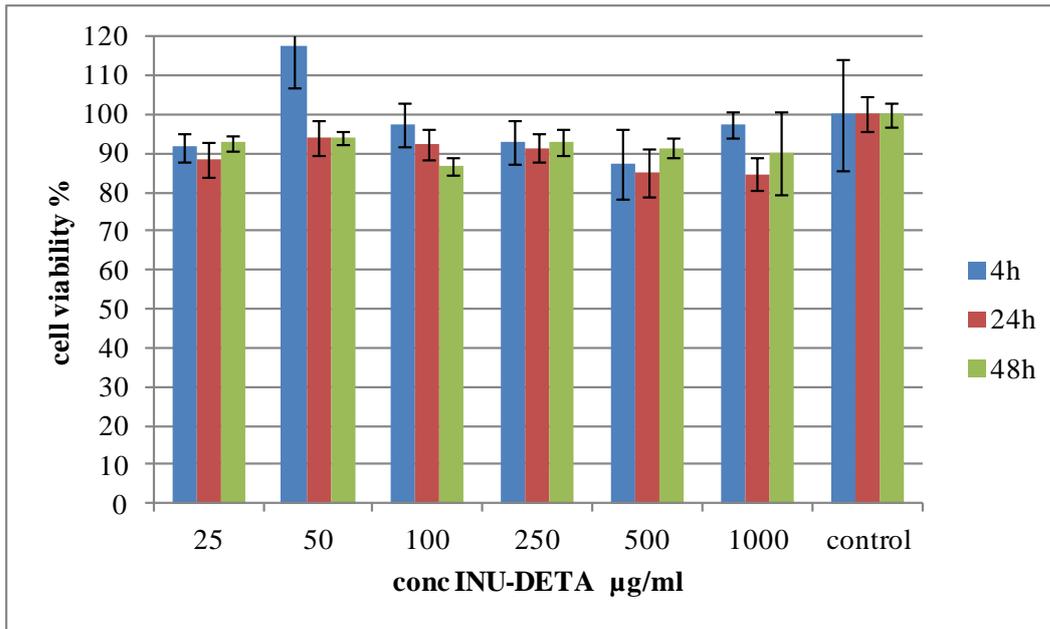


Figura 3.15. Studi di citocompatibilità di INU-DETA e dei poliplessi INU-DETA/siRNA su cellule 16HBE.

Studi di transfezione e silenziamento dei complessi INU-DETA/siE2F1.

L'efficacia in vitro dei poliplessi è stata saggiata su due linee cellulari, di cui una non tumorale, 16HBE e una tumorale, JHH6, utilizzando il NABD siE2F1, un siRNA il cui bersaglio è l'RNA messaggero di una proteina coinvolta nella progressione del ciclo cellulare, chiamata E2-promoter binding factor 1 (E2F1).

Studi preliminari di efficacia su cellule JHH6 hanno mostrato come il rapporto in peso copolimero/siRNA abbia un ruolo fondamentale nel determinare l'efficacia di transfezione del sistema e in particolare, nel caso dei poliplessi INU-DETA/siRNA, il rapporto più efficace è risultato essere pari a 4. A questo rapporto infatti, su cellule JHH6, i poliplessi sono in grado di determinare una riduzione della produzione della proteina E2F1 (**Figura 3.16A**) grazie ad una riduzione dell'mRNA relativo a E2F1 fino al 60% rispetto alle stesse cellule trattate con poliplessi contenenti un siRNA controllo (siGL2), preparati allo stesso rapporto in peso (**Figura 3.16B**). Inoltre, è stata osservata una riduzione dei livelli di mRNA di tre proteine (E2F3, ciclina D1 e ciclina A2) i cui geni sono trascrizionalmente controllati da E2F1 (**Figura 3.16C**). Tale osservazione supporta pienamente l'ipotesi che i poliplessi INU-DETA/siE2F1 siano in grado di transfettare le cellule tumorali JHH6 e che siano in grado di rilasciare all'interno della cellula una quantità di siRNA sufficiente a produrre l'effetto di silenziamento a carico dell'mRNA bersaglio. È inoltre possibile notare, attraverso studi di conta cellulare condotti parallelamente, come la riduzione di tale mRNA in cellule trattate con i poliplessi ottenuti con il siRNA attivo, si accompagni ad una riduzione del numero di cellule (**Figura 3.16D**).

Analogamente, utilizzando le stesse condizioni sperimentali, sono stati condotti studi di efficacia su cellule non tumorali epiteliali 16HBE. Sorprendentemente, i risultati mostrano come, su questa linea cellulare, i poliplessi al rapporto in peso pari a 4 non risultino efficaci, essendo i livelli di mRNA relativo a E2F1 non diminuiti rispetto al controllo (**Figura 3.17A**) e non mostrando, i risultati della conta cellulare, un decremento della popolazione cellulare rispetto al controllo (**Figura 3.17B**).

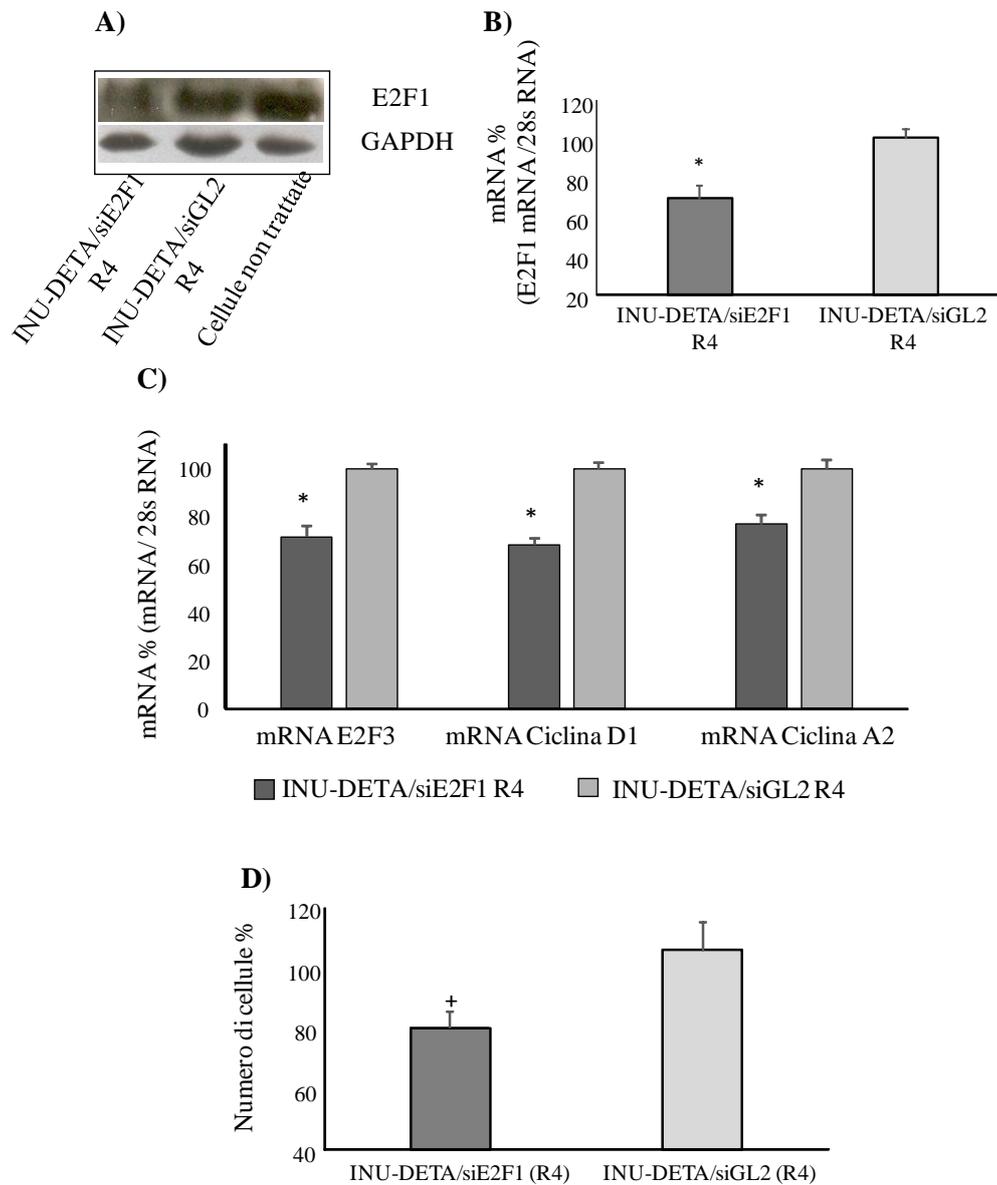


Figura 3.16. Studi di transfezione e silenziamento dei complessi INU-DETA/siE2F1 su cellule JHH6. A) livelli della proteina E2F1 (western blotting); B) livelli di mRNA di E2F1 (PCR); C) livelli di mRNA di proteine la cui trascrizione dei geni è controllata da E2F1; D) conta di cellule JHH6 trattate con poliplessi INU-DETA/siE2F1 e siGL2. * $p \leq 0.05$.

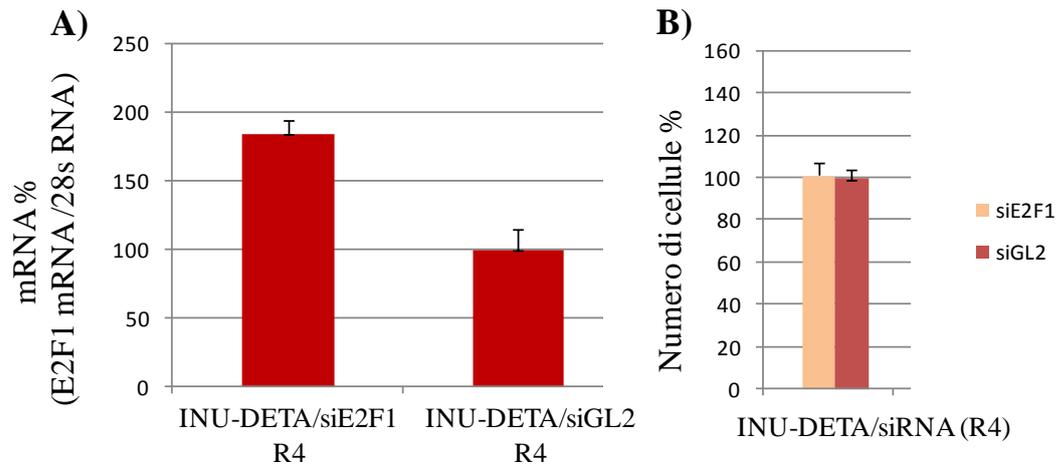
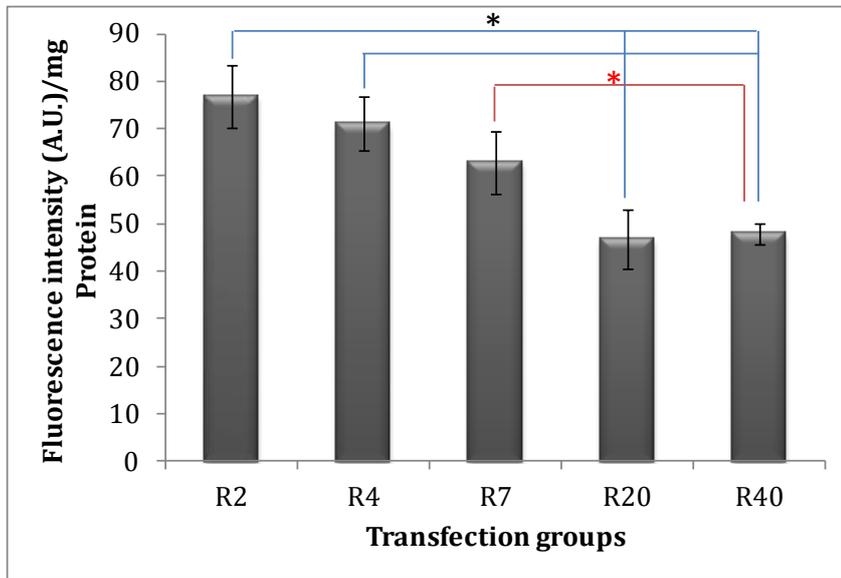


Figura 3.17. Studi di transfezione e silenziamento dei complessi INU-DETA/siE2F1 su cellule 16HBE. A) livelli di mRNA di E2F1 determinati mediante PCR; B) conta di cellule 16HBE trattate con poliplessi INU-DETA/siE2F1 e siGL2.

D'altra parte studi di uptake, qualitativo e quantitativo, su entrambe le linee cellulari mostrano che entrambi tali citotipi riescono ad internalizzare i poliplessi a diversi rapporti in peso, come è possibile osservare in **Figura 3.18** e in **Figura 3.19**, anche se per tutti i rapporti testati l'internalizzazione in cellule 16HBE avviene in maniera meno efficiente.

A)



B)

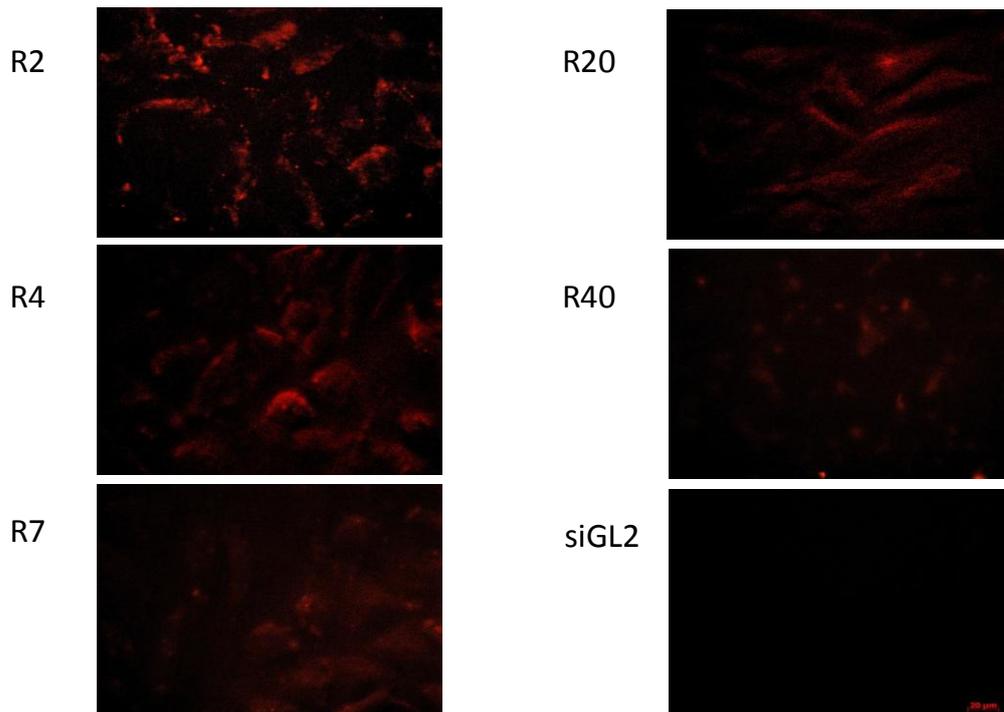
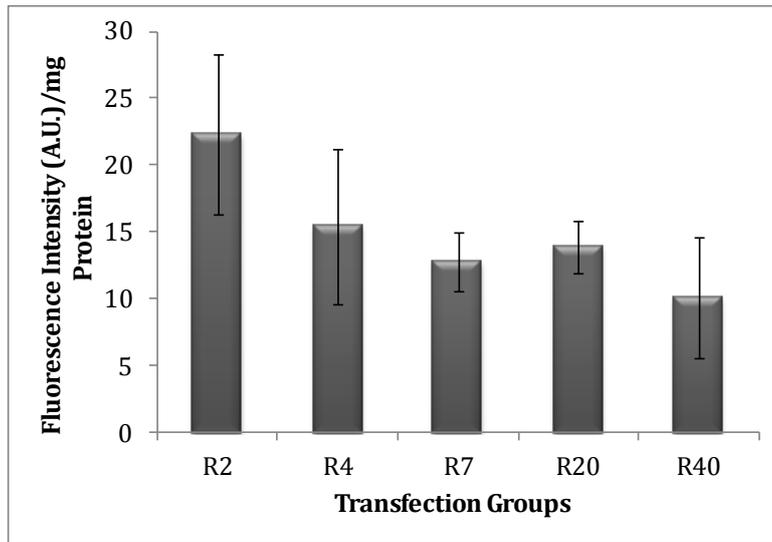


Figura 3.18. Uptake dei poliplessi INU-DETA/siGL3-Cy5 a vari rapporti in peso copolimero/siRNA (R) in cellule tumorali JHH6. A) Uptake quantitativo; B) Uptake qualitativo. * $p \leq 0.05$.

A)



B)

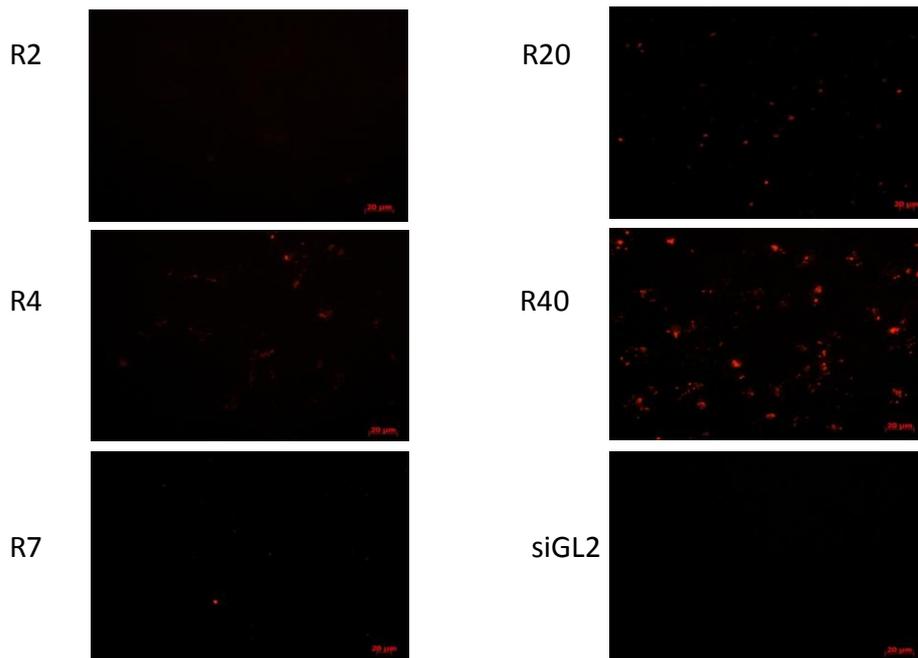


Figura 3.19. Uptake dei poliplessi INU-DETA/siGL3-Cy5 a vari rapporti in peso copolimero/siRNA (R) in cellule tumorali 16HBE. A) Uptake quantitativo; B) Uptake qualitativo.

Per indagare su questa apparente discrepanza, sono stati condotti degli studi per identificare se nelle due linee cellulari vi fosse una differenza di percorso endocitotico che, come è noto dalla letteratura, può determinare una differenza nel destino intracellulare del sistema e di conseguenza una efficacia o un fallimento nella somministrazione del poliplesso su una determinata linea cellulare. Tali studi hanno previsto l'impiego di inibitori chimici di vie endocitotiche specifiche ed in particolare: la wortmannina (WORT), inibitore della macropinositosi; la metil- β -ciclodestrina (M- β -CD), inibitore dell'endocitosi mediata dai lipidi e dal colesterolo (tra cui l'endocitosi caveolae dipendente); l'ossido di fenilarsina (PAO), inibitore dell'endocitosi mediata dalle clatrine.

L'effetto degli inibitori dell'endocitosi è dose dipendente e, ad alte concentrazioni, essi possono influenzare negativamente altri processi cellulari, portando ad una riduzione della vitalità ed ad una inibizione dei processi di endocitosi in maniera aspecifica. Per tale motivo, sono stati condotti degli studi di vitalità cellulare a varie concentrazioni di inibitori e per diversi tempi, al fine di individuare le condizioni migliori di utilizzo negli studi di esclusione successivi, sulle due linee cellulari impiegate. In base ai risultati ottenuti, mostrati in **Figura 3.20**, gli inibitori sono stati utilizzati alle concentrazioni di 1 μ M per la WORT e il PAO e 2 mg/ml per la M- β -CD, per un tempo di pre-incubazione di 0.5, 1, e 0.5 ore rispettivamente, ed un tempo di co-incubazione in presenza dei poliplessi INU-DETA/siRNA pari a 4h per la WORT e la M- β -CD.

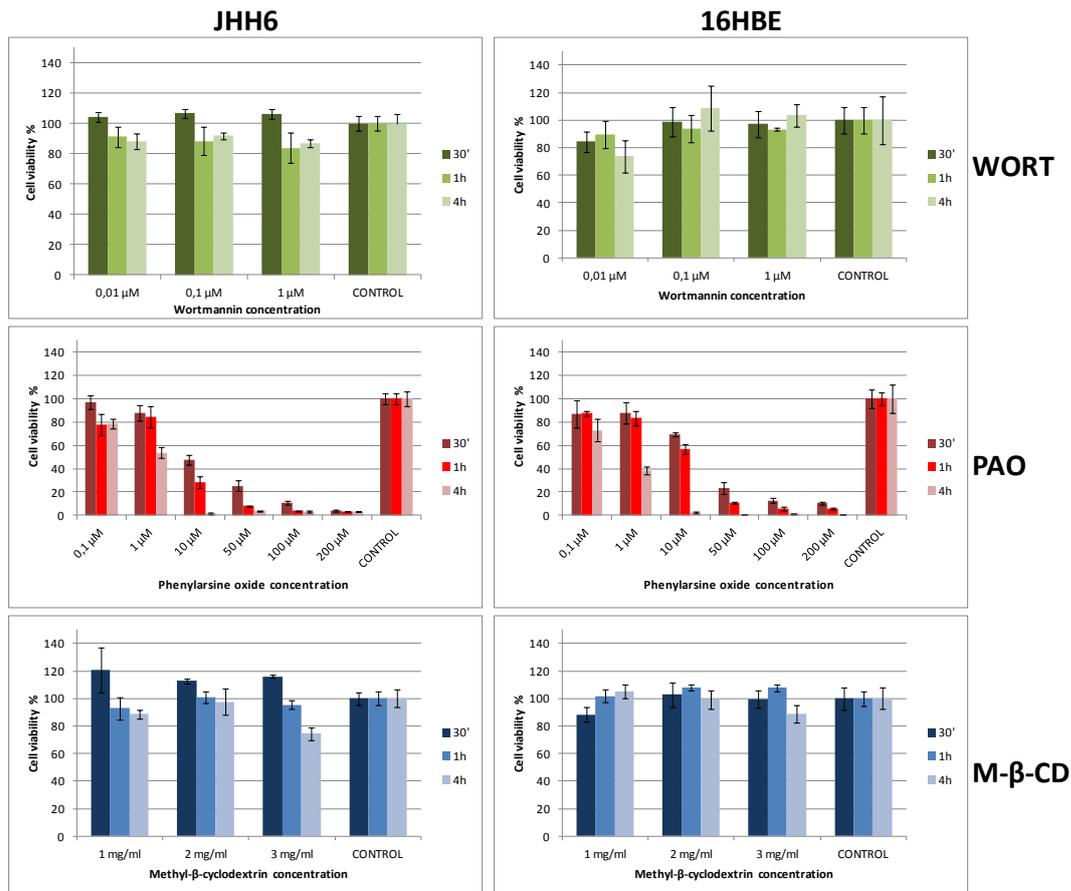


Figura 3.20. Studi di ottimizzazione delle condizioni di utilizzo degli inibitori dei processi endocitotici su cellule non tumorali 16HBE e tumorali JHH6.

Le cellule trattate con il PAO sono state sottoposte solamente al periodo di pre-incubazione in quanto un periodo di incubazione di 4h alla concentrazione di 1 μM, in entrambe le linee cellulari, causava una drastica riduzione della vitalità (tra 37 e 53% rispetto al controllo), mentre una minore concentrazione (0.1 μM), è stata considerata troppo bassa per produrre un effetto di inibizione consistente.

I risultati degli studi di esclusione, riportati in **Figura 3.21**, mostrano che in presenza degli inibitori PAO e WORT, l'internalizzazione dei poliplessi INU-DETA/siGL3-Cy5 nelle cellule JHH6 viene ridotta significativamente, rispetto al controllo di cellule trattate con i poliplessi allo stesso rapporto in peso ma in assenza di inibitore, permettendo di affermare che le vie coinvolte nell'internalizzazione in tali cellule tumorali dei poliplessi sono l'endocitosi mediata dalle clatrine e la macropinocitosi (**Figura 3.21A**).

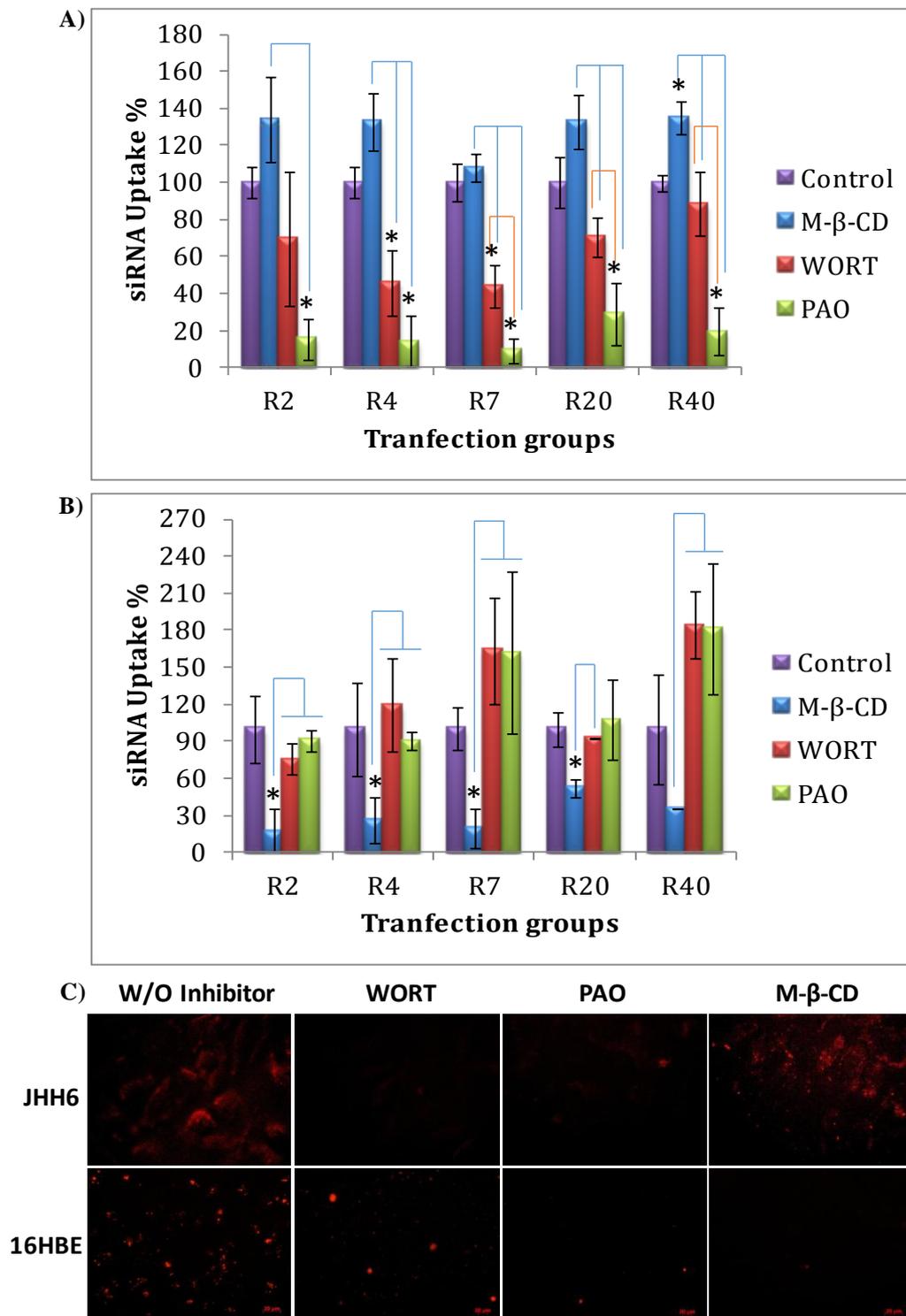


Figura 3.21. Uptake dei poliplessi Inu-DETA/siGL3-Cy5 in presenza di inibitori dei processi di endocitosi. A) uptake Quantitativo in cellule JHH6; B) uptake Quantitativo in cellule 16HBE; C) uptake qualitativo mediante microscopia a fluorescenza. * $p < 0.05$ rispetto al controllo.

Studi condotti sulle 16HBE, applicando le stesse condizioni sperimentali di quelli condotti sulla linea cellulare tumorale, rivelano che il meccanismo preferito per l'internalizzazione dei poliplessi INU-DETA/siGL3-Cy5 differisce nelle due linee cellulari, essendo per le cellule non tumorali 16HBE l'endocitosi mediata dai lipidi e dal colesterolo (**Figura 3.21B**), di cui fa parte l'endocitosi mediata dalle caveolae, un meccanismo che non prevede la fusione delle vescicole endosomiali con il lisosoma e la conseguente acidificazione.

Questi risultati permetterebbero di ipotizzare che la DETA, non è in grado di cambiare la sua conformazione a seguito di endocitosi nelle cellule non tumorali 16HBE, in cui il meccanismo di uptake non prevede l'acidificazione (meccanismo mediato dalle caveolae), risultando in un confinamento di esso nelle vescicole all'interno delle quali il siRNA non può espletare la sua azione di interferenza.

Tale ipotesi è inoltre supportata dall'osservazione che la distribuzione della fluorescenza, osservata mediante microscopia sulle cellule 16HBE, appare confinata in specifici punti all'interno di esse (**Figura 3.19B**), suggestiva di un accumulo/sequestro del siRNA in vescicole citoplasmatiche.

D'altra parte, si può ipotizzare che i meccanismi coinvolti nell'internalizzazione del sistema nelle cellule tumorali JHH6, la macropinocitosi e l'endocitosi mediata dalle clatrine, che prevedono invece una acidificazione del contenuto endosomiale a seguito della fusione con il lisosoma, permettano al sistema di sfuggire, grazie alla destabilizzazione prodotta dal cambiamento conformazionale della DETA a seguito dell'abbassamento del pH, ed essere rilasciato nel compartimento citoplasmatico dove il siRNA è in grado di legare e inibire il bersaglio, generando il fenomeno dell'interferenza.

3.1.3. Conclusioni.

L'ottenimento mediante procedure semplici e poco costose di polimeri biocompatibili è di cruciale importanza nella ricerca di un sistema di veicolazione di NABDs. I copolimeri INU-Spm e Inu-DETA, si sono dimostrati promettenti candidati in tal senso,

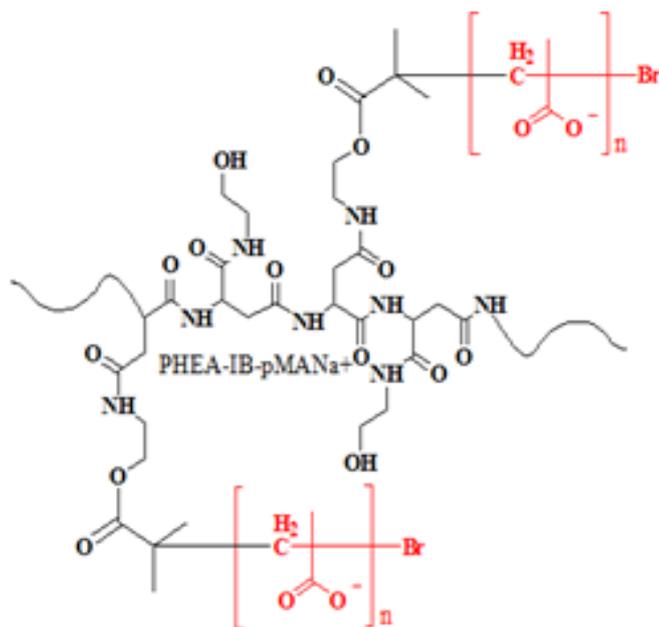
essendo citocompatibili ed abili ad interagire con NABDs, portando alla formazione di poliiplessi a rapporti in peso copolimero/NABD vantaggiosi. Tali sistemi sono in grado, in vitro di essere internalizzati da differenti tipi cellulari ed in particolare, nel caso dei poliiplessi ottenuti a partire dal copolimero Inu-DETA, essi appaiono selettivamente più attivi in una linea cellulare di epatocarcinoma umano, rispetto ad una linea cellulare non tumorale modello di epitelio bronchiale umano. Tale differenza di efficienza di transfezione rispetto alla linea cellulare non tumorale testata è stata ricondotta al differente meccanismo di endocitosi che coinvolge i sistemi nelle due differenti linee cellulari.

3.2. DERIVATI POLIANIONICI E PEGHILATI DEL PHEA PER LA PRODUZIONE DI SISTEMI PARTICELLARI PER LA VEICOLAZIONE POLMONARE DI TOBRAMICINA IN FIBROSI CISTICA.

Micro e nanoparticelle composte da principi attivi e polimeri biocompatibili rappresentano due tra i sistemi maggiormente studiati nella ricerca di nuovi carrier per la veicolazione di farmaci a livello polmonare.

Il copolimero PHEA-IB-pMANa⁺, la cui struttura è rappresentata nello **Schema 3.3**, è un derivato polianionico del PHEA [G. Cavallaro et al., 2009], sintetizzato presso il laboratorio in cui ho svolto il mio dottorato di ricerca, mediante Polimerizzazione Radicalica a Trasferimento Atomico (ATRP) del sale sodico dell'acido metacrilico (MANa⁺), a partire dal macroiniziatore PHEA-BIB, portante in catena laterale gruppi bromo-isobutirilici agenti da siti di iniziazione.

Tale copolimero possiede un numero medio di catene polimetacriliche laterali al backbone polimerico pari a 35, ciascuna delle quali è composta mediamente da 10 monomeri metacrilato sodico ed ha un peso molecolare mediamente pari a 478,000 Da (Mw/Mn 2.0) [Licciardi et al., 2013]. Tali proprietà fanno del PHEA-IB-pMANa⁺ un copolimero dal carattere marcatamente polianionico che, in dipendenza dal pH del mezzo in cui è disperso è capace di auto assemblare in sistemi micro e nano strutturati capaci di incorporare farmaci idrofili. Tale copolimero è stato già impiegato per la preparazione di nanoparticelle per la veicolazione di Doxorubicina, un farmaco idrosolubile con attività antitumorale [Licciardi et al., 2011]. Inoltre, più recentemente il copolimero PHEA-IB-pMANa⁺, ha mostrato una buona capacità di formare complessi polielettrolitici, dalle dimensioni colloidali, con polipeptidi carichi positivamente [Licciardi et al., 2013].



Schema 3.3. Struttura del copolimero PHEA-IB-pMANa⁺.

In questo lavoro, il carattere polianionico di tale derivato del PHEA e la possibilità di dare interazioni elettrostatiche con specie cariche positivamente, sono state utilizzate per incorporare, in microsistemi, il farmaco aminoglicosidico Tobramicina (TOB), una molecola che possiede 5 gruppi amminici protonabili a pH fisiologico, grazie al loro pKa compreso tra 9.83 e 12.54.

Attualmente, la TOB rappresenta un farmaco fondamentale nel trattamento delle infezioni da *Pseudomonas aeruginosa* che si instaurano a livello polmonare nei soggetti affetti da Fibrosi Cistica [www.cff.org].

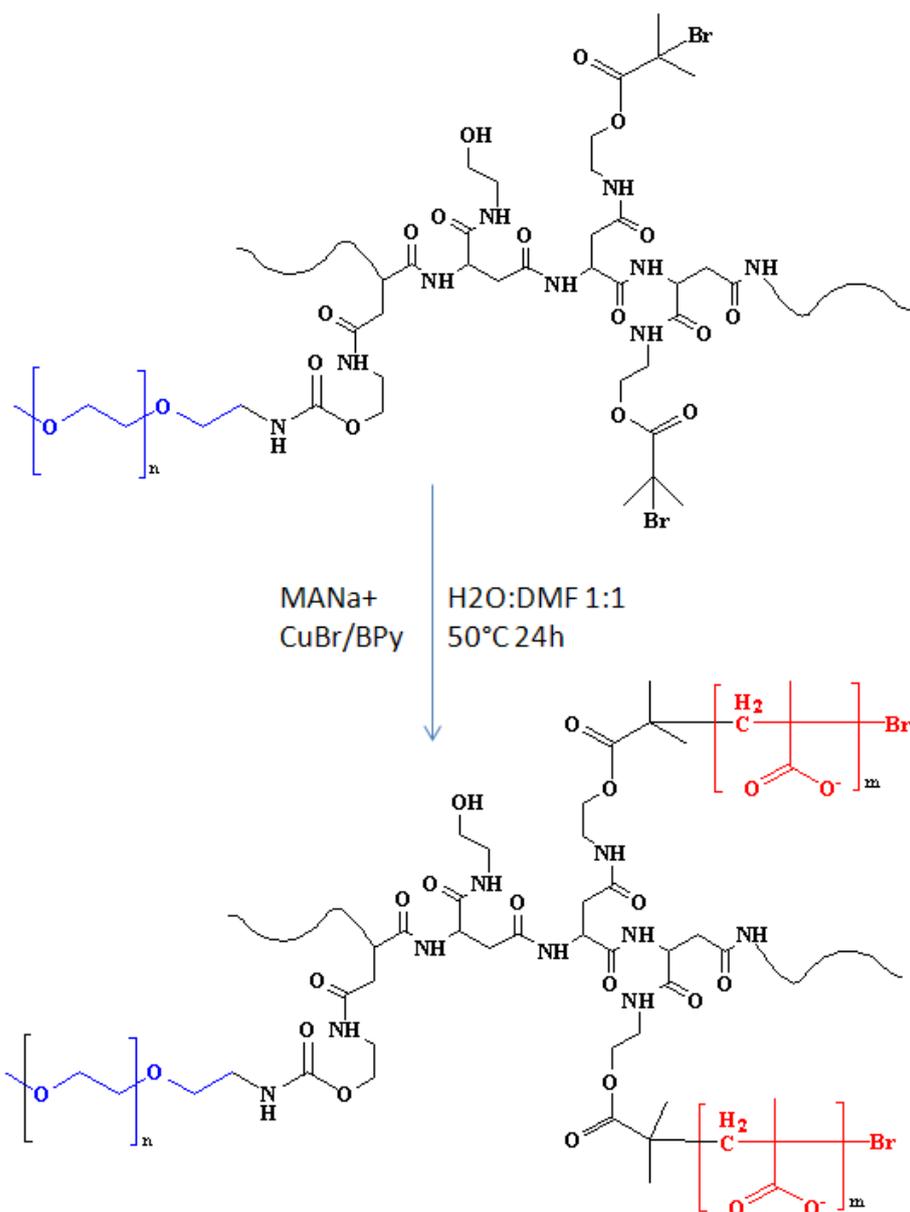
È stato riportato che il PEG conferisce proprietà muco penetranti ai nanomateriali [B.C. Tang et al., 2009]. Quindi, al fine di ottenere sistemi capaci di interagire con lo strato mucoso dell'epitelio bronchiale aumentando il tempo di permanenza e permettendo una penetrazione nello strato più interno del muco, dove è prevalentemente localizzata l'infezione batterica, è stato sintetizzato un derivato peghilato del copolimero PHEA-IB-pMANa⁺, il PHEA-IB-PEG₂₀₀₀-pMANa⁺, mediante ATRP a partire dal copolimero PHEA-PEG2000 [Craparo et al., 2006].

Sintesi e caratterizzazione del copolimero PHEA-PEG₂₀₀₀-IB-pMANa⁺.

La sintesi del copolimero PHEA-PEG₂₀₀₀-IB-pMANa⁺ ha richiesto più steps di reazione. Il copolimero di partenza, un derivato PEGylato del PHEA, il PHEA-PEG₂₀₀₀, è stato ottenuto mediante una procedura di reazione precedentemente messa a punto presso il laboratorio dove ho svolto il mio lavoro di dottorato[Craparo et al., 2006], attivando gli ossidrili del PHEA con il Bis(4-nitrofenil) carbonato (PNFC) e successiva reazione dell'attivato con il monoammino-monometossi PEG, avente peso molecolare medio di 2000 Da (PEG₂₀₀₀-NH₂), ed ottenendo la formazione di un legame uretanico. Il grado di derivatizzazione in PEG₂₀₀₀-NH₂, calcolato mediante analisi ¹H NMR come precedentemente riportato, è risultato essere pari a circa il 2.5% in moli rispetto alle moli di unità ripetitive di PHEA.

Al fine di ottenere il macroiniziatore PHEA-PEG₂₀₀₀-BIB, il PHEA-PEG₂₀₀₀ è stato quindi fatto reagire con il 2-Bromoisobutirril bromuro (BIBB). La reazione è stata condotta in DMAa, per 4h, in presenza di TEA. Il prodotto è stato caratterizzato mediante analisi ¹H-NMR in D₂O, che ha confermato l'avvenuto legame del BIB al copolimero PHEA-PEG₂₀₀₀ e ha rivelato un grado di derivatizzazione in BIB del 35% in moli rispetto alle moli di unità ripetitive di PHEA. Tale valore è stato calcolato paragonando l'integrale del picco a δ 1.9 relativo ai protoni dei metili del BIBB con l'integrale del picco a δ 2.7 relativo ai protoni metilenici del backbone polimerico del PHEA.

Il PHEA-PEG₂₀₀₀-BIB è stato successivamente sottoposto alla reazione di ATRP utilizzando come monomero il metacrilato sodico (MANa⁺), ottenendo così il copolimero PHEA-PEG₂₀₀₀-IB-pMANa⁺. Anche in questo caso, la reazione di ATRP ha previsto l'utilizzo del sistema catalitico costituito da Cu^IBr e biperidina. Lo **Schema 3.4** mostra la procedura di sintesi e la struttura del copolimero risultante.



Schema 3.4. Rappresentazione schematica della sintesi del copolimero PHEA-PEG₂₀₀₀-IB-pMANa⁺, a partire dal macroiniziatore PHEA-PEG₂₀₀₀-BIB.

La struttura del copolimero PHEA-PEG₂₀₀₀-IB-pMANa⁺ è stata confermata dall'analisi dello spettro ¹H-NMR, riportato in **Figura 3.22**, che ha permesso di calcolare il grado di derivatizzazione molare in MANa⁺, risultato essere pari a circa il 1231%. Tale valore, calcolato paragonando l'integrale del picco corrispondente ai protoni a δ 1.40 assegnati ai gruppi metilici appartenenti al metacrilato legato, con l'integrale del picco relativo ai

protoni a δ 2.84 assegnati ai CH_2 appartenenti al PHEA, corrisponde ad un numero medio di monomeri per catena polimetacrilica pari a circa 35.

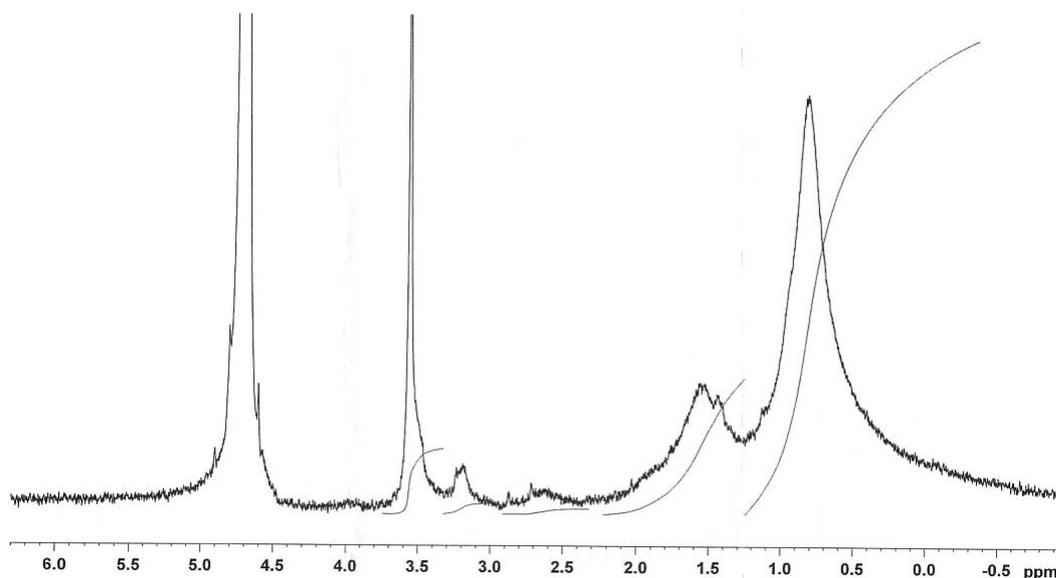


Figura 3.22. Spettro ^1H NMR del copolimero PHEA-PEG₂₀₀₀-IB-pMANa⁺.

Preparazione e caratterizzazione di microparticelle di PHEA-IB-pMANa⁺/TOB e PHEA-PEG₂₀₀₀-IB-pMANa⁺/TOB.

Sono stati eseguiti diversi tentativi per l'ottimizzazione del metodo di preparazione delle microparticelle. In particolare, sono state effettuate numerosi esperimenti, ricorrendo alla tecnica dell'omogeneizzazione all'Ultraturrax e modificando di volta in volta il numero di cicli di omogeneizzazione o ricorrendo all'aggiunta di un colloide protettore, come il polivinilpirrolidone (PVP).

Il metodo scelto è consistito nell'impregnazione dei copolimeri, precedentemente dispersi in tampone TRIS a pH 6 e liofilizzati, con una soluzione di Tobramicina per un tempo di circa 15 minuti. Al termine di tale tempo, per il sistema ottenuto a partire dal copolimero PHEA-IB-pMANa⁺, l'eccesso di farmaco non incorporato è stato rimosso mediante centrifugazione, e il solido ottenuto è stato ridisperso in acqua bidistillata. Per

la preparazione contenente PHEA-PEG-IB-pMANa⁺ non è stato possibile ricorrere alla centrifugazione, in quanto la dispersione appariva come una unica fase di gel. Entrambe le preparazioni sono state poi sottoposte a tre cicli di omogeneizzazione (15 minuti per ciclo, 24000 rpm). Le dispersioni ottenute sono state successivamente liofilizzate.

Per valutare l'effettiva incorporazione del farmaco all'interno dei sistemi ottenuti e quantificarlo in termini di Drug Loading (DL%), vale a dire come rapporto percentuale tra il peso di farmaco e il peso del sistema secco, è stata eseguita una analisi HPLC. L'analisi ha richiesto la preventiva funzionalizzazione del farmaco con Ortoftalaldeide/2-Mercaptoetanolo allo scopo di introdurre un cromoforo e renderlo visibile attraverso rivelazione UV/VIS a 335 nm. Il contenuto di farmaco è risultato essere pari al 37.5% per il sistema PEGylato e al 29.91% per il sistema non PEGylato.

Al fine di valutare la morfologia dei sistemi ottenuti per interazione del copolimero PHEA-IB-pMANa⁺ con la Tobramicina, è stata effettuata una analisi SEM su un campione secco, appena liofilizzato. Dall'analisi di un primo campione, ottenuto effettuando un solo ciclo di omogeneizzazione all'ultraturax (15 min 24000 rpm), è emersa la presenza di materiale amorfo e solo di una minore quantità di particelle il cui diametro è compreso tra 1.5 e 2 μm , come mostrato in **Figura 3.23**.

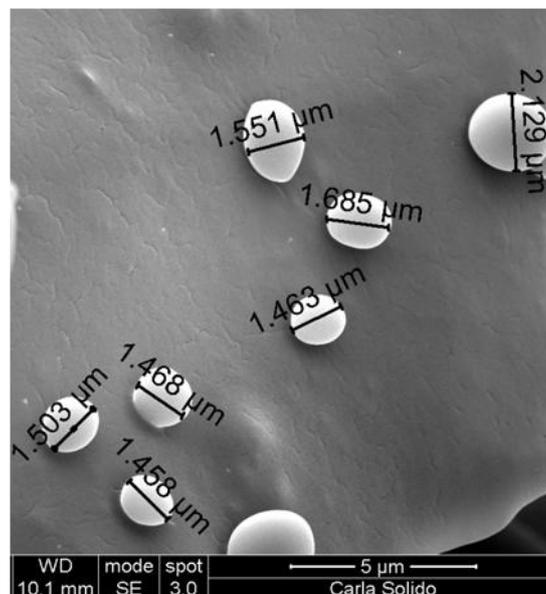


Figura 3.23. Analisi SEM del sistema PHEA-IB-pMANa⁺/TOB

L'aumento dei cicli di omogeneizzazione a 3, nelle stesse condizioni, e l'immediato congelamento della dispersione in azoto liquido prima della liofilizzazione, ha invece prodotto un maggior numero di particelle il cui diametro sembra rimanere pressoché invariato. Per questa ultima preparazione l'analisi è inoltre stata ripetuta dopo 3 mesi, durante i quali essa è stata conservata a temperatura ambiente e in condizioni di umidità non controllata. Come è possibile osservare dalle immagini riportate in **Figura 3.24**, il sistema allo stato solido risulta ancora costituito da microparticelle la cui morfologia appare inalterata.

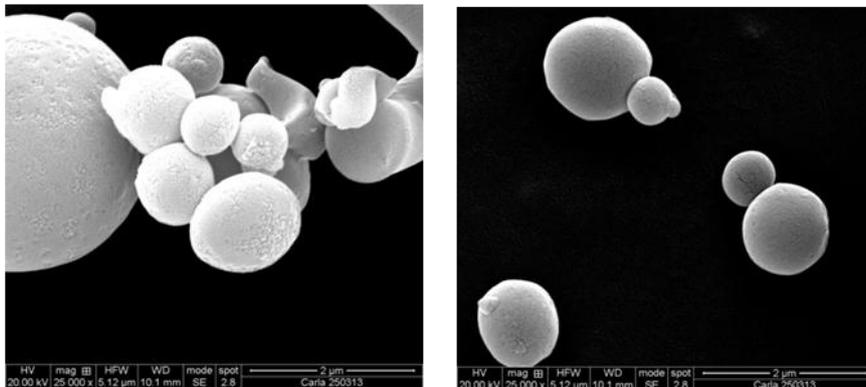


Figura 3.24. Immagine SEM ottenuta dopo 3 mesi dalla preparazione

Le microparticelle di PHEA-PEG₂₀₀₀-IB-pMANa⁺ e di PHEA-IB-pMANa⁺ contenenti la Tobramicina sono state, successivamente caratterizzate in termini di dimensione e potenziale ζ , dopo dispersione in una soluzione acquosa a pH 7.4 (DPBS), utilizzando la tecnica di Dynamic Light Scattering. I dati analitici dei campioni microparticellari contenenti Tobramicina e dei copolimeri in assenza del farmaco sono riportati in **Tabella 3.4**.

I dati ottenuti hanno rivelato, in primo luogo, che i copolimeri in dispersione acquosa a pH 7.4, anche in assenza del farmaco, esistono sottoforma di sistemi nanostrutturati con un diametro medio di 201 nm per il copolimero PHEA-IB-pMANa⁺ e di 211 nm per il copolimero PHEA-PEG₂₀₀₀-IB-pMANa⁺. La presenza del farmaco incorporato accresce le dimensioni dei sistemi, giungendo a valori di circa 437 nm per il sistema PHEA-IB-

pMANa⁺/TOB e di 4819 nm per il sistema PHEA-PEG₂₀₀₀-IB-pMANa⁺/TOB con la presenza, in quest'ultimo caso anche di una popolazione avente un diametro medio di circa 250 nm.

Campione	Potenziale ζ	Diam (nm)	PDI
PHEA-IB-pMANa ⁺	\	201±81	0.19
PHEA-PEG ₂₀₀₀ -IB-pMANa ⁺	\	211±85	0.26
PHEA-IB-pMANa ⁺ /TOB	-32±4	437±195	0.31
PHEA-PEG ₂₀₀₀ -IB-pMANa ⁺ /TOB	-43±5	4819±716 243±111	0.38

Tabella 3.4. Potenziale ζ (in mV), diametro (Diam.), polidispersità (PDI) dei copolimeri e dei sistemi incorporanti la Tobramicina.

Dal confronto con l'analisi SEM, è possibile sottolineare inoltre che, mentre allo stato solido, dopo l'avvenuta incorporazione del farmaco a pH 6, i sistemi sono costituiti da microparticelle, le caratteristiche dimensionali in dispersione acquosa a pH 7.4 delle preparazioni ottenute a partire da entrambi i copolimeri risultano dell'ordine dei nanometri. Le minori dimensioni possono essere spiegate da una aumentata deprotonazione dei gruppi carbossilici delle catene polimetacriliche a causa del pH del mezzo disperdente adoperato nell'analisi, con conseguente aumento del grado di ionizzazione e di idratazione del sistema e conseguentemente della sua solubilità nel mezzo acquoso. È inoltre probabile che le micro particelle allo stato solido siano il risultato dell'aggregazione di nano e microgeli, che permangono nel loro strato aggregato anche a seguito di essiccamento dopo omogeneizzazione.

Il potenziale ζ è risultato essere negativo per entrambi i sistemi incorporanti la Tobramicina, con un valore leggermente maggiore in valore assoluto per il sistema PEGylato. Ciò suggerisce che le cariche positive della tobramicina neutralizzano

parzialmente quelle negative dei copolimeri, e i sistemi risultanti hanno ancora una carica superficiale negativa.

Effetto della complessazione del polimero sul rilascio della Tobramicina in ambiente simulante il polmone.

Per valutare l'effettiva possibilità di una somministrazione polmonare di tali microparticelle in soggetti affetti da fibrosi cistica, sono stati condotti studi di rilascio della tobramicina dai sistemi PHEA-IB-pMANa⁺/TOB e PHEA-PEG₂₀₀₀-IB-pMANa⁺/TOB simulando le caratteristiche del fluido polmonare in condizioni patologiche, utilizzando un modello di muco preparato come descritto da P. Russo et al [P. Russo et al., 2013].

Nonostante in letteratura vengano descritti vari metodi sperimentali per studiare i profili di rilascio di un farmaco da un sistema di veicolazione particellare a base polimerica, come ad esempio il metodo della dialisi, nel presente lavoro di tesi è stato scelto il metodo della diffusione attraverso celle di Franz verticali, in quanto tale metodo consente di utilizzare la formulazione solida e non dover disperdere preventivamente le microparticelle nel mezzo di rilascio, e mimare quindi al meglio la somministrazione di una polvere secca per via inalatoria. I profili di rilascio sono mostrati in **Figura 3.25**.

In un primo set di esperimenti è stata valutata la diffusione, in assenza di muco, nell'arco di 24 h del farmaco contenuto all'interno dei sistemi PHEA-IB-pMANa⁺/TOB e PHEA-PEG₂₀₀₀-IB-pMANa⁺/TOB, dal compartimento donatore al compartimento accettore di una cella di Franz, attraverso una membrana di esteri della cellulosa interposta tra i due. Per confronto è stato effettuato lo stesso esperimento utilizzando farmaco non veicolato (tobramicina libera).

In queste condizioni, la tobramicina libera diffonde completamente al compartimento accettore in un tempo pari a 180 minuti, mentre lo stesso farmaco incorporato all'interno dei sistemi mostra una diffusione più lenta. In particolare, mentre per il sistema PHEA-IB-pMANa⁺/TOB si ha un rilascio completo della tobramicina in un

tempo di 21h, la tobramicina rilasciata dal sistema PHEA-PEG₂₀₀₀-IB-pMANa⁺/TOB dopo 24h ammonta solamente a circa il 30 % del farmaco incorporato.

In un secondo set di esperimenti, è stato deposto sulla membrana interposta tra i due compartimenti della cella di Franz, uno strato di muco dello spessore di circa 3 mm (350 µl). Il profilo di rilascio della sola tobramicina sembra variare ed essere sostanzialmente influenzato dalla presenza dello strato di muco. Infatti la diffusione del farmaco richiede in questo caso 7 ore per giungere a completezza, anche se circa il 70 % del farmaco ha diffuso nel compartimento accettore già dopo 180 minuti.

Il profilo di rilascio del farmaco dai sistemi PHEA-IB-pMANa⁺/TOB e PHEA-PEG₂₀₀₀-IB-pMANa⁺/TOB non sembra differire in maniera significativa dal profilo di diffusione ottenuto in assenza dello strato di muco. Ciò potrebbe significare che la diffusione del farmaco è influenzata solamente dalle caratteristiche del sistema che lo rilascia lentamente e in maniera prolungata nelle 24 h, nel caso del sistema PHEA-IB-pMANa⁺/TOB, e in un tempo ancora più prolungato nel caso del sistema PHEA-PEG₂₀₀₀-IB-pMANa⁺/TOB.

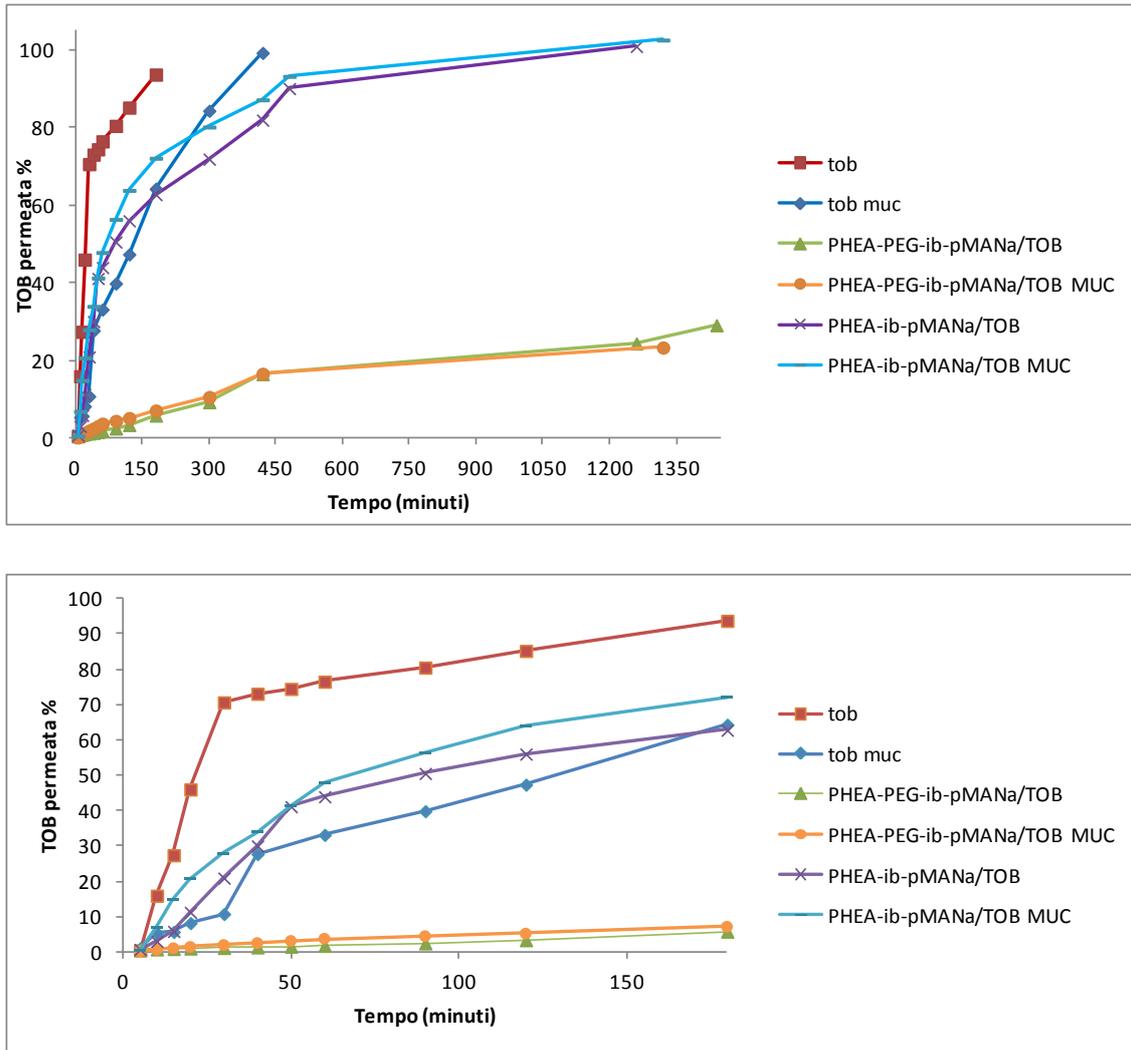


Figura 3.25. Profili di rilascio della tobramicina libera o incorporata all'interno dei sistemi PHEA-IB-pMANa⁺/TOB e PHEA-PEG₂₀₀₀-IB-pMANa⁺/TOB, in assenza o in presenza di muco.

Studi di citocompatibilità su cellule umane di epitelio bronchiale 16HBE.

Per valutare la biocompatibilità in vitro e l'ideoneità dei sistemi esaminati ad una somministrazione topica a livello polmonare, sono stati condotti studi di citocompatibilità su cellule umane di epitelio bronchiale (16HBE).

In particolare, le cellule sono state incubate con PHEA-IB-pMANa⁺/TOB e con PHEA-PEG-IB-pMANa⁺/TOB a concentrazioni nel range tra 25 e 1000 µg/ml e con una

soluzione di Tobramicina alla concentrazione più alta presente nei sistemi, pari a 0.375mg/ml. Allo stesso modo sono stati saggiati anche i copolimeri, PHEA-IB-pMANa⁺ e PHEA-PEG-IB-pMANa⁺, in assenza del farmaco, alle stesse concentrazioni presenti nei sistemi. La vitalità cellulare è stata valutata attraverso il saggio MTS, dopo 4 e 24 ore di incubazione e ha mostrato i risultati mostrati in **Figura 3.26**.

I dati mostrano un'eccellente biocompatibilità di entrambi i copolimeri e dei sistemi con e senza PEG₂₀₀₀ incorporanti la Tobramicina sulle cellule testate e nelle condizioni sperimentali usate. Anche la Tobramicina non incorporata non ha mostrato tossicità alla massima concentrazione presente nei sistemi (vitalità a 24ore: 98.08±2.36%).

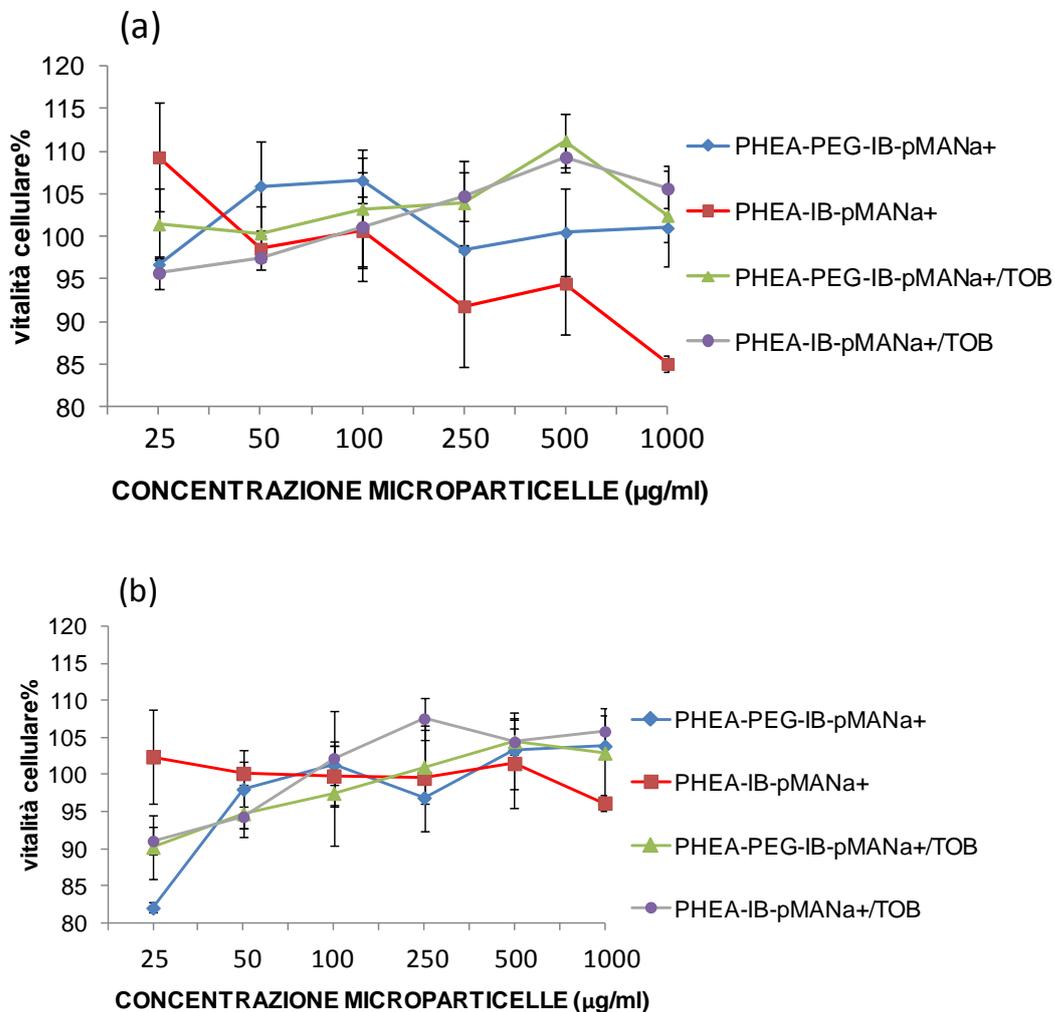


Figura 3.26. Vitalità delle cellule 16HBE dopo incubazione con i copolimeri PHEA-IB-pMANa⁺ e PHEA-PEG₂₀₀₀-IB-pMANa⁺ e con i sistemi PHEA-IB-pMANa⁺/TOB e

PHEA-PEG₂₀₀₀-IB-pMANa⁺/TOB a concentrazioni crescenti dopo 4 ore (a) e 24 ore (b) di incubazione.

3.2.1. Conclusioni.

In conclusione gli studi preliminari appena discussi dimostrano che i copolimeri PHEA-IB-pMANa⁺ e PHEA-IB-PEG₂₀₀₀-pMANa⁺ sono in grado di formare sistemi microparticellari incorporanti il farmaco Tobramicina. Tali sistemi, ottenuti con una elevata quantità di farmaco incorporato, possiedono buone proprietà in termini di rilascio del farmaco in vitro in ambiente che mima lo spesso strato di muco tipico delle vie polmonari dei soggetti affetti da FC. Inoltre i copolimeri e i sistemi da essi ottenuti risultano essere estremamente biocompatibili e rappresentano pertanto un buon punto di partenza per lo sviluppo di sistemi per la somministrazione polmonare di tobramicina nella terapia della FC..

3.3. FUNZIONALIZZAZIONE DI SUPERFICI DI PLA CON UN DERIVATO ANTIBATTERICO DEL PHEA.

Durante un periodo di formazione e ricerca all'estero, presso il gruppo di Biopolimeri Artificiali dell'Università di Montpellier (FRANCIA), sotto la supervisione del dottor Benjamin Nottelet, ho avuto la possibilità di approfondire alcuni aspetti dell'impiego dei polimeri per la funzionalizzazione di superfici, al fine di conferire alle stesse proprietà antibatteriche. L'approccio seguito per ottenere tale scopo è stato quello della click chemistry ed in particolare, sfruttando l'esperienza del gruppo del dottor Nottelet, si è utilizzata la reazione tiolo-ino foto catalizzata per funzionalizzare superfici di PLA propargilate, attraverso la tecnica del grafting onto. Questo metodo dà la possibilità di evitare la presenza di impurità metalliche residue e di aumentare la densità di funzionalizzazione della superficie, grazie alla possibilità di produrre prodotti di bis-addizione sui tripli legami.

L'approccio previsto per ottenere l'effetto antibatterico si basa sull'introduzione sulle superfici di PLA propargilato, di un copolimero policationico, il PHEA-EDA-CPTA-LA, derivato dell' α,β -poli-N2-idrossietil-DL-aspartammide (PHEA), un polimero idrofilico, altamente solubile in acqua, non tossico non immunogenico e non antigenico e facilmente funzionalizzabile grazie alla presenza di un gruppo idrossilico per unità ripetitiva [G. Giammona et al., 1987; R. Mendichi et al., 2000].

Tale derivato del PHEA, utilizzato per la funzionalizzazione delle superfici di PLA, è stato progettato tenendo conto della necessità che esso abbia gruppi ammoniacali quaternari, che conferiscono al copolimero carattere policationico e potenziale azione antibatterica, e gruppi tiolici in grado di coniugare tale derivato mediante reazioni di click chemistry tiolo-alchino foto catalizzate.

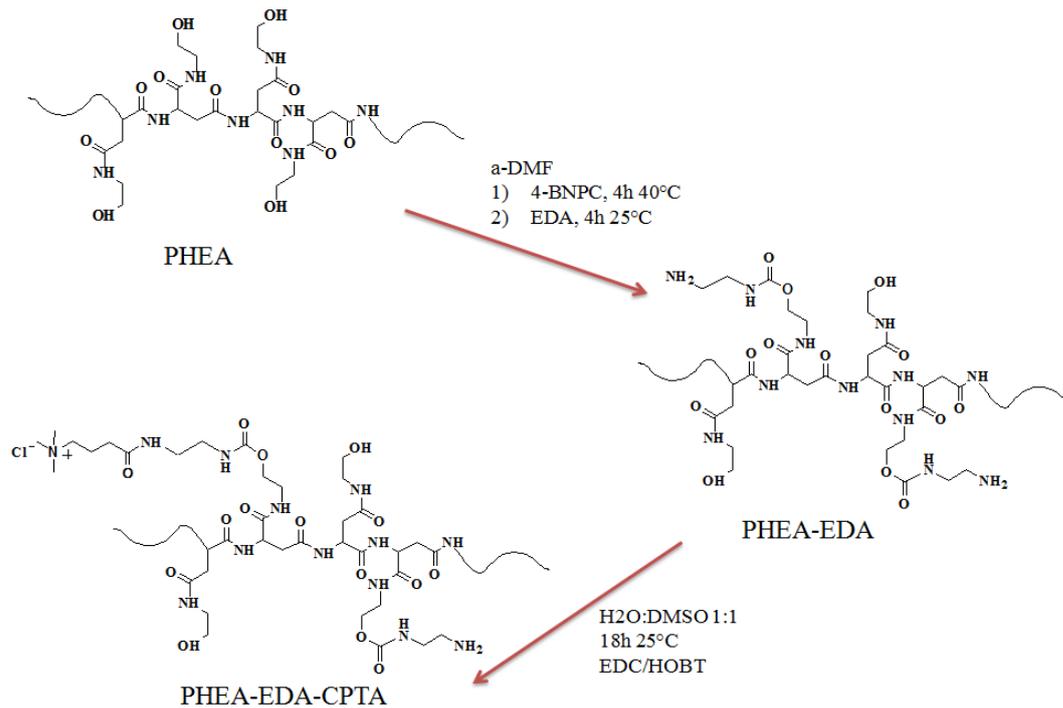
Per queste funzionalizzazioni sono stati utilizzati rispettivamente il carbossipropil trimetilammonio cloruro (CPTA) e l'acido lipoico (LA). Il CPTA attribuisce al copolimero la caratteristica di policatione, portante in catena laterale delle cariche positive permanenti. I policationi agiscono, a differenza degli antibiotici, con meccanismi aspecifici di lisi cellulare, il che fa di essi dei biocidi ad ampio spettro. La modificazione di superfici di PLA con tale polimero idrofilico può generare inoltre un

effetto antifouling dovuto alla riduzione dell'idrofobicità della superficie di PLA, per diminuzione dell'adsorbimento superficiale di proteine e sostanze che favoriscono l'istaurarsi di infezioni batteriche e la formazione di biofilm.

Allo scopo di introdurre in catena laterale un gruppo utile al legame, mediante photo-click coupling tiolo-ino, tra il policonato e le superfici di PLA propargilato, è stata messa a punto una reazione per legare l'acido lipoico al PHEA. L'acido lipoico contiene infatti un anello ditiolanico che, dopo opportuna riduzione, può reagire con i tripli legami presenti sulla superficie di PLA propargilato.

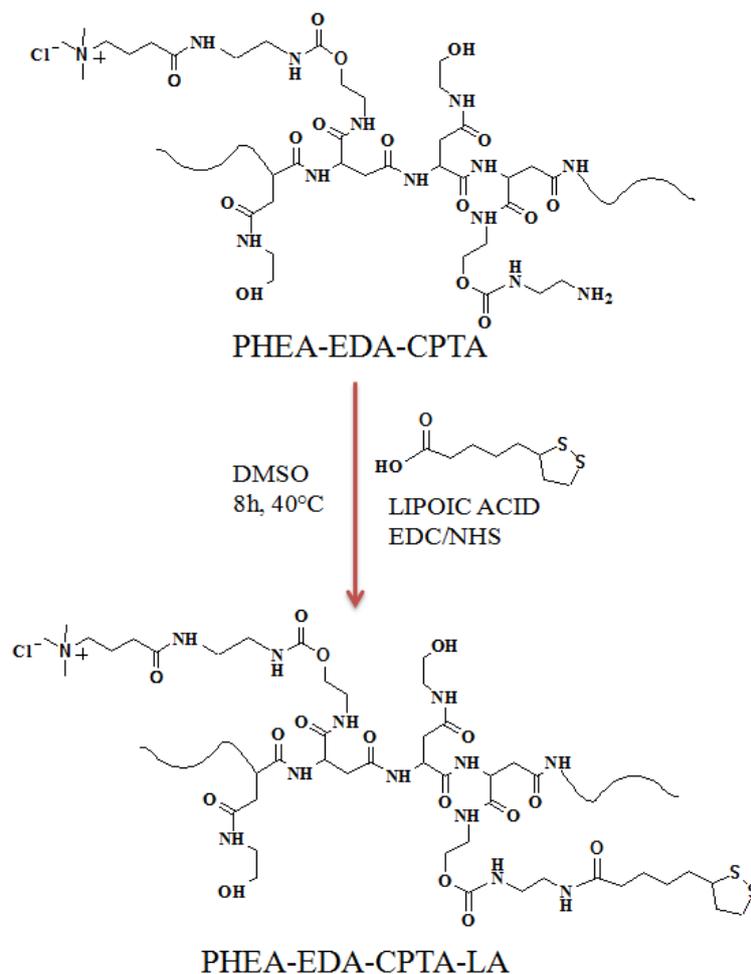
La coniugazione di tali molecole direttamente ai gruppi ossidrilici del PHEA porterebbe ad avere per entrambe le funzionalizzazioni, la formazione di un legame estereo, la cui idrolisi porterebbe alla perdita del carattere cationico (nel caso del CPTA) e al disancoraggio del copolimero dalla superficie (nel caso dell'LA). Al fine di avere per entrambe le molecole un legame chimico stabile, non facilmente idrolizzabile in vivo, il PHEA è stato preventivamente funzionalizzato con etilendiammina (EDA), mediante formazione di legami uretanici, in modo da esporre in catena laterale gruppi amminici primari, da funzionalizzare successivamente con il CPTA e con l'LA.

Il derivato PHEA-EDA-CPTA è stato sintetizzato a partire dal PHEA come descritto da Licciardi et al. [Licciardi et al., 2006]. Il primo step ha consistito nel legame di molecole di etilendiammina ai gruppi ossidrilici del PHEA, mediante la formazione di un legame uretanico, utilizzando bis(4-nitrofenil)carbonato (BNPC) come agente condensante. Il PHEA-EDA è stato ottenuto con un grado di derivatizzazione molare (DDmol%) pari al 50%. Il PHEA-EDA è stato ulteriormente derivatizzato con molecole di carbossipropil trimetil ammonio cloruro (CPTA), mediante la formazione di un legame ammidico tra il gruppo carbossilico del CPTA e gruppi amminici primari delle catene laterali del PHEA-EDA, in presenza di EDC ed HOBT, ottenendo il copolimero PHEA-EDA-CPTA, con un DDmol% in CPTA pari al 26.5%. I DDmol% in EDA e CPTA sono stati calcolati dall'analisi dello spettro ^1H NMR, come precedentemente riportato [Licciardi et al., 2006]. Gli step della reazione per ottenere il PHEA-EDA-CPTA sono riassunti nello **Schema 3.5**.



Schema 3.5. Rappresentazione schematica degli step sintetici per l'ottenimento del derivato PHEA-EDA-CPTA.

La reazione di legame dell'LA è stata condotta in condizioni molto blande utilizzando una tecnica di coniugazione carbodiimmide-mediata, reazione specifica tra i gruppi carbossilici dell'LA e i gruppi aminici primari liberi dell'EDA legata al PHEA-EDA-CPTA. In particolare L'LA è stato prima attivato attraverso la formazione di un idrossi-succinimidil estere in presenza di NHS. La miscela contenente l'LA attivato è stata poi addizionata di una soluzione del derivato PHEA-EDA-CPTA in modo tale da permettere la formazione del legame ammidico (**Schema 3.2**).



Schema 3.6. Sintesi del derivato PHEA-EDA-CPTA-LA.

Il nuovo copolimero è stato caratterizzato attraverso analisi ^1H NMR in D_2O e l'analisi dello spettro (**Figura 3.27**) ha confermato la struttura del derivato ottenuto e ha permesso di calcolare il DDmol% paragonando l'integrale del segnale a δ 1.33, assegnato all'LA ($-\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{SS}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), con il l'integrale del segnale a δ 4.63, relativo al backbone del PHEA ($-\text{NH}-\text{CH}(\text{CO})\text{CH}_2-$); il DDmol% in LA così calcolato risulta pari a 13.5%.

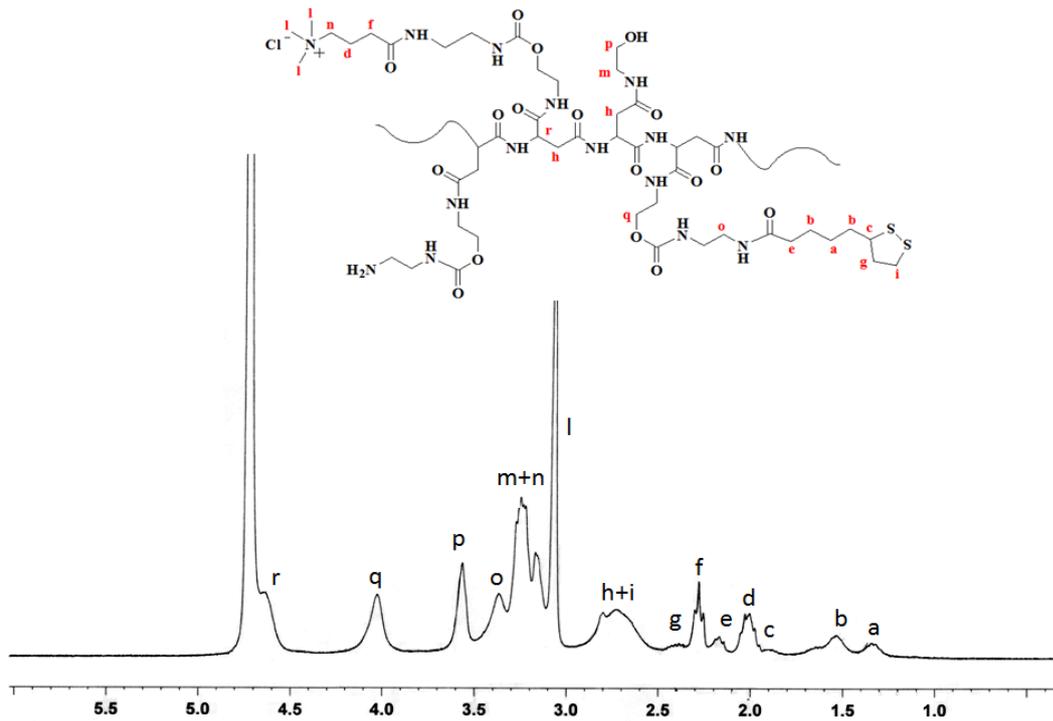


Figura 3.27. Spettro ^1H NMR del PHEA-EDA-CPTA-LA e relativa attribuzione dei segnali.

Il nuovo derivato è stato legato alle superfici di PLA propargilato, preparate come riportato da El Habnoui et al [S. El Habnoui et al., 2011] (**Figura 3.28**). Brevemente, il metodo consiste nella attivazione delle catene di PLA superficiali mediante l'utilizzo dell'LDA, base forte e non nucleofila, mediante formazione di un polycarbanione. In presenza di bromuro di propargile il polycarbanione viene funzionalizzato e il prodotto risultante è la superficie di PLA con delle funzioni alchiniche che costituisce una piattaforma generale, stabile per specifiche post-funzionalizzazioni mediante reazioni di coupling chemoselettive.

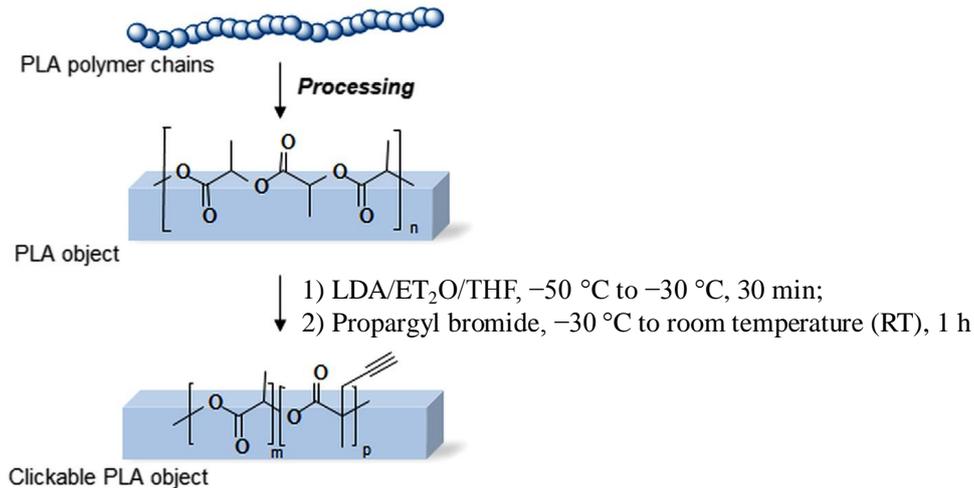


Figura 3.28. Preparazione delle superfici di PLA94 propargilato [El Habnoui et al., 2011].

Al fine di rendere disponibili i gruppi tiolici dell'acido lipoico legato al nuovo copolimero, il PHEA-EDA-CPTA-LA è stato trattato con una fosfina idrosolubile, il Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP). Lo step di riduzione è stato condotto per 2.5 h, ritenute sufficienti in quanto, nel caso della riduzione condotta per 24 h, la reazione successiva di legame alla superficie di PLA propargilato non mostrava alcun incremento di efficienza. Il prodotto ridotto non è stato dunque isolato, e la soluzione contenente il copolimero ridotto è stata posta direttamente in contatto con le superfici da funzionalizzare, e il sistema è stato irradiato per 15 minuti su ciascuna faccia. La reazione tiolo-alchino fotocatalizzata avviene con meccanismo radicalico ed è stato dunque necessario utilizzare nella soluzione contenente il copolimero, un fotoiniziatore idrosolubile, l'Igracure 2959. Tale catalizzatore è stato aggiunto in quantità di 4 mol% rispetto ai gruppi disolfuro disponibili, immediatamente prima dell'irraggiamento. Uno schema del processo è mostrato in **Figura 3.29**.

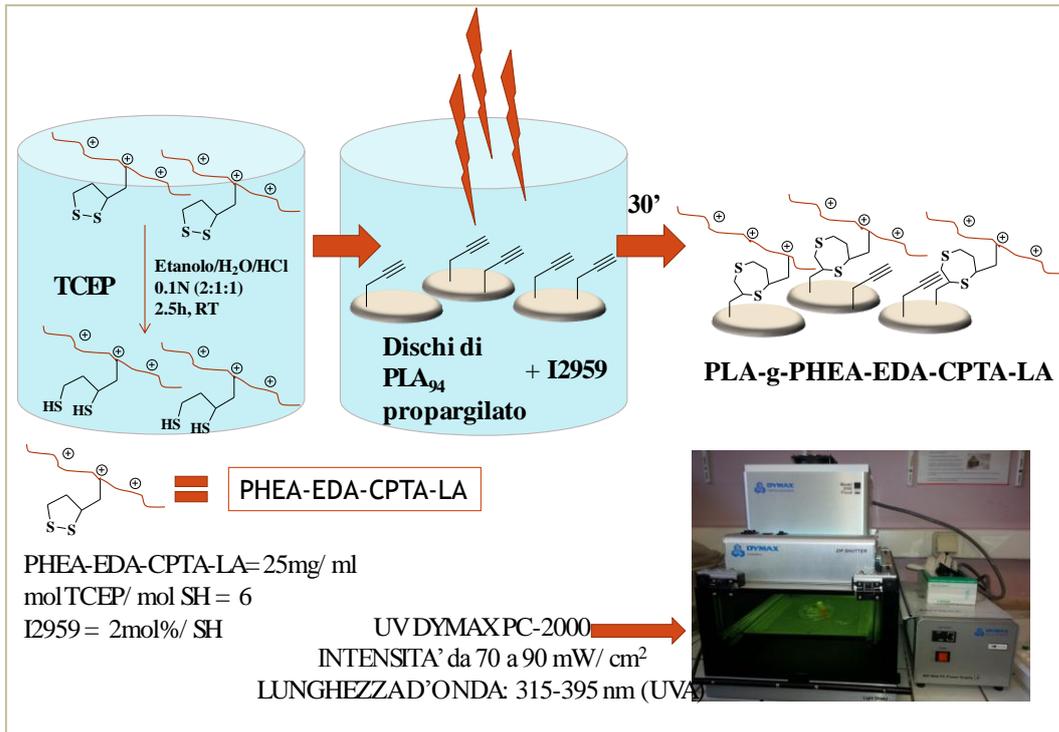


Figura 3.29. Schema della preparazione di PLA-g-PHEA-EDA-CPTA-LA mediante reazione tiolo-alchino fotocatalizzata. In figura è mostrato lo step di riduzione e la successiva irradiazione.

Al termine del processo non appaiono evidenti variazioni morfologiche dei dischi di PLA, e dato che la modificazione chimica avviene solo sulla superficie del PLA propargilato, è stata eseguita un'analisi XPS per dimostrare la presenza dei costituenti elementari del PHEA-EDA-CPTA-LA sulla superficie modificata. I risultati sono mostrati in **Figura 3.30**. Dall'analisi dello spettro si evince la presenza in superficie di azoto e zolfo, elementi presenti esclusivamente nel PHEA-EDA-CPTA-LA, oltre che carbonio ed ossigeno. L'energia di binding rilevata per il picco attribuito allo zolfo è inoltre compatibile con la formazione di un legame tioetereo [C. Wang et al., 2013].

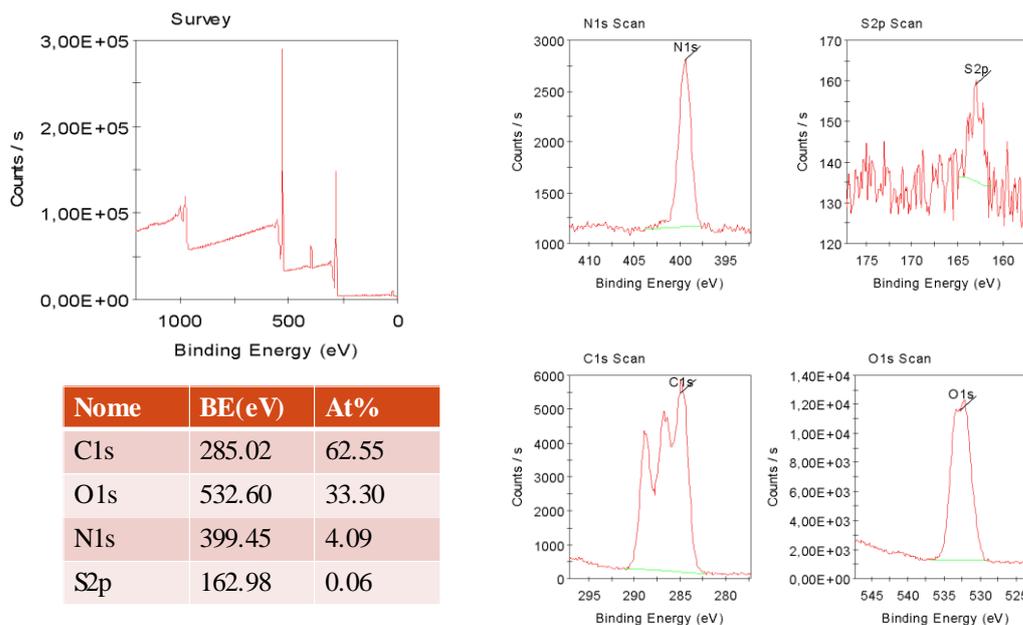


Figura 3.30. Spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS) del PLA-g-PHEA-EDA-CPTA-LA.

Per dimostrare pienamente l'immobilizzazione covalente, una sonda fluorescente, l'isotiocianato di fluoresceina, è stata legata al nuovo copolimero, ottenendo il PHEA-EDA-CPTA-LA-FITC. Il PLA-g-PHEA-EDA-CPTA-LA-FITC ottenuto con le stesse condizioni descritte per il copolimero senza la sonda fluorescente è stato poi solubilizzato in THF alla concentrazione di 10 mg/ml e sottoposto ad analisi SEC con rivelazione rifrattometrica e fluorimetrica (λ_{ex} : 437 nm, λ_{em} : 447 nm). Come si può vedere dal cromatogramma riportato in **Figura 3.31**, è presente un picco fluorescente in corrispondenza del picco che corrisponde al PLA, dimostrando che il PHEA-EDA-CPTA-LA-FITC non è solamente adsorbito sulla superficie di PLA, ma si tratta di un legame di natura covalente.

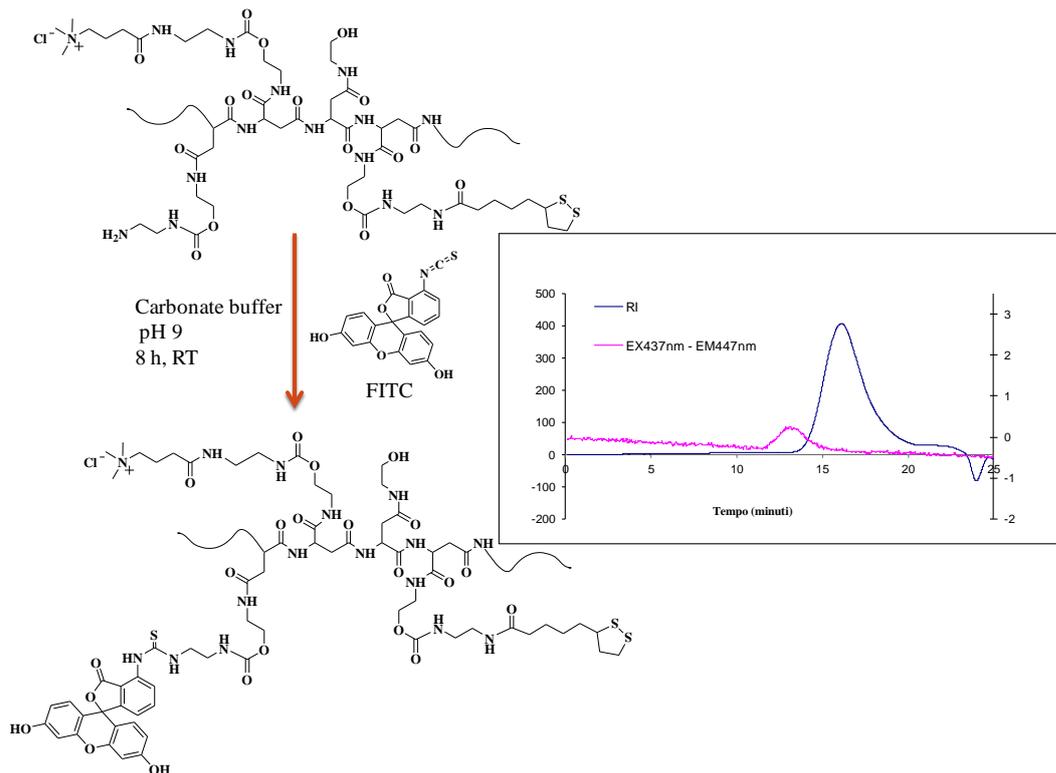


Figura 3.31. Schema di reazione per l'ottenimento del PHEA-EDA-CPTA-LA-FITC e cromatogramma SEC del PLA-g-PHEA-EDA-CPTA-LA-FITC.

L'attività di anti-aderenza e antibiofilm delle superfici modificate è stata valutata mediante due saggi, i cui risultati sono diagrammati in **Figura 3.32**, in cui le superfici sono state messe a contatto con delle dispersioni di 4 ceppi batterici, sia gram-positivi (*S. Epidermidis* e *S. Aureus*) che gram-negativi (*E. Coli* e *P. Aeruginosa*). Le superfici di PLA-g-PHEA-EDA-CPTA-LA hanno mostrato di essere molto attive contro tutti i ceppi se paragonate a superfici di PLA94, con una riduzione di aderenza sorprendentemente superiore e una marcata riduzione della formazione di biofilm.

Inoltre, è stata valutata la biocompatibilità delle superfici di PLA-g-PHEA-EDA-CPTA-LA, monitorando in vitro la proliferazione di fibroblasti di topo L929, come raccomandato dagli International and European Standards [AFNOR]. Tali studi (**Figura 3.33**) dimostrano che oltre alla notevole attività antibatterica, le superfici ottenute risultano citocompatibili non ostacolando, dopo 8 giorni la proliferazione fibroblastica rispetto ai controlli.

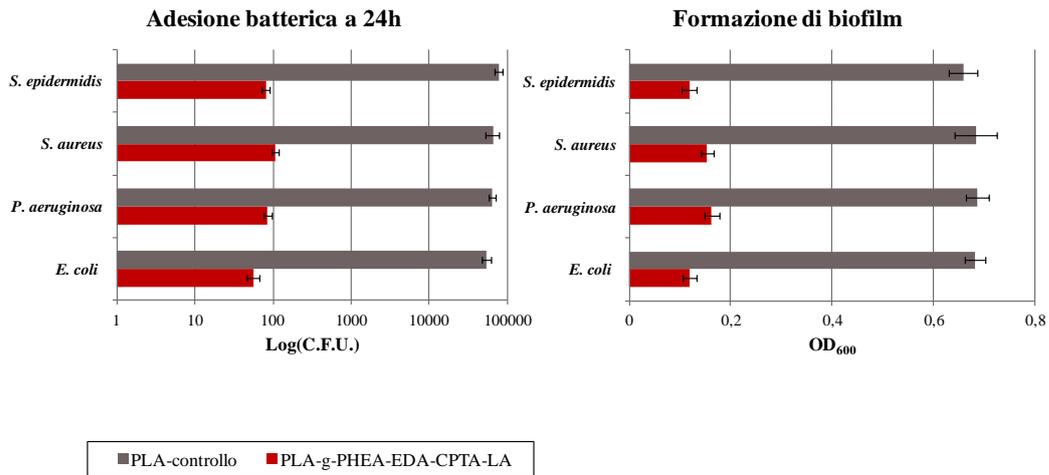


Figura 3.32. Studi sull'attività antibatterica del PLA-g-PHEA-EDA-CPTA-LA.

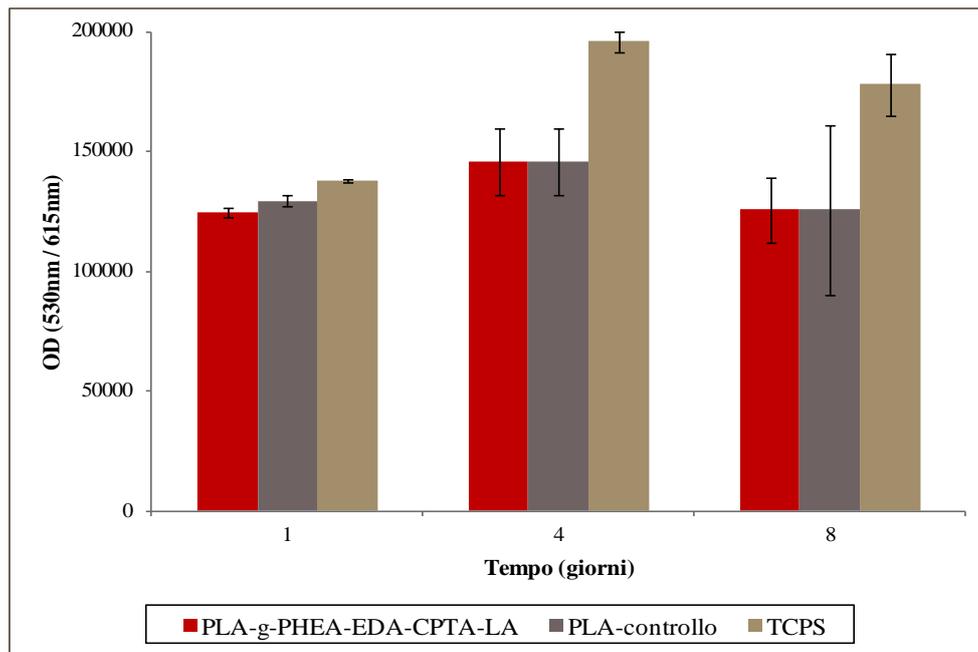


Figura 3.33. Citocompatibilità in vitro del PLA-g-PHEA-EDA-CPTA-LA, su fibroblasti L929.

3.3.1. Conclusioni.

Sono state preparate superfici antibatteriche di PLA dal grafting di un derivato policationico del PHEA, il PHEA-EDA-CPTA-LA. Ciò è stato ottenuto combinando una tecnica di attivazione anionica della superficie PLA che consente di ottenere una superficie propargilata, senza alcuna degradazione del poliestere, insieme con una reazione fotocatalizzata estremamente efficiente e chemoselettiva, tiolo-alchino in eterofase.

Le superfici ottenute risultano altamente efficaci contro i ceppi batterici testati, diminuendo la loro adesione e la formazione di biofilm. Inoltre, le nuove superfici antibatteriche sono risultati essere biocompatibili e potrebbero essere considerate per indagini future nel campo dei materiali biodegradabili per applicazioni biomediche.

4. PARTE SPERIMENTALE

4.1 MATERIALI

L'Inulina (from Dahlia Tubers Mw \approx 5000 Da), la Spermina (Spm), la dietilenetriammina (DETA), la etilendiammina (EDA), l'acido (\pm)- α -lipoico (LA), il Bis(4-nitrofenil)carbonato (para-nitrofenil carbonato, PNFC), la N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimmide cloridrato (EDC·HCl), l' N-idrossisuccinimide, l'1-idrossibenzotriazolo idrato (HOBT), l'agarosio, il bromuro di etidio (ETBr), la polietilenimina ramificata (BPEI, 25 kDa), gli standard SEC di ossido di polietilene e di pullulano a vari pesi molecolari, il monoamino monometossi polietilenglicole 2000 Da (PEG₂₀₀₀-NH₂), la fluoresceina isotiocianato (FITC), il 2-Bromoisobutirril bromuro (BIBB), il sodio metacrilato (MANa⁺), la 2,2'-bipiridina (bpy, 99%), il bromuro di rame (I) (Cu^IBr 99.999%), l'ortoftalaldeide (OPA), il 2-mercaptoetanololo (ME), la tobramicina (TOB), il 2-idrossi-4'-(2-idrossietossi)-2-metilpropiofenone (I2959), la soluzione 0.5 M di tris(2-carbossietil)fosfina cloridrato (TCEP), il tris idrossimetil aminometano (TRIZMA), la mucina di stomaco porcino, l'acido dietiltriainopentaacetico (DTPA), la soluzione aminoacidica RPMI 1640, l'Egg Yolk Emulsion, il DNA from Calf Thimus, la resina DOWEX 50WX8 100-200 mesh, le resine Sephadex G25 e G15, la trietilamina, l'ossido di deuterio (D₂O), l'acqua Nuclease Free, l'acetone, il dietil-etero (EtOEt), il metanolo (MeOH), l'N,N-dimetilformammide anidra e non anidra (DMFa e DMF), la dimetilacetammide (DMA), il tetraidrofurano (THF) sono state acquistate dalla Sigma Aldrich. Il THF è stato reso anidro mediante distillazione in presenza di una miscela benzophenone/sodio metallico. Il diclorometano (DCM) è stato acquistato da VWR. Il cloruro di sodio (NaCl) è stato acquistato da MERCK. Il cloruro di potassio (KCl) è stato acquistato dalla Carlo Erba. Le membrane da dialisi SpectraPor sono state acquistate dai Spectrum Laboratories Inc.

I mezzi di coltura cellulare, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) e Williams' E medium, il siero bovino fetale (FBS), la penicillina, la streptomina, la glutammina e l'anfotericina B sono stati acquistati dalla Euroclone. Il mezzo OPTI-MEM I reduced serum medium, il PrestoBlu e il siero equino sono stati acquistati da Invitrogen Life

Technologies. Il 3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-5 (3 carboxymethoxyphenyl) 2 (4 sulfophenyl)-2H-tetrazolium (reattivo MTS) e il Luciferase Assay System sono stati acquistati da Promega (Milan, Italy).

Short interfering RNA (siRNA) e plasmidi (pDNA).

Il plasmide codificante per la luciferasi (pGL3 promoter vector), è stato acquistato da Thermo Scientific Dharmacon. I siRNA, le cui sequenze sono riportate sotto, sono stati acquistati da Eurofins Genomics (siGL3 e siGL3-Cy5) e da Eurogentec S.A (siGL2 e siE2F1).

siRNA Luciferase GL3 (siGL3, Mw 13300 Da): sense 5'-CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT-3'; antisense 5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT-3';

siRNA Luciferase GL3, marcato con la sonda fluorescente Cy5 (siGL3-Cy5, Mw 13931 Da): sense 5'-Cy5-CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT -3'; antisense 5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT-3';

siRNA Luciferase GL2 (siGL2, Mw 13315 Da): sense 5'-CGUACGCGGAAUACUUCGAdTdT-3'; antisense 5'-UCGAAGUAUCCGCGUACGdTdT-3'

siRNA E2-promoter binding Factor 1 (siE2F1, Mw 13315 Da): sense 5'-GUCACGCUAUGAGACCUCAdTdT-3'; antisense 5'-UGAGGUCUCAUAGCGUGACdTdT-3'.

Culture cellulari.

Per gli studi biologici in vitro sono state utilizzate le seguenti linee cellulari:

Cellule di epitelio bronchiale umano (16HBE), coltivate a 37 °C in atmosfera umidificata contenente il 5% di CO₂, in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) arricchito con il 10% di siero bovino fetale (FBS), l'1% (100 U/ml) di penicillina, l'1% (100 U/ml) di streptomycina, 4 mM glutamina e lo 0.25% di anfotericina B;

Cellule di carcinoma epatocellulare umano (JHH6), coltivate a 37 °C in atmosfera umidificata contenente il 5% di CO₂, in mezzo Williams' E arricchito con il 10% di siero bovino fetale (FBS), l'1% (100 U/ml) di penicillina, l'1% (100 U/ml) di streptomicina.

Fibroblasti murini (L929), coltivate a 37 °C in atmosfera umidificata contenente il 5% di CO₂, in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) arricchito con il 10% di siero equino, l'1% (100 U/ml) di penicillina, l'1% (100 U/ml) di streptomicina, 4 mM glutamina.

Culture batteriche.

Per gli studi sull'attività antibatterica e sulla formazione di biofilm sono stati impiegati 4 differenti ceppi batterici:

Escherichia coli: ceppo NECS19923, batteri geneticamente modificati per l'espressione della Green Fluorescent Protein (GFP);

Staphylococcus aureus: ceppo NSA4201;

Staphylococcus epidermidis: ceppo NSE175861;

Pseudomonas aeruginosa: ceppo NPA01.

Le colture batteriche sono state condotte in mezzo Muller Hinton a 37°C sotto agitazione in condizioni aerobiche.

4.2. SINTESI DEI BIOMATERIALI.

4.2.1. Sintesi dei derivati dell'inulina.

Sintesi del copolimero Inulina-Spermina (INU-Spm) via "Enhanced Microwave Synthesis" (EMS).

Per standardizzare il peso molecolare medio del polimero di partenza, una soluzione acquosa di inulina è stata dializzata contro acqua bidistillata utilizzando una membrana

Spectrapor Dialysis Tubing con un cut-off pari a 1000 Da. Il solido ottenuto dopo freeze drying è stato seccato in stufa a 70°C per 24 h prima dell'utilizzo. 100 mg di inulina così purificata (0.6 mmoli di unità ripetitive di fruttosio) sono stati solubilizzati in DMFa, ottenendo una concentrazione finale di 25 mg/ml. Alla soluzione è stata poi aggiunta una quantità di PNFC tale da ottenere un rapporto molare tra PNFC e unità ripetitive di fruttosio dell'inulina, pari a 0.5. la miscela è poi stata trasferita in un recipiente di reazione cilindrico in vetro trasparente alle microonde e posta a reagire in un reattore a microonde CEM Discover Microwave Reactor. La reazione di attivazione in presenza di PNFC è stata condotta per un periodo massimo di un'ora, irradiando con microonde ad una potenza di 25 W e mantenendo la temperatura a 60 °C grazie all'introduzione nella camera di reazione di un flusso d'aria compressa controllato e raffreddato. In seguito, la miscela contenente l'inulina attivata è stata aggiunta goccia a goccia ad una soluzione di Spm in DMFa, alla concentrazione di 121.4 mg/ml (essendo il rapporto molare tra Spm e unità ripetitive di fruttosio pari a 1.0) e la miscela ottenuta è stata irradiata nuovamente per un'ora in condizioni analoghe a quelle sopra riportate. Dopo tale tempo la miscela di reazione è stata lasciata ad agitare a temperatura ambiente per ulteriori 4 h in assenza di irradiazione e successivamente aggiunta ad un eccesso di miscela etere etilico/acetone 2:1 (v/v). La sospensione ottenuta è stata centrifugata e il residuo solido lavato per due volte con la stessa miscela di solventi. Eventuali residui di solventi organici rimasti al termine dei lavaggi sono stati allontanati sottovuoto e il solido, solubilizzato in 1 ml di acqua bi distillata, è stato purificato ulteriormente mediante dialisi esaustiva contro acqua distillata (Spectrapor Dialysis Tubing; cut-off: 1000 Da). Il contenuto della dialisi è stato essiccato mediante freeze-drying.

Sintesi del copolimero INU-Spm via metodica termica convenzionale.

100 mg di inulina (0.6 mmoli di unità ripetitive di fruttosio), purificata come precedentemente descritto, sono stati solubilizzati in DMFa, ottenendo una concentrazione finale di 25 mg/ml. Alla soluzione è stata poi aggiunta una quantità di PNFC tale da ottenere un rapporto molare tra PNFC e unità ripetitive di fruttosio dell'inulina, pari a 0.5. la miscela è stata posta a reagire a 40°C in un bagno termostatico ad acqua, sotto costante agitazione, per 4 h. In seguito, la miscela contenente l'inulina

attivata è stata aggiunta goccia a goccia ad una soluzione di Spm in DMFa, alla concentrazione di 121.4 mg/ml (essendo il rapporto molare tra Spm e unità ripetitive di fruttosio pari a 1.0) e la miscela ottenuta è stata posta a reagire a 25°C o a 40°C, per 24 h, sotto costante agitazione. Il prodotto puro è stato ottenuto mediante i procedimenti di isolamento e purificazione riportati nella sezione precedente.

Sintesi del copolimero Inulina-dietilentriammina (Inu-DETA) via “Enhanced Microwave Synthesis” (EMS).

250 mg di Inulina (previamente seccata in stufa a 70 °C per 24 h), corrispondenti a 1.5 mmoli di unità ripetitive di fruttosio, sono stati solubilizzati in 4 ml di DMFa. A completa solubilizzazione del polimero, è stata aggiunta, a temperatura ambiente, una soluzione di PNFC (234 mg in 1 ml di DMFa). La miscela ottenuta è stata immediatamente posta a reagire in reattore a microonde, irradiando per 1 h ad una potenza di 25 W e mantenendo la temperatura di reazione a 60 °C. Al completamento della fase di attivazione, la miscela di reazione contenente l'inulina attivata è stata aggiunta goccia a goccia e molto lentamente, a temperatura ambiente e sotto agitazione ad una soluzione di DETA in DMFa (381 µl di DETA in 1 ml). La miscela è stata poi posta a reagire, a temperatura ambiente, sotto agitazione, per ulteriori 4 h.

Le quantità di PNFC e di DETA utilizzate per la sintesi del copolimero sono state determinate utilizzando i seguenti rapporti molari:



Il prodotto solido, di colore giallo pallido, è stato ottenuto mediante precipitazione in un eccesso di una miscela etere etilico/DCM in rapporto 2:1 v/v. Il solido è stato successivamente sottoposto a 2 lavaggi con la stessa miscela di precipitazione e ad un ulteriore lavaggio usando una miscela EtOEt/DCM/acetone in rapporto 2:1:0.5. I residui di solventi organici, rimasti al termine dei lavaggi, sono stati allontanati sottovuoto, il solido è stato solubilizzato in 1 ml di acqua bidistillata e il polimero purificato ulteriormente mediante gel filtration cromatography, usando una miscela di resine

Sephadex G25 e G15 come fase stazionaria e acqua bidistillata come eluente. Al termine della purificazione, la soluzione contenente il copolimero è stata essiccata mediante freeze drying.

4.2.2. Sintesi dei derivati dell' α,β -poli(N-2-idrossietil)-D,L-aspartammide (PHEA).

Sintesi del PHEA

L' α,β -Poli(N-2-idrossietil)-D,L-aspartammide (PHEA) è stata sintetizzata e purificata con una procedura già pubblicata in letteratura [Giammona et al. 1987]. I dati spettroscopici sono in accordo con le strutture attribuite: $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, D_2O , 25 °C), δ : 2.82 (m, 2H, -CH-CH₂-CO-NH-), 3.36 (t, 2H, -NH-CH₂-CH₂-OH), 3.66 (t, 2H, -CH₂-CH₂-OH), 4.72 (m, 1H, -NH-CH-CO-CH₂-) [Giammona et al., 1987; Mendichi et al., 2003]. Il peso molecolare medio pesato (M_w) del PHEA utilizzato negli esperimenti riportati in questa tesi è risultato pari a 45087 Da, con una polidispersità (M_w/M_n) di 2.08.

Sintesi del copolimero PHEA-IB-pMANa⁺

Il PHEA-IB-pMANa⁺ è stato sintetizzato tramite una reazione di Polimerizzazione Radicalica a Trasferimento Atomico (Atom Transfer Radical Polymerization o ATRP) a partire dal macroiniziatore PHEA-BIB, sintetizzato secondo la procedura precedentemente riportata in letteratura [G. Cavallaro et al., 2009]. Brevemente, il PHEA (500 mg, 3.16 mmoli di unità ripetitive) è stato solubilizzato in DMAa (10 ml). La soluzione così ottenuta è stata posta in un bagno a 0 °C e sono stati aggiunti la TEA (440.47 μl ; 3.16 mmoli) e il BIBB (390.6 μl ; 3.16 mmoli) e la miscela risultante è stata lasciata andare a temperatura ambiente in un tempo complessivo di 4h, trascorse le quali la miscela è stata filtrata su carta per allontanare il bromuro di trietilammonio. Il prodotto solido è stato isolato per precipitazione, goccia a goccia e sotto agitazione, del filtrato in un eccesso di etere dietilico. Il solido ottenuto è stato recuperato per centrifugazione, lavato nel medesimo solvente ed essiccato sotto vuoto. Il prodotto è stato purificato ulteriormente mediante dialisi esaustiva contro acqua (Spectrapor Dialysis Tubing; cut-off: 12000-14000 Da) ed essiccato mediante freeze drying.

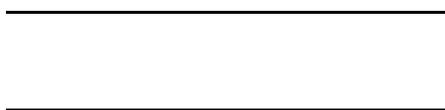
Il PHEA-IB-pMANa⁺ è stato sintetizzato secondo la procedura precedentemente riportata in letteratura [M. Licciardi et al., 2011]. 150 mg di PHEA-BIB (0.25 mmol dei gruppi BIB) sono stati solubilizzati in 12 ml di una miscela acqua bidistillata/DMF 1:1. Alla soluzione, sono stati aggiunti 1.62 g di MAMaNa⁺ (0.015 mmol) e la miscela è stata posta a gorgogliare con argon. Dopo circa 30 min la temperatura della miscela di reazione è stata portata a 50 °C in un bagno termostatico ad acqua, ed è stata effettuata l'aggiunta, in sequenza, del ligando biperidina (93.7 mg, corrispondenti a 0.6 mmol) e del catalizzatore Cu^IBr (21.51 mg, corrispondenti a 0.15 mmol). La reazione è stata condotta per 20 ore sotto continua agitazione a 50 C e in atmosfera di argon. La reazione è poi stata interrotta portando la miscela a contatto con l'aria fino alla completa ossidazione del rame. Il prodotto solido è stato ottenuto per precipitazione in un eccesso di acetone e isolato per centrifugazione. Il solido è stato successivamente lavato due volte in acetone e seccato sottovuoto. Il solido ottenuto è stato solubilizzato in acqua bidistillata e purificato ulteriormente mediante dialisi contro acqua (Spectrapor Dialysis Tubing; cut-off: 12000-14000 Da); per allontanare eventuali residui di rame adsorbito sul polimero, il contenuto della dialisi è stato sottoposto a passaggio su colonna con resina a scambio ionico DOWEX 50WX8 ed è stato infine essiccato mediante freeze drying.

Sintesi del copolimero PHEA-PEG₂₀₀₀-BIB.

Il copolimero PHEA- -BIB è stato sintetizzato a partire dal copolimero PHEA-PEG₂₀₀₀, ottenuto mediante una procedura precedentemente riportata in letteratura [E.F. Craparo et al., 2006]. Brevemente, 400 mg PHEA (2.53 mmoli di unità ripetitive di PHEA) sono stati solubilizzati in 10 ml DMFa. A completa solubilizzazione sono stati aggiunti 77.46 mg di PNFC solido e la miscela di reazione è stata posta a 40 C per 2.5 ore. Dopo tale tempo, una soluzione di - (610 mg, corrispondenti a 0.305 mmol di PEG, in 10 ml di DMFa) è stata aggiunta goccia a goccia alla miscela, che è stata lasciata a reagire a 60 C per ulteriori 2.5 ore, sotto continua agitazione. Trascorso il tempo di reazione, il prodotto solido è stato isolato per precipitazione in un eccesso di dietil-etero. Il residuo è stato recuperato per centrifugazione ed è stato lavato in una miscela dietil-etero/DCM, (2:1) e (1.5:1), e in acetone. Successivamente, i solventi organici residui sono stati allontanati sotto vuoto e il prodotto è stato disperso in acqua

bidistillata e ulteriormente purificato mediante dialisi esaustiva contro acqua (Spectrapor Dialysis Tubing; cut-off: 12000-14000 Da), per essere poi essiccato tramite freeze-drying.

200 mg di PHEA-PEG₂₀₀₀ (corrispondenti a 0.93 mmol di unità ripetitive di PHEA) sono stati solubilizzati in 4 ml di DMAa e posti in un bagno di acqua e ghiaccio a 0 °C. Sono stati aggiunti a tale soluzione 130.5 µl (0.93 mmoli) di TEA e 115.82 µl (0.93 mmoli) di BIBB e la miscela risultante è stata lasciata andare a temperatura ambiente in un tempo complessivo di 4h sotto continua agitazione. Le quantità di reattivi utilizzate sono state calcolate secondo i rapporti:

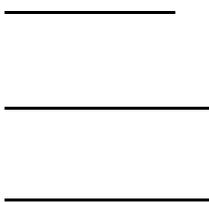


Trascorse 4 ore, la miscela di reazione è stata filtrata su carta (per allontanare il bromuro di trietilammonio) e il prodotto solido è stato ottenuto per precipitazione in un eccesso di etere etilico. il prodotto solido è stato recuperato per centrifugazione e lavato nel medesimo solvente di precipitazione. Il precipitato è stato poi solubilizzato in acqua bidistillata e dializzato esaustivamente contro acqua (Spectrapor Dialysis Tubing; cut-off: 12000-14000 Da). La soluzione è stata successivamente essiccata mediante freeze drying.

Sintesi del PHEA-PEG₂₀₀₀-IB-pMANa⁺.

Il copolimero PHEA-PEG₂₀₀₀-IB-pMANa⁺ è stato sintetizzato tramite una reazione di Polimerizzazione Radicalica a Trasferimento Atomico (Atom Transfer Radical Polymerization o ATRP). In particolare, 150 mg di PHEA-PEG₂₀₀₀-BIB (0.25 mmol dei gruppi BIB) sono stati pesati e solubilizzati in 12 ml di una miscela acqua/DMF 1:1. Alla soluzione, sono stati aggiunti 1.62 g di MAMaNa⁺ (0.015 mmol) e la miscela è stata posta a gorgogliare con argon. Dopo circa 30 min la temperatura della miscela di reazione è stata portata a 50 °C, grazie ad un bagno termostatico ad acqua, ed è stata effettuata l'aggiunta, in sequenza, del ligando Bipyridina (93.7 mg, corrispondenti a 0.6 mmol) e del catalizzatore Cu^IBr (21,51 mg, corrispondenti a 0.15 mmol). La reazione è

stata condotta per 20 ore sotto continua agitazione a 50 C e in atmosfera di argon. Le quantità sono state calcolate secondo i rapporti:



La reazione è poi stata interrotta portando la miscela a contatto con l'aria fino alla completa ossidazione del rame. Il prodotto solido è stato ottenuto per precipitazione in un eccesso di acetone e isolato per centrifugazione a 5 C, 9800 RPM per 10 min. il solido è stato successivamente lavato due volte in acetone e seccato sottovuoto . Il prodotto ottenuto è stato solubilizzato in acqua bidistillata e purificato ulteriormente mediante dialisi contro acqua (Spectrapor Dialysis Tubing; cut-off: 12000-14000 Da). Infine, il contenuto della dialisi è stato sottoposto a passaggio su resina a scambio ionico DOWEX 50WX8 ed è stato essiccato mediante freeze drying.

Sintesi del copolimero PHEA-EDA-CPTA.

La sintesi del PHEA-EDA-CPTA è stata condotta in accordo alla metodica precedentemente riportata in letteratura [M. Licciardi et al., 2006]. Brevemente: una soluzione di PHEA (250 mg, 1.58 mmoli di unità ripetitive) in 3 ml di DMFa, è stata aggiunta goccia a goccia ad una soluzione di BNPC (480 mg, 1.58 mmoli) in 4 ml dello stesso solvente sotto costante agitazione e la miscela è stata mantenuta a 40 °C per 4 h. Trascorso questo tempo, la soluzione PHEA attivato è stata aggiunta sotto agitazione a 530µl di etilendiammina (7.90 mmoli) e la miscela è stata mantenuta a temperatura ambiente per altre 4 h. La miscela di reazione è stata quindi precipitata in acetone e il solido ottenuto in sospensione è stato isolato mediante centrifugazione e lavato più volte con lo stesso solvente. Il prodotto è stato ulteriormente purificato mediante dialisi esaustiva contro acqua (Spectrapor Dialysis Tubing; cut-off: 12000-14000 Da) e infine essiccato mediante freeze drying.

100 mg di PHEA-EDA (corrispondenti a 0.26 mmoli di $-NH_2$) sono stati solubilizzati in 5 ml di una miscela 1:1 $H_2O/DMSO$ seguita dall'aggiunta di CPTA (24.16 mg , 0.13mmoli) e HOBT (26.95 mg, 0.19 mmoli) . Dopo aver aggiustato il pH a 6.8 con NaOH 0.1 N, è stata aggiunta l'EDC • HCl alla miscela di reazione (38.34 mg , 0.19 mmoli) e il pH è stato mantenuto costante usando HCl 0.1 N per almeno 2 ore. La miscela di reazione è stata lasciata a temperatura ambiente per una notte e poi purificata mediante dialisi esaustiva contro acqua (Spectrapor Dialysis Tubing; cut-off: 12000-14000 Da); il prodotto solido è stato poi ottenuto per freeze-drying.

Sintesi del copolimero PHEA-EDA-CPTA-LA.

24.74 mg di Acido lipoico (0.12 mmol), sono stati solubilizzati in 375 μ l di DMSO. A completa solubilizzazione, sono stati aggiunti 16.57 mg di NHS (0.144 mmoli) e 34.50 mg EDC (0.18 mmol). La miscela è stata fatta reagire a 40 °C per 4 h in bagno termostato sotto costante agitazione. Dopo questo tempo di attivazione, è stata aggiunta una soluzione di PHEA-EDA-CPTA (100 mg in 2.5 ml di DMSO) goccia a goccia alla soluzione di acido lipoico attivato e la miscela di reazione è stata mantenuta a 40 °C per altre 24 h. La miscela è stata poi precipitata in un eccesso di una miscela costituita da etere etilico/acetone 1:1. La sospensione ottenuta è stata centrifugata e il residuo solido lavato varie volte con la stessa miscela. I solventi organici sono stati rimossi sotto vuoto e il solido è stato disciolto in acqua bidistillata e purificato ulteriormente mediante dialisi esaustiva contro acqua (Spectrapor Dialysis Tubing; cut-off: 12000-14000 Da). Il prodotto è stato infine seccato mediante freeze-drying.

Coniugazione della fluoresceina isotiocianato (FITC) al PHEA-EDA-CPTA-LA.

100 mg di PHEA-EDA-CPTA-LA sono stati dispersi in 10 ml di tampone sodio carbonato/bicarbonato 0.1 M a pH 9. Alla soluzione ottenuta sono stati aggiunti, goccia a goccia e molto lentamente, 1,47 ml di una soluzione di FITC 1 mg/ml in DMSO. La miscela è stata posta sotto agitazione al buio per 5 ore a temperatura ambiente. Il prodotto è stato poi purificato mediante dialisi esaustiva contro acqua (Spectrapor

Dialysis Tubing; cut-off: 12000-14000 Da). Il solido puro è stato ottenuto mediante freeze-drying.

4.2.3. Preparazione delle superfici antibatteriche.

Propargilazione delle superfici di PLA.

Il PLA è stato sintetizzato mediante ring-opening copolymerization dell'acido L-lattico (88%) e DL-lattico (12%) (PURAC, Lyon, France) utilizzando come catalizzatore il 2-etilesanoato di stagno. Il peso molecolare medio pesato (M_w) del PLA utilizzato negli esperimenti riportati in questa tesi è risultato pari a 200000 Da, con una polidispersità (M_w/M_n) di 1.9.

Le superfici di PLA sono state ottenute utilizzando una pressa idraulica riscaldante (Carver press 4120-289). Brevemente, il PLA è stato riscaldato a 130 °C e pressato per 5 minuti a $1.5 \cdot 10^7$ Pa. Il materiale così ottenuto, avente uno spessore di 500 μm , è stato lasciato a raffreddare sotto pressione e poi tagliato in dischi del diametro di circa 1.76 cm^2 (125 mg).

La reazione di propargilazione delle superfici di PLA è stata eseguita come descritto precedentemente [S. El Habnoui et al., 2011]. Brevemente, 6 dischi di PLA sono stati immersi in 180 ml di una miscela anidra costituita da THF/EtOEt 1:2 (v/v). Il sistema è stato portato alla temperatura di -50 °C attraverso un bagno di etanolo e azoto liquido e l'ossigeno è stato allontanato mediante gorgogliamento di argon. Sono stati poi aggiunti 1.5 ml di una soluzione di diisopropil amiduro di litio 2 M (3 mmoli). Trascorsi 30 min, in cui il sistema raggiunge i -30 °C, sono stati aggiunti 700 μl di bromuro di propargile (6 mmoli). Il sistema è stato poi mantenuto sotto costante agitazione per ulteriori 60 minuti a -30 °C e successivamente lasciato andare a temperatura ambiente. I dischi sono stati lavati in acqua, MeOH ed etere etilico e i solventi organici allontanati sotto vuoto. I dischi sono stati conservati in freezer a circa -20 °C.

Preparazione delle superfici di PLA-g-PHEA-EDA-CPTA-LA mediante reazione chemioselettiva tiolo-ino fotocatalizzata.

25 mg di PHEA-EDA-CPTA-LA o PHEA-EDA-CPTA-LA-FITC sono stati dispersi in 250 μ l di HCl 0,1 N. Alla dispersione ottenuta sono stati aggiunti 250 μ l di una soluzione di TCEP 0,5 M in acqua distillata e 500 μ l di etanolo. La soluzione ottenuta è stata posta sotto agitazione per 2.5 h, al buio e a temperatura ambiente. Al termine di questo tempo la soluzione è stata addizionata di 100 μ l di una soluzione di I2959 (5 mM) in una miscela H₂O/etanolo 1:1, e 360 μ l di tale miscela sono stati posti immediatamente a reagire con una superficie discoidale di PLA propargilato, del diametro di circa 1 cm, irradiando il sistema per 15 minuti (per ciascuna faccia del disco) all'interno di un dispositivo UV DYMEX PC-2000 equipaggiato con una sorgente di luce UV da 315 a 375 nm ($\lambda_{\max} = 365$ nm), con una intensità compresa tra pari a circa 44 mW/cm². Al termine della reazione il disco funzionalizzato è stato lavato più volte dapprima con HCl 0.01N, poi con H₂O distillata e con una miscela H₂O/etanolo 1:1 (v/v) e infine con etanolo ed etere etilico. I solventi sono stati allontanati sotto vuoto e i dischi funzionalizzati conservati in freezer a -20 °C fino alle successive caratterizzazioni.

4.3. CARATTERIZZAZIONE CHIMICO-FISICA DEI BIOMATERIALI.

4.3.1. Spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare ¹H NMR.

Gli spettri ¹H NMR sono stati registrati in D₂O (VWR) utilizzando uno spettrometro Bruker AC-250 operante a 250.13 MHz.

Spettro ¹H NMR di INU-Spm: δ 1.67 (m, 4H_{Spm} -NH-CH₂-**CH₂**-CH₂-CH₂-NH-), δ 1.82 (m, 4H_{Spm} -NH-CH₂-**CH₂**-CH₂-NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH-CH₂-**CH₂**-CH₂-NH₂), δ 2.8- δ 3.0 (m, 8H_{Spm} -CO-NH-CH₂-CH₂-**CH₂**-NH-**CH₂**-CH₂-CH₂-**CH₂**-NH-**CH₂**-CH₂-CH₂-NH₂), δ 3.1- δ 3.5 (m, 4H_{Spm} -CO-NH-**CH₂**-CH₂-CH₂-NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH-CH₂-CH₂-**CH₂**-NH₂), δ 3.5- δ 4.0 (m, 5H_{Inu}, -**CH₂**-OH; -**CH**-CH₂-OH; -C-**CH₂**-O-), δ 4.03 (t, 1H_{Inu}, -**CH**-OH), δ 4.18 (d, 1H_{Inu}, -**CH**-OH).

Spettro FT-IR (KBr) di INU-Spm: 3300- 3500 cm⁻¹ (v OH_{Inu}, v NH_{Spm}, NH_{2Spm}), 1125-1065 cm⁻¹ (v C-N_{Spm}).

Spettro 1H NMR di INU-DETA: δ 2.68 (m, 2H_{Det}, -CH₂-NH₂), δ 2.81 (m, 4 H_{Det}, -CH₂-NH-CH₂), δ 3.2 (m, 2H_{Det}, -O-CO-NH-CH₂-), δ 3.5- 4.0 (m, 5H_{Inu}, -CH₂-OH; -CH-CH₂-OH; -C-CH₂-O-), δ 4.03 (t, 1H_{Inu}, -CH-OH), δ 4.18 (d, 1H_{Inu}, -CH-OH).

Spettro 1H NMR di PHEA-IB-pMANa⁺: δ 1-1.4 (m_{MA}, 3H, CH₃; 6H_{IB}, CH₃), δ 1.62 (m, 2H_{MA}, CH₂); δ 2.84 (m, 2H_{PHEA}, CH₂), δ 3.38 (m, 2H_{PHEA}, CH₂), δ 3.56 (m, 2H_{PHEA}, CH₂), δ 3.69 (m, 2H_{PHEA}, CH₂), δ 4.20 (m, 2H_{PHEA}, CH₂) e δ 4.70 (m, 1H_{PHEA}, CH).

Spettro 1H NMR di PHEA-PEG₂₀₀₀-BIB: δ 1.90 (s, 6H_{BIB}, CH₃) per il BIB; δ 2.84 (m, 2H_{PHEA}, CH₂), δ 3.38 (m, 2H_{PHEA}, CH₂), δ 3.68 (m, 2H_{PHEA}, CH₂), δ 4.33 (m, 2H_{PHEA}, CH₂) e δ 4.76 (m, 1H_{PHEA}, CH), δ 3.56. (m, 176H_{PEG2000}, -CH₂-CH₂-O-).

Spettro 1H NMR di PHEA-PEG-IB-pMANa⁺: δ 1-1.4 (m_{MA}, 3H, CH₃; 6H_{IB}, CH₃), δ 1.62 (m, 2H_{MA}, CH₂); δ 2.84 (m, 2H_{PHEA}, CH₂), δ 3.38 (m, 2H_{PHEA}, CH₂), δ 3.56 (m, 2H_{PHEA}, CH₂), δ 3.69 (m, 2H_{PHEA}, CH₂), δ 4.20 (m, 2H_{PHEA}, CH₂) e δ 4.70 (m, 1H_{PHEA}, CH), 3.56. (m, 176H, -CH₂-CH₂-O-) per il PEG₂₀₀₀.

Spettro 1H NMR di PHEA-EDA-CPTA: δ 1.99 (m, 2 H_{CPTA}, -CO-CH₂-CH₂-CH₂-N⁺(CH₃)₃), 2.27 (m, 2H_{CPTA}, -CO-CH₂-CH₂-CH₂-N⁺(CH₃)₃), 2.71 (m, 2H_{PHEA}, -CO-CH-CH₂-CO-NH-), 3.06 (s, 9H_{CPTA}, -C-N⁺(CH₃)₃), 3.15-3.25 (m, 4H_{PHEA-CPTA}, -NH-CH₂-CH₂-OH, -CO-CH₂-CH₂-CH₂-N⁺(CH₃)₃), 3.36 (m, 2H_{EDA}, -NH-CH₂-CH₂-NH-CO-), 3.57 (m, 2H_{PHEA}, -NH-CH₂-CH₂-OH), 4.02 (m, 2H_{PHEA}, -NH-CH₂-CH₂-O(CO)NH-CH₂-CH₂-NH-) 4.72 (m, 1H_{PHEA}, -NH-CH(CO)CH₂-).

Spettro 1H NMR di PHEA-EDA-CPTA-LA: δ 1.33 (m, 2H_{LA}, -NH-CO-(CH₂)₂-CH₂-CH₂-CH-SS-CH₂-CH₂-), 1.55 (m, 4H_{LA}, -NH-CO-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH-SS-CH₂-CH₂-), 1.90 (m, 1H_{LA}, -NH-CO-(CH₂)₄-CH-SS-CH₂-CH₂-), 2.01 (m, 2H_{CPTA}, -CO-CH₂-CH₂-CH₂-N⁺(CH₃)₃), 2.17 (m 2H_{LA}, -NH-CO-CH₂-(CH₂)₃-CH-SS-CH₂-CH₂-), 2.29 (m, 2H_{CPTA}, -CO-CH₂-CH₂-CH₂-N⁺(CH₃)₃), 2.36 (m, 2H_{LA}, -NH-CO-(CH₂)₄-CH-SS-CH₂-CH₂-), 2.73 (m, 2H_{PHEA}, -CO-CH-CH₂-CO-NH-; 2H_{LA}, -NH-CO-(CH₂)₄-CH-SS-CH₂-CH₂-), 3.06 (s, 9H_{CPTA}, -C-N⁺(CH₃)₃), 3.17-3.24 (m, 2H_{PHEA}, -NH-CH₂-CH₂-OH; 2H_{CPTA} -CO-CH₂-CH₂-CH₂-N⁺(CH₃)₃), 3.37 (m, 2H_{EDA}, -NH-CH₂-CH₂-NH-CO-), 3.57 (m, 2H_{PHEA}, -NH-CH₂-CH₂-OH), 4.02 (m, 2H_{PHEA}, -NH-CH₂-CH₂-O(CO)NH-CH₂-CH₂-NH-) 4.63 (m, 1H_{PHEA}, -NH-CH(CO)CH₂-).

4.3.2. Determinazione del peso molecolare mediante size exclusion chromatography (SEC).

I pesi molecolari medi pesati (M_w) e la polidispersità (M_w/M_n) dell'inulina e dei suoi derivati, INU-Spm e INU-DETA sono stati determinati attraverso analisi SEC in tampone fosfato 0.05 M a pH 4, utilizzando una colonna PolySep-GFC-P3000 Gel Column (Phenomenex) connessa ad un rivelatore ad indice di rifrazione Waters 2410 Refractive-Index Detector. Le analisi sono state condotte a 35 °C con una velocità di flusso pari a 0.6 ml/min. Per la calibrazione sono state utilizzate dispersioni di pullulano con peso molecolare noto nel range tra 180 e 47300 Da.

I pesi molecolari medi pesati e la polidispersità del PHEA e del suo derivato PHEA-EDA, sono stati determinati come sopra descritto per l'inulina e i suoi derivati.

I pesi molecolari medi pesati e la polidispersità dei derivati PHEA-EDA-CPTA e del PHEA-EDA-CPTA-LA sono stati ottenuti mediante analisi SEC in DMSO a 50 °C con un flusso di 0.6 ml/min, utilizzando lo stesso apparato sopra descritto. In questo caso, come fase stazionaria è stata adoperata una colonna Phenogel GPC Column (5 μ m, 104Å; Phenomenex).

I pesi molecolari medi pesati e la polidispersità dei derivati del PHEA, PHEA-PEG₂₀₀₀, PHEA-PEG₂₀₀₀-BIB e PHEA-PEG₂₀₀₀-IB-pMANa⁺ sono stati ottenuti mediante SEC in miscela tampone fosfato 0.2M a pH 6.6 /MeOH in rapporto 1/9, a 37 °C con un flusso pari a 0.8ml/min, utilizzando una colonna TSK Gel Column G4000PW (Tosoh).

I pesi molecolari medi pesati e la polidispersità dei derivati PHEA-BIB e PHEA-IB-pMANa⁺ sono stati ottenuti mediante SEC in tampone fosfato a pH 8, a 37 °C, con un flusso pari a 0.8ml/min, utilizzando una colonna TSK Gel Column G4000PW (Tosoh).

Per l'analisi di tutti i derivati del PHEA, la calibrazione è stata ottenuta impiegando dispersioni di ossido di polietilene con peso molecolare noto nel range tra 500 e 478 000 Da.

4.3.3. Valutazione della funzionalizzazione delle superfici di PLA propargilato.

Valutazione fluorimetrica.

Un campione del peso di 5 mg è stato tagliato da ogni disco di PLA purificato dopo la funzionalizzazione con il derivato PHEA-EDA-CPTA-LA-FITC. Tali frammenti sono stati solubilizzati in THF, filtrati utilizzando filtri a siringa 0,45 μm in nylon, e analizzati mediante cromatografia a esclusione dimensionale in THF, a temperatura ambiente e con un flusso di 1 ml/min, utilizzando una colonna 600 mm PLgel 5 mm Mixed C (Polymer Laboratories) e un apparato Waters connesso a due rivelatori in serie, rispettivamente a indice di rifrazione (Waters 410) e a fluorescenza (Waters 470), quest'ultimo impostato alle seguenti lunghezze d'onda: $\lambda_{\text{em}} = 447 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{ex}} = 437 \text{ nm}$. Per valutare l'efficienza di funzionalizzazione relativa alle varie condizioni di grafting, per ciascun campione è stato calcolato il rapporto, Fluo/RI, tra l'area del picco generato dal rivelatore a fluorescenza e l'area relativa al picco generato dal rivelatore ad indice di rifrazione, corrispondenti al copolimero.

Valutazione spettroscopica mediante Spettroscopia Fotoelettronica a raggi X (XPS).

Gli spettri XPS sono stati registrati utilizzando uno spettrometro fotoelettronico Escalab 250 dotato di una sorgente di eccitazione Al K α (hv: 1486,6 eV) e una risoluzione di 1,1 eV. Tutti gli spettri sono stati ottenuti con un angolo di decollo degli elettroni di 90° rispetto alla superficie del campione e sono state analizzate superfici di 400 μm^2 . Le energie di legame sono state corrette facendo riferimento all'energia della componente C1s del legame C-C a 284,8 eV.

4.3.4. Titolazione acido-base dei derivati cationici dell'inulina per la determinazione della capacità tamponante.

6 mg di INU-Spm o di INU-DETA sono stati solubilizzati in H₂O bidistillata o in NaCl 0.1M, alla concentrazione di 0.2 mg/ml. Il pH delle soluzioni ottenute è stato portato a 10 con NaOH 0.1N, ed esse sono state immediatamente titolate aggiungendo gradualmente 30 μl di HCl 0.1N e registrando per ogni aggiunta la variazione di pH delle soluzioni. Sono state inoltre registrate allo stesso modo le curve di titolazione

relative a soluzioni di NaCl 0.1M, inulina e b-PEI (25 kDa). La capacità tamponante relativa di ciascun derivato, nel range di pH compreso tra 7.4 e 5.1, è stata calcolata come segue:

$$\text{Capacità tamponante relativa} = (V_{\text{HCl}} \times 0,1\text{M}) \cdot 100/N_{\text{mol}}$$

dove, V_{HCl} è il volume di HCl 0.1 M resosi necessario per cambiare il pH da 7.4 a 5.1 e N_{mol} sono le moli di gruppi aminici protonabili relativi alla quantità di polimero presente nella soluzione titolata.

4.4. POLIPLESSI A BASE DI DERIVATI CATIONICI DELL' INULINA PER LA VEICOLAZIONE DI FARMACI A BASE DI ACIDI NUCLEICI.

4.4.1. Metodi per la preparazione e la caratterizzazione dei poliplessi.

Preparazione dei poliplessi.

I poliplessi sono stati formati in tampone HEPES contenente il 5% di glucosio (HBG) a pH 7.4, o in tampone DPBS RNAsi free, a pH 7.4.

In particolare, un volume stabilito di soluzioni di copolimero a varie concentrazioni è stato aggiunto allo stesso volume di una soluzione di DNA duplex o siRNA a concentrazione fissa, in modo da ottenere il rapporto in peso copolimero/oligonucleotide desiderato. Durante la miscelazione le due soluzioni sono state delicatamente spipettate insieme e la miscela è stata incubata per 30 minuti, a temperatura ambiente per consentire la completa formazione dei complessi, impiegati poi immediatamente dopo la preparazione per ciascuno studio successivo.

Elettroforesi.

20 µl di dispersione dei complessi preparati in HBG a vari rapporti in peso copolimero/oligonucleotide, formati come precedentemente descritto, ad una concentrazione fissa di DNA duplex o siRNA pari a 0,1 µg/µl, sono stati caricati all'interno dei pozzetti di un gel d'agarosio all'1.5% (p/v) contenente 0.5µg/ml di bromuro di etidio, preparato in tampone tris-acetato/EDTA (TAE) a pH 8. L'oligonucleotide naked (DNA duplex o siRNA) è stato utilizzato come controllo. La corsa elettroforetica è stata eseguita a 100 V per 20 min, in immersione nello stesso tampone TAE, utilizzando un apparato Horizontal Electrophoresis Unit (Sigma Aldrich). Il gel è stato poi visualizzato attraverso un transilluminatore UV e fotografato mediante una fotocamera digitale.

Determinazione del diametro e del potenziale ζ : Dynamic light scattering.

Studi di Dynamic light scattering (DLS) sono stati condotti a 25 °C con uno strumento Zetasizer Malvern NanoZS operante con un laser a 532 nm laser, con un angolo di scattering fisso pari a 173°, utilizzando il Dispersion Technology Software (DTS) 7.00. I campioni per l'analisi sono stati preparati in HBG in un volume complessivo di 100 μ l, utilizzando rapporti in peso copolimero/oligonucleotide crescenti ed una concentrazione fissa di DNA duplex o siRNA pari a 0,04 μ g/ μ l. L'oligonucleotide naked (DNA duplex o siRNA) è stato utilizzato come controllo. Il diametro idrodinamico medio (nm) e l'indice di polidispersità (PDI) sono stati ottenuti dall'analisi cumulativa della funzione di correlazione.

Le misure di potenziale ζ sono state eseguite mediante rilevamento della mobilità elettroforetica a 25 °C utilizzando lo stesso apparato. Il potenziale ζ (mV) è stato calcolato utilizzando la funzione di Smoluchowsky assumendo che $k \cdot a \gg 1$ (dove k e a rappresentano rispettivamente il parametro di Debye-Hückel e il raggio della particella).

Analisi morfologica e dimensionale: Transmission electron microscopy (TEM).

La microscopia a trasmissione elettronica (Transmission Electron Microscopy (TEM)) è stata effettuata utilizzando un apparato JEM-2100LaB6 Transmission Electron Microscope operante con un voltaggio di accelerazione pari a 200 kV, equipaggiato con una Multi Scan CCD camera. I campioni sono stati preparati deponendo 50 μ l di dispersione dei poliiplessi in DPBS a una concentrazione pari allo 0.25% (p/v) su una griglia di rame per analisi TEM e rimuovendo l'eccesso di liquido con carta da filtro. Le griglie sono state lasciate seccare spontaneamente per una notte e successivamente analizzate.

Studi di stabilità allo scambio polianionico dei poliiplessi.

La stabilità dei poliiplessi è stata valutata in presenza di albumina sierica bovina, utilizzata come scambiatore polianionico [14]. I complessi, preparati come descritto in precedenza per il saggio elettroforetico, sono stati incubati con 5 µl di una dispersione di albumina in HBG (200 µg / µl) per tempi prestabiliti a temperatura ambiente. La stabilità è stata valutata monitorando la corsa elettroforetica a vari tempi e paragonandola a quella effettuata in assenza dello scambiatore.

4.4.2. Metodi per la caratterizzazione biologica del copolimero INU-Spm e dei poliiplessi INU-Spm/siGL3: citocompatibilità e transfezione.

Studi di citocompatibilità.

Cellule 16HBE sono state seminate in una piastra da 96 pozzetti ad una densità di $25 \cdot 10^3$ cellule/pozzetto. Dopo 24 h le cellule sono state trattate con 20 µl di dispersione di poliiplessi, preparati a rapporti in peso copolimero/DNA crescenti (R7, R10 e R15 per il copolimero INU-Spm3 e R3, R6 e R9 per il copolimero INU-Spm6) in tampone HBG. All'interno di ogni pozzetto la concentrazione di DNA è pari a 150 nM ($2.175 \cdot 10^3$ µg/µl) in un volume finale di 200 µl. Dopo 4 e 24 h, le cellule sono state lavate con 100 µl di DPBS sterile, e sono stati aggiunti 100 µl di mezzo fresco contenenti 20 µl di reagente MTS per ciascun pozzetto. Le piastre sono state dunque incubate a 37 °C per 2 h. Dopo tale tempo, l'assorbanza è stata misurata mediante un lettore di piastra multipozzetto (Tecan, Groedig, Austria) a 490 nm. Come controllo negativo sono state usate cellule non trattate (100% di vitalità) e pozzetti contenenti il reagente MTS alla stessa concentrazione in DMEM sono stati utilizzati come bianco, per calibrare lo spettrofotometro al valore zero di assorbanza.

La vitalità cellulare relativa (%) paragonata al controllo è stata calcolata come rapporto:

$$\frac{\text{Abs}}{\text{Abs}_{\text{controllo}}}$$

dove:

Abs = assorbanza del campione

= assorbanza del controllo (cellule non trattate con 100% di vitalità)

e in cui la vitalità cellulare relativa rappresenta la media \pm la deviazione standard per i campioni in sestuplicato.

Studi di transfezione mediante il saggio “Luciferase gene down regulation assay”.

Cellule 16HBE sono state coltivate su piastra a 96 pozzetti ad una densità pari a $1 \cdot 10^4$ cellule/pozzetto e incubate per 24h prima del saggio di transfezione. In seguito, le cellule sono state trattate con poliplessi costituiti dal plasmide codificante per la luciferasi (pGL3 promoter vector) complessato dal transfettante commerciale Turbofect (TF), in mezzo OPTI-MEM per 4h. Tali complessi TF/pGL3 sono stati preparati secondo il protocollo fornito dal produttore del TF. Trascorse 4 h, le cellule sono state lavate più volte con DPBS sterile e incubate in mezzo completo fino al giorno successivo. Le cellule sono, quindi, state trattate con i complessi INU-Spm6/siGL3 e incubate per 24 h, dopo le quali le cellule sono state lavate con DPBS sterile e lasciate in mezzo complete per ulteriori 24h. I poliplessi INU-Spm6/siGL3 sono stati preparati in DPBS nuclease free, a pH 7.4, miscelando uguali volumi di soluzioni di siRNA e del copolimero, e sono stati incubati a temperatura ambiente per 30 minuti, per permettere la formazione dei complessi, prima di essere aggiunti ai pozzetti in un volume complessivo di 200 μ l e ottenendo una concentrazione finale di siRNA pari a 150 nM. L'espressione della luciferasi è stata valutata utilizzando il Luciferase Assay System (Promega), in accordo al manuale fornito dal produttore, utilizzando un luminometro GloMax 20/20 (Promega). L'efficienza di transfezione dei poliplessi INU-Spm6/siRNA, a rapporti in peso copolimero/siRNA pari a 3, 6 e 9, è stata espressa come percentuale rispetto alla luminescenza assoluta ricavata dalle cellule trattate solamente con i complessi TF/pGL3. Il siRNA naked è stato utilizzato come controllo negativo. I risultati sono espressi come medie percentuali di esperimenti eseguiti in triplicato, più o meno la deviazione standard. La luminescenza assoluta prodotta dalle cellule trattate solamente con i complessi TF/pGL3 è risultata pari a $10.2 \cdot 10^4$ RLU (Relative Light Units). Sono stati inoltre condotti esperimenti in paralleli alle stesse condizioni sperimentali per valutare, mediante saggio MTS, la vitalità delle cellule dopo al momento della misura dell'efficienza di transfezione.

4.4.2. Metodi per la caratterizzazione biologica del copolimero INU-DETA e dei poliplessi INU-DETA/siRNA: studi di citocompatibilità, uptake, transfezione e determinazione del meccanismo di endocitosi.

Studi di uptake mediante quantificazione della fluorescenza nei lisati cellulari.

Cellule 16HBE o JHH6 sono state coltivate su piastre a 48 pozzetti ad una densità di $6 \cdot 10^4$ cellule/pozzetto. After dopo 24h il mezzo di coltura è stato sostituito con 600 μ l di mezzo OPTI-MEM I contenente i poliplessi Inu-DETA/Cy5-siRNA a rapporti in peso copolimero/siRNA pari a 2, 4, 7, 20 and 40, preparati come descritto in precedenza, ottenendo una concentrazione finale di siRNA pari a 200 nM. Dopo 4 h di incubazione, le cellule sono state lavate più volte con 100 μ l di DPBS sterile e successivamente lisate in 300 μ l di mezzo per lisi cellulare costituito da DPBS arricchito contenente il 2% di SDS e l'1% di Triton X-100. L'operazione è stata eseguita per 30 minuti durante i quali le cellule sono state sottoposte ad un ciclo di congelamento e scongelamento. 275 μ l di lisato sono stati diluiti ad un ml con acqua bidistillata RNAsi free e la soluzione risultante è stata utilizzata per quantificare l'intensità di fluorescenza utilizzando uno spettrofluorofotometro Shimadzu RF-5301 PC. 25 μ l di lisato sono invece stati impiegati per determinare il contenuto totale di proteine nel lisato attraverso il saggio BCA protein assay (Sigma Aldrich). I risultati sono espressi come intensità di fluorescenza (U.A.)/mg proteine.

Studi di citotossicità degli inibitori dei processi endocitotici mediante il saggio MTS.

Cellule 16HBE o JHH6 sono state coltivate su piastre a 96 pozzetti ad una densità pari a $2 \cdot 10^4$ cellule/pozzetto. Dopo 24 h, il mezzo è stato sostituito con 200 μ l di mezzo fresco contenente 1-3 mg/ml metil- β -ciclodestrina (M- β Cy), 0.01-1 μ M wortmannina (Wo) o 0.1-200 μ M ossido di fenilarsina (PAO). Dopo incubazione per ulteriori 0.5, 1 o 4 h, le cellule sono state lavate estensivamente con DPBS sterile e trattate con 100 μ l di mezzo contenente 20 μ l di reattivo MTS. Le piastre sono state dunque incubate a 37 °C per 2 h. Dopo tale tempo, l'assorbanza è stata misurata mediante un lettore di piastra multipozzetto a 490 nm. Come controllo negativo sono state usate cellule non trattate (100% di vitalità) e pozzetti contenenti il reagente MTS alla stessa concentrazione in

DMEM sono stati utilizzati come bianco, per calibrare lo spettrofotometro al valore zero di assorbanza.

La vitalità cellulare relativa (%) paragonata al controllo è stata calcolata come rapporto:

—

dove:

Abs = assorbanza del campione

= assorbanza del controllo (cellule non trattate con 100% di vitalità)

e in cui la vitalità cellulare relativa rappresenta la media \pm la deviazione standard per i campioni in triplicato.

Studio dell'effetto degli inibitori dei processi endocitotici sull'uptake dei poliplessi.

Cellule 16HBE o JHH6 sono state coltivate su piastre a 24 pozzetti ad una densità pari a $12 \cdot 10^4$ cellule/pozzetto. Prima dell'incubazione con i poliplessi Inu-DETA/siGL3-Cy5, a rapporti in peso copolimero/siRNA pari a 2, 4, 7, 20 e 40, le cellule sono state pre-incubate con 1200 μ l di mezzo contenenti 2 mg/ml di M- β Cy, 1 μ M di Wo o 1 μ M di PAO per 30 minuti o 1h (per PAO), a 37 °C. dopo tale tempo il mezzo è stato sostituito con 1200 μ l di OPTI-MEM I contenente i poliplessi e gli inibitori, eccetto PAO, alle stesse concentrazioni della pre-incubazione. Dopo 4 h di incubazione, le cellule sono state lavate più volte con 100 μ l di DPBS sterile e successivamente lisate in 300 μ l di mezzo per lisi cellulare costituito da DPBS arricchito contenente il 2% di SDS e l'1% di Triton X-100. L'operazione è stata eseguita per 30 minuti durante i quali le cellule sono state sottoposte ad un ciclo di congelamento e scongelamento. 275 μ l di lisato sono stati diluiti ad un ml con acqua bidistillata RNAsi free e la soluzione risultante è stata utilizzata per quantificare l'intensità di fluorescenza utilizzando uno spettrofluorofotometro Shimadzu RF-5301 PC. 25 μ l di lisato sono invece stati impiegati per determinare il contenuto totale di proteine nel lisato attraverso il saggio BCA protein assay. I risultati sono espressi come intensità di fluorescenza in Unità Arbitrarie (U.A.) normalizzata per i mg proteine. Il lisato di cellule non trattate è stato utilizzato come bianco nella determinazione dell'intensità di fluorescenza. I risultati sono espressi come percentuale di uptake rispetto all'uptake in cellule trattate con i poliplessi, agli stessi rapporti in peso copolimero/siRNA, ma in assenza degli inibitori.

Microscopia a fluorescenza.

Cellule 16HBE o JHH6 sono state coltivate su piastre a 96 pozzetti ad una densità pari a $2 \cdot 10^4$ cellule/pozzetto. Dopo 24 h, il mezzo è stato sostituito con 200 μ l di OPTI-MEM I contenente i poliplessi INU-DETA/siGL3-Cy5 a rapporti in peso copolimero/siRNA pari a 2, 4, 7, 20 e 40, e una concentrazione finale di siRNA pari a 200 nM. Dopo 4 h di incubazione, le cellule sono state lavate molte volte con 100 μ l di DPBS sterile e fissate con una soluzione di paraformaldeide in DPBS al 4% per 30 minuti. Dopo un lavaggio in DPBS sterile, i nuclei delle cellule sono stati colorati con il DAPI per 20 minuti e le cellule visualizzate con un microscopio a fluorescenza Axio Vert.A1 (Zeiss).

Studi di transfezione mediante PCR quantitativa in tempo reale (RTQ-PCR).

Cellule 16HBE o JHH6 sono state coltivate su piastre a 6 pozzetti ad una densità pari a $3.8 \cdot 10^3$ cells/cm². Dopo 24 h, il mezzo è stato sostituito con mezzo fresco contenente i poliplessi Inu-DETA/siGL2 o Inu-DETA/siE2F1 al rapporto in peso copolimero/siRNA pari a 4 e contenenti una quantità di siRNA tale da avere una concentrazione finale di 200 nM. Dopo 3 h di incubazione le cellule sono state lavate con 3 ml di DPBS ed incubate con mezzo fresco per 72 h. trascorso tale tempo è stato estratto e caratterizzato mediante QRT-PCR [Baiz et al., 2014] per la quantificazione dell'mRNA E2F1. Per la trascrizione inversa sono stati utilizzati 500 ng di RNA totale in presenza di esameri random e trascrittasi inversa MuLV. I primers (MWG Biotech, GA, 300 nM) e le condizioni di amplificazione sono riportate in [Farra et al., 2011]. La quantità di mRNA E2F1 è stata normalizzata per il contenuto di 28 S rRNA.

4.5. SISTEMI POLIMERICI MICROPARTICELLARI A BASE DI DERIVATI DEL PHEA PER LA VEICOLAZIONE POLMONARE DI TOBRAMICINA.

4.5.1. Preparazione dei sistemi micro particellari.

Preparazione delle microparticelle di PHEA-IB-pMANa⁺ contenenti Tobramicina (TOB).

100 mg di PHEA-IB-pMANa⁺ sono stati dispersi in 5 ml di tampone 0.05 M Tris a pH=6, congelati e liofilizzati. Il solido spugnoso ottenuto è stato impregnato con 5 ml di una soluzione di TOB, alla concentrazione di 12 mg/ml (60 mg di TOB), in acqua bidistillata. La miscela è stata posta sotto agitazione per circa 15 min a temperatura ambiente e successivamente sottoposta a centrifugazione (12000 RPM per 15 min a 4 C) per allontanare l'eccesso di farmaco non incorporato. Il solido isolato, è stato ridisperso in 5 ml di acqua bidistillata e sottoposto ad uno o più cicli di omogeneizzazione per 15 min e con una velocità di rotazione di 24000 RPM, utilizzando un omogenizzatore ULTRA-TURRAX (IKA). Durante l'omogeneizzazione il sistema è stato raffreddato utilizzando un bagno di acqua e ghiaccio. La dispersione ottenuta è stata, infine, immediatamente congelata per immersione in N₂ (l) e liofilizzata.

Preparazione delle microparticelle di PHEA-IB-pMANa⁺ contenenti Tobramicina (TOB).

Per la preparazione contenente PHEA-PEG-IB-pMANa⁺ non è stato possibile isolare alcun solido per centrifugazione, in quanto la dispersione appariva come una unica fase viscosa. La preparazione è stata sottoposta ad uno o più cicli di omogeneizzazione per 15 min e con una velocità di rotazione di 24000 RPM. Durante l'omogeneizzazione il sistema è stato raffreddato utilizzando un bagno di acqua e ghiaccio. La dispersione ottenuta è stata, infine, immediatamente congelata per immersione in N₂ (l) e liofilizzata.

4.5.2. Caratterizzazione delle microparticelle: dimensioni, morfologia, proprietà in dispersione.

Analisi di Microscopia a Scansione Elettronica (SEM).

I sistemi PHEA-IB-pMANa+/TOB allo stato secco sono stati analizzati mediante analisi di microscopia a scansione elettronica (SEM), utilizzando un apparato ESEM Philips XL30. Il campione prima dell'analisi è stato uniformemente depositato su un biadesivo conduttivo, a base di grafite, previamente applicato su uno "stub", un supporto costituito da una base in acciaio inossidabile dotata di perno di bloccaggio. Il campione, prima dell'analisi è stato reso conduttivo mediante ricopertura con un sottile strato di oro colloidale.

Determinazione delle dimensioni e del potenziale ζ dei sistemi in dispersione.

I valori di diametro medio e la deviazione standard di ogni campione sono stati determinati mediante studi di Dynamic Light Scattering (DLS), che sono stati effettuati a 25 °C tramite l'utilizzo di uno strumento Zetasizer NanoZS (Malvern Instrument, Malvern, UK) con un laser regolato a 532 nm e un angolo fisso di scattering pari a 173°, usando il Software Dispersion Technology 7.00. I campioni sono stati preparati disperdendo 5 mg di ciascuna preparazione in 10 ml acqua bidistillata, per una concentrazione finale di 0.5 mg/ml. Prima dell'analisi i campioni sono stati sottoposti a sonicazione per circa 15 min e filtrati con un filtro di nylon con cut-off di 5 μ m. Il valore di diametro idrodinamico medio (in nm) e l'indice di polidispersità (PDI) sono stati ottenuti mediante analisi cumulativa della funzione di correlazione. Le misure di potenziale ζ sono state effettuate utilizzando la stessa apparecchiatura, sugli stessi campioni utilizzati per la determinazione del diametro idrodinamico medio. Il potenziale ζ è stato calcolato dalla mobilità elettroforetica usando la relazione di Smoluchowsky e assumendo che $K \cdot A \gg 1$ (dove per "K" si intende il parametro di Debye-Hückel e per "a" il raggio delle particelle).

4.5.3. Determinazione del contenuto e dei profili di rilascio del farmaco dalle micro particelle.

Funzionalizzazione pre-colonna della Tobramicina con ortoftalaldeide.

Al fine di introdurre un gruppo cromoforo nella struttura della TOB, i suoi gruppi aminici sono stati funzionalizzati con ortoftalaldeide (OPA) in presenza di 2-mercaptoetanololo (ME). 24 h prima dell'analisi, è stata preparata una miscela reattiva (OPA-ME) solubilizzando 40 mg di OPA in 1 ml di MeOH per HPLC e diluendo la soluzione risultante con 7 ml di tampone borato a pH= 10.4, contenente l'1% (v/v) di ME. Al momento dell'analisi, a 100 µl della dispersione da analizzare sono stati aggiunti 500 µl di una miscela MeOH/acqua 85/15 e 100 µl di OPA-ME e la miscela è stata posta a reagire per 35 minuti a temperatura ambiente, dopo i quali i campioni sono stati immediatamente analizzati mediante HPLC, come riportato di seguito.

Determinazione della Drug Loading% (DL%) mediante analisi HPLC.

L'analisi HPLC è stata eseguita utilizzando un cromatografo Waters Breexe System Liquid Chromatograph equipaggiato con un autocampionatore Waters 717 Plus e con un rivelatore UV-Vis Shimadzu impostato a una lunghezza d'onda pari a 335 nm. L'eluizione è stata condotta utilizzando una colonna Chromolith Performance RP18 (MERK) e con il metodo dell'eluizione "a gradiente", ovvero variando la natura dell'eluente durante l'analisi e in particolare partendo da una miscela MeOH/H₂O bidistillata 85/15 e arrivando al 100% di MeOH in un tempo di 15 minuti, mantenendo una velocità di flusso costante e pari a 0.6 ml/min (i dettagli relativi al gradiente utilizzato sono riportati in Tabella 2).

TEMPO (min)	%A	%B
0	15	85
4	10	90
8	5	95
16	0	100
30	15	85
35	15	85

Tabella 1: Dettagli del gradiente di eluizione utilizzato per l'analisi HPLC. %A e %B rappresentano le percentuali (v/v) rispettivamente di acqua bidistillata e di MeOH nella miscela eluente.

Le aree dei picchi ottenuti al tempo di ritenzione di 4.1 min, corrispondenti alla Tobramicina incorporata all'interno delle microparticelle, sono state confrontate con una curva di taratura ottenuta usando soluzioni a concentrazione nota di Tobramicina in acqua bidistillata, trattate come precedentemente descritto. Prima dell'analisi tutti i campioni sono stati filtrati su filtri a siringa (nylon, 0.45 μm). I risultati sono stati espressi come rapporto percentuale tra il peso di farmaco incorporato e il peso del sistema liofilizzato.

Studi di rilascio della Tobramicina dalle micro particelle in mezzo simulante l'ambiente polmonare in situazione patologica FC.

Gli studi di rilascio della Tobramicina dalle microparticelle sono stati condotti mediante l'utilizzo di celle di Franz verticali. Membrane di estere di cellulosa (diametro medio dei pori 0.45 μm) sono state inserite tra il compartimento donatore e quello accettore. La zona ricevente è stata riempita con tampone fosfato 0.05 M a pH= 7.4. Il fluido è stato mantenuto ad una temperatura di 37 C e sotto continua agitazione. Il muco artificiale, mimante le secrezioni polmonari in FC, è stato preparato come segue: 55 mg di KCl, 125 mg di NaCl e 147.5 mg di acido DTPA sono stati solubilizzati in acqua bidistillata Nucleasi Free. A questa soluzione sono poi state aggiunte una dispersione di mucina (125 mg in 5 ml), una dispersione di DNA (100 mg in 10 ml), 500 μl di soluzione di aminoacidi RPMI 1640, 125 μl di Egg Yolk emulsion e l'1.5% (p/v) di idrossietilcellulosa come agente viscosizzante. Il muco è stato poi alcalinizzato con NaOH 2 M, al fine di portare il pH al valore di 7.4, e diluito fino ad un volume finale di 25 ml con acqua bidistillata Nucleasi Free. Nel compartimento donatore direttamente sulla membrana o su uno strato di circa 3 mm (350 μl) di muco artificiale sono stati posti i sistemi PHEA-IB-pMANa⁺/TOB (50 mg) o PHEA-PEG₂₀₀₀-IB-pMANa⁺/TOB (40 mg) oppure la Tobramicina da sola (15 mg) e ad intervalli di tempo prefissati (in un arco di tempo compreso in 24h) sono state prelevate aliquote da 700 μl dal compartimento ricevente e rimpiazzate con pari volume di tampone fresco al fine di

mantenere le condizioni sink. I campioni prelevati dalle celle sono stati liofilizzati e il farmaco successivamente estratto utilizzando 500 µl di una miscela MeOH/acqua 85/15 ed infine analizzati mediante HPLC per determinare la quantità di farmaco permeata come riportato in precedenza per la determinazione della DL%.

4.5.4. Studi di citocompatibilità dei sistemi PHEA-IB-pMANa⁺/TOB e PHEA-PEG-IB-pMANa⁺/TOB

Cellule 16HBE sono state seminate su su piastre a 96 pozzetti ad una densità pari a $2 \cdot 10^4$ cellule/pozzetto. Dopo 24 ore, il mezzo cellulare è stato sostituito con 200 µl di dispersione di PHEA-IB-pMANa⁺/TOB e PHEA-PEG-IB-pMANa⁺/TOB in DMEM a concentrazioni nel range tra 25 e 1000 µg/ml o con 200 µl di soluzione di Tobramicina alla concentrazione più alta presente nei sistemi, pari a 0.375mg/ml. Allo stesso modo sono stati saggiati anche i copolimeri, PHEA-IB-pMANa⁺ e PHEA-PEG-IB-pMANa⁺, in assenza del farmaco, alle stesse concentrazioni presenti nei sistemi. Trascorse 4 e 24 h, il mezzo di coltura è stato sostituito con 100 µl di mezzo fresco contenente 20 µl di reagente MTS e le piastre sono state incubate a 37 °C per 2 h. Dopo tale tempo, l'assorbanza nei singoli pozzetti è stata misurata mediante un lettore di piastra multipozzetto a 490 nm. Come controllo negativo sono state usate cellule non trattate (100% di vitalità) e pozzetti contenenti il reagente MTS alla stessa concentrazione in DMEM sono stati utilizzati come bianco, per calibrare lo spettrofotometro al valore zero di assorbanza.

La vitalità cellulare relativa (%) paragonata al controllo è stata calcolata come rapporto:

$$\frac{\text{Abs}}{\text{Abs}_{\text{controllo}}}$$

dove:

Abs = assorbanza del campione

= assorbanza del controllo (cellule non trattate con 100% di vitalità)

e in cui la vitalità cellulare relativa rappresenta la media \pm la deviazione standard per i campioni in triplicato.

4.6. FUNZIONALIZZAZIONE DI SUPERFICI DI PLA CON UN DERIVATO ANTIBATTERICO DEL PHEA.

4.6.1. Metodi per la valutazione dell'attività antibatterica.

Studio di adesione batterica alle 24 h.

Lo studio di adesione batterica è stato effettuato immergendo i dischi in una soluzione batterica ($OD_{600} = 0,05$) per 1 h, quindi i batteri non aderiti alla superficie dei campioni sono stati rimossi mediante ripetuti lavaggi con acqua sterile e poi immersi in un mezzo neutro, a 37 °C in condizioni statiche. A distanza di 24 ore, le superfici sono state nuovamente lavate con una soluzione salina sterile per rimuovere i batteri non adesi a formare biofilm e trasferite in 2 ml di soluzione salina sterile, in cui i batteri aderiti sulle piastre sono stati recuperati vortexando per 30 secondi (sospensione A). I campioni sono stati trasferiti in altri 2 ml dello stesso mezzo e sonicati per 3 minuti (sospensione B). Una terza sospensione (sospensione C) è stata ottenuta trasferendo i campioni in ulteriori 2 ml di soluzione salina sterile e vortexando vigorosamente per 30 secondi. Le sospensioni A, B e C sono state poi riunite e i batteri sono stati quantificati da soluzioni diluite in serie e attraverso piastratura in agar di tipo Luria. Le cellule batteriche rimosse durante queste prime tre fasi rappresentano quelle meno fortemente adese alle superfici dei campioni. A seguito del trattamento di vortexing con cui è stata ottenuta la sospensione C, ciascuna faccia dei campioni è stata premuta per 1 minuto su agar di tipo Mueller Hinton, e l'operazione è stata ripetuta su 15 piastre di agar per ciascun campione. Tale operazione ha permesso la conta dei batteri più aderenti alla superficie dei campioni. Il conteggio delle colonie è stato effettuato dopo una notte di incubazione a 37 °C. La popolazione totale aderente è ottenuta sommando a tutti i batteri in coltura le unità formanti colonie ottenute dalla visualizzazione delle piastre di agar.

Studio della formazione di biofilm.

La suscettibilità delle superfici di PLA-g-PHEA-EDA-CPTA-LA alla formazione di biofilm è stata valutata creando una interfaccia liquido-aria tra i dischi e una sospensione batterica con un' $OD_{600} = 0.05$, (corrispondente a circa $1 \cdot 10^5$ CFU/ml). Per

creare l'interfaccia, i differenti campioni sono stati posti verticalmente in una piastra di tipo Greiner a 12 pozzetti, preventivamente riempita con 2 ml di mezzo di coltura Muller Hinton. A ciascun pozzetto sono stati poi aggiunti 20 μ l di PBS contenenti i batteri e dopo 72 h di incubazione a 37 °C in condizioni statiche e in atmosfera umidificata al 100%, i campioni sono stati rimossi dai pozzetti e lavati accuratamente ed estensivamente con acqua sterile per rimuovere i batteri non aderiti. Per rilevare i batteri coinvolti nella formazione di un biofilm, i campioni sono stati immersi in DMSO e 250 μ l della sospensione ottenuta sono stati analizzati in con un luminometro Mithras LB940 (Berthold). I risultati ottenuti sono stati espressi in RLU.

La formazione di biofilm è stata inoltre valutata esaminando i campioni con un microscopio a fluorescenza Leica, dotato di obiettivi 20 e 100X. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato.

4.6.2. Studi di citotossicità e proliferazione fibroblastica.

I dischi di PLA e PLA-g-PHEA-EDA-CPTA-LA sono stati sterilizzati in etanolo assoluto per 30 min prima di essere immersi in PBS sterile contenete penicillina e streptomina, alla concentrazione di 1 mg/ml, e incubati per 48 h a 37 °C. I dischi sono stati poi lavati 3 volte con PBS sterile, e lasciati in immersione nello stesso mezzo per 12 h all'interno di una piastra per coltura cellulare a 24 pozzetti. La vitalità cellulare è stata saggiata dopo incubazione con $1 \cdot 10^4$ cellule L929 per 1, 4, 8 e 12 giorni utilizzando il saggio PrestoBlue™, che riflette il numero di cellule vitali presenti sulla superficie. Il mezzo di coltura è stato rimosso ad ogni tempo stabilito e sostituito con 1 ml di mezzo fresco contenete il 10% di PrestoBlue™. L'intensità di fluorescenza a 530 nm (eccitazione) e 615 nm (emissione) è stata misurata mediante un fotometro Victor X3 (Perkin Elmer). Tutti i dati sono la media di misure in triplicato.

5. BIBLIOGRAFIA

- AFNOR. Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. 2009; ISO 10993-5:2009.
- A. Aderem, D.M. Underhill, Mechanisms of phagocytosis in macrophages, *Annu. Rev. Immunol.* 17 (1999) 593-623.
- A. Aied, U. Greiser, A. Pandit, W. Wang, Polymer gene delivery: overcoming the obstacles, *Drug Discov Today* 18 (2013) 1090-1098.
- H. Akita, H. Hatakeyama, I.A. Khalil, Y. Yamada, H. Harashima, Delivery of Nucleic Acids and Gene Delivery, *Comprehensive Biomaterials* 4 (2011) 411-444.
- F.A. Alhusban, P.C. Seville, Carbomer-modified spray-dried respirable powders for pulmonary delivery of salbutamol sulphate, *Journal of Microencapsulation* 26 (2009) 444-455.
- M.S. Ali, J.P. Pearson, Upper airway mucin gene expression: a review, *Laryngoscope* 117 (2007) 932-938.
- T.M. Allen, P.R. Cullis, Drug delivery systems: entering the mainstream, *Science* 303 (2004) 1818-1822.
- C.R. Arciola, D. Campoccia, P. Speziale, L. Montanaro, J.W. Costerton, Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials, *Biomaterials* 33(2012) 5967-5982.
- M.M. Arnold, E.M. Gorman, L.J. Schieber, E.J. Munson, C. Berkland, NanoCipro encapsulation in monodisperse large porous PLGA microparticles. *Journal of Controlled Release* 121 (2007) 100-109.
- T. Azzam, H. Eliyahu, A. Makovitzki, et al., Hydrophobized dextran spermine conjugate as potential vector for in vitro gene transfection, *J. Control. Release* 96(2) (2004) 309-323.

- D. Baiz, B. Dapas, R. Farra, B. Scaggiante, G. Pozzato, F. Zanconati, N. Fiotti, L. Consoloni, S. Chiaretti, G. Grassi, Bortezomib effect on E2F and cyclin family members in human hepatocellular carcinoma cell lines, *World J Gastroenterol.* 20(3) (2014) 795-803.
- B. Ballarín-González, K.A. Howard, Polycation-based nanoparticle delivery of RNAi therapeutics: Adverse effects and solutions, *Adv Drug Deliv Rev* 64(15) (2012) 1717-1729
- K. Bazaka, M. V. Jacob, R. J. Crawford, E. P. Ivanova, Plasma-assisted surface modification of organic biopolymers to prevent bacterial attachment. *Acta Biomaterialia* 7(5) (2011) 2015-2028.
- K. Bazaka, M.V. Jacob, R.J. Crawford, E.P. Ivanova, Efficient surface modification of biomaterial to prevent biofilm formation and the attachment of microorganisms, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95 (2012) 299-311.
- J.-P. Behr, The Proton Sponge: a Trick to Enter Cells the Viruses Did Not Exploit, *CHIMIA International Journal for Chemistry* 51(1997) 1-2.
- A. Bernkop-Schnurch, Thiomers: a new generation of mucoadhesive polymers, *Advanced Drug Delivery Reviews* 57 (2005) 1569-1582.
- L. Borgström, B. Olsson, L. Thorsson, Degree of throat deposition can explain the variability in lung deposition of inhaled drugs, *Journal of Aerosol Medicine* 19 (2006) 473-483.
- O. Boussif, F. Lezoualc'h, M. A. Zanta, et al., A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92(16) (1995) 7297-7301.
- W.A. Braunecker, Y. Itami, K. Matyjaszewski, Osmium-mediated radical polymerization, *Macromolecules* 38 (2005) 9402-9404.
- V.J. Broughton-Head, J. Shur, M.P. Carroll, J.R. Smith, J.K. Shute, Unfractionated heparin reduces the elasticity of sputum from patients with cystic fibrosis, *Am. J. Physiol.-Lung Cell Mol. Physiol.* 293 (2007) 1240-L1249.

- P. Bures, Y. Huang, E. Oral, N.A. Peppas, Surface modifications and molecular imprinting of polymers in medical and pharmaceutical applications, *J. Control. Release* 72 (2001) 25-33.
- J.G. Cai, Y. Yue, D. Rui, et al., Effect of chain length on cytotoxicity and endocytosis of cationic polymers, *Macromolecules* 44 (2011) 2050-2057.
- D. Campoccia, L. Montanaro, C.R. Arciola, The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance, *Biomaterials* 27 (2006) 2331-2339.
- Z. Cao, L. Mi, J. Mendiola, J.-R. Ella-Menye, L. Zhang, H. Xue and S. Jiang, Reversibly switching the function of a surface between attacking and defending against bacteria, *Angew. Chem.* 124 (2012) 2656-2659.
- I. Carlstedt, J.K. Sheehan, A.P. Corfield, J.T. Gallagher, Mucous glycoproteins: a gel of a problem, *Essays Biochem.* 20 (1985) 40-76.
- F. Castelli, M.G. Sarpietro, D. Micieli, et al., Differential scanning calorimetry study on drug release from an inulin-based hydrogel and its interaction with a biomembrane model: pH and loading effect. *Eur J Pharm Sci* 35 (2008) 76-78.
- G. Cavallaro, L. Mariano, S. Salmaso, P. Caliceti, G. Giammona, Folate-mediated targeting of polymeric conjugates of gemcitabine, *International Journal of Pharmaceutics* 307(2) (2006) 258-269.
- G. Cavallaro, M. Campisi, M. Licciardi, M. Ogris, G. Giammona, Reversibly stable thiopolyplexes for intracellular delivery of genes, *Journal of Controlled Release* 115 (2006) 322-334.
- G. Cavallaro, M. Licciardi, G. Amato, C. Sardo, G. Giammona, R. Farra, B. Dapas, M. Grassi, G. Grassi, Synthesis and characterization of polyaspartamide copolymers obtained by ATRP for nucleic acid delivery, *International Journal of Pharmaceutics* 466, (1-2) (2014) 246-257.
- G. Cavallaro, M. Licciardi, M. Di Stefano, G. Pitarresi, G. Giammona, New self-assembling polyaspartamide-based brush copolymers obtained by atom transfer radical polymerization, *Macromolecules* 42(9) (2009) 3247-3257.

- G. Cavallaro, M. Licciardi, P. Caliceti, S. Salmaso, G. Giammona, Synthesis, physico-chemical and biological characterization of a paclitaxel macromolecular prodrug, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 58 (1) (2004) 151-159.
- C.J. Cheng, Q.L. Fu, X.X. Bai, S.J. Liu, L. Shen, W.Q. Fan, et al., Facile synthesis of gemini surface-active ATRP initiator and its use in soap-free AGET ATRP mini-emulsion polymerization, *Chem. Pap.* (2013) 67336-67341.
- K. Ciftci, R. J Levy, Enhanced plasmid DNA transfection with lysosomotropic agents in cultured fibroblasts, *International Journal of Pharmaceutics* 218 (2001) 81-92.
- A.L. Coates, C. O'Callaghan, Drug administration by aerosol in children, *Kendig's Disorders of the Respiratory Tract in Children* (2006) 268-279.
- V. Coessens, T. Pintauer, K. Matyjaszewski, Functional polymers by atom transfer radical polymerization, *Prog. Polym. Sci.* 26 (2001) 337-377.
- E.F. Craparo, G. Cavallaro, M.L. Bondi, D. Mandracchia, G. Giammona, PEGylated nanoparticles based on a polyaspartamide preparation, physico-chemical characterization, and intracellular uptake, *Biomacromolecules* 7(11) (2006) 3083-3092. 6.
- S. Davida, B. Pitard, J.-P. Benoît, C. Passirani, Non-viral nanosystems for systemic siRNA delivery, *Pharmacological Research* 62 (2010) 100-114.
- E. Deneuille, C. Perrot-Minot, F. Pennaforte, M. Roussey, J.M. Zahm, C. Clavel, E. Puchelle, S. de Bentzmann, Revisited physicochemical and transport properties of respiratory mucus in genotyped cystic fibrosis patients, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 156 (1997) 166-172.
- S. Dharmawardhane, A. Schurmann, M.A. Sells, J. Chernoff, S.L. Schmid, G.M. Bokoch, Regulation of macropinocytosis by p21-activated kinase-1, *Mol. Biol. Cell* 11 (2000) 3341-3352.
- A. Di Lena, K. Matyjaszewski, Transition metal catalysts for controlled radical polymerization, *Progress in Polymer Science*, 35 (2010) 959-1021.

- F. Ding, Y. Sun, F. Verpoort, V. Dragutan, I. Dragutan, Catalytic activity and selectivity of a range of ruthenium complexes tested in the styrene/EDA reaction system, *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 386 (2014) 86-94.
- G.J. Doherty, H.T. McMahon, Mechanisms of endocytosis, *Annu. Rev. Biochem.* 78 (2009) 3131-3146.
- S.P. Duddu, S.A. Sisk, Y.H. Walter, T.E. Tarara, K.R. Trimble, A.R. Clark, M.A. Eldon, R.C. Elton, M. Pickford, P.H. Hirst, S.P. Newman, J.G. Weers, Improved lung delivery from a passive dry powder inhaler using an engineered Pulmo-Sphere powder, *Pharm Res.* 19 (2002) 689-695.
- D.A. Edwards, A. Ben-Jebria, R. Langer, Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles, *J Appl Physiol* 85 (1998) 379-385.
- S. El Habnoui, V. Darcos, X. Garric, J.-P. Lavigne, B. Nottelet, and J. Coudane, Mild Methodology for the Versatile Chemical Modification of Polylactide Surfaces: Original Combination of Anionic and Click Chemistry for Biomedical Applications, *Advanced Functional Materials* 21 (2011) 3321-3330.
- J. Emami, H. Hamishehkar, A.R. Najafabadi, K. Gilani, M. Minaiyan, H. Mahdavi, H. Mirzadeh, A. Fakhari, A. Nokhodchi, Particle size design of PLGA microspheres for potential pulmonary drug delivery using response surface methodology, *J Microencapsul* 26 (2009) 1-8.
- E. Fadeeva, V.K. Truong, M. Stiesch, B.N. Chichkov, R.J. Crawford, J. Wang, E.P. Ivanova, Bacterial retention on superhydrophobic titanium surfaces fabricated by femtosecond laser ablation, *Langmuir* 27 (2011) 3012-3019.
- R. Farra, B. Dapas, G. Pozzato, B. Scaggiante, F. Agostini, C. Zennaro, M. Grassi, N. Rosso, C. Giansante, N. Fiotti, G. Grassi, Effects of E2F1-cyclin E1-E2 circuit down regulation in hepatocellular carcinoma cells, *Dig Liver Dis.* 43(12) (2011) 1006-1014.
- C. Fiorica, G. Pitarresi, F.S. Palumbo, M. Di Stefano, F. Calascibetta, G. Giammona, A new hyaluronic acid pH sensitive derivative obtained by ATRP for potential oral administration of proteins, *International Journal of Pharmaceutics* 457(1) (2013) 150-157.

- CF Foundation. Patient registry annual data report 2007. <http://cff.org/UploadedFiles/research/ClinicalResearch/2007-Patient-Registry-Report.pdf>.
- S.A. Galema, Microwave chemistry. *Chem Soc Rev* 26 (1997) 233-238.
- C.J. Galvin, J. Genzer, Applications of surface-grafted macromolecules derived from post-polymerization modification reactions, *Progress in Polymer Science* 37 (2012) 871-906.
- D.E. Geller, J. Weers, S. Heuerding, Development of an Inhaled Dry-Powder Formulation of Tobramycin Using PulmoSphere Technology, *Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery* 24 (2011) 175-182.
- G. Giammona, B. Carlisi, G. Cavallaro, G. Pitarresi and S. Spampinato, A new water-soluble synthetic polymer, -polyasparthyl hydrazide, as potential plasma expander and drug carrier, *Journal of Controlled. Release* 29 (1994) 63-72.
- G. Giammona, B. Carlisi, S. Palazzo, Reaction of α,β -poly(Nhydroxyethyl)-DL-aspartamide with derivatives of caoboxylic acids. *J Polym Sci: Polym Chem Ed* 25 (1987) 2813-8.
- G. Giammona, B. Carlisi, S. Palazzo, Reaction of α,β -poly(Nhydroxyethyl)-DL-aspartamide with derivatives of caoboxylic acids, *Journal of Polymer Science: Polym Chem* 25 (1987) 2813-2818.
- G. Giammona, G. Cavallaro, G. Pitarresi, Studies of macromolecular prodrugs of zidovudine, *Advanced Drug Delivery Reviews* 39 (1999) 153-164.
- P. Gilbert, L.E. Moore, Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet, *J. Appl. Microbiol.* 99 (2005) 703-715.
- O.O. Glebov, N.A. Bright, B.J. Nichols, Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells, *Nat. Cell Biol.* 8 (2006) 46-54.
- C. Goncalves, E. Mennesson, R. Fuchs, J.P. Gorvel, P. Midoux, C. Pichon, Macropinocytosis of polyplexes and recycling of plasmid via the clathrin-dependent pathway impair the transfection efficiency of human hepatocarcinoma cells, *Mol. Ther.* 10 (2004) 373-385.

- R. Gong, S. Maclaughlin, S. Zhu, Surface modification of active metals through atom transfer radical polymerization grafting of acrylics, *Appl. Surf. Sci.* 254 (2008) 6802-6809.
- M. Grassi, G. Cavallaro, S. Scire, B. Scaggiante, B. Dapas, R. Farra, D. Baiz, C. Giansante, G. Guarnieri, D. Perin, G. Grassi, Current Strategies to Improve the Efficacy and the Delivery of Nucleic Acid Based Drugs. *Current Signal Transduction Therapy* 5 (2010) 92-120.
- O. Guillaume, J.P. Lavigne, O. Lefranc, B. Nottelet, J. Coudane, X. Garric, New antibiotic-eluting mesh used for soft tissue reinforcement, *Acta Biomaterialia* 7 (2011) 3390-3397.
- O. Harush-Frenkel, N. Debotton, S. Benita, Y. Altschuler, Targeting of nanoparticles to the clathrin-mediated endocytic pathway, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 353 (2007) 26-32.
- J. Hasan, R.J. Crawford, and E.P. Ivanova, Antibacterial surfaces: the quest for a new generation of biomaterials, *Trends in Biotechnology* 31(5) (2013) 295-304.
- B.L. Hayes, *Microwave Synthesis: Chemistry at the Speed of Light*, CEM Publishing: Matthews, NC (2002).
- B.L. Hayes, Recent Advances in Microwave-Assisted Synthesis, *Aldrichimica Acta* 37(2) (2004) 66-77.
- A. Haynes, J. Nakamura, C. Heng, S. Heuerding, G. Thompson, R. Malcolmson, Aerosol performance of tobramycin inhalation powder, *Respiratory Drug Delivery* (2010) 701-706.
- C.L. He, C.W. Zhao, X.S. Chen, Z.J. Guo, X.L. Zhuang, X.B. Jing, Novel pH- and temperature-responsive block copolymers with tunable pH-responsive range, *Macromol Rapid Commun* 29 (2008) 490-497.
- C. Hou, R. Qu, C. Sun, C. Ji, C. Wang, L. Ying, et al., Novel ionic liquids as reaction medium for ATRP of acrylonitrile in the absence of any ligand, *Polymer* 49 (2008) 3424-3427.

- N. Houdret, J.M. Perini, C. Galabert, A. Scharfman, P. Humbert, G. Lamblin, P. Roussel, The high lipid-content of respiratory mucins in cystic-fibrosis is related to infection, *Biochim. Biophys. Acta* 880 (1986) 54-61.
- M.T. Howes, M. Kirkham, J. Riches, K. Cortese, P.J. Walser, F. Simpson, M.M. Hill, A. Jones, R. Lundmark, M.R. Lindsay, D.J. Hernandez-Deviez, G. Hadzic, A. McCluskey, R. Bashir, L. Liu, P. P.F. Pilch, H. McMahon, P.J. Robinson, J.F. Hancock, S. Mayor, R.G. Parton, Clathrin-independent carriers form a high capacity endocytic sorting system at the leading edge of migrating cells, *J. Cell Biol.* 190 (2010) 675-691.
- C.E. Hoyle, A.B. Lowe, C.N. Bowman, Thiol-click chemistry: a multifaceted toolbox for small molecule and polymer synthesis, *Chem Soc Rev* 39 (2010) 1355-87.
- S.S. Hsieh, C. Malerczyk, A. Aigner, F. Czubyko, *Int. J. Cancer* 86 (2000) 644-651.
- S. Huang, M. Kamihira, Development of hybrid viral vectors for gene therapy, *Biotechnology Advances* 31(2) (2013) 208-223.
- Y. Huang, W. Leobandung, A. Foss, N.A. Peppas, Molecular aspects of muco- and bio-adhesion: tethered structures and site-specific surfaces, *J. Control. Release* 65 (2000) 63-71.
- T. Huayu, Z. Tang, X. Zhuang, X. Chen, X. Jing, Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application. *Progress in Polymer Science* 37 (2012) 237- 280
- B.E. Hunt, A. Weber, A. Berger, B. Ramsey, A.L. Smith, Macromolecular mechanisms of sputum inhibition of tobramycin activity, *Antimicrob Agents Chemother* 39(1) (1995) 34-39.
- K. Ishihara, M. Kyomoto, Photo-induced functionalization on biomaterials surfaces, *Journal of Photopolymer Science and Technology* 23(2) (2010) 161-166.

- N. Islam, M.J. Cleary, Developing an efficient and reliable dry powder inhaler for pulmonary drug delivery - a review for multidisciplinary researchers, *Med. Eng. Phys.* 34 (2012) 409-427.
- E.P. Ivanova, J. Hasan, V.K. Truong, J.Y. Wang, M. Raveggi, C. Fluke, R.J. Crawford, The influence of nanoscopically thin silver films on bacterial viability and attachment, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91 (2011) 1149-1157.
- T. Izumisawa, Y. Hattori, M. Date, K. Toma, Y. Maitani, Cell line-dependent internalization pathways determine DNA transfection efficiency of decaarginine- PEG-lipid, *Int. J. Pharm.* 404 (2011) 264-270.
- J. Jacquot, A. Hayem, C. Galabert, Functions of proteins and lipids in airway secretions, *Eur. Respir. J.* 5 (1992) 343-358.
- J. Jacquot, A. Hayem, C. Galabert, Functions of proteins and lipids in airway secretions, *Eur. Respir. J.* 5 (1992) 343-358.
- W. Jakubowski, K. Min, K. Matyjaszewski, Activators regenerated by electron transfer for atom transfer radical polymerization of styrene, *Macromolecules* 39 (2006) 39-45.
- W. Jakubowski, K. Min, K. Matyjaszewski, Activators regenerated by electron transfer for atom transfer radical polymerization of styrene, *Macromolecules* 39 (2006) 39-45.
- J. Jiang, X. Lu, Y. Lu, Stereospecific preparation of polyacrylamide with low polydispersity by ATRP in the presence of Lewis acid, *Polymer* 49 (2008) 1770-1776.
- S. John Patton, P.R. Byron, Inhaling medicines: delivering drugs to the body through the lungs, *Nat Rev Drug Discov* 6 (2007) 67-74.
- A.T. Jones, Macropinocytosis: searching for an endocytic identity and role in the uptake of cell penetrating peptides, *J. Cell. Mol. Med.* 11 (2007) 670-684.
- I. Kanatani, T. Ikai, A. Okazaki, J. Jo, M. Yamamoto, M. Imamura, A. Kanematsu, S. Yamamoto, N. Ito, O. Ogawa, Y. Tabata, Efficient gene transfer by pullulanspermine occurs through both clathrin- and raft/caveolae-dependent mechanisms, *J. Control. Release* 116 (2006) 75-82.

- K. Katoa, E. Uchidab, E. Kangc, Y. Uyamaa, Y. Ikada, Polymer surface with graft chains, *Prog. Polym. Sci.* 28 (2003) 209-259.
- E.-R. Kenawy, A.R. El-Raheem El-Shanshoury, N.O. Shaker, B.E.-S.Mohamed, A.H.B. Khattab, B.I. Badr, Biocidal polymers: synthesis, antimicrobial activity, and possible toxicity of poly (hydroxystyrene-comethylmethacrylate) derivatives, *J. Appl. Polym. Sci.* 120 (2011) 2734-2742.
- I.A. Khalil, K. Kogure, S. Futaki, H. Harashima, High density of octaarginine stimulates macropinocytosis leading to efficient intracellular trafficking for gene expression, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 3544-3551.
- G.M. Kim, Y.H. Bae, W.H. Jo, pH-induced micelle formation of poly(histidine-co-phenylalanine)-block-poly(ethylene glycol) in aqueous media, *Macromolecular Bioscience* 5 (2005) 1118-1124.
- E. Kiss, E. Kutnyanszky, I. Bertoti, Modification of poly(lactic/glycolic acid) surface by chemical attachment of polyethylene glycol, *Langmuir* 26 (2010) 1440-1444.
- H.C. Kolb, M.G. Finn, K.B. Sharpless, Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions, *Angew Chem Int Ed* 2001.
- Y. Kotani, M. Kamigaito, M. Sawamoto, Living radical polymerization of para-substituted styrenes and synthesis of styrene-based copolymers with rhenium and iron complex catalysts, *Macromolecules* 33 (2000) 6746-6751.
- A.M. Kraigsley and S.E. Finkel, Adaptive evolution in single spcieEs bacterial biofilms, *FEMS Microbiol. Lett.* 293 (2009) 135-140.
- C. Krejtschi, K. Hauser, Stability and folding dynamics of polyglutamic acid, *Eur Biophys J.* 40(5) (2011) 673-85.
- P. Król, P. Chmielarz, Recent advances in ATRP methods in relation to the synthesis of copolymer coating materials, *Progress in Organic Coatings* 77 (2014) 913-948.

- P. Król, P. Chmielarz, Recent advances in ATRP methods in relation to the synthesis of copolymer coating materials, *Progress in Organic Coatings*, 77 (2014) 913-948.
- N. Kuhnert, Microwave-assisted reactions in organic synthesis are there any nonthermal microwave effects?, *Angew Chem Int Ed* 41 (2002) 1863-1866.
- S. Kumar, A. Tana, A. Shankar, Cystic fibrosis - What are the prospects for a cure?, *European Journal of Internal Medicine* 25 (9) (2014) 803-807.
- Y. Kwak, K. Matyjaszewski, ARGET ATRP of methyl methacrylate in the presence of nitrogen-based ligands as reducing agents, *Polym. Int.* 58 (2009) 242-247.
- S.K. Lai, K. Hida, S.T. Man, C. Chen, C. Machamer, T.A. Schroer, J. Hanes, Privileged delivery of polymer nanoparticles to the perinuclear region of live cells via a non-clathrin, non-degradative pathway, *Biomaterials* 28 (2007) 2876-2884.
- J.K. Lam, W. Liang, H.K. Chan, Pulmonary delivery of therapeutic siRNA, *Advanced Drug Delivery Reviews* 64 (2012) 1-15.
- C. Lamaze, A. Dujeancourt, T. Baba, C.G. Lo, A. Benmerah, A. Utry-Varsat, Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway, *Mol. Cell* 7 (2001) 661-671.
- S. Lazarinis, J. Kärrholm, and N.P. Hailer, Effects of hydroxyapatite coating on survival of an uncemented femoral stem, *Acta Orthop.* 82 (2011) 399-404.
- E.S. Lee, M.J. Kwon, K. Na, J.H. Bae, Protein release behavior from porous microparticle with lysozyme/hyaluronate ionic complex, *Colloids Surf B Biointerfaces* 55 (2007) 125-130.
- B.S. Lele, A.S. Hoffman, Mucoadhesive drug carriers based on complexes of poly (acrylic acid) and PEGylated drugs having hydrolysable PEG-anhydride-drug linkages, *J. Control. Release* 69 (2000) 237-248.
- J. Lesley, V.C. Hascall, M. Tammi, R. Hyman, Hyaluronan binding by cell surface CD44, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 26967-26975.

- M.I. Lethem, The role of tracheobronchial mucus in drug administration to the airways, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 11 (1993) 271-298.
- J. Levy, Antibiotic activity in sputum, *J Pediatr* 108 (1986) 841-846.
- M. Li, S. Lv, Z. Tang, W. Song, H. Yu, H. Sun, H. Liu, and X. Chen, Polypeptide/Doxorubicin Hydrochloride Polymersomes Prepared Through Organic Solvent-free Technique as a Smart Drug Delivery Platform, *Macromolecular Bioscience* 13 (2013) 1150-1162.
- M. Licciardi, C. Scialabba, C. Sardo, G. Cavallaro, G. Giammona, Amphiphilic inulin graft co-polymers as self-assembling micelles for doxorubicin delivery, *J. Mater. Chem. B*, DOI:10.1039/C4TB00235K.
- M. Licciardi, C. Scialabba, G. Cavallaro, C. Sangregorio, E. Fantechi, G. Giammona, Cell uptake enhancement of folate targeted polymer coated magnetic nanoparticles, *Journal of Biomedical Nanotechnology* 9(6) (2013) 949-64.
- M. Licciardi, G. Cavallaro, M. Di Stefano, C. Fiorica, G. Giammona, Polyaspartamide-graft-Polymethacrylate Nanoparticles for Doxorubicin Delivery, *Macromol. Biosci* 11 (2011) 445-454.
- M. Licciardi, G. Pasut, G. Amato, C. Scialabba, A. Mero, M. Montopoli, G. Cavallaro, O. Schiavon, G. Giammona, PHEA-graft-polymethacrylate supramolecular aggregates for protein oral delivery, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 84 (2013) 21-28.
- M. Licciardi, M. Campisi, G. Cavallaro, M. Cervello, A. Azzolina, G. Giammona, Synthesis and characterization of polyaminoacidic polycations for gene delivery, *Biomaterials* 27 (2006) 2066-2075.
- M. Licciardi, M. Campisi, G. Cavallaro, M. Cervello, A. Azzolina, G. Giammona, Synthesis and characterization of polyaminoacidic polycations for gene delivery, *Biomaterials* 27(9) (2006) 2066-2075.
- Z. Liu, Y. Jiao, Y. Wang, C. Zhou, Z. Zhang, Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60 (2008) 1650-1662.

- A. Loupy, Solvent-free microwave organic synthesis as an efficient procedure for green chemistry. *C R Chim* 7 (2004) 103-112.
- A.B. Lowe, Thiol-yne 'Click'/Coupling chemistry and recent applications in Polymer and materials synthesis and modification, *Polymer* (2014), DOI: 10.1016/j.polymer.2014.08.015.
- T. Lühmann, M. Rimann, A.G. Bittermann, H. Hall, Cellular uptake and intracellular pathways of PLL-g-PEG-DNA nanoparticles, *Bioconjug. Chem.* 19 (2008) 1907-1916.
- X. Luo, Y. Zhuang, X. Zhao, M. Zhang, S. Xu, B. Wang, Controlled/living radical polymerization of styrene catalyzed by cobaltocene, *Polymer* 49 (2008) 3457-3461.
- J.P. Luzio, P.R. Pryor, N.A. Bright, Lysosomes: fusion and function, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (2007) 622-632.
- H. Lv, S Zhang, Wang B, S. Cui, J. Yan, Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery, *J Control Release* 114 (2006) 100-109.
- Z. M. Qian, H. Li, H. Sun, K. Ho, Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway, *Pharmacol. Rev.* 54(4) (2002) 561-587.
- H. Maeda, Macromolecular therapeutics in cancer treatment: The EPR effect and beyond, *Journal of Controlled Release* 164(2) (2012) 138-144.
- S. Manchun, C.R. Dass, P. Sriamornsak, Targeted therapy for cancer using pH-responsive nanocarrier systems, *Life Sciences* 90 (2012) 381-387.
- P. Matricardi, C. Di Meo, T. Coviello, W.E. Hennink, F. Alhaique, Interpenetrating Polymer Networks polysaccharide hydrogels for drug delivery and tissue engineering, *Advanced Drug Delivery Reviews* 65(9) (2013) 1172-1187.
- K. Matyjaszewski, Atom transfer radical polymerization (ATRP): current status and future perspectives, *Macromolecules* 45 (2012) 4015-4039.
- F.R. Maxfield, T.E. McGraw, Endocytic recycling, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5 (2004) 121-132.

- S. Mayor, R.E. Pagano, Pathways of clathrin-independent endocytosis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (2007) 603-612.
- M. Meldal, C.W. Tornøe, Cu-catalyzed azide-alkyne cycloadditions, *Chem Rev* 108 (2008) 2952-3015.
- R. Mendichi, G. Giammona, G. Cavallaro, A. Giacometti Schieronni, Molecular characterization of a,b-poly(N hydroxyethyl)-DL-aspartamide by light scattering and viscometry studies, *Polymer* 4 (2000) 8649-8657.
- J. Mercer, A. Helenius, Virus entry by macropinocytosis, *Nat. Cell Biol.* 11 (2009) 510-520.
- J. Mercer, M. Schelhaas, A. Helenius, Virus entry by endocytosis, *Annu. Rev. Biochem.* 79 (2010) 803-833.
- K. Min, K. Matyjaszewski, Atom transfer radical polymerization in aqueous dispersed media, *Cent. Eur. J. Chem.* 7 (2009) 657-674.
- K. Miyata, M. Oba, M. Nakanishi, S. Fukushima, Y. Yamasaki, H. Koyama, N. Nishiyama, K. Kataoka, Polyplexes from Poly(aspartamide) Bearing 1,2-Diaminoethane Side Chains Induce pH-Selective, Endosomal Membrane Destabilization with Amplified Transfection and Negligible Cytotoxicity, *J. AM. CHEM. SOC.* 130 (2008) 16287-16294.
- E.J. Montemayor, Biochemical Studies of Spermidine/spermine N1-acetyltransferase, an Important Regulator of Cellular Polyamines, ProQuest 2008.
- S. Moreau-Marquis, J.M. Bomberger, G.G. Anderson, A. Swiatecka-Urban, S. Ye, G.A. O'Toole, B.A. Stanton, The DeltaF508-CFTR mutation results in increased biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* by increasing iron availability, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 295(1) (2008) 25-37.
- A. Muñoz-Bonilla, and M. Fernández-García, Polymeric materials with antimicrobial activity, *Prog. Polym. Sci.* 37 (2012) 281-339

- H. Murata, R.R. Koepsel, K. Matyjaszewski, A.J. Russell, Permanent, non-leaching antibacterial surfaces – 2: how high density cationic surfaces kill bacterial cells, *Biomaterials* 28 (2007) 4870-4879.
- P. Muttli, J. Kaur, K. Kumar, A.B. Yadav, R. Sharma, A. Misra, Inhalable microparticles containing large payload of anti-tuberculosis drugs, *Eur J Pharm Sci* 32 (2007) 140-150.
- Islam N et al., Developing an efficient and reliable dry powder inhaler for pulmonary drug delivery—a review for multidisciplinary researchers, *Med. Eng. Phys.* 2012; 34: 409–427.
- I. Nakase, A. Tadokoro, N. Kawabata, T. Takeuchi, H. Katoh, K. Hiramoto, M. Negishi, M. Nomizu, Y. Sugiura, S. Futaki, Interaction of arginine-rich peptides with membrane-associated proteoglycans is crucial for induction of actin organization and macropinocytosis, *Biochemistry* 46 (2007) 492-501.
- Y.S. Nam, J.J. Yoon, T.G. Park, A novel fabrication method of macroporous biodegradable polymer scaffolds using gas foaming salt as a porogen additive, *J Biomed Mater Res* 53 (2000) 1-7.
- C. Neumann-Giesen, B. Falkenbach, P. Beicht, S. Claasen, G. Lüers, C.A.O. Stuermer, V. Herzog, R. Tikkanen, Membrane and raft association of reggie-1/flotillin-2: role of myristoylation, palmitoylation and oligomerization and induction of filopodia by overexpression, *Biochem. J.* 378 (2004) 509-518.
- M. Ogris, E. Wagner, Targeting tumors with non-viral gene delivery systems, *Drug Discovery Today* 7 (2002) 479-85.
- M. Ogris, A. K. Kotha, N. Tietze, E. Wagner, F. S. Palumbo, G. Giammona and G. Cavallaro, Novel biocompatible cationic copolymers based on polyasparthyldrazide being potent as gene vector on tumor cells. *Pharm. Res.* 24(12) (2007) 2213-2222.
- H.X. Ong, D. Traini, M. Bebawy, P.M. Young, Epithelial profiling of antibiotic controlled release respiratory formulations, *Pharm. Res.* 28 (2011) 2327-2338.

- M. Ouchi, T. Terashima, M. Sawamoto, Transition metal-catalyzed living radical polymerization: toward perfection in catalysis and precision polymer synthesis, *Chem. Rev.* 109 (2009) 4963-5050.
- Peer, P. Zhu, C.V. Carman, J. Lieberman, M. Shimaoka, Selective gene silencing in activated leukocytes by targeting siRNAs to the integrin lymphocyte function-associated antigen-1, *Proc Natl Acad Sci USA* 104 (2007) 4095-100.
- Song, P. Zhu, S.K. Lee, D. Chowdhury, S. Kussman, D.M. Dykxhoorn, et al., Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors, *Nat Biotechnol* 23 (2005) 709-17.
- L. Pelkmans, A. Helenius, Endocytosis via caveolae, *Traffic* 3 (2002) 311-320.
- G. Pitarresi, D. Giacomazza, D. Triolo, et al., Rheological characterization and release properties of inulin-based hydrogels, *Carbohydr Polym* 88 (2012) 1033-1040
- G. Pitarresi, F.S. Palumbo, C. Fiorica, F. Calascibetta, G. Giammona, Electrospinning of α,β -poly(N-2-hydroxyethyl)-dl-aspartamide-graft-poly(lactic acid) to produce a fibrillar scaffold, *European Polymer Journal* 46(2) (2010) 181-184.
- G. Pitarresi, F.S. Palumbo, G. Tripodo, G. Cavallaro, G. Giammona, Preparation and characterization of new hydrogels based on hyaluronic acid and α,β -polyaspartylhydrazide, *European Polymer Journal* 43 (9) (2007) 3953-3962.
- G. Pitarresi, G. Cavallaro, G. Giammona, G. De Guidi, M. G. Salemi, S. Sortino, New hydrogel matrices containing an antiinflammatory agent. evaluation of in vitro release and photoprotective activity, *Biomaterials* 23 (2002) 537-550.
- G. Pitarresi, G. Tripodo, G. Cavallaro, et al. Inulin-iron complexes: A potential treatment of iron deficiency anaemia. *Eur J Pharm Biopharm* 68 (2008) 267-276.
- G.D.C. Pizarro, M. Jeria-Orell, O.G. Marambio, A.F. Olea, D.T. Valdes, K.E. Geckeler, Synthesis of functional poly(styrene)-block-(methyl methacrylate/methacrylic acid) by homogeneous reverse atom transfer radical polymerization:

- spherical nanoparticles, thermal behavior, self-aggregation, and morphological properties, *J. Appl. Polym. Sci.* 129 (2013) 2076-2085.
- J.S. Price, A.F. Tencer, D.M. Arm, G.A. Bohach, Controlled release of antibiotics from coated orthopedic implants, *J. Biomed. Mater. Res.* 30 (1996) 281-286.
 - M.G. Qaddoumi, H.J. Gukasyan, J. Davda, V. Labhassetwar, K.J. Kim, V.H.L. Lee, Clathrin and caveolin-1 expression in primary pigmented rabbit conjunctival epithelial cells: role in PLGA nanoparticle endocytosis, *Mol. Vis.* 9 (2003) 559-568.
 - Lemarchand, R. Gref, P. Couvreur, Polysaccharide-decorated nanoparticles, *European Journal of. Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 58 (2004) 327-341.
 - M. Rabinovitch, Professional and nonprofessional phagocytes—an introduction, *Trends Cell Biol.* 5 (1995) 85-87.
 - H. Radhakrishna, J.G. Donaldson, ADP-ribosylation factor 6 regulates a novel plasma membrane recycling pathway, *J. Cell Biol.* 139 (1997) 49-61.
 - J. Rejman, A. Bragonzi, M. Conese, Role of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis in gene transfer mediated by lipo- and polyplexes, *Mol. Ther.* 12 (2005) 468-474.
 - J. Rejman, A. Bragonzi, M. Conese, Role of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis in gene transfer mediated by lipo- and polyplexes, *Mol. Ther.* 12 (2005) 468-474.
 - De Roma, H.-J. Yang, S. Milione, C. Capacchione, G. Roviello, A. Grassi, Atom transfer radical polymerization of methylmethacrylate mediated by a naphthyl–nickel(II) phosphane complex, *Inorganic Chemistry Communications* 14 (4) (2011) 542-544.
 - P. Russo, M. Stigliani, L. Prota, G. Auriemma, C. Crescenzi, A. Porta, R.P. Aquino, Gentamicin and leucine inhalable powder: What about antipseudomonal activity and permeation through cystic fibrosis mucus?, *International Journal of Pharmaceutics* 440 (2013) 250-255.

- W. Rutsch, K. Dietliker, D. Leppard, M. Köhler, L. Misev, U. Kolczak, G. Rist, Recent developments in photoinitiators, *Progress in Organic Coatings* 27 (1-4) (1996) 227-239.
- E. Rytting, J. Nguyen, X. Wang, T. Kissel, Biodegradable polymeric nanocarriers for pulmonary drug delivery, *Exp. Opin. Drug Deliv.* 5 (2008) 629-639.
- G. Sahay, D.Y. Alakhova, A.V. Kabanov, Endocytosis of nanomedicines, *Journal of Controlled Release* 145 (2010) 182-195.
- M. Sakagami, W. Kinoshita, K. Sakon, J. Sato, Y. Makino, Mucoadhesive beclomethasone microspheres for powder inhalation: their pharmacokinetics and pharmacodynamics evaluation, *Journal of Controlled Release* 80 (2002) 207-218.
- K. Sandvig, B. Spilsberg, S.U. Lauvraka, M.L. Torgersen, T.G. Iversen, B. van Deurs, Pathways followed by protein toxins into cells, *Int. J. Med. Microbiol.* 293 (2004) 483-490.
- A. Saovapakhiran, A. Emanuele, D. Attwood, J. Penny, Surface modification of PAMAM dendrimers modulates the mechanism of cellular internalization, *Bioconjug. Chem.* 20 (2009) 693-701.
- M.R.J. Scherer, *Double-Gyroid-Structured Functional Materials: Synthesis and Applications*, Springer Science & Business Media, 25 giu 2013.
- C. Scholz, E. Wagner, Therapeutic plasmid DNA versus siRNA delivery: Common and different tasks for synthetic carriers, *Journal of Controlled Release* 161 (2012) 554-565.
- J. Segurola, N. Allen, M. Edge, A. Parrondo, I. Roberts, Photochemistry and photoinduced chemical crosslinking activity of several type II commercial photoinitiators in acrylated prepolymers, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 122 (2) (1999) 115-125.
- L. Serra, J. Doménech, N.A. Peppas, Design of poly(ethylene glycol)-tethered copolymers as novel mucoadhesive drug delivery systems, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 63 (2006) 11-18.

- M.N. Sheppard and A.G. Nicholson, The pathology of cystic fibrosis, *Current Diagnostic Pathology* 8 (2002) 50-59.
- S. Simoes, V. Slepshkin, P. Pires, R.M. Gaspar, P.de Lima, N. Duzgunes, Mechanisms of gene transfer mediated by lipoplexes associated with targeting ligands or pH-sensitive peptides, *Gene Therapy* 6(11) (1999) 1798-1807.
- J.D. Smart, The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. *Adv Drug Deliv Rev* 57 (2005) 1556-1568.
- A. Sosnik, G. Gotelli, G.A. Abraham, Microwave-assisted polymer synthesis (MAPS) as a tool in biomaterials science: How new and how powerful. *Progress in Polymer Science* 36 (2011) 1050-1078.
- C.V. Stevens, A. Meriggi, K. Booten, Chemical Modification of Inulin, a Valuable Renewable Resource, and Its Industrial Applications, *Biomacromolecules* 2(1) (2001) 1-16.
- F. Stoffelbach, D.M. Haddleton, R. Poli, Controlled radical polymerization of alkyl acrylates and styrene using a half-sandwich molybdenum(III) complex containing diazadiene ligands, *European Polymer Journal* 39 (2003) 2099-2105.
- F. Stoffelbach, D.M. Haddleton, R. Poli, Controlled radical polymerization of alkyl acrylates and styrene using a half-sandwich molybdenum(III) complex containing diazadiene ligands, *European Polymer Journal*, 39 (2003) 2099-2105.
- D. Stuerge, K. Gonon, M. Lallemand, Microwave heating as a new way to induce selectivity between competitive reactions. Application to isomeric ratio control in sulfonation of naphthalene, *Tetrahedron* 49 (1993) 6229-6234.
- J.A. Swanson, Shaping cups into phagosomes and macropinosomes, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (2008) 639-649.
- B.C. Tang, M. Dawson, S.K. Lai, Y.Y. Wang, J.S. Suk, M. Yang, P. Zeitlin, M.P. Boyle, J. Fu, J. Hanes, Biodegradable polymer nanoparticles that rapidly penetrate the human mucus barrier, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 106(46) (2009) 19268-19273.

- B. Thallinger, E.N. Prasetyo, G.S. Nyanhongo, G.M. Guebitz, Antimicrobial enzymes: an emerging strategy to fight microbes and microbial biofilms, *Biotechnol. J.* 8 (2013) 97-109.
- D.J. Thornton, J.K. Sheehan, From mucins to mucus: toward a more coherent understanding of this essential barrier, *Proc. Am. Thorac. Soc.* 1 (2004) 54-61.
- H. Tian, Z. Tang, X. Zhuang, X. Chen, X. Jing, Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application, *Progress in Polymer Science* 37 (2012) 237-280.
- J.C. Tiller, C.-J. Liao, K. Lewis, and A.M. Klibanov, Designing surfaces that kill bacteria on contact, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (2001) 5981-5985.
- L. Timofeeva, and N. Kleshcheva, Antimicrobial polymers: mechanism of action, factors of activity, and applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89 (2011) 475-492.
- J.L. Tucker, Green chemistry: cresting a summit toward sustainability, *Org Process Res Dev* 14 (2010) 328-331.
- M.A.E.M. van der Aa, U.S. Huth, S.Y. Hafele, R. Schubert, R.S. Oosting, E. Mastrobattista, W.E. Hennink, R. Peschka-Suss, G.A. Koning, D.J.A. Crommelin, Cellular uptake of cationic polymer-DNA complexes via caveolae plays a pivotal role in gene transfection in COS-7 cells, *Pharm. Res.* 24 (2007) 1590-1598.
- R. Vanbever, J.D. Mintzes, J. Wang, J. Nice, D. Chen, R. Batycky, R. Langer, D.A. Edwards, Formulation and physical characterization of large porous particles for inhalation, *Pharm Res* 16 (1999) 1735-1742.
- C.A. Ventura, S. Tommasini, E. Crupi, I. Giannone, V. Cardile, T. Musumeci, G. Puglisi, Chitosan microspheres for intrapulmonary administration of moxifloxacin: interaction with biomembrane models and in vitro permeation studies, *Eur J Pharm Biopharm* 68 (2008) 235-244.
- D. Vercauteren, J. Rejman, T.F. Martens, J. Demeester, S.C. De Smedt, K. Braeckmans, On the cellular processing of non-viral nanomedicines for nucleic

- acid delivery: Mechanisms and methods, *Journal of Controlled Release* 161 (2012) 566-581.
- D. Vercauteren, M. Piest, L.J. van der Aa, M. Al Soraj, A.T. Jones, J.F.J. Engbersen, S.C. De Smedt, K. Braeckmans, Flotillin-dependent endocytosis and a phagocytosis-like mechanism for cellular internalization of disulfide-based poly(amido amine)/DNA polyplexes, *Biomaterials* 32 (2011) 3072-3084.
 - K. von Gersdorff, N.N. Sanders, R. Vandenbroucke, S.C. De Smedt, E. Wagner, M. Ogris, The internalization route resulting in successful gene expression depends on polyethylenimine both cell line and polyplex type, *Mol. Ther.* 14 (2006) 745-753.
 - M. Walsh, M. Tangney, M.J. O'Neill, J.O. Larkin, D.M. Soden, S.L. McKenna, R. Darcy, G.C. O'Sullivan, C.M. O'Driscoll, Evaluation of cellular uptake and gene transfer efficiency of pegylated poly-L-lysine compacted DNA: implications for cancer gene therapy, *Mol. Pharm.* 3 (2006) 644-653.
 - C. Wang, Y. Fan, M.-X. Hu, W. Xu, J. Wu, P.-F. Renb, Z.-K. Xu, Glycosylation of the polypropylene membrane surface via thiol-yne click chemistry for lectin adsorption, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 110 (2013) 105-112.
 - J.-S. Wang, K. Matyjaszewski, Living/controlled radical polymerization. Transition-metal-catalyzed atom transfer radical polymerization in the presence of a conventional radical initiator, *Macromolecules* 28 (1995) 7572-7573.
 - M. Wang, M. Thanou, Targeting nanoparticles to cancer, *Pharmacological Research* 62(2) (2010) 90-99.
 - S.G. Wang, W.J. Cui, J.Z. Bei, Bulk and surface modifications of polylactide, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 381(3) (2005) 547-556.
 - W. Wanga, J. Zhanga, C. Li, P. Huang, S. Gao, S. Han, A. Dong, D. Kong, Facile access to cytocompatible multicompart ment micelles with adjustable Janus-cores from A-block-B-graft-C terpolymers prepared by combination of ROP and ATRP, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 115 (2014) 302-309.

- J.G. Weers, T.E. Tarara, A.R. Clark, Design of fine particles for pulmonary drug delivery, *Expert Opin Drug Del.* 4 (2007) 297-313.
- A.W. Wong, S.J. Scales, D.E. Reilly, DNA internalized via caveolae requires microtubule-dependent, Rab7-independent transport to the late endocytic pathway for delivery to the nucleus, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 22953-22963.
- Y. Wu, G. Dong, J. Xu, G. Ni, Emulsion copolymerization of styrene and butyl acrylate by reverse atom transfer radical polymerization, *J. Appl. Polym. Sci.* 126 (2012) 1152-1158.
- www.cff.org.
- M. Xiong, K. Zhang, Y. Chen, ATRP of 3-(triethoxysilyl)propyl methacrylate and preparation of “stable” gelable block copolymers, *European Polymer Journal* 44 (2008) 3835-3841.
- M.H. Xiong, Y. Bao, X.Z. Yang, Y.H. Zhu, J. Wang, Delivery of antibiotics with polymeric particles, *Advanced Drug Delivery Reviews* 78C (2014) 63-76.
- F.J. Xu, X. C. Yang, C. Y. Li, W. T. Yang, Functionalized polylactide film surfaces via surface-initiated ATRP, *Macromolecules* 44 (2011) 2371-2377.
- F.J. Xu, Z.H. Wang, W. T. Yang, Surface functionalization of polycaprolactone films via surface-initiated atom transfer radical polymerization for covalently coupling cell-adhesive biomolecules, *Biomaterials* 31 (2010) 3139-3147.
- Z. Xue, B.W. Lee, S.K. Noh, W.S. Lyoo, Pyridylphosphine ligands for iron-based atom transfer radical polymerization of methyl methacrylate and styrene, *Polymer* 48 (2007) 4704-4714.
- Y.-H. Yu, X.-H. Liu, D. Jia, B.-W. Cheng, F.-J. Zhang, H.-N. Li, et al., “Nascent” Cu(0) nanoparticles-mediated single electron transfer living radical polymerization of acrylonitrile at ambient temperature, *Journal Polymer Science Part A: Polymers Chemistry*, 51 (2013) 1468-1474.
- H.L. Zhang, Y. Ma, X.L. Sun, Recent developments in carbohydrate-decorated targeted drug/gene delivery, *Med. Res. Rev.* 30 (2010) 270-289.

- X. Zhang, D.O. Hayward, D.M.P. Mingos, Apparent equilibrium shifts and hot spot formation for catalytic reactions induced by microwave dielectric heating, *Catal Commun* 11 (1999) 975-996.
- X.X. Zhang, P.G. Allen, M. Grinstaff, Macropinocytosis is the major pathway responsible for DNA transfection in CHO cells by a charge-reversal amphiphile, *Mol. Pharm.* 8 (2011) 758-766.
- I.S. Zuhorn, R. Kalicharan, D. Hoekstra, Lipoplex-mediated transfection of mammalian cells occurs through the cholesterol-dependent clathrin-mediated pathway of endocytosis, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 18021-18028.
- I.S. Zuhorn, W.H. Visser, U. Bakowsky, J.B.F.N. Engberts, D. Hoekstra, Interference of serum with lipoplex-cell interaction: modulation of intracellular processing, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* 1560 (2002) 25-36.