



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

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

Sviluppo di smart *Drug Delivery Systems* a base polimerica per la
terapia inalatoria dell'asma

IL DOTTORE

SALVATORE EMANUELE DRAGO

IL COORDINATORE

CH.MO PROF. PATRIZIA DIANA

IL TUTOR

CH.MO PROF. GENNARA CAVALLARO

CICLO XXXIII
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2021

Indice

1.	Introduzione.....	1
1.1	L'asma	1
1.1.1	Fisiopatologia dell'asma.....	2
1.1.2	Patogenesi dell'asma	4
1.1.3	Terapia farmacologica dell'asma.....	7
1.2	La terapia inalatoria	10
1.2.1	Anatomia e fisiologia polmonare	11
1.2.2	Deposizione degli aerosol nelle vie aeree.....	14
1.2.3	Meccanismi fisiologici in risposta agli aerosol	16
1.2.4	Dispositivi di inalazione	18
1.3	Terapia inalatoria innovativa nell'asma.....	28
1.3.1	Approccio della nanomedicina alle patologie polmonari.....	29
1.3.2	Barriere nella terapia inalatoria	32
1.3.3	Strategie per eludere le barriere polmonari	37
1.3.4	Drug repurposing	41
1.3.5	Terapia genica per il trattamento dell'asma	44
2.	Scopo della tesi.....	47
3.	Risultati e discussioni	54
3.1	Nuovi copolimeri della poliaspartammide per il rilascio polmonare di siRNA nella terapia antiasmatica	54
3.1.1	Sintesi e caratterizzazioni dei polimeri.....	54
3.1.2	Effetto pH dipendente sulle membrane biologiche del copolimero PHEA-g- bAPAE.....	59
3.1.3	Coniugazione con polietilenglicole(PEG)	60
3.1.4	Valutazione della vitalità cellulare	62

3.1.5	Studi di complessazione e caratterizzazione dei poliplessi	63
3.1.6	Studi di interazione dei poliplessi con la mucina	65
3.1.7	Saggio di silenziamento genico	67
3.1.8	Conclusioni.....	68
3.2	Sviluppo di un nanocomplessi funzionalizzati con peptide TAT per la veicolazione inalatoria di siRNA nella terapia antiasmatica	70
3.2.1	Sintesi e caratterizzazioni dei polimeri.....	70
3.2.2	Introduzione del gruppo tiolico nel peptide TAT	74
3.2.3	Studio di complessazione	75
3.2.4	Valutazione della vitalità cellulare	77
3.2.5	Stabilità allo scambio polianionico.....	78
3.2.6	Dynamic Light Scattering.....	79
3.2.7	Studio di interazione con le mucine	80
3.2.8	Studi di uptake cellulare	82
3.2.9	Conclusioni.....	84
3.3	Sviluppo di nanoparticelle per la veicolazione inalatoria di Zileuton	86
3.3.1	Sintesi e caratterizzazione della 2-metil-2-ossazina.....	86
3.3.2	Sintesi della poli-2-metil-2-ossazolina (PMeOx) e della poli-2-metil-2-ossazina	
3.3.3	Sintesi e caratterizzazione dei copolimeri	89
3.3.4	Caratterizzazione delle nanoparticelle ottenute	94
3.3.5	Test di vitalità cellulare	97
3.3.6	Caratterizzazione delle microparticelle	97
3.3.7	Cinetica di rilascio del farmaco	99
3.3.8	Valutazione dell'interazione tra nanoparticelle e mucina.....	100
3.3.9	Conclusioni.....	102
3.4	Sviluppo di nanoparticelle per veicolazione inalatoria di Rapamicina.....	104

3.4.1	Sintesi e caratterizzazione di copolimeri	104
3.4.2	Caratterizzazione delle nanoparticelle ottenute	109
3.4.3	Test di vitalità cellulare	112
3.4.4	Caratterizzazione delle microparticelle	113
3.4.5	Cinetiche di rilascio del farmaco	115
3.4.6	Valutazione dell'interazione tra nanoparticelle e mucina	116
3.4.7	Valutazione del comportamento aerodinamico delle microparticelle	119
3.4.8	Conclusioni	120
4.	Parte Sperimentale	122
4.1	Nuovi copolimeri della poliaspartammide per il rilascio polmonare di siRNA nella terapia antiasmatica	124
4.1.1	Sintesi e caratterizzazione del copolimero PHEA-g-bAPAE	124
4.1.2	Sintesi e caratterizzazione dei copolimeri PHEA-g-PEG	125
4.1.4	Determinazione del contenuto di unità ripetitive funzionalizzate con ammina nei copolimeri PHEA-g-bAPAE e PHEA-g-PEG-g-bAPAE tramite saggio TNBS	127
4.1.5	Determinazione dei pesi molecolari dei copolimeri mediante Size Exclusion Chromatography	127
4.1.6	Profilo acido-base del copolimero PHEA-g-bAPAE	127
4.1.7	Titolazione potenziometrica del copolimero PHEA-bAPAE	128
4.1.8	Studio di destabilizzazione di membrane	128
4.1.9	Test di vitalità cellulare	129
4.1.10	Studio di complessazione	129
4.1.11	Stabilità allo scambio polianionico dei poliplessi in presenza di mucine	130
4.1.12	Valutazione interazioni poliplessi-mucine	130
4.1.13	Saggio di silenziamento genico	131

4.2	Sviluppo di un nanocomplessi funzionalizzati con peptide TAT per la veicolazione inalatoria di siRNA nella terapia antiasmatica	132
4.2.1	Sintesi del copolimero PHEA-g-bAPAE.....	132
4.2.2	Sintesi del polimero MLB-PEG-COOH.....	133
4.2.3	Sintesi del copolimero PHEA-g-bAPAE-PEG-MLB.....	133
4.2.4	Funzionalizzazione del peptide TAT con l'estere succinimmidico dell'acido 3-(2-piridilditio) propionico (SPDP)	134
4.2.5	Deprotezione del gruppo tiolico nel coniugato TAT-SPDP	135
4.2.6	Studio di complessazione	135
4.2.7	Preparazione dei complessi rivestiti con peptide TAT	136
4.2.8	Stabilità allo scambio polianionico dei poliplessi in presenza di mucine	136
4.2.9	Misure di Dynamic light scattering (DLS)	136
4.2.10	Valutazione interazioni poliplessi-mucine	137
4.2.11	Valutazione della capacità mucopenetrante dei poliplessi	137
4.2.12	Test di vitalità cellulare	138
4.2.13	Uptake cellulare.....	138
4.3	Sviluppo di nanoparticelle per veicolazione inalatoria di Zileuton	140
4.3.1	Sintesi della 2-metil-2-ossazina.....	140
4.3.2	Sintesi della poli-2-metil-2-ossazolina-Piperazina-Boc e della poli-2-metil-2-ossazina-Piperazina-Boc tramite Cationic Ring-Opening Polymerization (CROP)	140
4.3.3	Rimozione del protettore BOC	141
4.3.4	Sintesi dei copolimeri PHEA-g-Pip-PMeOx e PHEA-g-Pip-PMeOz	141
4.3.5	Sintesi dei copolimeri PHEA-g-Pip-PMeOx-g-PLA e PHEA-g-Pip-PMeOz-g-PLA.....	142

4.3.6	Determinazione dei pesi molecolari dei copolimeri mediante Size Exclusion Chromatography	143
4.3.7	Preparazione nanoparticelle tramite nanoprecipitazione diretta.....	143
4.3.8	Preparazione nanoparticelle tramite nanoprecipitazione mediante dialisi	144
4.3.9	Preparazione nanoparticelle tramite emulsione/evaporazione del solvente	144
4.3.10	Dynamic light scattering.....	144
4.3.11	Microscopia a scansione elettronica (SEM)	144
4.3.12	Preparazione di nanoparticelle caricate con Zileuton.....	145
4.3.13	Test di vitalità cellulare	145
4.3.14	Preparazione di microparticelle mediante tecnica dello spray drying	146
4.3.15	Cinetica di rilascio del farmaco	147
4.3.16	Analisi turbidimetrica	147
4.3.17	Analisi reologica.....	148
4.4	Sviluppo di nanoparticelle per veicolazione inalatoria di Rapamicina.....	149
4.4.1	Sintesi e caratterizzazione del poli-ε-caprolattone-succinato (PCL-SUCC)....	149
4.4.2	Sintesi e caratterizzazione del copolimero PHEA-g-SUCC-PCL	149
4.4.3	Sintesi e caratterizzazione dei copolimeri PHEA-g-SUCC-PCL-g-PEG.....	150
4.4.4	Determinazione dei pesi molecolari dei copolimeri mediante Size Exclusion Chromatography	151
4.4.5	Analisi FT-IR.....	151
4.4.6	Preparazione di nanoparticelle tramite tecnica della nanoprecipitazione diretta	151
4.4.7	Dynamic light scattering.....	152
4.4.8	Analisi di spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS)	152
4.4.9	Determinazione della Drug Loading (DL%)	152
4.4.10	Stabilità del farmaco	153

4.4.11	Test di vitalità cellulare	153
4.4.12	Produzione di microparticelle mediante strategia Nano in Micro (NiM).....	154
4.4.13	Caratterizzazione delle microparticelle NiM mediante microscopio elettronico a scansione (SEM) e microscopio ottico (OM).....	154
4.4.14	Cinetiche di rilascio	155
4.4.15	Analisi turbidimetrica	155
4.4.16	Analisi reologica.....	155
4.4.17	Test di mucopenetrazione.....	156
4.4.18	Comportamento aerodinamico delle NiM	156
5.	Bibliografia.....	159

1. Introduzione

1.1 L'asma

L'asma colpisce circa 300 milioni di individui in tutto il mondo, rappresentando un grave problema di salute che interessa tutte le fasce d'età, con un'incidenza in continuo aumento in molti Paesi. Nonostante si sia assistito ad un calo dei ricoveri e dei decessi per asma, tale patologia impone tutt'oggi un peso sui Sistemi Sanitari e sulla società attraverso la perdita di produttività sul lavoro e causando disagio nelle famiglie, soprattutto per le manifestazioni asmatiche dei bambini.

Nel 1993, un team nato dalla collaborazione tra il National Heart, Lung, and Blood Institute e l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha portato alla elaborazione del Report del Workshop: "Global Strategy for Asthma Management and Prevention" a cui ha fatto seguito la creazione della iniziativa "Global Initiative for Asthma" (GINA), una rete formata da persone, organizzazioni e autorità sanitarie pubbliche, finalizzata alla diffusione delle conoscenze sull'asma tra gli addetti del servizio sanitario, le autorità sanitarie e la società, e per migliorare la prevenzione e la gestione di questa patologia attraverso uno sforzo coordinato a livello globale.

Questo progetto prepara infatti relazioni scientifiche, incoraggia la diffusione e l'attuazione delle raccomandazioni e promuove la collaborazione internazionale nella ricerca sulla patologia[1].

L'asma viene definita come una patologia infiammatoria cronica delle vie respiratorie in cui molte cellule infiammatorie come mastociti, eosinofili e linfociti T giocano un ruolo patogenetico fondamentale; tale infiammazione cronica si traduce con un aumento della reattività bronchiale (definita come un aumento della risposta delle vie aeree a stimoli di diverso tipo) con comparsa di episodi ricorrenti di broncospasmo, caratterizzati clinicamente da respiro sibilante, dispnea, tosse e senso di costrizione toracica associati generalmente ad una ostruzione bronchiale[2].

In tal modo viene evidenziato come l'infiammazione sia considerata un meccanismo fondamentale per lo sviluppo e progressione della malattia, indipendentemente dalla gravità clinica, identificando quindi il trattamento con farmaci ad azione antiinfiammatoria come terapia d'elezione.

È altresì importante distinguere l'asma persistente dagli attacchi di asma, definiti riacutizzazioni, caratterizzati da un peggioramento della sintomatologia, che può rivelarsi potenzialmente mortale in assenza di una efficace terapia farmacologica.

In base a frequenza dei sintomi, frequenza e gravità della riacutizzazione, grado di ostruzione bronchiale e variabilità dell'ostruzione bronchiale, sono stati definiti quattro stadi di gravità: intermittente, lieve persistente, moderata e grave[1], [2].

Tabella 1 Classificazione della gravità dell'asma.

Gravità	Frequenza dei Sintomi	PEF* o FEV₁**	Varabilità del PEF	Sintomi Notturmi
Lieve intermittente	≤2/settimana	≥80%	<20%	≤2/mese
Lieve persistente	3-6/ settimana	≥80%	20-30%	3-4/mese
Moderata persistente	Quotidiana	60-80%	>30%	≥5/mese
Grave persistente	Continua	≤60%	>30%	Frequenti

*PEF: Peak Expiratory Flow, picco di flusso espiratorio

**FEV₁: Forced Expiratory Volume in 1 second, volume espiratorio forzato nel primo secondo

I pazienti asmatici spesso hanno una forte storia familiare di asma o allergie, suggerendo che i fattori genetici possono svolgere un ruolo nello sviluppo; tuttavia, pare che i fattori genetici non rappresentano i soli determinanti nell'insorgere della patologia.

Diversi fattori ambientali come allergeni, inquinamento, fumo di sigaretta, infezioni respiratorie, vengono considerati come i principali fattori inducenti la risposta asmatica; i meccanismi con cui questi inducono la risposta sono variabili, ma essenzialmente agiscono dapprima sensibilizzando l'organismo e successivamente mantenendo attivo il processo infiammatorio, causando cronicizzazione[3], [4].

L'eziologia dell'asma risulta dunque essere molto complessa e multifattoriale.

1.1.1 Fisiopatologia dell'asma

Le alterazioni fisiopatologiche caratteristiche dell'asma sono determinate dalla condizione di infiammazione cronica delle vie aeree[1].

Una delle principali alterazioni nella fisiologia polmonare è l'iperreattività bronchiale, definita come un aumento della risposta delle vie aeree a stimoli di diverso tipo, determinando il restringimento delle vie aeree. L'entità del restringimento del lume bronchiale è di gran lunga superiore rispetto a quella che si può registrare in soggetto sano, poiché gli stimoli esogeni (o endogeni nel caso di mediatori cellulari rilasciati dal processo infiammatorio) possono agire direttamente sulle fibre muscolari lisce inducendo un incremento della capacità contrattile,

innescando una reazione nota come “risposta asmatica precoce”, che costituisce le basi della broncocostrizione[2].

La riduzione del calibro delle vie aeree viene anche determinata dalla presenza di edema, che si manifesta in conseguenza dell’aumento della permeabilità dei vasi del microcircolo bronchiale indotta dal processo infiammatorio[5].

Altre alterazioni della fisiologia polmonare sono a carico delle secrezioni; l’ipertrofia delle ghiandole della sottomucosa comporta una maggiore secrezione di muco che insieme alla presenza di essudati infiammatori e detriti cellulari può dare luogo alla formazione di tappi di muco che sono in grado di occludere le piccole vie aeree[2].

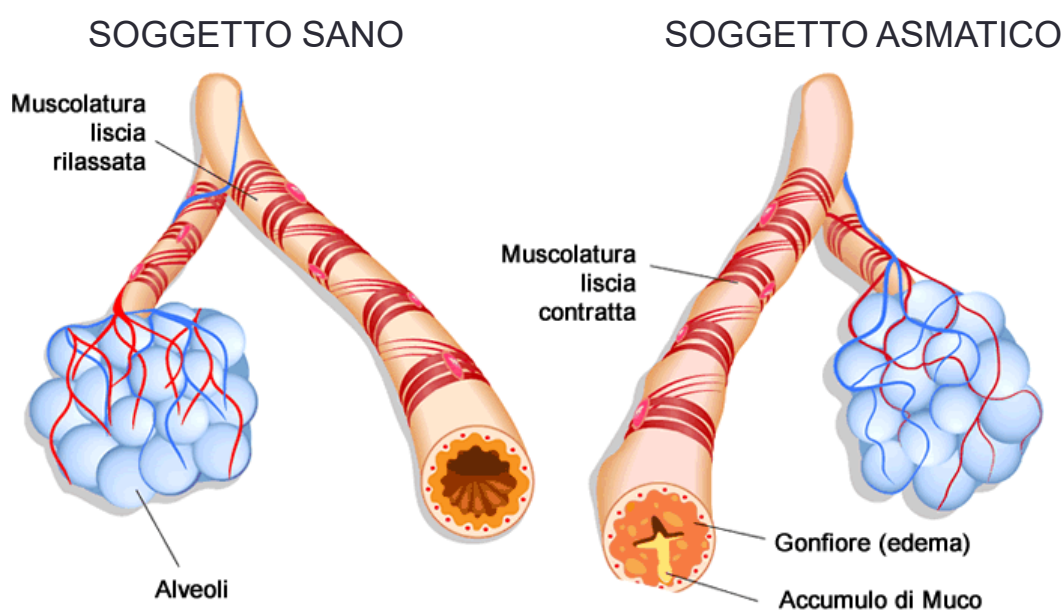


Figura 1 Alterazioni strutturali dell’albero respiratorio nei soggetti sani (a sinistra) e nei soggetti asmatici (a destra). Tratta da [6] ed opportunamente modificata.

Le alterazioni della muscolatura liscia, l’edema e la maggiore secrezione di muco concorrono, dunque, a determinare una riduzione del calibro delle vie aeree, aumentando conseguentemente le resistenze delle stesse, generando difficoltà sia durante l’inspirazione che durante l’espirazione; l’aumento della resistenza in genere si accompagna ad intrappolamento di aria e conseguente aumento dei volumi polmonari, dando luogo alla dispnea[4], [7].

Fortunatamente la riduzione del calibro delle vie aeree dovuta ai fattori sopracitati può risolversi in seguito ad un’opportuna terapia farmacologica, ma con l’avanzare della malattia si registrano modifiche strutturali del tratto respiratorio che purtroppo determinano una broncocostrizione irreversibile. Queste modificazioni strutturali vengono collettivamente definite “*rimodellamento delle vie aeree*” e vengono attribuite al ripetuto insulto alle vie aeree proveniente dal continuo ripetersi in maniera ciclica di infiammazione e riparo; i cambiamenti più importanti comprendono iperplasia delle cellule caliciformi, ipertrofia ed iperplasia dei

miociti e proliferazione di fibroblasti e miofibroblasti. A questi ultimi si associa un incremento della deposizione di proteine della matrice extracellulare (collagene, fibronectina, tenascina), dando origine ad una fibrosi sub-epiteliale che causa un ispessimento della membrana basale[8]–[12].

Anche i vasi vengono coinvolti nel rimodellamento delle vie aeree; l'elevata produzione di fattori di crescita vascolari (VEGF) inducono fenomeni di neo-angiogenesi che aumentano numero, dimensioni ed area complessiva degli elementi vascolari nella parete bronchiale[13].

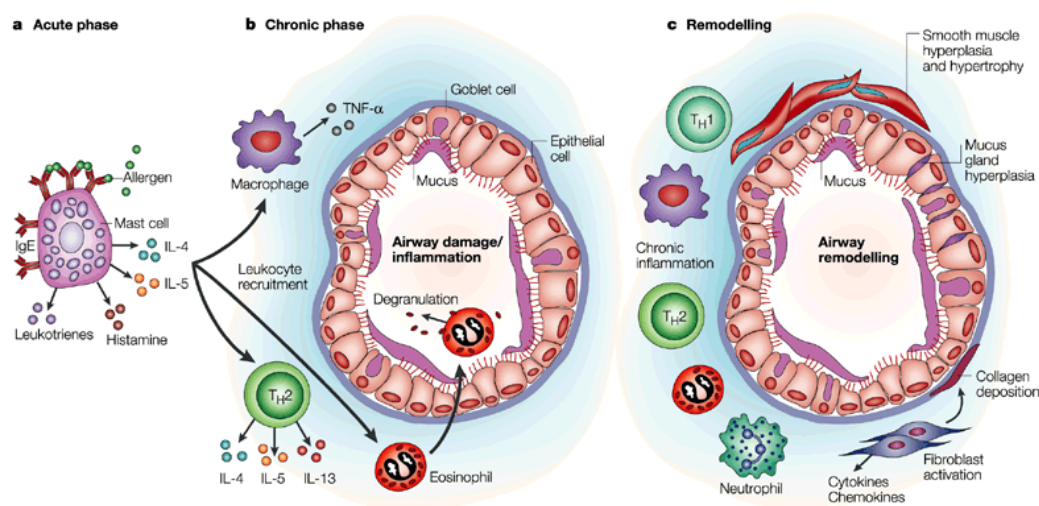


Figura 2 Rappresentazione grafica della progressione da eventi acuti (a) come l'attivazione dei mastociti indotta da allergeni, che rilasciando mediatori portano ad infiammazione cronica (b), caratterizzata dall'attivazione di T helper (Th2) e macrofagi e reclutamento e degranolazione degli eosinofili. Infine, in alcuni soggetti, si osserva un'ulteriore progressione dei cambiamenti infiammatori verso il rimodellamento delle vie aeree (c), con alterazioni permanenti nell'architettura delle vie aeree in modo tale che gli eventi ostruttivi siano irreversibili. Tratta da [8].

1.1.2 Patogenesi dell'asma

I possibili fattori che scatenano il fenomeno asmatico sono molteplici e l'interazione di questi fattori e cellule immunitarie dà inizio a una cascata molecolare che comporta un aumento della produzione e liberazione di sostanze infiammatorie; l'infiammazione delle vie aeree nell'asma è un processo multicellulare che coinvolge principalmente eosinofili, neutrofili, linfociti $CD4^{+}T$ e mastociti, con l'infiltrazione eosinofila che è la caratteristica più evidente[14].

Il processo infiammatorio è in gran parte limitato alle vie aeree conduttrici, ma con il progredire della patologia, l'infiltrato infiammatorio si diffonde includendo anche le piccole vie aeree ed in alcuni casi gli alveoli adiacenti[15].

Nel caso in cui il fattore scatenante sia un allergene, viene generata una risposta immunitaria mediata dalle citochine Th2. Affinché possa generarsi questo tipo di risposta, è fondamentale che avvenga un processo di sensibilizzazione agli allergeni; gli allergeni inalati vengono

assorbiti da parte delle cellule dendritiche situate nell'epitelio e nella sottomucosa delle vie aeree[16], [17] ed una volta all'interno della cellula dendritica, gli allergeni vengono processati da parte della catepsina S ed i frammenti peptidici vengono esposti sulla superficie cellulare dalle molecole HLA (MHC classe II)[18].

Successivamente la cellula dendritica riceve i segnali per migrare verso i linfonodi locali, dove avviene la presentazione dell'antigene ai linfociti Th *naive*[19], [20]; alcuni recettori specifici per le chemochine, inclusi CCR7 e i suoi ligandi CCL19 e CCL21, sono coinvolti in questa migrazione chemiotattica. La presentazione del peptide antigenico selezionato al recettore delle cellule T avvia la sensibilizzazione e la successiva risposta immunitaria all'allergene specifico[21].

Una volta sensibilizzati, i linfociti T migrano verso le vie aeree al sito di presentazione dell'antigene sotto l'influenza di varie chemochine, che interagiscono con i loro recettori reciproci [22], [23]; allo stesso tempo queste cellule diventano anche potenti produttori di citochine, come IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13 ed il fattore stimolante le colonie granulociti-macrofagi (GM-CSF)[24]–[26].

IL-4 e IL-13 prodotte da linfociti Th2 attivati inducono le cellule B a produrre anticorpi IgE allergene specifici; questi si legano ai recettori IgE sui mastociti e basofili; la successiva esposizione agli stessi allergeni, induce un cross-linking tra IgE ed i recettori adiacenti sulla superficie dei mastociti e dei basofili, portando alla degranulazione e al rilascio di istamina, triptasi, leucotrieni e prostaglandine. Inoltre, IgE forma anche complessi IgE-allergeni che si legano in modo più efficace ai recettori IgE ad alta e bassa affinità, rispettivamente, sulla superficie delle cellule dendritiche (FcεRI) e delle cellule B (FcεRII), facilitando così l'elaborazione e la presentazione degli allergeni alle cellule Th[27].

I mediatori rilasciati in seguito alla degranulazione dei mastociti sono potenti agenti contrattili della muscolatura liscia e aumentano anche la permeabilità microvascolare; per di più, sia PGD₂ che LTD₄ interagiscono con i recettori della superficie cellulare su eosinofili, macrofagi, basofili e mastociti dove fungono da agenti chemiotattici e agenti di innesco[28].

La degranulazione dei mastociti, indotta attraverso il recettore IgE ad alta affinità (FcεRI), porta al rilascio di alcune citochine tra cui TNF-α, IL-4 e IL-5[29], [30], ma induce anche la trascrizione di queste e altre citochine e chemochine che vengono secrete fino a 72 ore dopo la perturbazione cellulare[31].

IL-5 prodotta da linfociti Th2 attivati e dai mastociti induce la maturazione e sopravvivenza di eosinofili, che a loro volta producono mediatori infiammatori, come eicosanoidi come la prostaciclina (PGI₂) e i leucotrieni cisteinilici, che stimolano la secrezione di muco, l'ispessimento della membrana subepiteliale delle vie aeree e responsabili di altri meccanismi

che conducono alla cronicizzazione dell'infiammazione e conseguente danno tissutale della mucosa bronchiale. Un contributo degli eosinofili al rimodellamento delle vie aeree è supportato dalla loro capacità di generare fattore di crescita trasformante (TGF)- β 1 e di supportare la proliferazione dei fibroblasti, la sintesi del collagene e la maturazione dei miofibroblasti[32].

La patogenesi dell'asma non allergica ad insorgenza tardiva sembra essere molto simile a quella dell'asma di tipo allergico, sebbene siano state segnalate alcune differenze nella proporzione relativa delle varie cellule infiammatorie presenti[24], [33], [34]; nel caso di fattori scatenanti come virus, batteri ed inquinanti, l'infiammazione eosinofila può ancora insorgere in risposta al danno epiteliale. Le "allarmine" epiteliali IL-25, IL-33 e TSLP sono le principali citochine coinvolte; sono tipicamente rilasciate in risposta al danno epiteliale delle vie aeree e promuovono una risposta immunitaria T2 anche in assenza di atopia.

Livelli aumentati di IL-25 in risposta all'infezione da rinovirus sono anche associati ad aumenti di IL-4, IL-5 e IL-13, suggerendo che le risposte mediate da IL-25 nelle cellule epiteliali bronchiali provocano il rilascio di citochine infiammatorie T2 e sovraregolazione della risposta T2[35].

L'IL-33 viene rilasciata dalle cellule epiteliali necrotiche, probabilmente in risposta a lesioni da allergeni, ma anche da microbi e inquinanti atmosferici. Si lega al recettore ST2 presente su un'ampia gamma di cellule effettrici e presenta una serie di funzioni, tra cui la stimolazione delle cellule linfoidi innate di tipo 2 (ILC2) e delle cellule Th2 per regolare la secrezione di IL-4, IL-5 e IL-13, promuovendo così l'adesione e la sopravvivenza degli eosinofili[36].

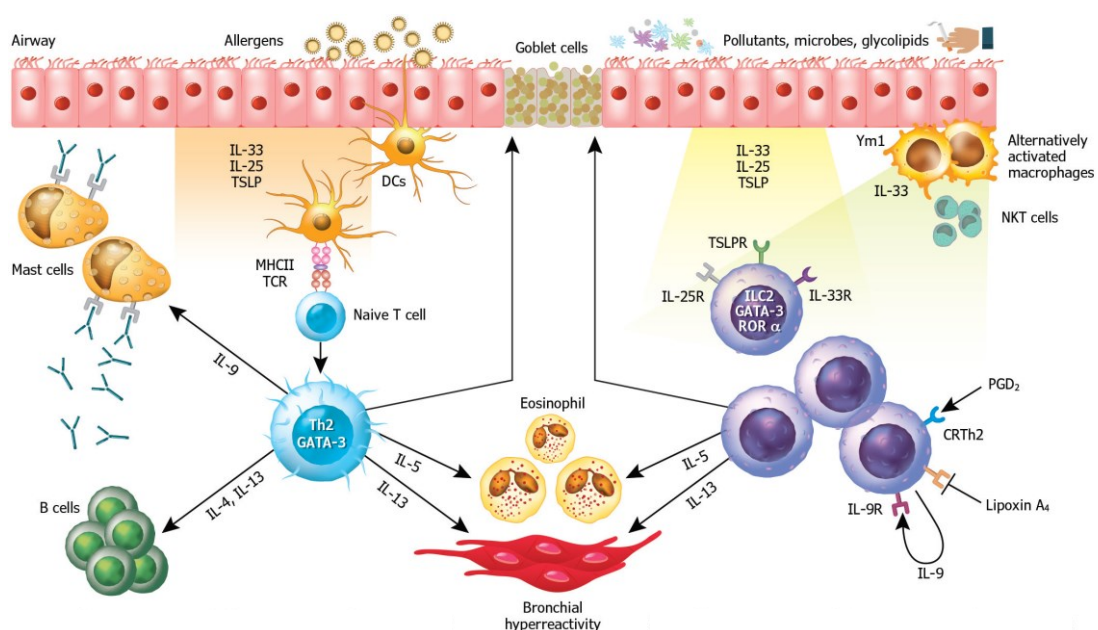


Figura 3 Rappresentazione schematica dell'asma atipico (sinistra) e dell'asma non atipico (destra). Tratta da [37].

Il legame tra IL-33 e ST2 su mastociti, macrofagi e basofili aumenta anche la secrezione di citochine infiammatorie[36]. Inoltre, IL-33 promuove la maturazione delle cellule CD34⁺ in mastociti e stimola le cellule progenitrici CD34⁺ a secernere IL-5, IL-6, IL-13, CXCL8, CCL1 e CCL17, con conseguente aumento della risposta immunitaria[36].

Per quanto concerne l'asma indotta da aria fredda oppure dall'esercizio fisico, il meccanismo non è del tutto chiaro. Si pensa che l'aria inspirata relativamente fresca e secca induca sia raffreddamento che essiccazione dell'epitelio delle vie aeree; l'alterazione dell'ambiente ionico dopo l'essiccazione della mucosa, il rilascio di mediatori, l'iperemia della mucosa in seguito al riscaldamento delle vie aeree e la stimolazione dei recettori irritanti sono stati tutti proposti come meccanismi, ma nessuno è universalmente accettato[4].

Per quanto riguarda i fenomeni asmatici correlati all'uso di FANS, la causa risiede nello squilibrio di attività tra cicloossigenasi e lipossigenasi; l'inibizione della via metabolica della cicloossigenasi operata dall'Aspirina e dai FANS, sposta il metabolismo dell'acido arachidonico verso la via metabolica della lipoossigenasi.

L'inibizione della cicloossigenasi porta a una rapida diminuzione della prostaglandina E2, che normalmente inibisce gli enzimi che generano mediatori proinfiammatori come i leucotrieni B4, C4, D4 ed E4, mentre il sovraccarico della lipoossigenasi porta ad una produzione maggiore di leucotrieni C4, D4 e E4[3].

1.1.3 Terapia farmacologica dell'asma

Gli obiettivi a lungo termine nella gestione dell'asma mirano sia al controllo dei sintomi, riducendo l'impatto della malattia sul paziente, ma anche a ridurre i danni alle vie aeree che si presentano con il progredire della malattia[38].

Al fine di garantire un trattamento adeguato, gli effetti della terapia vengono controllati periodicamente per valutarne l'efficacia; qualora gli esami diagnostici non soddisfino determinati parametri si modifica il trattamento e si rivaluta la risposta.

I farmaci attualmente approvati per il trattamento dell'asma comprendono broncodilatatori ed antinfiammatori.

Tra i broncodilatatori più utilizzati per il trattamento dell'asma vi sono β_2 agonisti a breve durata d'azione (pirbuterolo, salbutamolo e levalbuterolo), β_2 agonisti a lunga durata d'azione (salmeterolo e formoterolo) ed anticolinergici (ad esempio tiotropio, ossitropio e ipratropio bromuri), mentre tra i farmaci più utilizzati per la soppressione del processo infiammatorio, i corticosteroidi inalatori (ICS) rappresentano la terapia d'elezione[39]–[41].

Purtroppo questi approcci sono associati ad un'ampia gamma di effetti avversi.

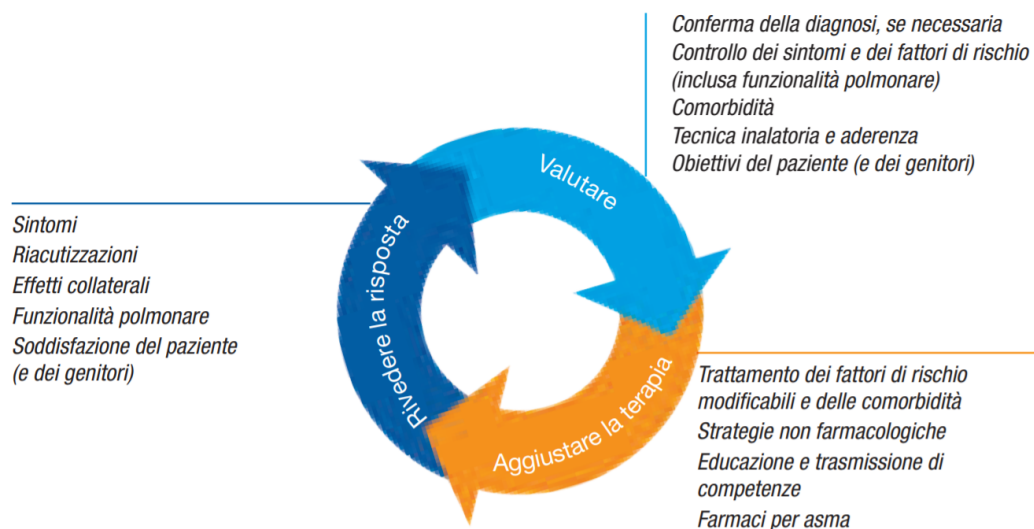


Figura 4 Ciclo di trattamento dell'asma per la prevenzione delle riacutizzazioni e per il controllo dei sintomi. Tratta da [38].

L'utilizzo di β_2 agonisti è stato correlato all'insorgenza di effetti collaterali simpaticomimetici (ansia, tremore e tachicardia)[42], [43], mentre l'utilizzo di anticolinergici è stato associato all'induzione della xerostomia [44], [45], che influenzano la compliance del paziente.

Per quanto riguarda gli steroidi, sebbene rappresentino la terapia più efficace per l'asma, è stato segnalato che causano una serie di effetti collaterali indesiderati come glaucoma, cataratta, contusioni cutanee, teleangectasia, osteoporosi, mal di gola, disfonia (a causa di edema laringeo e ipertrofia muscolare), iperglicemia, soppressione surrenalica e candidosi topica[46]–[49].

Per di più, alcuni soggetti asmatici sono resistenti al trattamento con steroidi a causa di una varietà di fattori come l'alterazione dell'espressione del recettore dei glucocorticoidi, l'attività instabile del recettore dei glucocorticoidi e il fallimento nella traslocazione nucleare dei complessi recettore-glucocorticoidi. Anche il legame impreciso di questi complessi alle specifiche sequenza del DNA (note come elementi di risposta ai glucocorticoidi, GRE) e lo splicing difettoso dell'RNA che porta a un'espressione aberrante di citochine o alla matrice extracellulare distorta sono stati suggeriti come possibili cause della resistenza agli steroidi[50], [51].

Per quanto riguarda l'innovativo Omalizumab, un anticorpo monoclonale umanizzato al 95% che agisce legandosi selettivamente al sito di legame delle IgE circolanti per il recettore Fc, sebbene si sia dimostrato efficace nella gestione dell'asma non controllata in pazienti con asma allergico persistente da moderato a grave[52], il suo utilizzo è stato associato a fenomeni di anafilassi ed eventi aterotrombotici come infarto miocardico e ictus[53].

Un'altra alternativa all'uso di corticosteroidi è rappresentata dai cromoni, stabilizzatori dei mastociti come Disodiocromoglicato e Nedocromil sodico, che però non sono efficaci nell'attacco acuto di asma, ma migliorano la sintomatologia e la funzionalità respiratoria e

riducono la frequenza delle riacutizzazioni; questi però risultano meno efficaci dei glucocorticoidi per via inalatoria[2].

Altre classi di farmaci approvate per la terapia dell'asma comprendono antagonisti selettivi del recettore di tipo 1 per i cisteinil-leucotrieni (CysLT1), come Montelukast, Pranlukast e Zafirlukast, ed un inibitore selettivo della 5-lipoossigenasi, quale lo Zileuton (non disponibile in Italia).

Generalmente gli antagonisti di CysLT1 vengono somministrati per via orale e sono generalmente ben tollerati, ma come per i cromoni, sono tutti meno efficaci rispetto alla terapia steroidea[54], [55].

Per quanto riguarda lo Zileuton, studi clinici controllati in pazienti con asma persistente, hanno mostrato un miglioramento della funzione polmonare ed una riduzione dei sintomi in modo significativo, riducendo inoltre la necessità dell'uso di β 2-agonisti e di corticosteroidi sistemici per gli attacchi acuti di asma[56]; attualmente la terapia con Zileuton, disponibile in commercio solo negli Stati Uniti, è desueta per via della possibilità di epatotossicità che compare nel 5% dei pazienti in terapia con questo farmaco e per la scarsa compliance, considerando che le formulazioni disponibili in commercio sono esclusivamente sottoforma di compresse (Zyflo®) che necessitano di quattro somministrazioni al giorno[2].

1.2 La terapia inalatoria

Il tratto respiratorio, fornisce un'ampia superficie mucosa per l'assorbimento dei farmaci. La somministrazione di farmaci per via inalatoria offre la possibilità di una terapia farmacologica mirata per le malattie polmonari.

Per queste patologie, la somministrazione locale del farmaco consente di utilizzare dosi di farmaco inferiori di un ordine di grandezza rispetto alla somministrazione sistemica (via orale o parentale), riducendo così l'esposizione sistemica al farmaco, gli effetti collaterali sistemici ed i costi della terapia. Inoltre, l'attività enzimatica relativamente bassa aiuta a mantenere un'elevata biodisponibilità locale del farmaco e la natura non invasiva della via inalatoria, grazie all'uso di inalatori portatili, rende questa via di somministrazione conveniente per i pazienti, aumentando la compliance e l'aderenza alla terapia.

Da anni gli agenti terapeutici per il trattamento o la profilassi delle malattie delle vie aeree, come l'asma, la broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO) e la fibrosi cistica, vengono solitamente somministrati direttamente alle vie respiratorie per ottenere un effetto diretto sui tessuti bersaglio del sistema respiratorio.

Nonostante l'inalazione sia iniziata come una via per il trattamento di malattie limitate alle vie respiratorie, negli ultimi anni l'inalazione è usata anche per trattare le malattie sistemiche.

Infatti, grazie alla presenza di una superficie molto grande (70 m^2) disponibile per l'assorbimento di farmaci, allo spessore relativamente sottile della barriera epiteliale a livello alveolare e all'elevato flusso sanguigno, il polmone potrebbe rappresentare un sito di somministrazione più conveniente rispetto alla somministrazione parenterale. Inoltre, rispetto alla via orale, la somministrazione per via inalatoria di un farmaco ne evita il metabolismo di primo passaggio epatico, con conseguente incremento della biodisponibilità.

L'inizio dell'azione a seguito della somministrazione polmonare di farmaci è molto rapido, simile a quello che si ottiene a seguito di una somministrazione endovenosa; l'assorbimento sistemico dei farmaci rispetto ad altre vie non tradizionali di somministrazione sistemica come le cavità buccale, sublinguale, nasale, rettale e vaginale non è invece comparabile a quello ottenuto per via inalatoria, che risulta in generale relativamente più alto.

La sfida principale nella somministrazione per via inalatoria è la mancanza di riproducibilità nella deposizione a livello bronchiale e alveolare della dose somministrata. Infatti, la struttura ramificata dei polmoni fornisce un efficiente filtro aerodinamico, che ostacola la deposizione del farmaco in profondità. Inoltre, la risposta farmacologica dipende non solo dalla quantità di particelle depositate, ma anche dalla quantità trattenuta nel sito. Infatti, le particelle depositate sullo strato di muco, che ricopre le vie aeree conduttrici, possono essere rimosse, prima di essere

assorbite e di poter esercitare un'azione biologica, mediante diversi meccanismi di eliminazione, tra cui tosse, dissoluzione, clearance mucociliare, traslocazione dalle vie aeree ad altri siti e fagocitosi da parte dei macrofagi.

È anche vero che l'efficienza della somministrazione polmonare dipende non solo dalla geometria e dalla fisiologia dei polmoni, ma anche da altri diversi fattori, correlati con le proprietà della formulazione e dei dispositivi di inalazione.

La progettazione di una forma di dosaggio polmonare è un procedimento complesso che implica la conoscenza accurata sia dell'anatomia e della fisiologia del sistema respiratorio, ma anche dei fenomeni a cui le particelle inalate andranno incontro, al fine di modificare le proprietà della formulazione e dei dispositivi di inalazione.

Gli inalatori devono soddisfare le necessità che ogni formulazione richiede ed avere un design opportuno per una migliore deposizione di aerosol nei polmoni, ma allo stesso tempo devono essere abbastanza semplici da essere adeguatamente utilizzati da pazienti di ogni età[57], [58].

1.2.1 Anatomia e fisiologia polmonare

Il sistema respiratorio opera lo scambio di ossigeno e anidride carbonica tra sangue ed atmosfera; la superficie epiteliale, altamente permeabile, che permette questo scambio di gas respiratori è di circa 70-150 m²[59].

I componenti conduttivi dell'aerea polmonare sono trachea, bronchi e bronchioli. La trachea si divide in bronco primario, destro e sinistro, che forniscono rispettivamente aria ai polmoni, dividendosi progressivamente nei bronchi secondari e terziari all'interno dei lobi polmonari ed in bronchioli più piccoli fino a diventare bronchioli respiratori. Questi a loro volta forniscono aria attraverso condotti alveolari negli alveoli, dove avviene lo scambio di gas. L'ossigeno si diffonde attraverso le pareti degli alveoli nei capillari avvolgenti.

La diminuzione del diametro lungo le vie aeree e l'aumento della superficie sono i due fattori più importanti che influenzano la funzionalità polmonare. Il diametro della trachea è di circa 1.8 cm, mentre il diametro dei condotti alveolari è di circa 0.04 cm, consentendo una adeguata penetrazione dell'aria nelle vie aeree inferiori, necessaria all'espansione dei polmoni. L'aumento della superficie polmonare promuove lo scambio di gas tra lo spazio alveolare ed il sangue dei vasi capillari alveolari[59].

Un altro fattore importante che influenza la funzionalità polmonare è la presenza o l'assenza di cartilagine nelle vie aeree. Trachea e bronchi presentano anelli di cartilagine ialina in modo da mantenere aperte le vie aeree, rimanendo pervi e accessibili anche quando la pressione interna è inferiore a quella esterna; l'ampio diametro e la struttura rigida sono responsabili di una

piccolissima resistenza al flusso d'aria. Diversamente, i bronchioli non hanno cartilagine e sono circondati dalla muscolatura liscia, la cui contrazione influenza il lume dei bronchioli[60].

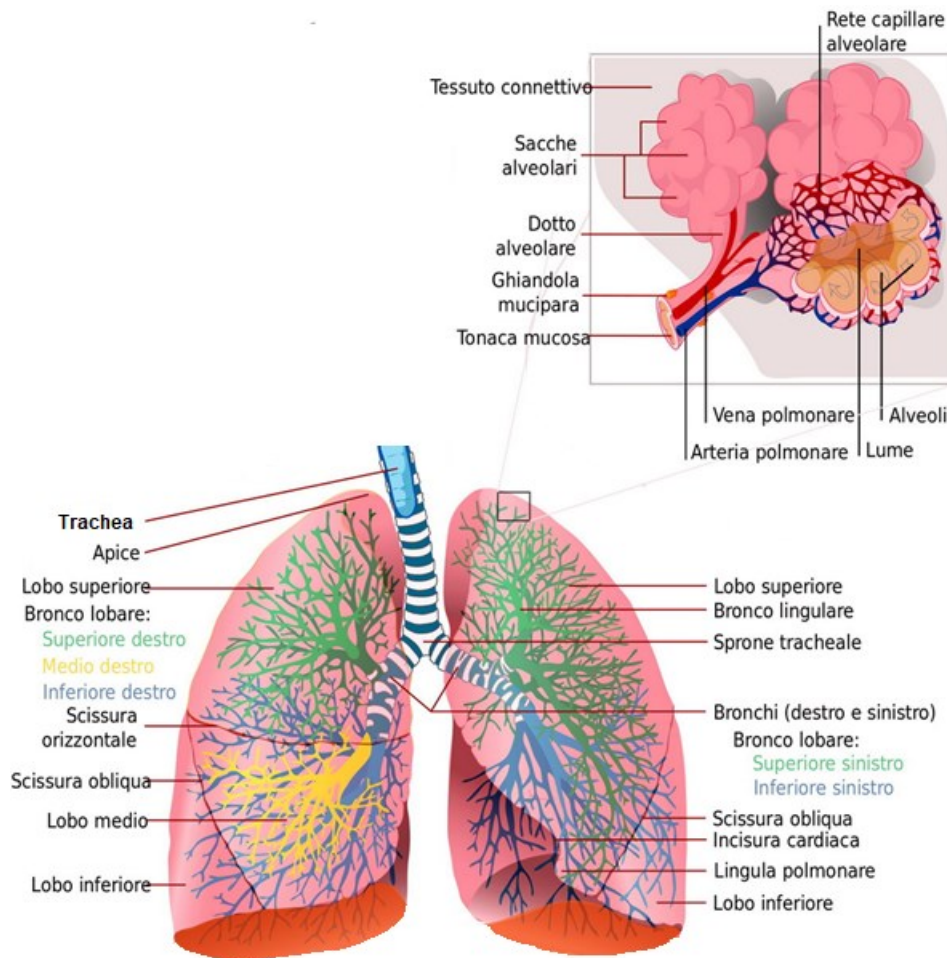


Figura 5 Struttura dell'albero respiratorio. Tratta da [61] ed opportunamente modificata.

L'intero tratto respiratorio è ricoperto da un epitelio, con composizione e struttura variabile tra le varie zone, la cui funzione principale è sia riscaldare ed umidificare l'aria inspirata, sia proteggere le vie aeree, agendo come una barriera contro potenziali patogeni e particelle estranee, prevenendo così infezioni e lesioni ai tessuti, grazie all'azione della clearance mucociliare[60].

Le regioni conduttive del sistema respiratorio sono rivestite da un epitelio colonnare pseudostratificato ciliato, composto da cellule ciliate, cellule caliciformi ed una membrana basale, la cui composizione e spessore varia lungo il tratto respiratorio.

Le cellule ciliate sono cellule epiteliali colonnari con modificazioni ciliari specializzate, mentre le cellule caliciformi sono cellule epiteliali colonnari che contengono granuli mucosi legati alla membrana e secernono muco e liquido periciliare, che una volta secreti si stratificano senza miscelarsi[60].

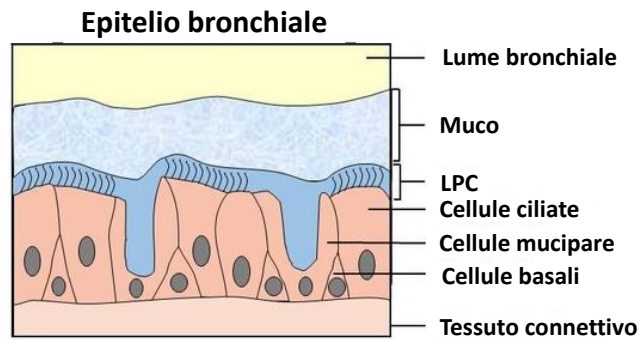


Figura 6 Rappresentazione della superficie delle vie respiratorie. Tratta da [62] ed opportunamente modificata

Negli individui sani, il muco contiene il 97% di acqua e solo il 3% di solidi; di questo 3%, solo un terzo è rappresentato da mucine, mentre la restante parte comprende proteine non muciniche, lipidi, sali e detriti cellulari. Di conseguenza il muco presenta una consistenza di gel fluido e potrà essere facilmente eliminato dalle vie aeree tramite il battito ciliare. Diversamente lo strato di liquido periciliare (LPC) si compone da grandi quantità di mucine e grandi glicoproteine, entrambe legate alle ciglia. Questa composizione rende difficile il passaggio attraverso l'LPC di macromolecole, incluse le mucine dello strato di muco, e delle particelle inalate. Questo strato bifasico muco-LPC protegge l'epitelio dalla disidratazione, aiutando a umidificare l'aria, e fornisce una barriera protettiva in grado di intrappolare le particelle inalate[63].

Eventuali lesioni dovute alla mancanza di questo effetto barriera spesso non destano preoccupazioni, poiché la presenza di cellule con alta capacità di differenziamento presenti nella membrana basale permette di rispondere alle eventuali lesioni che possono verificarsi nell'epitelio delle vie aeree[60].

Nei tratti più distali del tratto respiratorio, a livello dei bronchioli, l'epitelio diventa cuboidale, mentre a livello alveolare l'epitelio diventa squamoso e contiene cellule chiamate pneumociti di tipo I che facilitano lo scambio di gas. Sparse tra queste cellule squamose è presente una piccola percentuale di cellule cuboidali più grandi, chiamate cellule alveolari maggiori o pneumociti di tipo II. Queste cellule secernono tensioattivo, che svolge la funzione importantissima di ridurre la tensione superficiale e prevenire il collasso degli alveoli, e contiene il 90% di lipidi e il 10% di proteine.

A livello alveolare lo spessore dello strato cellulare della barriera aria-sangue diminuisce fino ad un monostrato cellulare di 0.3-1 μm , permettendo lo scambio gassoso[59].

Essendo gli spazi alveolari in comunicazione con l'esterno tramite le vie aeree, questi sarebbero facilmente accessibili ad agenti patogeni; fortunatamente il corpo umano è protetto da questo

evento grazie alla presenza di altri tipi cellulari presenti lungo le vie aeree e nel tessuto perialveolare, come linfociti e soprattutto i macrofagi.

1.2.2 Deposizione degli aerosol nelle vie aeree

Affinché un farmaco possa giungere alle vie aeree per inalazione, è necessario che questo si presenti in forma di aerosol, vale a dire un sistema bifasico in cui particelle solide o liquide sono disperse in una fase gassosa (generalmente aria).

La quantità e il sito di deposizione nei polmoni dipendono dalle proprietà chimico-fisiche delle particelle, dalla formulazione, dal dispositivo utilizzato per la somministrazione e dalle caratteristiche del paziente (geometria dei polmoni, sesso, età, integrità del sistema respiratorio, presenza di stati patologici)[57].

La proprietà fisica più fondamentale importante di un aerosol per inalazione è la dimensione. La dimensione delle particelle di un aerosol è normalmente standardizzata dal calcolo del diametro aerodinamico (d_a) che corrisponde al diametro di una sfera di densità unitaria che si deposita nell'aria con una velocità uguale a quella della particella in questione[57].

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

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

Essendo gli aerosol farmaceutici polidispersi, la dimensione delle particelle inalate è generalmente definita con il diametro aerodinamico mediano di massa (MMAD) che corrisponde al valore di diametro delle particelle considerando la massa totale dell'aerosol divisa in due parti uguali (il 50% della massa dell'aerosol ha diametro maggiore, l'altro 50% ha diametro minore)[64]; in questo caso, il diametro da usare per l'equazione è il diametro mediano di massa.

Un'altra proprietà correlata alla dimensione delle particelle è l'igroscopicità; quando le particelle entrano nel tratto respiratorio, trovano un'umidità relativa elevata ($\sim 99\%$) che potrebbe provocare la condensazione dell'acqua sulla superficie delle particelle. L'eventuale crescita dimensionale dovuta ad igroscopicità e conseguente aggregazione delle particelle può influenzare la deposizione di particelle, determinando una deposizione più alta nel tratto respiratorio rispetto a quanto sarebbe stato previsto dalle valutazioni della loro dimensione iniziale[57]. In generale, si ritiene che la crescita dimensionale dovuta ad igroscopicità non

abbia molto effetto nelle particelle con MMAD inferiore a $0.1\mu\text{m}$, mentre tale effetto è molto intenso in particelle con MMAD maggiore di $0.5\mu\text{m}$ [64]. D'altro canto, l'igroscopicità delle particelle può essere utilizzata in modo strategico per cercare di favorire la deposizione delle particelle inalate.

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

Diversamente, le particelle porose, con diametro fisico dell'ordine di $20\mu\text{m}$, vengono efficacemente trasportate e depositate nei polmoni, poiché avendo bassa densità per via della presenza di porosità elevata nella loro struttura, presentano basso diametro aerodinamico e vengono quindi trasportate nei tratti più profondi dell'albero respiratorio[57].

I meccanismi di deposizione delle particelle nel polmone comprendono l'impatto, la sedimentazione, l'intercettazione, la diffusione e la deposizione elettrostatica[64].

L'impatto è il fenomeno fisico per il quale la particella tende a proseguire su una traiettoria attraverso le vie aeree, indipendentemente dalla conformazione e dal percorso delle vie respiratorie. Se le particelle possiedono una quantità di moto sufficiente, non seguiranno il flusso d'aria, ma nei punti in cui il flusso d'aria cambia improvvisamente direzione, entrano in collisione con la parete delle vie aeree. Questo meccanismo di deposizione è particolarmente importante per particelle di grandi dimensioni aventi un diametro maggiore di $5\mu\text{m}$, (ancor più se maggiore di $10\mu\text{m}$) ed è comune nelle vie aeree superiori; rappresenta il principale meccanismo di deposizione nel naso, nella bocca, nella faringe e nella laringe.

Con il proseguire della ramificazione delle vie aeree conduttrici, la velocità del flusso d'aria diminuisce e l'impatto diventa un meccanismo meno importante per la deposizione.

La sedimentazione gravitazionale di una particella inalata dipende dalla sua dimensione e densità, oltre che dal suo tempo di permanenza nelle vie aeree. La sedimentazione è un importante meccanismo di deposizione per particelle di dimensioni comprese tra $0.5\mu\text{m}$ e $3\mu\text{m}$ (sfuggite alla deposizione per impatto), nelle piccole vie aeree e negli alveoli, dove la velocità dell'aria è bassa ed il tempo di permanenza è quindi più lungo.

La diffusione è il fenomeno predominante per le particelle con MMAD inferiore a $0.5\mu\text{m}$, poiché soggette a collisione da parte delle molecole di gas delle vie aeree, causando un moto browniano. Le particelle così si muovono dalle regioni ad alta concentrazione verso quelle a

bassa concentrazione, soprattutto a livello degli spazi alveolari, dove la velocità dell'aria è praticamente nulla. Queste particelle generalmente non si depositano e vengono nuovamente espulse durante l'espirazione.

Sebbene l'impatto, la sedimentazione e la diffusione siano i meccanismi più importanti per la deposizione delle particelle di farmaco nel tratto respiratorio, possono verificarsi altri meccanismi. Questi includono l'intercettazione, per cui particelle con forme allungate, come le fibre, sono intercettate dalle pareti delle vie aeree mentre passano attraverso il tratto respiratorio, e l'attrazione elettrostatica, per cui la presenza di una carica elettrostatica su una particella induce la localizzazione di una carica opposta sulla superficie del tratto respiratorio, con conseguente attrazione tra la particella e le pareti.

Riassumendo, la deposizione delle particelle dipende dunque prevalentemente dalle dimensioni; quelle più grandi di 5 μm si depositeranno prevalentemente per impatto inerziale nelle vie aeree superiori, mentre quelle di dimensioni comprese tra 1 μm e 5 μm si depositano principalmente per sedimentazione gravitazionale nelle vie aeree inferiori, specialmente durante la respirazione lenta e profonda. Le particelle più piccole di 1 μm si depositano per diffusione browniana a livello delle vie aeree inferiori e spesso vengono espirate rapidamente. Anche i fattori dipendenti dal paziente, come la fisiologia polmonare e la presenza di malattie polmonari, influenzano la deposizione delle particelle. Maggiore è il volume di aria inalato, maggiore sarà la distribuzione periferica delle particelle nel polmone, mentre un'inalazione lenta è generalmente preferita per ridurre al minimo l'impatto inerziale nelle vie aeree superiori e per aumentare la penetrazione nei polmoni di particelle grandi; diversamente le particelle piccole sono molto meno sensibili alle variazioni della velocità di inspirazione [65].

La deposizione ottimale di aerosol si ottiene generalmente con inalazioni lente e profonde fino alla capacità polmonare totale, seguite dall'arresto del respiro prima dell'espirazione.

Purtroppo, cambiamenti nelle vie aeree derivanti da stati patologici possono influenzare il profilo di deposizione di un aerosol inalato.

1.2.3 Meccanismi fisiologici in risposta agli aerosol

Una volta depositate nelle vie aeree, le particelle possono essere eliminate attraverso il verificarsi di diversi fenomeni, tra cui tosse, dissoluzione nei fluidi polmonari, clearance mucociliare, traslocazione ad altri siti e fagocitosi da parte dei macrofagi.

Quando le particelle giungono alle vie aeree, vengono a contatto con il tensioattivo presente nel fluido di rivestimento delle vie aeree; quest'ultimo migliorerà la capacità delle stesse di essere bagnate nel fluido presente, penetrando nello stesso [66].

La dissoluzione delle particelle dipende dal volume dei fluidi presenti nel sito di deposizione, dalla solubilità e dalla quantità delle particelle[66]. I composti liberamente solubili in acqua (sali organici e composti polari) si dissolveranno prontamente nel fluido delle vie aeree; le molecole solubilizzate vengono così diluite nel fluido delle vie aeree, dove potranno legarsi a proteine oppure ad altri costituenti ed essere successivamente metabolizzate o assorbite, oppure eliminati dalla clearance mucociliare.

La clearance mucociliare interessa le vie aeree ciliate, dove il movimento delle ciglia trasporta il muco, su cui si depositano le particelle, verso la faringe-laringe e quindi verso il tratto gastrointestinale[66].

La velocità della clearance mucociliare nelle vie aeree respiratorie diminuisce con il diametro delle vie aeree. La velocità del muco misurata nella trachea umana è di 5.5 mm min^{-1} , diminuendo a 2.4 mm min^{-1} nei bronchi principali[65].

La composizione del muco e la velocità della clearance del muco respiratorio sono spesso alterate nei pazienti affetti da malattie respiratorie e questo può influenzare il destino delle particelle inalate.

Le particelle scarsamente solubili richiedono più tempo per dissolversi e riescono a penetrare nelle regioni alveolari, dove vengono rimosse più lentamente. Generalmente i macrofagi alveolari fagocitano tali particelle tramite la chemiotassi che coinvolge l'opsonizzazione. Si ritiene che la fagocitosi dei macrofagi si completi entro 12 ore dopo la deposizione delle particelle negli alveoli[66].

Una volta interiorizzate nei macrofagi, le particelle potranno essere disintegrate dagli enzimi lisosomiali oppure accumularsi nel sistema linfatico. Una frazione minore dei macrofagi trasportatori di particelle migrerà verso le vie aeree ciliate dove verrà rimossa ad opera della clearance mucociliare[66].

Quando le particelle inalate riescono ad eludere i meccanismi di difesa descritti in precedenza, possono essere endocitate dalle cellule epiteliali oppure essere trasportate al sistema linfatico oppure a quello circolatorio tramite fenomeni di transitosi; quando vengono traslocati e arrivano nella circolazione sistemica, il farmaco o le particelle possono causare effetti indesiderati a livello ematico o anche sistemico[66].

Questo meccanismo può però essere sfruttato qualora lo scopo sia una somministrazione sistemica.

Generalmente può essere ottenuta un'azione rapida del farmaco utilizzando soluzioni o polveri di sali solubili in acqua, mentre un assorbimento più lento o prolungato può essere ottenuto con formulazioni in sospensione, polveri di sali meno solubili o innovativi sistemi di veicolazione micro e nano strutturati innovativi[57].

1.2.4 Dispositivi di inalazione

I dispositivi utilizzati per la somministrazione di farmaci ai polmoni sono di tre tipologie: nebulizzatori, inalatori di aerosol dosato (Pressurized Metered Dose Inhaler, pMDI) ed inalatori di polvere secca (Dry Powder Inhaler, DPI).

I principali problemi correlati all'utilizzo di questi inalatori riguardano sia la deposizione di particelle aerosolizzate nella regione orofaringea e nelle vie aeree superiori, sia la mancanza di coordinamento tra l'azionamento del dispositivo e l'inalazione del paziente.

I nebulizzatori sono dispositivi che convertono i liquidi in aerosol; forniscono volumi relativamente grandi di soluzioni o sospensioni per un periodo prolungato e sono spesso utilizzati per farmaci che non possono essere opportunamente formulati in pMDI o DPI, o dove la dose terapeutica è troppo elevata per essere somministrata con questi sistemi [57], [67].

I nebulizzatori hanno anche il vantaggio, rispetto ai sistemi pMDI e DPI, di non richiedere sforzi particolari dell'utilizzatore in quanto il farmaco può essere inalato durante la normale respirazione, attraverso un boccaglio o una maschera facciale, e quindi sono utili per pazienti come bambini piccoli, anziani e pazienti con patologie tali da avere difficoltà con i pMDI[57].

In commercio sono disponibili tre tipi di nebulizzatori: *jet*, *ultrasuoni* e *a maglia*; questi differiscono per la forza utilizzata per generare l'aerosol dal rispettivo liquido. A seconda del modello e del produttore, i nebulizzatori generano goccioline da 1–5 μm .

I nebulizzatori *jet* utilizzano aria compressa (che può essere fornita da una bombola di gas compresso, una linea d'aria compressa o un compressore elettrico) per convertire un liquido in uno spray.

Il getto di gas ad alta velocità viene fatto passare attraverso un ugello stretto (ugello Venturi), tipicamente da 0.3 mm a 0.7 mm di diametro; la pressione negativa in uscita, fa sì che il liquido venga aspirato tramite un tubo di alimentazione dal serbatoio per via dell'effetto Bernoulli. Il liquido emerge come filamenti sottili, che collassano in goccioline a causa della tensione superficiale. Una parte dell'aerosol risultante lascia direttamente il nebulizzatore; le rimanenti goccioline grandi e non respirabili impattano sui deflettori o sulle pareti della camera del nebulizzatore e vengono riciclate nel fluido del serbatoio[57].

La velocità del flusso di gas che determina l'atomizzazione è il principale determinante della dimensione delle goccioline di aerosol; ad esempio, quando la portata viene aumentata da 4 L min^{-1} a 8 L min^{-1} può esserci una riduzione fino al 50% del diametro aerodinamico medio di massa, con un aumento lineare della proporzione di goccioline inferiore a 5 μm [57].

I nebulizzatori funzionano in modo continuo e poiché la fase inspiratoria della respirazione

costituisce circa un terzo del ciclo respiratorio, una grande percentuale dell'aerosol emesso non viene inalata ma viene rilasciata nell'ambiente.

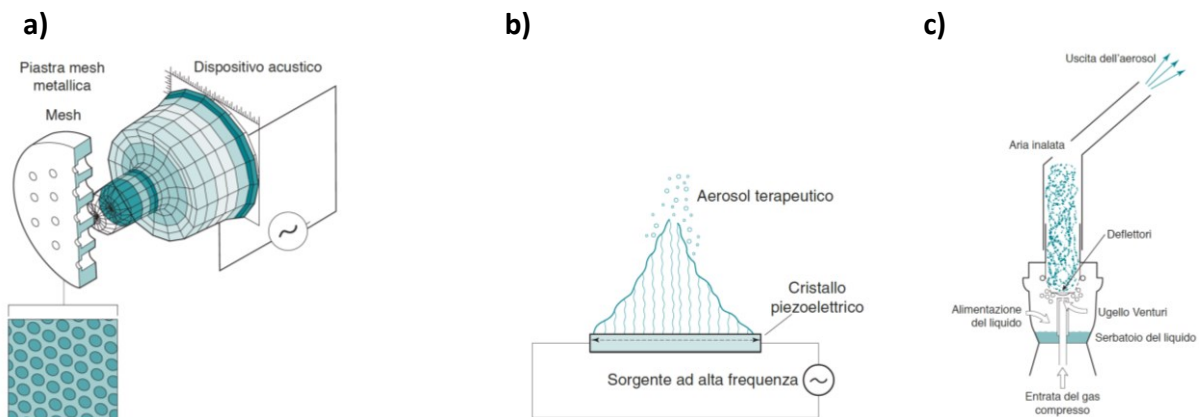


Figura 7 Schematizzazione grafica dei nebulizzatori a maglia vibrante (a), ad ultrasuoni (b) e jet (c). Tratta da [57].

Nei nebulizzatori *ad ultrasuoni*, l'energia necessaria per atomizzare i liquidi proviene da un cristallo piezoelettrico che vibra ad alta frequenza all'interno della camera di nebulizzazione, trasmettendo l'energia vibratoria al liquido che è a contatto con essa. Ad intensità ultrasoniche sufficientemente elevate, si forma una fontana di liquido nella camera del nebulizzatore. Grandi goccioline vengono emesse dall'apice e una "nebbia" di piccole goccioline viene emessa dalla parte inferiore. Alcuni modelli hanno anche una ventola per far espellere le goccioline inalabili dal dispositivo, mentre in altri l'aerosol diventa disponibile al paziente solo durante l'inalazione[57]. I nebulizzatori ad ultrasuoni potrebbero non essere efficaci per sospensioni o soluzioni viscosi[64].

Le variabili che possono inficiare la somministrazione corretta sono il volume della soluzione inalabile, la viscosità della soluzione, il flusso d'aria e la pressione in caso di nebulizzatori jet, ma anche il tubo che collega la camera di nebulizzazione con l'utilizzatore, poiché una grande parte della dose emessa dai nebulizzatori può essere persa nel tubo, rimanendo come "volume morto"[67].

Uno svantaggio dei nebulizzatori è che devono essere assemblati e caricati con il farmaco prima di ogni utilizzo e quindi devono essere smontati e puliti.

I modelli più recenti di nebulizzatori sono stati immessi sul mercato utilizzando una nuova tecnologia in grado di aggirare gli svantaggi dei nebulizzatori classici. Questi includono nebulizzatori potenziati dal respiro, nebulizzatori attivati dal respiro e nebulizzatori a maglia vibranti[67].

I nebulizzatori a getto potenziato dal respiro sono progettati affinché il processo di inspirazione possa fungere da traino per l'aerosol e per far fuoriuscire l'aria espirata all'esterno del

dispositivo; il vantaggio principale di questo approccio è aumentare il tasso di produzione, che a sua volta ridurrà il tempo di somministrazione[68].

I nebulizzatori attivati dal respiro emettono aerosol solo durante l'inspirazione dell'utilizzatore; di conseguenza nessun farmaco viene sprecato durante l'espirazione poiché si evita la diffusione di farmaci costosi o tossici nell'ambiente circostante[67].

I nebulizzatori *a maglia vibrante* hanno una piastra a rete che, quando vibra per l'azione dell'elemento piezoelettrico, rompe il liquido generando aerosol con un'elevata frazione di particelle, aumentando il volume di aerosol depositato negli alveoli. Questi dispositivi, erogano fluidi molto rapidamente ed hanno volumi residui molto piccoli rispetto ai nebulizzatori a getto e ad ultrasuoni[69].

Gli inalatori dosati pressurizzati (pressurized Metered-Dose Inhalers, pMDI), sono stati introdotti a metà degli anni '50 e sono i dispositivi di somministrazione di farmaci per inalazione più comunemente usati per il trattamento di malattie respiratorie locali come l'asma e la BPCO. Nei pMDI, il farmaco viene solubilizzato o sospeso in propellenti liquidi insieme ad altri eccipienti, inclusi i tensioattivi; il dispositivo è composto da un contenitore pressurizzato dotato di una valvola di dosaggio progettata per erogare una quantità di aerosol precisa (20–100 μ L) ogni volta che il dispositivo viene attivato[64].

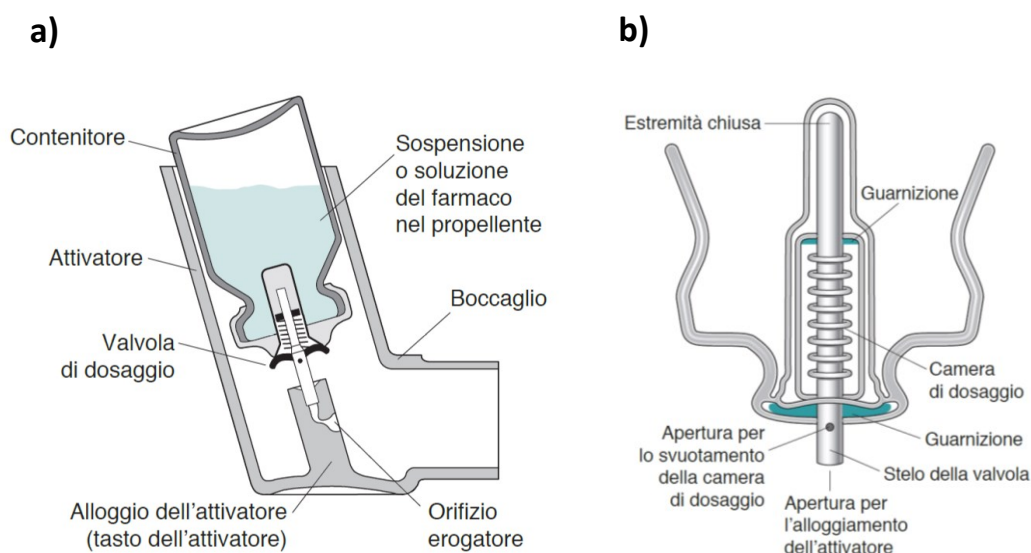


Figura 8 Rappresentazione schematica di un pMDI (a) e della valvola dosatrice (b). Tratta da [57].

Una dose predeterminata viene rilasciata sotto forma di spray all'azionamento della valvola di dosaggio. Quando viene rilasciata dal reservoir, la formulazione subisce espansione di volume passando all'interno della valvola e forma una miscela di gas e liquido. Il flusso di gas ad alta velocità aiuta a rompere il liquido in un sottile getto di goccioline[57].

Quando l'inalatore non è in funzione, la valvola interna tra il reservoir e la camera di dosaggio è aperta consentendo di riempire la camera con la miscela propellente-farmaco in forma liquida. Allo stesso tempo, un'altra valvola esterna tra la camera del contatore e l'aria esterna viene chiusa. Quando il paziente preme la valvola per l'erogazione della dose, la valvola interna si chiude mentre la valvola esterna si apre rilasciando la miscela dosata farmaco-propellente trattenuta nella camera attraverso l'orifizio di azionamento sotto forma di aerosol[70].

Internamente, l'attuatore comprende l'ugello e la camera di espansione in cui il propellente rilasciato dalla camera di dosaggio si espande e si volatilizza parzialmente a causa della diminuzione della pressione[57]. Il design dell'attuatore influenza in modo significativo le prestazioni dei pMDI.

Le formulazioni di farmaci di pMDI possono essere soluzioni o sospensioni in un singolo propellente o in una miscela di propellenti e possono includere eccipienti come etanolo o tensioattivi per solubilizzare il farmaco o stabilizzare una sospensione di farmaco[71]. Idealmente, i propellenti dovrebbero essere non tossici, non infiammabili, compatibili con la formulazione e fornire una pressione di vapore costante durante l'intera vita del prodotto. In passato, i propellenti utilizzati erano i clorofluorocarburi (CFC), ma a causa dei loro effetti nocivi sullo strato di ozono, sono stati sostituiti dagli idrofluoroalcani (HFA)[72].

La grande maggioranza delle formulazioni di inalatori pressurizzati sono sospensioni; questi sistemi sono più difficili da formulare poichè devono essere considerati tutti i problemi della formulazione in sospensione convenzionale, come l'aggregazione e la crescita delle particelle, che possono indurre l'ostruzione della valvola[57].

Negli ultimi anni, alcune formulazioni in sospensione sono state riformulate in modo da ottenere delle soluzioni, come per il caso del beclometasone dipropionato; l'evaporazione del propellente (HFA) a seguito dell'attivazione di queste formulazioni produce particelle di dimensioni inferiori rispetto alle formulazioni in sospensione convenzionali dello stesso farmaco, con conseguenti cambiamenti nella sua biodisponibilità[64].

I principali vantaggi dei pMDI sono molteplici tra cui la loro portabilità, il basso costo, l'elevato numero di dose per ogni contenitore, l'erogazione riproducibile e la possibilità di avere anche un contatore delle dosi residue. Inoltre le condizioni inerti create dal propellente, insieme al contenitore ermeticamente sigillato, proteggono i farmaci dalla degradazione ossidativa e dalla contaminazione microbiologica. Tuttavia, i pMDI non sono molto efficienti; all'attivazione, le prime goccioline di propellente escono ad alta velocità e di conseguenza, gran parte del farmaco viene perso a causa dell'impatto di queste goccioline nelle aree orofaringee. La dimensione media delle goccioline emesse supera tipicamente i 40 µm ed i propellenti potrebbero non evaporare rapidamente in modo che la loro dimensione diminuisca fino a raggiungere quella

adatta per la deposizione polmonare profonda[57].

Un ulteriore problema con i pMDI, è il loro uso scorretto da parte dei pazienti, a causa della scarsa sincronizzazione inspirazione-attivazione; il corretto utilizzo da parte dei pazienti è vitale per un'efficace deposizione del farmaco e quindi per un'azione terapeutica adeguata. Idealmente, il pMDI dovrebbe essere attivato durante il corso di un'inalazione lenta e profonda, seguita da un periodo di trattenimento del respiro. Molti pazienti lo trovano difficile, soprattutto bambini ed anziani.

Alcuni degli svantaggi dei pMDI, vale a dire la coordinazione inspirazione-attivazione e la deposizione prematura di goccioline ad alta velocità e grandi nelle vie aeree, possono essere superati utilizzando dispositivi di estensione, chiamati "distanziatori" o camere di tenuta con valvola (Valved Holding Chamber, VHC), posizionate tra il pMDI e il paziente[67]. La dose da un pMDI viene scaricata direttamente nel serbatoio prima dell'inalazione, da cui il paziente inala tramite una valvola unidirezionale. Questi ausili per inalazione riducono la velocità dell'aerosol emesso e consentono l'evaporazione del propellente da goccioline più grandi riducendo la deposizione orofaringea e aumentando la deposizione polmonare profonda; viene meno anche la necessità di coordinazione tra attivazione e inspirazione. Lo svantaggio dei distanziatori tradizionali, sebbene altamente efficaci, è che possono essere ingombranti a causa del loro grande volume; in alternativa, i tubi di prolunga possono essere integrati nel design del pMDI stesso come boccaglio esteso[57].

Tuttavia, questi ausili possono ridurre la quantità effettiva erogata dal pMDI a causa della precipitazione elettrostatica; i distanziatori e i VHC più recenti sono realizzati con polimeri antistatici che riducono al minimo l'aderenza delle particelle emesse alle pareti interne del distanziatore[70].

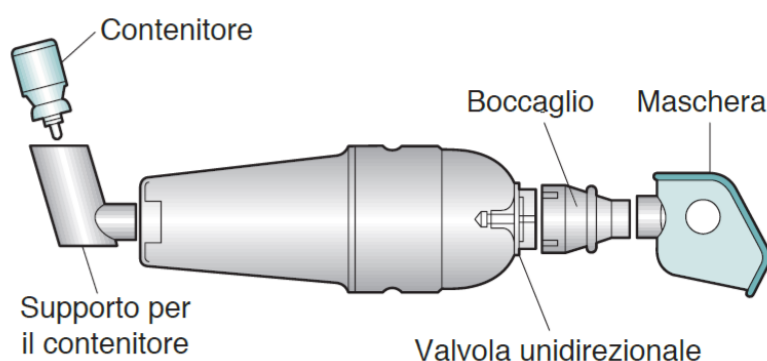


Figura 9 Dispositivo distanziatore per pMDI, dotato di maschera facciale per l'utilizzo da parte di un bambino. Tratta da [57].

Altri dispositivi per eliminare il problema della coordinazione inspirazione-attivazione sono i dispositivi attivati dal respiro; i pMDI attivati dal respiro si attivano quando il dispositivo rileva la respirazione del paziente ed emette la dose in risposta, risolvendo il problema della scarsa coordinazione tra l'azionamento dell'inalatore e il respiro del paziente, senza aggiungere ingombro al dispositivo[70].

Differentemente i DPI sono dispositivi attraverso i quali viene erogata una formulazione in polvere secca ai polmoni utilizzando la respirazione del paziente e risultano più vantaggiosi dei pMDI, poiché non richiedono coordinazione tra inspirazione e attivazione ed hanno un ridotto impatto ambientale, dato che le formulazioni DPI sono prive di propellenti[64].

I DPI possono anche erogare dosi di farmaco maggiori rispetto ai pMDI, che invece sono limitati dal volume della valvola di dosaggio e dalla concentrazione massima di sospensione che può essere impiegata senza causare l'ostruzione della valvola.

Le formulazioni DPI hanno una maggiore stabilità chimica rispetto alle formulazioni liquide, ma la produzione di polveri con le caratteristiche appropriate per una facile aerosolizzazione e rilascio alveolare è più complessa[67]. Le prestazioni dei DPI dipendono dalla formulazione della polvere e dal dispositivo inalatore [73].

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

Le polveri prodotte dalla micronizzazione hanno scarse proprietà di scorrimento a causa della loro natura statica, coesiva e adesiva. La scorrevolezza di una polvere è influenzata dalle sue proprietà fisiche, tra cui dimensione e forma delle particelle, densità, rugosità superficiale, contenuto di umidità e densità apparente. Per migliorare le loro proprietà di flusso, le particelle vengono generalmente mescolate con particelle "trasportatrici" più grandi (40 μm) di un eccipiente inerte, solitamente lattosio (α -lattosio monoidrato)[57].

Gli eccipienti aggiunti in modo appropriato possono ridurre le forze coesive interparticellari (forze di van der Waals, principalmente) che altrimenti causerebbero aggregazione particellare, che rende molto difficile la dispersione della polvere; si ottiene così un flusso migliore e dosi più uniformi.

Il farmaco e le particelle di veicolo vengono miscelati per produrre una miscela ordinata in cui le piccole particelle di farmaco aderiscono alla superficie delle particelle di veicolo più grandi. Ciò non solo aumenta il rilascio del farmaco dal dispositivo di inalazione migliorando il flusso della polvere, ma aumenta anche l'uniformità del riempimento della capsula o del dispositivo. Una volta liberato dal dispositivo, il flusso d'aria turbolento generato all'interno del dispositivo di inalazione dovrebbe essere sufficiente per la disaggregazione degli aggregati farmaco-

trasportatore. Le particelle trasportatrici più grandi hanno un impattano nelle vie aeree superiori, faringe e laringe, mentre le particelle più piccole del farmaco vengono trasportate dall'aria inalata più in profondità nel tratto respiratorio[57].

Il successo delle formulazioni DPI dipende dunque dall'adesione tra farmaco e veicolo durante la miscelazione, seguita dalla capacità delle particelle di farmaco di staccarsi dal veicolo durante l'inalazione, in modo tale che il farmaco libero sia disponibile per arrivare alle vie aeree inferiori. L'adesione e il distacco dipenderanno dalla morfologia delle superfici delle particelle e dalle energie superficiali, che possono essere influenzate dalla natura chimica dei materiali coinvolti e dalla natura della lavorazione della polvere[57].

La valutazione dell'equilibrio tra forze adesive e coesive tra le particelle, utilizzando tecniche come la microscopia a forza atomica, è stata impiegata per caratterizzare le miscele di polveri utilizzate nella formulazione DPI.

Per modulare il bilancio tra forze adesive e coesive interparticellari, la formulazione del DPI può essere modificata, impiegando una miscela ternaria; per esempio, il lattosio a granulometria fine può essere aggiunto al lattosio a granulometria maggiore convenzionalmente utilizzato come veicolo, in modo da occupare i siti ad alta energia sulle particelle veicolo più grandi. In tal modo, le particelle di farmaco occuperanno solo i siti a bassa energia, con conseguente miglioramento del rilascio del farmaco dalle particelle veicolo durante l'inalazione della formulazione. Allo stesso modo, materiali come leucina e magnesio stearato possono essere inclusi nelle formulazioni per modificare le proprietà di adesione del farmaco e delle particelle di veicolo.

Altri fattori che influenzano l'erogazione e la deposizione di aerosol includono il design del dispositivo di erogazione e la tecnica di inalazione del paziente.

In base al numero di dosi, i DPI possono essere classificati come per dose singola, dose multipla e multidose.

Il primo dispositivo DPI sviluppato è stato lo Spinhaler® per la somministrazione del sodio cromoglicato. Ciascuna dose, contenuta in una capsula di gelatina dura, viene collocata individualmente nel dispositivo in un rotore mobile.

La capsula viene perforata da due aghi metallici su entrambi i lati della capsula e il flusso d'aria inalato genera un flusso d'aria turbo-vibatorio che innesca una rapida rotazione del rotore; la polvere viene così dispersa nell'inspirato dell'utilizzatore. Sebbene oggi la tendenza sia quella di sviluppare dispositivi a dose multipla, altri dispositivi basati su capsule rigide, che funzionano con principi simili sono ancora disponibili, come l'HandiHaler® (Boehringer Ingelheim / Pfizer) e l'Aerolizer® / Cyclohaler® (Novartis / Teva)[57].

I DPI a dose multipla utilizzano dosi confezionate in fabbrica e sigillate in modo che il

dispositivo possa contenere più dosi contemporaneamente senza dover essere ricaricato. Un dispositivo molto comune di questo tipo è l'Accuhaler®, noto anche come inalatore Diskus® (Glaxo-SmithKline), che contiene fino a 60 dosi.

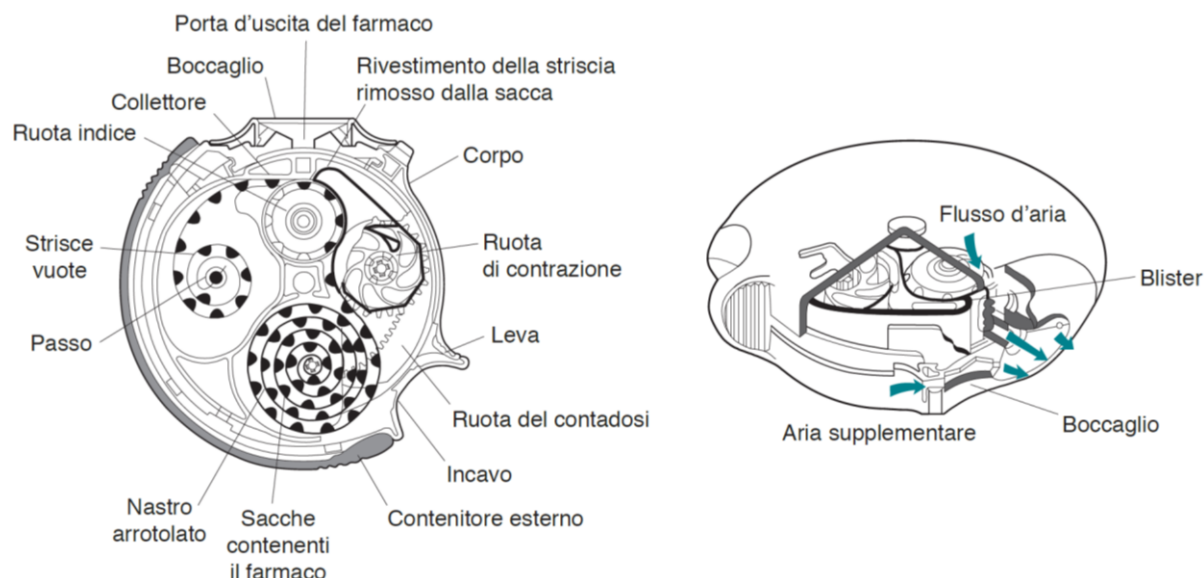


Figura 10 L'inalatore di polvere secca Accuhaler® / Diskus®: un diagramma schematico (a sinistra) ed una rappresentazione in sezione trasversale del dispositivo (a destra). Tratta da [57].

Poiché ogni dose è confezionata separatamente ed esposta alle condizioni ambientali solo immediatamente prima dell'inalazione, l'Accuhaler è relativamente insensibile all'umidità rispetto ai sistemi basati su capsule rigide[57].

L'inalatore Ellipta® (Glaxo SmithKline) è un dispositivo che può contenere una quantità sufficiente di farmaci per un mese (30 dosi) senza dover sostituire cartucce o capsule. Questo DPI è stato progettato per essere facilmente azionato da pazienti di tutte le età, compresi gli anziani[74].

I dispositivi multidose invece presentano un reservoir, in cui una dose viene misurata con precisione e erogata dal dispositivo stesso[75]. Nel Clickhaler® DPI (Innovata Biomed), una miscela farmaco-lattosio viene dosata da degli incavi dosatori che vengono riempiti per gravità dal reservoir e trasferiscono la polvere nella camera di inalazione, dalla quale verrà inalata la dose. Il dispositivo è in grado di contenere fino a 200 dosi e incorpora un contatore della dose che indica il numero di dosi dosate e informa i pazienti quando il dispositivo è quasi vuoto[57]. Il Turbohaler® (AstraZeneca) ha superato la necessità sia di un carrier (in alcune formulazioni) che del caricamento di singole dosi. Il dispositivo contiene un gran numero di dosi (fino a 200) di farmaco micronizzato debolmente aggregato, che viene immagazzinato in un reservoir, che scorre su un disco rotante nell'unità di dosaggio. Quando il disco viene ruotato, spostando avanti

e indietro una manopola girevole, una dose dosata viene presentata al canale di inalazione, e questa viene inalata dal paziente, con il flusso d'aria turbolento creato all'interno del dispositivo che rompe gli aggregati di farmaco[57].

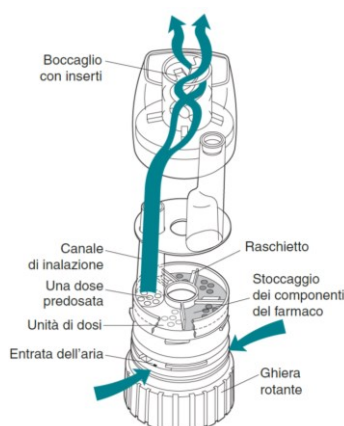


Figura 11 Rappresentazione schematica del Turbohaler® (AstraZeneca). Tratta da [57].

Tuttavia, i DPI presentano alcuni svantaggi; la liberazione delle polveri dal dispositivo e la disaggregazione delle particelle sono limitate dalla capacità di inalazione del paziente, che in caso di pazienti pediatrici, di pazienti anziani e di quelli con malattie respiratorie avanzate, può essere compromessa.

Sono stati sviluppati diversi dispositivi che riducono o eliminano la dipendenza dallo sforzo inspiratorio del paziente per disperdere il farmaco; questi sono progettati con una fonte di energia interna per aerosolizzare il letto di polvere nel DPI, in modo che la somministrazione della dose non dipenda più dalla velocità del flusso inspiratorio del paziente. Questa fonte di energia può essere una batteria, un gas compresso o un meccanismo a molla.

Questi nuovi dispositivi di inalazione che non si classificano perfettamente nelle categorie tradizionali di pMDI, DPI e nebulizzatori, perché operano su principi alternativi. Tra questi troviamo il Respimat® (Boehringer Ingelheim) e il sistema di rilascio polmonare AERx® (Aradigm).

L'inalatore Respimat Soft Mist™ è un sistema non pressurizzato, portatile, contenente un reservoir multidose che rilascia una nuvola della durata di 1.5 secondi; essendo molto più lento rispetto ai pMDI convenzionali, consente più tempo per il coordinamento tra attivazione e inalazione. Il dispositivo è azionato meccanicamente senza l'uso di un propellente.

L'aerosol generato dal dispositivo ha una velocità inferiore e una dimensione delle particelle inferiore a quella generata con un pMDI convenzionale, con conseguente deposizione nelle vie aeree inferiori.

Il sistema di rilascio polmonare AERx® contiene il farmaco contenuto in blister a dose unitaria. L'erogazione del farmaco è controllata elettronicamente e prevede l'estrusione di liquido

attraverso un ugello monouso contenente numerosi fori sferici, con uscite di circa $1\text{ }\mu\text{m}$ di diametro. Questo produce aerosol molto fini, adatti per la somministrazione di biofarmaci alle vie aeree periferiche. Il dispositivo monitora elettronicamente la velocità del flusso inspiratorio del paziente e rilascia il farmaco alla velocità del flusso inspiratorio ritenuta ottimale per l'erogazione del farmaco.

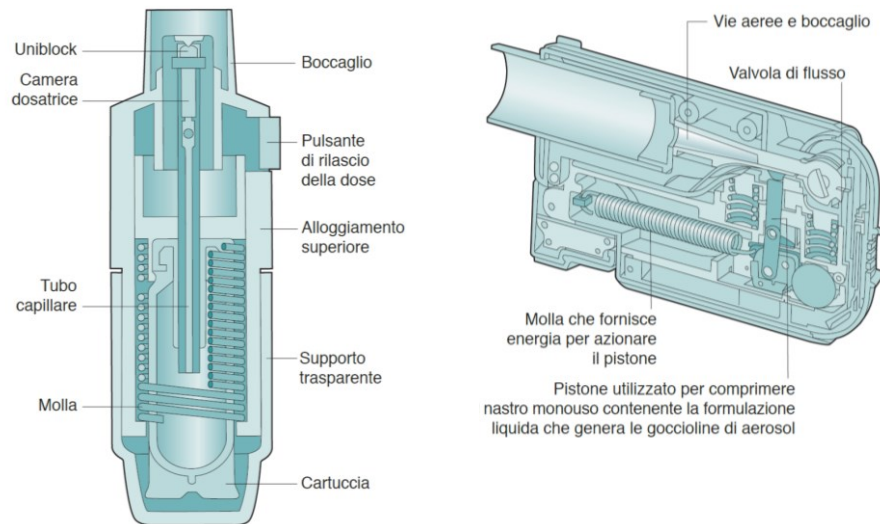


Figura 12 L'inalatore Respimat® Soft Mist™ (a sinistra) ed il sistema di rilascio polmonare AERx® (a destra). Tratta da [57].

1.3 Terapia inalatoria innovativa nell'asma

Come descritto in precedenza, la somministrazione di farmaci ai polmoni per inalazione offre una terapia farmacologica mirata per le malattie respiratorie, consentendo di somministrare dosi di farmaco inferiori di un ordine di grandezza, rispetto alla somministrazione sistemica per via orale o per iniezione.

Il basso dosaggio riduce l'esposizione sistemica al farmaco e quindi gli effetti collaterali sistemici, aumentando dunque l'indice terapeutico del farmaco. Inoltre, gli inalatori portatili rendono questa via di somministrazione conveniente per il paziente.

Tuttavia, l'efficacia terapeutica dei farmaci inalatori è limitata dalla loro rapida eliminazione nei polmoni[65].

A livello polmonare le molecole di piccole dimensioni diffondono rapidamente attraverso gli epitelii polmonari e penetrano nel flusso sanguigno in pochi minuti; anche i peptidi vengono trasportati rapidamente nella circolazione sistemica, ma vengono anche significativamente metabolizzati localmente[76], [77]. Anche le macromolecole, sebbene possano essere assorbite nella circolazione sistemica dopo diverse ore, possono comunque essere rapidamente endocitate dai macrofagi alveolari oppure rimosse tramite clearance mucociliare.

Il breve tempo di permanenza dei farmaci a livello locale può anche implicare un dosaggio frequente, come nel caso dei corticosteroidi inalatori, per cui sono previste due somministrazioni al giorno, e dei β_2 -agonisti a breve durata d'azione, per cui sono previste fino a 4 somministrazioni al giorno[65].

I sistemi a rilascio prolungato potrebbero migliorare i risultati terapeutici dei medicinali inalati, fungendo da reservoir di farmaco a livello polmonare per un periodo di tempo prolungato e rilasciando progressivamente il farmaco localmente a livelli terapeutici; in tal modo potrebbero essere ridotti ulteriormente gli effetti collaterali sistemici poiché la biodistribuzione attraverso la circolazione sistemica è ridotta al minimo.

Inoltre, una formulazione per inalazione a rilascio prolungato potrebbe evitare picchi nelle concentrazioni locali del farmaco che potrebbero essere tossici per il tessuto polmonare.

Sebbene il rilascio prolungato del farmaco nei polmoni presenti un alto potenziale per migliorare l'efficacia terapeutica e la sicurezza dei farmaci inalati, non esiste ancora alcuna formulazione a rilascio prolungato disponibile sul mercato.

Solo poche formulazioni a rilascio prolungato sono in fase di sviluppo clinico e tutte sono sotto forma di liposomi[65].

1.3.1 *Approccio della nanomedicina alle patologie polmonari*

La nanomedicina consiste nell'applicazione medica delle possibilità derivanti dalle nanotecnologie e comprende una vasta gamma di sistemi nanometrici che possono essere suddivisi in nanocarrier (che includono nanoparticelle polimeriche, micelle, liposomi e nanoparticelle lipidiche solide) e coniugati polimerici.

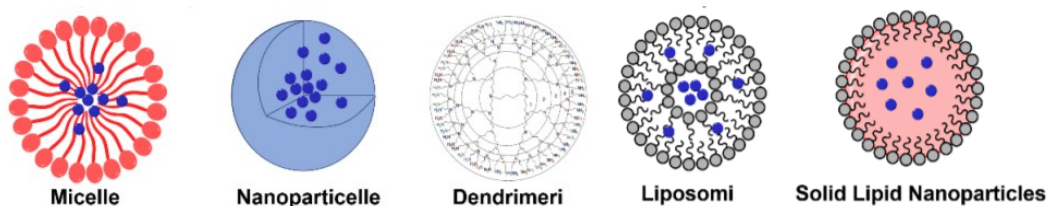


Figura 13 Rappresentazione schematica dei nanosistemi più utilizzati in ambito biomedico

Le dimensioni di questi sistemi vanno da pochi nanometri a 1 μm [78]; essendo sulla stessa scala dimensionale delle entità biologiche, possono interagire facilmente con le biomolecole sia sulla superficie cellulare che all'interno della cellula[77].

Nell'arco degli anni, la migliore comprensione degli eventi molecolari e cellulari alla base della risposta infiammatoria ha aperto nuove prospettive nel trattamento dell'infiammazione, in particolare attraverso lo sviluppo di nanosistemi opportunamente progettati, che hanno attirato una crescente attenzione per la possibilità sia di agire su un bersaglio specifico, sia di ottenere un rilascio controllato delle molecole bioattive[79]; infatti, è ampiamente dimostrato che l'incapsulamento di agenti terapeutici in nanosistemi modula il profilo farmacocinetico del farmaco a livello polmonare[80], [81].

Inoltre, la progettazione di nanosistemi con specifiche proprietà chimico-fisiche (ad es. dimensioni, forma, chimica di superficie e proprietà bioadesive) in grado di superare i meccanismi di clearance del polmone potrebbe fornire tempi di permanenza prolungati dell'agente terapeutico all'interno delle vie respiratorie[82].

Il meccanismo di rilascio del farmaco da qualsiasi tipo di nanosistema coinvolge principalmente la diffusione del farmaco attraverso il materiale che compone il nanosistema, ma possono essere coinvolti anche meccanismi aggiuntivi che dipendono dal tipo di nanosistema[83].

Per liposomi e nanoparticelle lipidiche solide, il meccanismo più importante di rilascio del farmaco è rappresentato dalla diffusione del farmaco attraverso i doppi strati lipidici o attraverso la matrice lipidica. Il rilascio del farmaco può essere modulato dalla composizione lipidica, dalla temperatura di transizione dei fosfolipidi e dalla multilamellarità dei

liposomi[83]. Ad esempio, la presenza di fosfolipidi rigidi o di colesterolo diminuisce la fluidità della membrana liposomiale, rendendola meno permeabile[84].

Per le micelle polimeriche, la velocità con cui il farmaco viene rilasciato dipende dalla velocità di diffusione del farmaco dall'interno del sistema di rilascio, dal coefficiente di ripartizione del farmaco, dalla stabilità delle micelle e dalla velocità di degradazione del copolimero che aggregandosi costituisce la micella stessa[83].

Per le nanoparticelle polimeriche, il rilascio di farmaci avviene sia per diffusione attraverso la matrice polimerica o attraverso i pori presenti nella stessa, sia attraverso i fenomeni di erosione superficiale o di massa del nanosistema [85], [86].

Tra le varie classi di nanosistemi esistenti, i nanosistemi a base polimerica con particolari proprietà chimico-fisiche sono stati identificati come candidati aventi un grande potenziale[78], [87], poiché in grado di soddisfare i requisiti rigorosi richiesti per la veicolazione polmonare, garantendo un sufficiente caricamento di farmaco ed un rilascio controllato del farmaco per un periodo di tempo prolungato[87], [88]; inoltre, le nanoparticelle polimeriche sfuggono in gran parte all'assorbimento da parte dei macrofagi della superficie polmonare e possono rimanere nel tessuto polmonare per settimane[77].

La scelta di un polimero appropriato per lo sviluppo del nanosistema si basa principalmente su criteri quali la sua biocompatibilità e degradabilità[89].

Dailey e colleghi hanno confrontato il potenziale tossicologico di nanoparticelle non biodegradabili e biodegradabili in vivo[90].

Per caratterizzare il potenziale infiammatorio indotto dal sistema di veicolazione, sono stati quantificati vari parametri di risposta presenti nel liquido di lavaggio broncoalveolare; le nanoparticelle biodegradabili, costituite da un poliestere lineare (PLGA) o da un poliestere ramificato modificato con ammina, hanno rivelato un potenziale infiammatorio significativamente inferiore rispetto alle nanoparticelle di polistirene non biodegradabili, specialmente nel reclutamento di cellule infiammatorie. Questi risultati sperimentali sono in generale accordo con il "sistema di classificazione nanotossicologica" (NCS)[91], che differenzia i rischi tossicologici legati alle nanoparticelle polimeriche tenendo in considerazione effetti legati alle dimensioni e quelli derivati dalla degradabilità del polimero.

I polimeri usati per formulare nanoparticelle sono gli stessi di quelli usati per formulare microparticelle e includono principalmente l'acido poli lattico- co- glicolico (PLGA) ma anche poli-ε-caprolattone(PCL), chitosano ed alginato[92].

I poliesteri alifatici come il PLGA sono stati ampiamente utilizzati a causa della loro bassa tossicità[93], [94], ma la bassa velocità di degradazione (da settimane a mesi), tuttavia, porterebbe ad un accumulo indesiderato nel tratto respiratorio, soprattutto quando è richiesto

un dosaggio frequente[95], [96].

Ungaro e colleghi hanno sviluppato nanoparticelle di PLGA caricate con tobramicina mediante una tecnica di emulsione e diffusione del solvente[97]. Diversi polimeri adiuvanti sono stati aggiunti al PLGA per ottimizzare le dimensioni delle nanoparticelle, la superficie, le proprietà di rilascio e l'efficienza di incapsulamento; tra questi, il polivinilalcol ed il chitosano hanno permesso di ottimizzare le dimensioni e di modulare le proprietà superficiali delle nanoparticelle PLGA, mentre l'uso di alginato ha consentito un più efficace intrappolamento di tobramicina all'interno delle nanoparticelle ed un rilascio prolungato superiore a 30 giorni[97]. Altri tipi di polimeri biodegradabili adatti per l'applicazione polmonare sono basati su polianidridi e polichetali biodegradabili[98], [99].

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

Tra le varie formulazioni discusse in precedenza, i DPI sono quelle preferibili per via dei diversi vantaggi che posseggono.

Uno degli approcci più promettenti per convertire i sistemi nanostrutturati in polvere secca inalabile è la strategia Nano in Micro (NiM), che prevede l'incorporazione di nanoparticelle all'interno di microparticelle idrosolubili aventi un opportuno diametro aerodinamico[100]; in questo modo le microparticelle inalate, dopo deposizione nei polmoni, si disassemblano, liberando così le nanoparticelle.

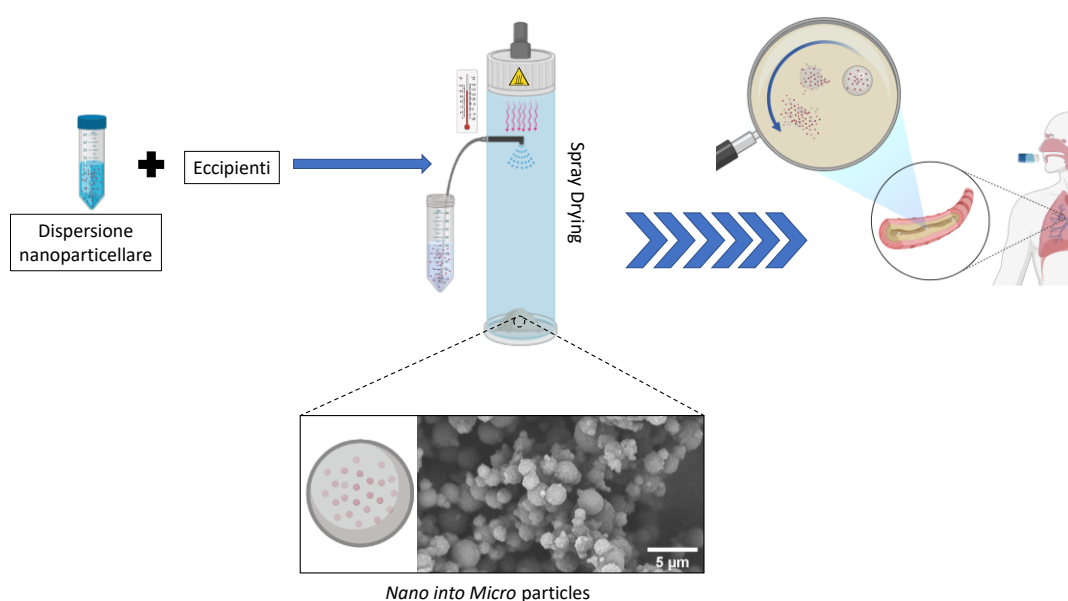


Figura 14 Rappresentazione schematica della preparazione di particelle NiM tramite tecnica dello Spray Drying e del loro destino dopo inalazione

I materiali che compongono la matrice delle microparticelle possono essere materiali inerti, che fungono solo da vettore per la somministrazione polmonare, come il lattosio, oppure eccipienti “funzionali”; in particolare tra i materiali che potrebbero essere utilizzati come eccipienti funzionali ci sono i materiali mucoadesivi, come polivinilalcol, chitosano, acido ialuronico o destrano. In questo modo si potrebbe prolungare il tempo di permanenza della formulazione nel sito di assorbimento consentendo un contatto prolungato con la mucosa, diminuendo la frequenza di somministrazione e conseguentemente aumentando la compliance del paziente e l'aderenza alla terapia.

1.3.2 Barriere nella terapia inalatoria

Negli ultimi decenni, le terapie inalatorie per il controllo e la gestione della patologia asmatica hanno fatto progressi sostanziali.

Tuttavia, questi progressi nel trattamento dell'inflammatione, nella prevenzione del rimodellamento delle vie aeree e nella progressione della malattia sono limitati, poiché la maggior parte delle strategie di formulazione mira ad ottimizzare la deposizione polmonare delle particelle, che è insufficiente per la somministrazione polmonare dei farmaci[101].

In linea generale, quando le particelle giungono sulla superficie della mucosa, rimangono intrappolate nel muco e vengono eliminate del movimento mucociliare o tramite la fagocitosi dei macrofagi; qualora le particelle riuscissero a sfuggire a questi meccanismi, per poter espletare l'azione farmacologica devono penetrare attraverso la barriera epiteliale[102].

La mancanza di un'approfondita conoscenza sulle barriere polmonari nelle malattie ostruttive e sulla patogenesi delle stesse, impedisce lo sviluppo di formulazioni funzionali mediante progettazione razionale.

Per di più è noto che alcuni cambiamenti patologici nelle malattie polmonari ostruttive possono portare a cambiamenti nelle barriere polmonari, come ispessimento del muco, disfunzione delle ciglia epiteliali e proliferazione delle ghiandole sottomucose e dei macrofagi alveolari.

Una più profonda comprensione delle caratteristiche e delle proprietà delle barriere polmonari può aiutare nello studio del destino delle particelle inalate[101].

La prima barriera che si interpone tra le nanoparticelle ed il loro sito d'azione è lo strato di muco[101], che riveste le vie aeree, con l'obiettivo di proteggere il sistema respiratorio dagli agenti esterni. Lo strato di muco respiratorio è costituito da uno strato periciliare, che facilita l'attività delle ciglia dell'epitelio, e da uno strato di gel. Quest'ultimo contiene glicoproteine

secrete, chiamate mucine, con un peso molecolare compreso tra 200 kDa e 200 MDa, costituite da un backbone peptidico lineare con catene laterali costituiti da centinaia di carboidrati [103]. Le regioni glicosilate di queste proteine costituiscono circa il 70-80% della massa totale della mucina e le catene di oligosaccaridi sono solitamente terminate da solfato, acido sialico o fucosio [104]. Gli oligosaccaridi sialilati e/o solfatati sono dunque anionici e conferiscono una superficie fortemente negativa che aumenta la rigidità del polimero, tramite la repulsione di carica [105], e ne conferisce proprietà di barriera idrofila; gli oligosaccaridi terminati con fucosio, differentemente, contribuiscono all'idrofobicità del muco [106],

Le regioni glicosilate delle fibre di mucina, che portano una carica netta negativa, sono separate da domini proteici idrofobici periodici [107].

Nei soggetti asmatici, la produzione e la secrezione di muco sono notevolmente sovraregolate[108].

Un recente studio quantitativo su 275 vie aeree di 93 pazienti deceduti per asma in Nuova Zelanda ha riscontrato un'occlusione del lume che varia dal 20-100% dell'area della sezione trasversale delle principali vie aeree (98% delle vie aeree) [109]. Pertanto, l'ostruzione del lume delle vie aeree da parte delle secrezioni mucose sembra essere una delle principali cause di asma fatale.

Anche nei pazienti con asma da lieve a moderata, il numero di cellule mucose nell'epitelio superficiale delle vie aeree è aumentato[110], [111].

Come negli individui normali, MUC5AC e MUC5B sono le principali mucine secrete nelle vie aeree degli individui con asma, ma con livelli di MUC5AC aumentati in maniera marcata[112]; l'incremento di MUC5AC pare sia correlato agli alti livelli di IL-13, che ne aumentano in modo notevole l'espressione genica, come dimostrato da alcuni studi in vitro ed in vivo[112].

MUC5B è principalmente prodotta e secreta dalle cellule mucose delle ghiandole sottomucose, ma è anche prodotta da alcune cellule caliciformi superficiali delle vie aeree nei soggetti asmatici[113].

Nei soggetti sani, si distinguono due isoforme di MUC5B, a bassa e ad alta carica; l'isoforma a carica bassa predomina negli individui asmatici, ma non negli individui non asmatici[114].

Il network di mucine dà origine ad un gel viscoso, elastico ed adesivo che agisce intrappolando e rimuovendo rapidamente non solo particelle estranee ma anche molecole idrofobe, che aderiscono a domini idrofobici sulle fibre di mucina; per questi motivi, le nanoparticelle inalate devono essere in grado di evitare tale interazioni per dirigersi verso l'epitelio bronchiale[107], [115]–[117]

Oltre alle mucine, il muco contiene DNA, lipidi, sali, proteine, cellule e detriti cellulari[118].

In soggetti sani, il DNA rappresenta circa lo 0.02% in massa del muco, derivante maggiormente da detriti di cellule epiteliali.

I lipidi, con un rapporto di massa fino all'1–2%, rappresentano un'alta percentuale delle molecole presenti nel muco e sono associati ai domini idrofobici delle mucine; questi contribuiscono notevolmente alle proprietà reologiche del muco [119], [120].

I sali sono normalmente presenti nella secrezione del muco, rappresentando fino all'1% della massa del muco [121], ma alcune patologie come asma e BPCO inducono cambiamenti patologici che influenzano la forza ionica del muco, portando direttamente a restringimento o rigonfiamento dello strato di muco, alterando significativamente la viscoelasticità dello stesso. L'elasticità del muco aumenta anche con una maggiore valenza ionica [122], [123]. Alte concentrazioni di cationi multivalenti, come calcio e magnesio, possono far collassare completamente il gel di muco e facilitare fenomeni di reticolazione reversibili le catene di mucina [124].

Considerata l'eterogeneità dei componenti del muco, il suo comportamento fisico risulta complesso (non newtoniano), con proprietà molto variabili che si classificano tra quelle di un liquido viscoso e di un solido elastico. La viscosità (resistenza al flusso) e l'elasticità (rigidità), vengono spesso utilizzate insieme per descrivere la consistenza del muco. Le proprietà reologiche del muco variano in funzione dello stress da taglio, della velocità di taglio e della scala della lunghezza. I cambiamenti nelle proprietà reologiche del muco possono influenzare notevolmente la sua capacità di funzionare come lubrificante, barriera selettiva e prima linea di difesa del corpo contro le infezioni[121].

La caratterizzazione delle proprietà fisiche del muco si concentra in gran parte su due proprietà, il modulo viscoso (G''), che misura la resistenza del gel allo scorrimento, ed il modulo elastico (G'), che misura la tendenza del gel a recuperare la sua forma originale in seguito a deformazione indotta da stress.

La reologia *in bulk* del muco è caratterizzata da una viscosità che non è lineare con la velocità di taglio, presentando una forte resistenza alla deformazione a basse velocità di taglio e debole resistenza a velocità di taglio elevate.

La reologia *in bulk* è fondamentale per la corretta funzione su macroscale del muco, inclusa la rimozione e la lubrificazione del muco. Tuttavia, considerando la viscosità *in bulk* delle tipiche secrezioni di muco, la diffusione di particelle o anche di piccole proteine verrebbe preclusa solo apparentemente. Poiché, dunque, il muco consente un rapido passaggio di proteine e particelle selezionate, la caratterizzazione macroreologica del fluido è inadeguata per comprendere le proprietà barriera del muco, specialmente su scale di lunghezza rilevanti per agenti patogeni, tossine e particelle estranee.

È importante inoltre notare che il network del muco è caratterizzato da legami di tipo reversibile. Infatti, a differenza di gel reticolati che si strappano irreversibilmente al taglio, la viscoelasticità del muco si ripristina rapidamente e in modo reversibile, ripristinando tipicamente gran parte delle sue proprietà viscoso ed elastiche in pochi secondi [121]. Questo rapido recupero è fondamentale per il trasporto mucociliare e impedisce al muco tranciato dalla tosse di fluire verso il basso verso gli alveoli per gravità. Oltre all'entanglement fisico, i legami non covalenti a bassa affinità [125] ed i ponti disolfuro più forti [126] possono ulteriormente contribuire alla viscoelasticità del muco; questi legami possono comunque riassociarsi dopo il taglio, seppur con una cinetica più lenta (dai minuti alle ore).

Le proprietà viscoelastiche dinamiche del muco sono strettamente regolate biochimicamente per garantire una clearance efficiente, pur mantenendo una forza adesiva ed elastica sufficiente da trattenere sulla superficie epiteliale nonostante le forze di taglio dovute alla deglutizione, alla peristalsi, all'ammiccamento e alla gravità.

Le alterazioni biochimiche dovute ad una condizione di infiammazione cronica e/o acuta delle vie aeree, spesso osservata nella fibrosi cistica, nella BPCO e nell'asma, innescano l'ipersecrezione di mucina, aumentando la viscoelasticità del muco [127]–[129]. Inoltre, lo stress ossidativo dovuto all'infiammazione aumenta anche la densità di ponti disolfuro tra le catene muciniche.

A livello microscopico, il muco delle vie aeree possiede una struttura porosa [115], [130].

Quando la scala della lunghezza si avvicina alle dimensioni di questi pori, si prevede che la permeabilità del particolato nel muco si riduca a causa dell'aumento dell'ostruzione sterica, portando così a una viscosità apparente più elevata [131]. Alle scale di lunghezza delle macromolecole come le proteine (< 10 nm), la resistenza alla loro diffusione browniana riflette in gran parte la resistenza viscosa dell'acqua, assumendo che queste molecole abbiano un'affinità trascurabile con i costituenti del muco [132], [133]. Quando le scale di lunghezza vengono ulteriormente aumentate fino alle dimensioni del capsido dei piccoli virus, anche le loro velocità di diffusione nel muco non vengono ridotte rispetto a quella misurata in acqua. In particolare, è stato osservato che sia il virus Norwalk (38 nm) che il papilloma virus umano (HPV) (55 nm) si diffondono nel muco cervicale umano rapidamente come nell'acqua [132]. Ciò implica direttamente che per dimensioni fino a 55 nm, la microviscosità del muco rimane simile alla viscosità dell'acqua.

La scoperta che virus più grandi, come il virus herpes simplex (HSV) di circa 180 nm, vengono rallentati di almeno 100-1000 volte rispetto all'acqua, anche nelle regioni più sottili del muco, è in buon accordo con una stima della grandezza dei pori di circa 100 nm per il muco [132]. A

sua volta, ciò implica che la viscosità effettiva per scale di lunghezza di 200 nm e superiori dovrebbe aumentare notevolmente.

Recentemente, questa ipotesi è stata messa in discussione da studi condotti su nanoparticelle di PS-PEG da 200 e 500 nm in grado di attraversare il muco umano con diffusività efficaci solo 6 volte e 4 volte ridotte rispetto all'acqua, rispettivamente [134]. La rapida diffusione di queste particelle, significativamente più grande della spaziatura media delle fibre di muco precedentemente stimata, suggerisce fortemente che l'architettura della maglia del muco è radicalmente diversa dalla maggior parte delle stime precedenti derivate da studi di diffusione di virus e microscopia elettronica, spostando notevolmente la scala delle lunghezze da 55 nm all'intervallo di circa 500 nanometri.

La microviscosità su scale di lunghezza significativamente più grandi di 500 nm dovrebbe deviare da un fluido a bassa viscosità, poiché le particelle significativamente più grandi della distanza media tra le catene incontreranno un ampio ingombro sterico che contribuisce a moduli viscoelastici notevolmente più elevati. L'aumento della microviscosità diventa evidente su scale di lunghezza vicine a 1 μm , poiché le particelle da 1 μm rivestite con un rivestimento muco-inerte mostrano velocità di trasporto notevolmente ridotte rispetto all'acqua [135].

L'incremento del contenuto di mucina, associati a stati patologici cronici come l'asma, comporta una riduzione della dimensione dei pori della maglia di muco; inoltre, come discusso in precedenza, è probabile che anche l'aumento del tasso di reticolazione della mucina indotto dallo stress ossidativo, riscontrato in queste malattie polmonari ostruttive [136], riduca ulteriormente la dimensione dei pori [137].

Anche il liquido periciliare rappresenta una significativa barriera sterica ai farmaci o alle particelle inalate, poiché ha una struttura a maglie fini [138]. Inoltre, in modo simile allo strato di gel di muco, il liquido periciliare può anche fungere da barriera adesiva poiché il reticolo è composto principalmente da mucine legate alle cellule.

Un'altra barriera da tenere in considerazione è la membrana cellulare delle cellule epiteliali delle vie aeree, dato che molti farmaci, come agenti antinfiammatori, devono accedere al citoplasma per espletare la loro azione farmacologica. La superficie epiteliale delle vie aeree rappresenta un'ulteriore barriera perché caratterizzata da una bassa efficienza endocitotica attraverso la membrana apicale e da giunzioni strette intercellulari che impediscono l'ingresso di sostanze [139].

Inoltre, le proprietà barriera dell'epitelio delle vie aeree sono alterate dalle malattie polmonari ostruttive, principalmente a causa di perturbazioni strutturali delle giunzioni strette; per esempio nell'asma, la funzione barriera dell'epitelio delle vie aeree è compromessa dalla formazione di giunzioni strette difettose [140].

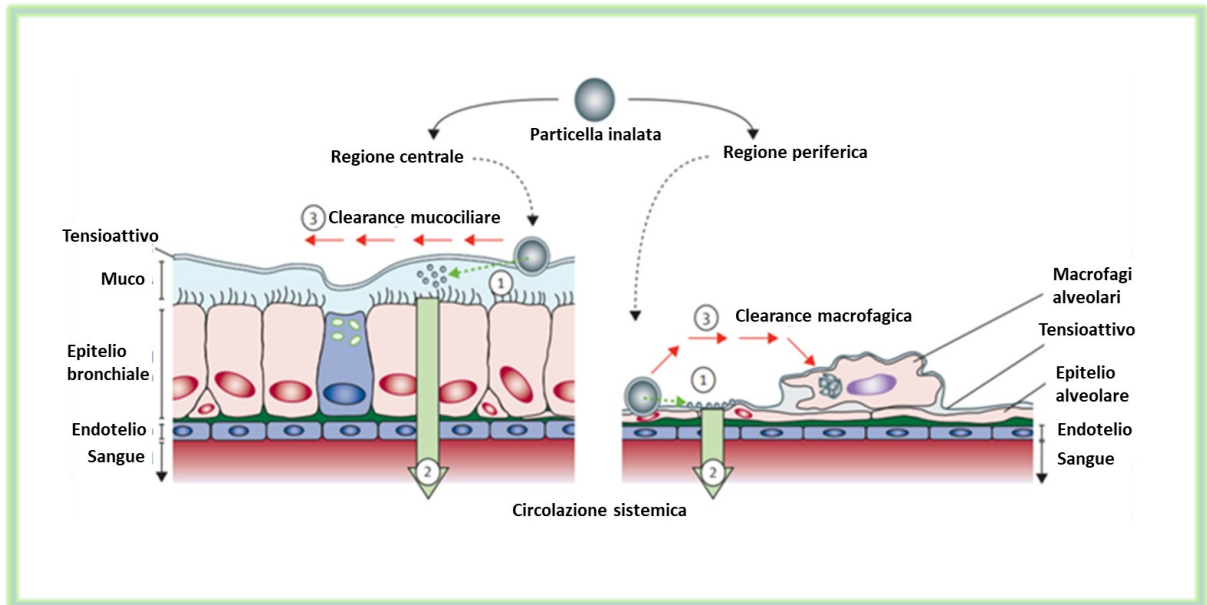


Figura 15 Panorama dei possibili destini delle particelle inalate. (1) Contatto con i fluidi che rivestono polmone: il rilascio del farmaco dalla particella di aerosol depositata comprende diversi processi, regolati dalla quantità e dalla composizione del fluido di rivestimento disponibile localmente e dalle proprietà intrinseche del farmaco e della particella veicolo. (2) Assorbimento del farmaco attraverso l'epitelio polmonare: questo processo è principalmente controllato dalle sue proprietà fisico-chimiche. (3) Clearance della particella non disciolta. Tratta da [141] ed opportunamente modificata.

Un'altra barriera che può ostacolare il destino delle particelle inalate è rappresentata dai macrofagi, i quali possono fagocitare rapidamente le particelle di farmaco o di altro materiale, così come particelle estranee come meccanismo di difesa, rappresentando una barriera critica per la maggior parte delle terapie inalatorie[139], [142].

Generalmente la fagocitosi da parte dei macrofagi si osserva per le particelle di dimensioni maggiori di 250 nm, con un processo fagocitico crescente con l'aumento della dimensione delle particelle; diversamente, le particelle più piccole di 250 nm vengono assorbite in modo meno efficiente dai macrofagi.

1.3.3 Strategie per eludere le barriere polmonari

Per superare i suddetti difetti della terapia inalatoria "convenzionale", sono auspicabili sistemi di rilascio polmonare più sofisticati e "intelligenti".

Tra i vari potenziali sistemi di veicolazione, i vettori micro e nanometrici a base polimerica hanno attirato una crescente attenzione per via della possibilità di avere rilascio controllato, proprietà di targeting e di bypassare i meccanismi di clearance del polmonare, fornendo tempi di permanenza prolungati dell'agente terapeutico all'interno del tratto respiratorio.

Per ottenere sistemi in grado di attraversare lo strato mucoso, sono state individuate alcune caratteristiche peculiari. Poiché questo reticolo polimerico funge da filtro, la diffusione delle

particelle può essere ostacolata dall'impedimento sterico; quindi, per consentire il passaggio attraverso le maglie del reticolo, le dimensioni dei nanosistemi dovrebbero essere dell'ordine dei nanometri[103]. Inoltre, le mucine possono interagire con i farmaci e con la superficie delle nanoparticelle tramite legami ad idrogeno o forze dipolo-dipolo, prevenendone ulteriormente il passaggio. Data la natura polianionica delle mucine, a causa dei residui di acido sialico, la presenza di cariche negative sulla superficie dei nanosistemi tende a ridurre le interazioni adesive; diversi studi hanno dimostrato che le nanoparticelle caricate positivamente interagiscono fortemente con il muco tendendo a trattenersi[117], mentre, le particelle caricate negativamente passano più facilmente grazie alle forze repulsive[143], [144].

Inoltre, le regioni idrofobiche non glicosilate delle mucine possono dar luogo a interazioni idrofobiche che rendono difficile la diffusione di farmaci e nanoparticelle attraverso il muco[107], [145]. È stato riscontrato che la lipofilia è la caratteristica chimico-fisica che maggiormente influenza la diffusione attraverso il muco[146], come dimostrato per le nanoparticelle di polistirene carbossilato (PS), che nonostante la loro carica negativa, sono altamente trattenute dallo strato di muco a causa delle interazioni idrofobiche[147]. Una strategia utile per evitare questo problema consiste nell'aumentare l'idrofilia superficiale dei nanomateriali per ottenere una maggiore diffusione attraverso il muco; a questo scopo è abbastanza comune rivestire la superficie dei nanosistemi con materiali idrofili, per coniugazione o adsorbimento[148]. Tra i materiali utilizzati per questo scopo, va menzionato il PEG per il suo uso consolidato[149], essendo il polimero idrofilo più diffuso utilizzato per applicazioni biomediche.

Tuttavia non è aprioristicamente vero che il PEG sia capace di ridurre le interazioni delle particelle con i componenti del muco, dato che il PEG è infatti ampiamente utilizzato anche come agente mucoadesivo.

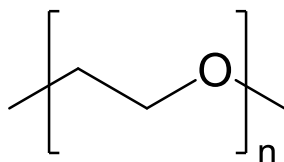


Figura 16 Struttura chimica del PEG

Molti studi hanno dimostrato che le proprietà di penetrazione da parte di sistemi nanoparticellari, che espongono il PEG in superficie, nel muco potrebbero essere ottenute selezionando un PEG con peso molecolare sufficientemente basso da evitare interazioni mucoadesive con le mucine e con un'adeguata densità di rivestimento della superficie particellare per schermare o proteggere efficacemente il nucleo delle particelle

idrofobiche[150], [151]. La conformazione della catena di PEG assume un ruolo importante; infatti, una conformazione del PEG “brush like”, conferisce uno shell protettivo, facilitando la penetrazione di particelle peghilate attraverso lo strato di muco[152]. Al contrario, una conformazione “mushroom like” aumenta il tempo di permanenza della frazione di particelle aderente sullo strato di muco.

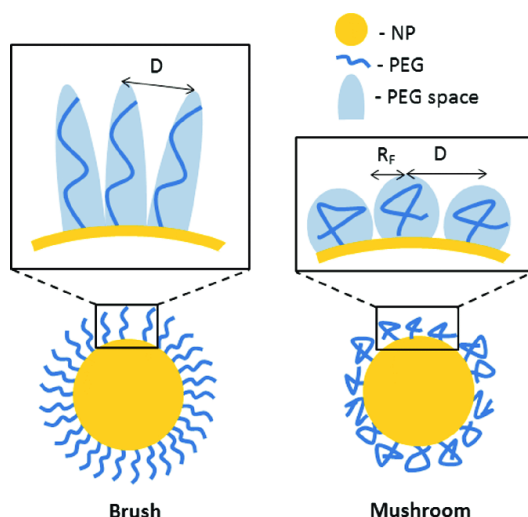


Figura 17 Schematizzazione della conformazione delle catene di PEG sulla superficie di nanosistemi

Il rivestimento con PEG può migliorare inoltre la penetrazione dei vettori inalati attraverso il liquido periciliare, se i diametri delle particelle sono abbastanza piccoli da adattarsi ai pori delle maglie che compongono il liquido periciliare[138].

Nonostante il PEG sia considerato scarsamente immunogenico, diversi recenti studi e rapporti clinici hanno dimostrato il verificarsi di risposte immunogene in seguito a somministrazione sistemica di farmaci o nanosistemi modificati con PEG; tali risposte includono la produzione di anticorpi anti-PEG, reazioni acute di ipersensibilità e l’attivazione del sistema del complemento, riducendo dunque sia l’efficacia terapeutica che l’emivita dei sistemi PEGilati. È importante sottolineare che queste risposte immunogene possono verificarsi anche alla prima dose, a causa di anticorpi preesistenti generati in seguito all’utilizzo prodotti cosmetici contenenti PEG [153], [154].

Recentemente, una classe di polimeri non tossici e biocompatibili noti come poliossazoline (POx), hanno ricevuto ampio interesse essendo in grado di conferire ai nanosistemi proprietà stealth come il PEG[155]–[157]. La FDA non ha ancora approvato queste sostanze, ma visto il crescente interesse per questi polimeri, è molto probabile che entro i prossimi anni si possa ottenere un’autorizzazione normativa[158], considerando anche che sono iniziate le sperimentazioni cliniche su alcune formulazioni contenenti poli (2- etil-2-ossazolina)[159]. La capacità delle poliossazoline di ridurre l’interazione tra particelle e la mucina è stata valutata da

Mansfield e colleghi[159], [160]; in particolare, nel primo lavoro, è stata valutata la diversa diffusione in dispersioni di mucina gastrica suina di nanoparticelle di silice tiolata non funzionalizzate e funzionalizzate con poli (2-etil-2-ossazolina) PEOx (Mw 5kg / mol) o con PEG (Mw 5kg / mol). Le nanoparticelle funzionalizzate con PEOx sono risultate significativamente più diffusive rispetto al campione tiolato, che invece risultava mucoadesivo per le interazioni tra il gruppo tiolico e il legame disolfuro presente nelle mucine[161]; nessuna differenza significativa nella diffusione è stata osservata tra nanoparticelle funzionalizzate con PEOx e nanoparticelle funzionalizzate con PEG. Nel secondo lavoro è stata valutata l'influenza della catena laterale delle poliossazoline nella diffusione di nanoparticelle attraverso la dispersione di mucina. In particolare, si è riscontrato che riducendo la lunghezza della catena laterale (n-propile, etile, metile) si migliorava la diffusione nella dispersione di mucina; questo risultato è correlato ad un aumento dell'idrofilia, dovuto alla riduzione della lunghezza della catena laterale (PMeOx è il più idrofilo, mentre PnPOx è il meno idrofilo). Altre ragioni che supportano la scelta delle poliossazoline piuttosto che del PEG, risiedono sulla sintesi più semplice e su una maggiore escrezione dall'organismo, con conseguente minor accumulo nei tessuti corporei[162], [163].

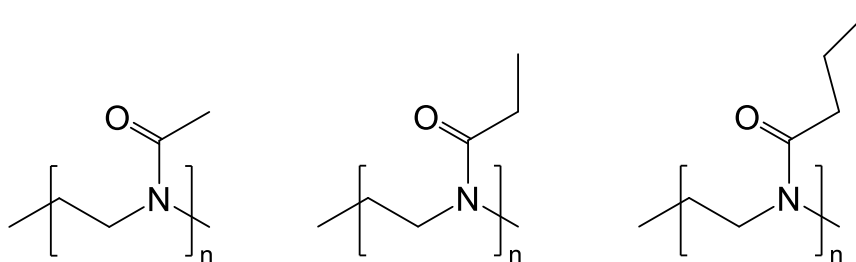


Figura 18 Struttura chimica della PMeOx, PEOx e PnPOx

Al fine di migliorare l'accumulo del farmaco nelle cellule epiteliali delle vie aeree, la superficie del carrier dovrebbe essere anche ingegnerizzata per favorire l'endocitosi nelle cellule che compongono l'epitelio bronchiale.

Il targeting alle cellule di interesse tramite ligandi specifici è certamente un approccio praticabile per migliorare l'internalizzazione nelle cellule che compongono l'epitelio bronchiale. Sebbene la maggior parte degli studi coinvolga il targeting del cancro a causa di numerosi pathways sovraregolati ben consolidati nei tumori[138], diversi gruppi hanno riportato la fattibilità di mirare specificamente alle cellule parenchimali nel polmone, comprese le cellule epiteliali alveolari e delle vie aeree.

Vettori a base di polietilenimmina (PEI) modificati con acido mannuronico e PEG generano un'espressione genica aumentata fino a 1000 volte nelle cellule bersaglio 16HBE rispetto sia ai controlli di trasfezione, che alle cellule trattate con complessi privi di ligandi[164].

In uno studio più recente, il targeting alle cellule epiteliali bronchiali umane è stato studiato utilizzando la lattoferrina come ligando[165].

La coniugazione chimica della lattoferrina a PEI ramificata (br-PEI) ha determinato un aumento significativo dell'efficienza di trasfezione nelle cellule epiteliali BEAS-2B bronchiali umane.

Geiger et collaboratori[166] hanno valutato l'efficienza di targeting della PEI funzionalizzata con il prostaglandina I₂, un analogo della prostaglandina I₂, che si lega al recettore della prostaciclina. Gli studi in vitro ed in vivo hanno dimostrato che il vettore PEI-g-ILO ha aumentato da 14 a 46 volte l'espressione della luciferasi nelle cellule epiteliali respiratorie, rispetto al vettore non modificato (PEI).

Negli ultimi dieci anni è emerso un approccio promettente che prevede l'utilizzo dei peptidi penetranti le cellule (CPP). Le molecole peptidiche CPP sono capaci di attraversare prontamente la membrana cellulare idrofobica con un meccanismo non completamente chiarito[167].

Nell'ultimo decennio sono stati pubblicati numerosi lavori sull'uso dei CPP per il rilascio intracellulare in vitro e in vivo di macromolecole, enzimi, anticorpi, DNA, liposomi e sonde di imaging biologicamente attivi[167].

Il CPP più intensamente studiato è il peptide attivatore trascrizionale transattivante (TATp) derivato dal dominio di trasduzione proteica (PTD) del virus dell'immunodeficienza umana di tipo 1 (HIV-1), che si estende dai residui 47 a 57 (YGRKKRRQRRR), ed è ricco di amminoacidi caricati positivamente arginina e lisina.

1.3.4 Drug repurposing

Come descritto in precedenza, l'asma è una malattia eterogenea caratterizzata da molti fenotipi clinici, molecolari, biologici e fisiopatologici. Le attuali strategie di gestione soddisfano con successo la maggior parte dei pazienti che vi hanno accesso. Tuttavia, esiste un sottogruppo di pazienti che presenta un fenotipo di asma grave caratterizzato in modo sproporzionato da sintomi ed esacerbazioni, risultando refrattari al trattamento farmacologico. L'assistenza richiesta per questa percentuale relativamente piccola di pazienti è significativa ed ha un impatto notevole sul sistema sanitario[168].

Al fine di migliorare le condizioni di vita dei pazienti resistenti alle terapie classiche, sono state sviluppate diverse terapie biologiche che mostrano notevoli benefici. Gli anticorpi che hanno

come target l'immunoglobulina E (IgE), come l'omalizumab, sono ormai ampiamente prescritti a molti pazienti refrattari alle terapie convenzionali[169]. Questi anticorpi agiscono impedendo il legame delle IgE ai recettori IgE sulla superficie dei mastociti e degli eosinofili, prevenendone così l'attivazione[170]. Molti altri anticorpi, diretti contro IL - 2, IL - 13, IL - 5, IL - 1, C5a e TNF - α sono in fase di sviluppo clinico per pazienti con asma grave, ampliando la diversità dei potenziali interventi biologici[171].

Sebbene le terapie biologiche abbiano fornito molti benefici ai pazienti, i costi ne limitano il loro uso a numeri limitati di pazienti [172].

Per tale motivo la ricerca si è rivolta allo sviluppo di nuovi farmaci chimici che possano avere migliori effetti farmacologici e ridotti effetti avversi. Tuttavia, lo sviluppo di nuovi farmaci chimici è un'impresa rischiosa che costa centinaia di milioni di dollari e richiede anni di ricerca e sperimentazioni cliniche.

Alla luce di queste sfide, c'è stato un crescente interesse per un nuovo paradigma nello sviluppo di farmaci: farmaci già approvati dalla FDA, con standard di sicurezza ben documentati che non richiederebbero test di fase I, vengono testati per l'efficacia in altre indicazioni mediche[173]. Questo approccio è noto come "drug repurposing"[174] o "drug repositioning"[175]. Un esempio recente di riposizionamento di farmaci è il Plerixafor, un antagonista di CXCR4, originariamente sviluppato come inibitore dell'ingresso dell'HIV, ma con scarso successo[176]. Un effetto collaterale osservato durante gli studi è stata la leucocitosi nel sangue periferico, comprese le cellule staminali ematopoietiche (HSCs)[176]. Questa scoperta ha portato a riproporre Plerixafor come nuovo agente per mobilizzare le HSCs nel trapianto di midollo osseo[177].

La strategia di riproposizione dei farmaci può originare da approcci diversi[178]. A volte, è guidata dall'esperienza clinica degli stessi medici, in cui il trattamento per una determinata patologia in un paziente porta al miglioramento di un altro processo patologico apparentemente non correlato nello stesso paziente. Altre volte, invece, è guidata da una più profonda comprensione della biologia sottostante la malattia, grazie alle continue nuove informazioni fornite dalla ricerca di base.

Per il trattamento dell'asma, la Rapamicina può rappresentare un nuovo possibile trattamento. La rapamicina, inibitore di mTOR, è approvata per l'immunosoppressione durante i trapianti di organi. Sebbene sia efficace per l'immunosoppressione generale, è possibile che la rapamicina possa essere utilizzata in dosi inferiori o in dosi applicate localmente per trattare le malattie allergiche, dato che il target meccanicistico della via della rapamicina (mTOR) modula la segnalazione di cellule immunitarie sia innate che adattive[179]. Alcuni studi hanno dimostrato che la rapamicina può attenuare sia l'infiammazione allergica delle vie aeree in un modello

murino, inibendo la differenziazione degli eosinofili[180], sia l'iper-reattività bronchiale in un modello di cavia, inibendo la migrazione dei leucociti[181]. La rapamicina è stata anche in grado di attenuare l'iper-reattività delle vie aeree, le cellule caliciformi e i livelli di IgE nel modello murino di asma allergico indotto dagli acari della polvere[182].

Tuttavia, rispetto al trattamento con desametasone in un modello consolidato di asma allergica, uno studio diverso ha rilevato che la rapamicina era meno potente rispetto al trattamento con steroidi, suggerendo che deve essere dosata prima della piena comparsa dei sintomi[171].

Anche Bortezomib, un inibitore del proteasoma 26S approvato per il trattamento del linfoma a cellule mantellari e del mieloma multiplo recidivante, può trovare un'applicazione nel trattamento dell'asma[183]. Bortezomib si è dimostrato capace di ridurre la secrezione di anticorpi di varie classi differenti, compreso IgE, provocando stress del reticolo endoplasmatico nelle plasmacellule, determinandone la loro morte[184]. In un modello murino asmatico, tuttavia, il trattamento a lungo termine con Bortezomib è stato efficace nel ridurre i livelli di IgE allergene-specifiche, ma non ha potuto migliorare i sintomi asmatici nei topi[185]. Un altro studio ha trovato risultati contrastanti, poiché Bortezomib da solo o in combinazione con farmaci che potenziano l'attività della proteina fosfatasi - 2A ha ridotto efficacemente l'infiammazione e le caratteristiche della malattia allergica delle vie aeree nei topi[186].

Un'altra molecola candidata è l'antineoplastico Imatinib, un inibitore della tirosin chinasi[187], poichè può inibire Flt-3, Lck e Protein Chinasi Attivata da Mitogeno (MAPK), sopprimendo varie funzioni nelle cellule dendritiche, nei macrofagi e nei linfociti T[188].

Alcuni studi in vitro hanno dimostrato come l'Imatinib può anche inibire la segnalazione del recettore c-Kit, noto anche come recettore del fattore di crescita dei mastociti, causando in tal modo l'apoptosi dei mastociti[189]. Inoltre, è stato scoperto che l'Imatinib riduce la proliferazione e l'attivazione delle cellule T attraverso l'inibizione della segnalazione del recettore delle cellule T in modo dose-dipendente[190].

In un modello murino di asma allergica, il precedente trattamento con imatinib orale ha alleviato in modo significativo i sintomi, con ridotta iperreattività delle vie aeree, accumulo di eosinofili peribronchiali e citochine Th2[191].

Un altro studio condotto su un modello murino di asma cronico ha scoperto che l'Imatinib può inoltre ridurre l'iper-reattività delle vie aeree, l'ispessimento della muscolatura liscia e l'infiammazione eosinofila[192].

L'efficacia di Imatinib nel trattamento di allergie e asma è stata anche valutata tramite studi sull'uomo. In pazienti con Leucemia mieloide cronica (LMC) è stato dimostrato che imatinib inverte la produzione aberrante di leucotriene C4 nei neutrofili[193]. In due pazienti con LMC che avevano anche sintomi delle vie aeree inferiori simili all'asma, i pazienti trattati con

Imatinib per il trattamento del cancro hanno mostrato una risoluzione dei sintomi delle vie aeree, suggerendo effetti mirati per l'asma.

Un altro antitumorale che potenzialità applicative nell'asma è il Tamoxifene, inibitore del recettore degli estrogeni[194]. È stato dimostrato che gli estrogeni in un modello murino di asma stimolano la produzione di citochine Th2 e regolano l'azione degli eosinofili durante la stimolazione con allergeni[195]; pertanto, l'inibizione della segnalazione degli estrogeni potrebbe avere benefici per entrambi i tipi di cellule nell'asma. Ciò è stato testato in vitro dimostrando che i mastociti possono essere inibiti dal Tamoxifene, limitandone la proliferazione e la sopravvivenza[196].

Allo stesso modo, il Tamoxifene può inibire la maturazione delle cellule dendritiche che presentano l'antigene[197]. Questi risultati sono stati estesi a un modello animale di asma neutrofila, in cui i cavalli trattati con Tamoxifene presentavano livelli ridotti di neutrofili nei fluidi di lavaggio broncoalveolare, paragonabili al trattamento con desametasone negli stessi animali[198].

Anche la Metformina, un farmaco comunemente prescritto per i pazienti con diabete di tipo II, presenta possibilità applicative nell'asma, poiché ha dimostrato di ridurre il rimodellamento delle vie aeree e l'infiammazione in un modello murino di asma cronico tramite l'attivazione di protein chinasi attivata da AMP (AMPK).

Anche l'Azitromicina è stata ampiamente studiata come terapia per l'asma[199]. In uno studio clinico su bambini di età compresa tra 1 e 3 anni, l'Azitromicina ha ridotto la durata dei sintomi simili all'asma[199]; tuttavia, un ampio studio controllato randomizzato in una popolazione adulta che confrontava Azitromicina contro un placebo per il trattamento delle riacutizzazioni acute dell'asma non ha riscontrato alcun beneficio clinicamente significativo[200]. Un diverso studio controllato randomizzato su 420 adulti con asma sintomatica persistente ha rilevato una migliore qualità della vita con meno esacerbazioni tra i pazienti trattati con Azitromicina orale[201]. Pertanto, rimane incerto se l'Azitromicina sia veramente di beneficio nel trattamento dell'asma nei bambini e negli adulti.

1.3.5 Terapia genica per il trattamento dell'asma

La branca della terapia genica che trova una possibile applicazione nella patologia asmatica è rappresentata dal meccanismo di RNA interference (RNAi).

Il meccanismo dell'RNAi è coinvolto normalmente nelle difese cellulari contro le infezioni virali ed è l'unico meccanismo di silenziamento genico post-trascrizionale[202].

Esistono diverse classi di RNA che agiscono all'interno della via RNAi. Questi composti sono piccole molecole di RNA, che rientrano in tre categorie in base alla loro funzione e origine: small interfering RNAs (siRNA), short hairpin RNAs (shRNA), and microRNAs (miRNA)[203].

Gli small interference RNA (siRNA) sono costituiti da piccoli frammenti di RNA a doppio filamento capaci di innescare la degradazione di una mRNA specifico[204], riducendo così l'espressione di un determinato gene; per tale ragione possono trovare un'applicazione terapeutica per patologie in cui si osserva un aumento dell'espressione di alcuni geni.

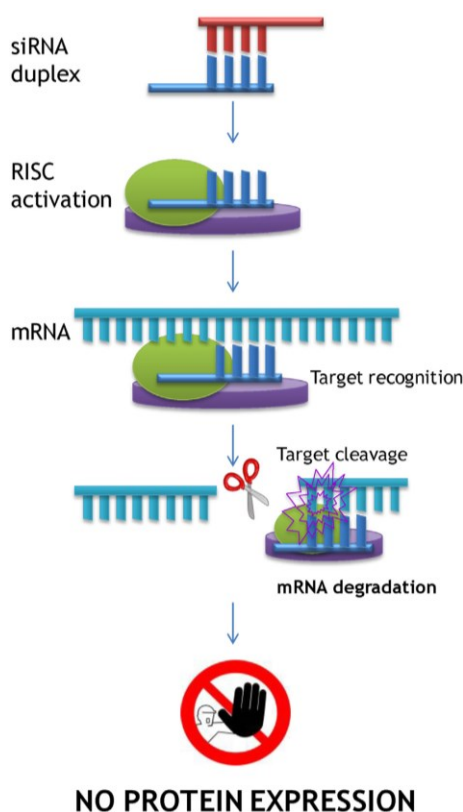


Figura 19 Rappresentazione schematica del meccanismo d'azione dei siRNA. Tratta da [205].

Nel caso particolare dell'asma, dove la cascata infiammatoria trova numerose proteine come protagonisti, i fattori di trascrizione svolgono un ruolo chiave e sono considerati potenti bersagli per il targeting dei siRNA.

Ad oggi sono stati ora identificati molti nuovi bersagli coinvolti nella patogenesi dell'asma; tra questi troviamo geni che codificano per citochine (interleuchine; IL-4, IL-5, IL-13)[206], [207], per il recettore delle chemochine (CCR3), per la tirosina chinasi della milza (SYK), per trasduttori di segnale e per attivatori di trascrizione come STAT1, STAT5b, STAT6[208], [209], GATA3 e NF κ B (fattore nucleare κ B)[210], [211].

La tirosina chinasi della milza (SYK) è coinvolta nella segnalazione dai recettori delle cellule B ed è un regolatore dei segnali a valle che attivano diversi fattori di trascrizione pro-

infiammatori; SYK costituisce perciò un importante bersaglio terapeutico per la mitigazione dell'asma[212], [213]. La somministrazione locale di siRNA anti-SYK, somministrato per via inalatoria, ha dimostrato di avere un potenziale nel prevenire il reclutamento di cellule infiammatorie nel fluido bronco-alveolare di topi sensibilizzati agli allergeni. A tal proposito è stato sviluppato da ZaBeCor Pharmaceuticals, (USA) Excellair™, un prodotto a base di siRNA anti-SYK, attualmente in fase di sperimentazione clinica.

L'inibitore dell'attivatore del plasminogeno (PAI-1) è coinvolto nel ritardo dell'attività fibrinolitica e studi recenti rivelano che è un importante bersaglio per l'asma bronchiale. I livelli di PAI-1 nell'espettorato dei pazienti asmatici erano positivamente correlati alla durata dell'asma; ciò è stato confermato dall'inibizione di PAI-1 nei topi, tramite instillazione di siRNA anti-PAI-1 nudo.

Nel modello di asma acuto, il deficit di PAI-1 ha ridotto l'infiammazione delle vie aeree e nel modello di asma cronica ha limitato il rimodellamento delle vie aeree. Il ruolo di PAI-1 nella patogenesi dell'asma bronchiale è stato così confermato[214].

Il trasduttore di segnale e l'attivatore della trascrizione 6 (STAT6), è una proteina coinvolta nella differenziazione delle cellule T e regola anche IL-4 e IL-13 in chemochine Th-2. Le cellule epiteliali, i fibroblasti e le cellule muscolari lisce sono la principale fonte di questo attivatore, che svolge un ruolo chiave nell'iperreattività nell'asma. La trasfezione mediante lipofectamina di siRNA contro STAT6 in vitro in cellule A549 ha mostrato un'eccellente inibizione dell'mRNA e dei livelli di proteine di IL-4 e IL-13. È stata anche osservata una riduzione dell'infiltrazione delle vie aeree nei polmoni di topi e studi istologici hanno concluso la diminuzione dell'espressione dell'IL-4, IL-5 e IL-13[215].

Rispetto ai farmaci tradizionali, i siRNA mostrano effetti terapeutici superiori grazie alla loro elevata selettività e potenza. Inoltre possono essere progettati per fornire una terapia personalizzata[216], [217].

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

Rispetto a questo approccio relativamente sicuro, i plasmidi che codificano gli shRNA devono invece entrare nel sito di trascrizione nucleare, per la loro corretta espressione, per cui devono superare un'ulteriore barriera nucleare, mentre i dsRNA, a causa delle loro grandi dimensioni, possono causare la risposta dell'interferone nelle cellule di mammifero[218], [219].

2. Scopo della tesi

L'asma viene definita come una patologia infiammatoria cronica delle vie respiratorie caratterizzata da aumento della reattività bronchiale con comparsa di episodi ricorrenti di broncospasmo, caratterizzati clinicamente da respiro sibilante, dispnea, tosse e senso costrizione toracica associati generalmente ad una ostruzione bronchiale[2].

I possibili fattori che scatenano il fenomeno asmatico sono molteplici e l'interazione di questi fattori e cellule immunitarie dà inizio a una cascata molecolare che comporta un aumento della produzione e liberazione di sostanze infiammatorie; l'infiammazione delle vie aeree nell'asma è un processo multicellulare che coinvolge principalmente eosinofili, neutrofili, linfociti CD4⁺T e mastociti, con l'infiltrazione eosinofila che è la caratteristica più evidente[14].

Le alterazioni fisiopatologiche caratteristiche dell'asma sono determinate dalla condizione di infiammazione cronica delle vie aeree[1].

Una delle principali alterazioni nella fisiologia polmonare è l'iperreattività bronchiale, inducendo restringimento delle vie aeree, che spesso è aggravato dalla presenza di edema e di una maggiore secrezione di muco[2].

Nei primi stadi della malattia la riduzione del calibro delle vie aeree può risolversi in seguito ad un'opportuna terapia farmacologica, ma con l'avanzare della malattia si registrano modifiche strutturali del tratto respiratorio che purtroppo determinano una broncocostrizione irreversibile.

Sebbene la somministrazione di farmaci ai polmoni per inalazione abbia offerto una terapia farmacologica mirata per le malattie respiratorie, riducendo l'esposizione sistemica al farmaco e quindi gli effetti collaterali sistemici, l'efficacia terapeutica dei farmaci inalatori è limitata dalla loro rapida eliminazione nei polmoni[65].

Infatti, quando le particelle giungono sulla superficie della mucosa, rimangono intrappolate nel muco e vengono eliminate del movimento mucociliare o tramite la fagocitosi dei macrofagi; qualora le particelle riuscissero a sfuggire a questi meccanismi, per poter espletare l'azione farmacologica devono penetrare attraverso la barriera epiteliale[102].

Per superare i suddetti difetti della terapia inalatoria "convenzionale", sono auspicabili sistemi di rilascio polmonare più sofisticati e "intelligenti".

Tra i vari potenziali sistemi di veicolazione, i vettori micro e nanometrici a base polimerica hanno attirato una crescente attenzione per via della possibilità di avere rilascio controllato, proprietà di targeting e di bypassare i meccanismi di clearance polmonare, fornendo tempi di permanenza prolungati dell'agente terapeutico all'interno del tratto respiratorio.

Alla luce delle premesse sopracitate e discusse in dettaglio nel primo capitolo, lo scopo

principale di questa tesi riguarda lo sviluppo di nanosistemi di natura polimerica, al fine di ottenere Drug Delivery Systems somministrabili per via inalatoria, con possibile applicazione nel il trattamento antiinfiammatorio dell'asma.

Per lo sviluppo dei Drug Delivery System trattati in questa tesi si è scelto di utilizzare come polimero precursore l' α , β -poli (N-2-idrossietil)-D, L-aspartammide (PHEA), derivato per amminolisi completa degli anelli succinimmidici della polisuccinimide (PSI) ad opera dell'etanolanmina.

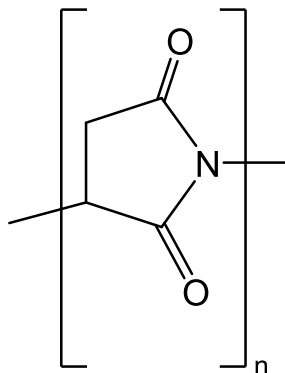


Figura 20 Struttura chimica della PSI.

In base al carbonile che subisce l'attacco nucleofilo si generano due unità ripetitive, denominate α e β ; queste unità ripetitive, hanno la stessa composizione chimica, ma diversa isomeria di struttura, come è possibile notare nella struttura chimica qui riportata.

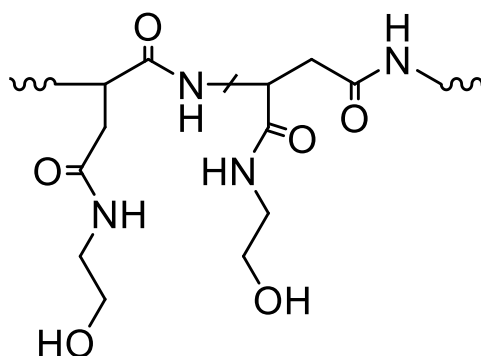


Figura 21 Struttura chimica del PHEA.

Si ottiene così un polimero altamente solubile in acqua, biocompatibile, non immunogenico, non antigenico, avente una struttura poliamminoacidica che presenta in catena laterale, per ciascuna unità ripetitiva, dei gruppi ossidrilici che ne permettono la funzionalizzazione con un gran numero di molecole e macromolecole.

Il primo studio sviluppato in questo lavoro di tesi si propone di realizzare un sistema basato sull'approccio della terapia genica a base di siRNA nel trattamento dell'asma. Nel caso

particolare dell'asma, dove la cascata infiammatoria trova numerose proteine come protagonisti, i fattori di trascrizione svolgono un ruolo chiave e sono considerati potenti bersagli per il targeting dei siRNA.

Il trasduttore di segnale e l'attivatore della trascrizione 6 (STAT6), è una proteina coinvolta nella differenziazione delle cellule T e regola anche IL-4 e IL-13 in chemochine Th-2. Le cellule epiteliali, i fibroblasti e le cellule muscolari lisce sono la principale fonte di questo attivatore, che svolge un ruolo chiave nell'iperreattività nell'asma [215].

Al fine di ottenere il silenziamento genico di STAT6, è stato sviluppato un derivato della α , β -poli (N-2-idrossietil)-D, L-aspartammide (PHEA), coniugando chimicamente al backbone polimerico del PHEA l'1,2-Bis (3-amminopropilammino)etano (bAPAE), ottenendo il copolimero graft PHEA-g-bAPAE, avente in catena laterale ammine protonabili, le quali conferiscono la capacità di complessare il materiale genico mediante interazioni elettrostatiche. Inoltre il copolimero che forma il complesso con il siRNA dovrebbe possedere caratteristiche aggiuntive; infatti, considerando una somministrazione per via polmonare, è necessario che il nanocomplesso passi attraverso lo strato di muco presente a livello delle vie aeree, fino a raggiungere le cellule epiteliali bronchiali, obiettivo principale per il rilascio di siRNA.

Per conferire capacità di muco penetrazione al sistema è possibile aumentare l'idrofilia superficiale del sistema, riducendo così le interazioni con le catene proteiche della mucina; per questo motivo si è scelto di coniugare al backbone polimerico del PHEA una quantità adeguata di polietilenglicole (PEG).

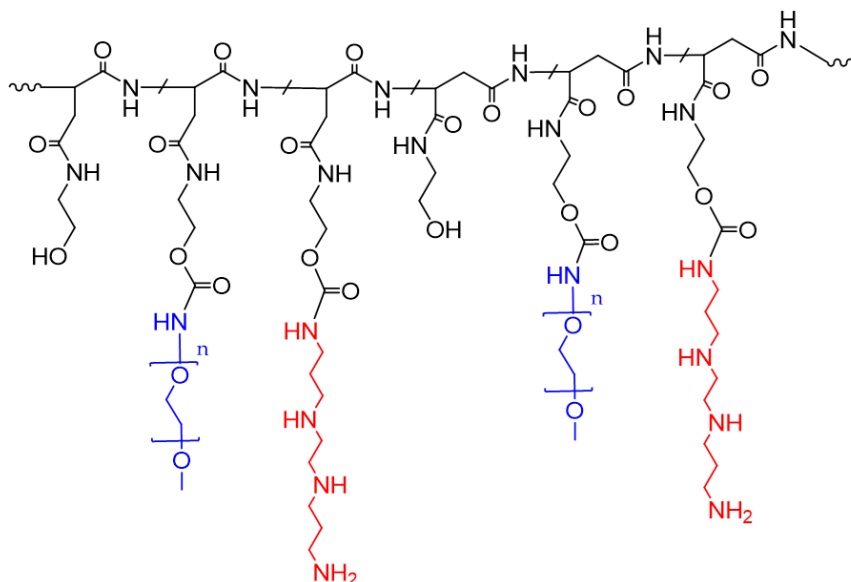


Figura 22 Struttura chimica del copolimero graft PHEA-g-PEG-g-bAPAE.

Tutti i copolimeri ottenuti, peghilati o meno, sono stati caratterizzati dal punto di vista chimico e strutturale e la loro capacità complessante è stata valutata al variare del rapporto in peso polimero/siRNA.

La stabilità e la capacità dei poliplessi ottenuti di internalizzare il siRNA è stata valutata in vitro, così come la capacità di mucopenetrazione.

Nel secondo studio viene presentato un ulteriore sviluppo dei poliplessi ottenuti nel primo studio con il copolimero PHEA-g-PEG(C)-g-bAPAE. Considerando che i poliplessi devono essere in grado di attraversare non solo la barriera di muco, ma anche la barriera rappresentata dall'epitelio bronchiale, si è scelto di funzionalizzare i poliplessi in superficie con il peptide TAT, sfruttando una reazione del tipo *tiolo-ene*, che essendo classificabile come *click chemistry* è rapida, efficiente e non produce sottoprodotti.

L'introduzione di un doppio legame al terminale del PEG è stata ottenuta utilizzando un derivato della maleimmide, ottenendo il derivato MLB-PEG-COOH che successivamente è stato coniugato al copolimero PHEA-g-bAPAE.

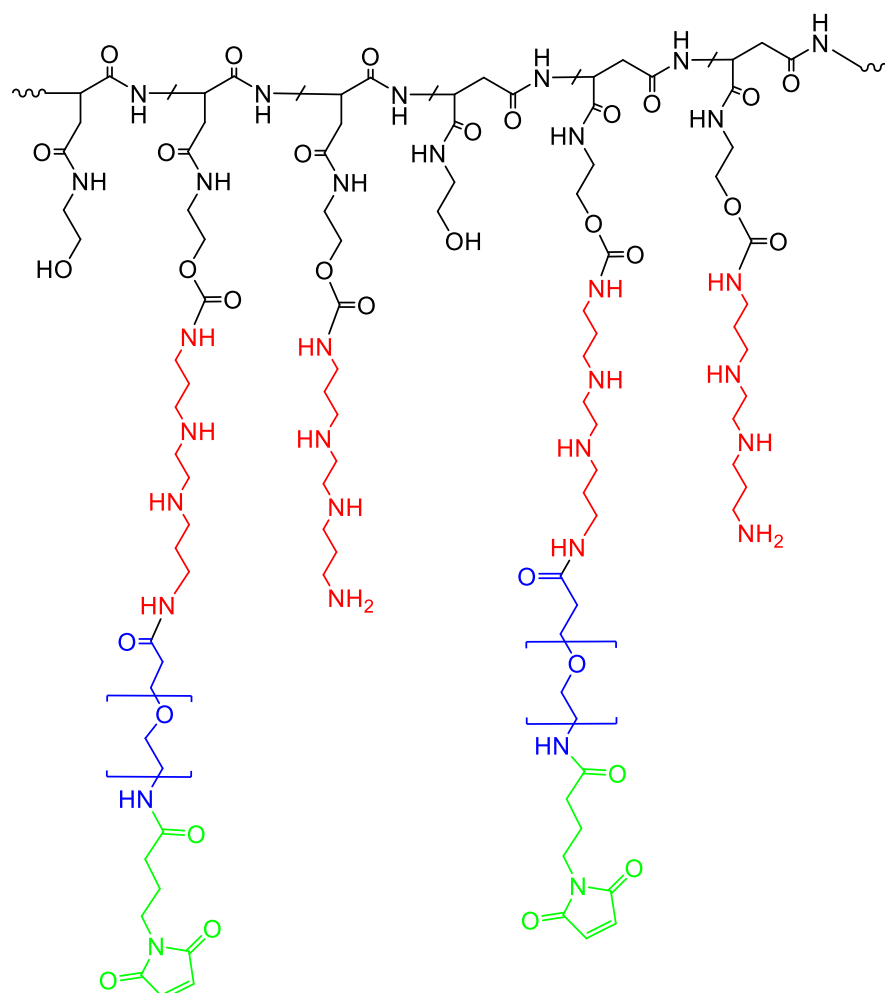


Figura 23 Struttura chimica del copolimero graft PHEA-g-bAPAE-PEG-MLB.

L'introduzione del gruppo tiolico nella struttura del peptide è stata ottenuta utilizzando l'estere succinimidico dell'acido 3- (2-piridilditio) propionico.

Il copolimero ottenuto è stato caratterizzato dal punto di vista chimico e strutturale e la sua capacità complessante è stata valutata al variare del rapporto in peso polimero/siRNA.

I poliplessi, funzionalizzati o meno con il peptide TAT, sono stati caratterizzati dal punto di vista chimico-fisico e biologico.

La stabilità nel muco e la loro capacità di mucopenetrazione è stata valutata in vitro, così come la loro capacità di essere internalizzati in cellule 16HBE.

Il terzo studio si focalizza sulla realizzazione di una formulazione polmonare, sottoforma di DPI in grado di veicolare lo Zileuton, un inibitore selettivo della 5-lipoossigenasi.

Come è noto, lo Zileuton ad oggi è disponibile in commercio in USA solo esclusivamente sottoforma di compresse (Zyflo®) che necessita di quattro somministrazioni al giorno[2], il cui uso è associato a fenomeni di epatotossicità. Lo sviluppo di una formulazione a rilascio prolungato per la veicolazione inalatoria di Zileuton, propone la possibilità di fornire molteplici vantaggi in termini di riduzione degli effetti collaterali, migliore efficienza farmacologica e migliore compliance del paziente.

Per raggiungere questo obiettivo sono stati sviluppati due derivati anfifilici del PHEA, in grado di formare nanoparticelle che incorporano lo Zileuton. Come porzione idrofobizzante per entrambi i copolimeri si è scelto di usare acido polilattico (PLA), un poliesteri non tossico, biodegradabile, biocompatibile e biorassorbibile[220]; come porzione idrofila si è scelto di utilizzare in un caso la poli-2-metil-2-ossazolina (PMeOx), un polimero altamente idrofilo per cui è già stata valutata la capacità di conferire mucopenetrazione[160], mentre nell'altro caso si è scelto di utilizzare la poli-2-metil-2-ossazina (PMeOz), un polimero strutturalmente simile a PMeOx per il quale non è stata ancora valutata in letteratura la capacità di conferire mucopenetrazione.

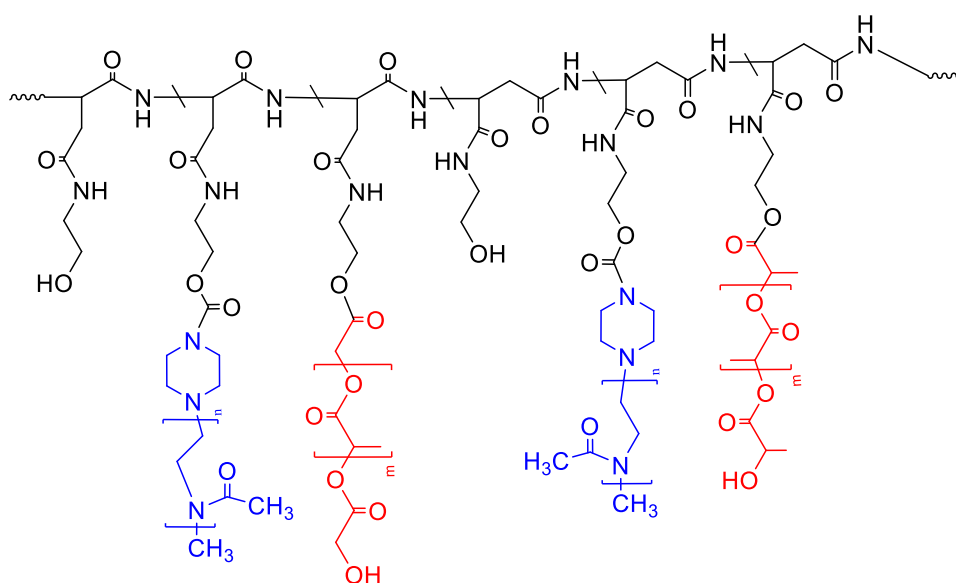


Figura 24 Struttura chimica del copolimero graft PHEA-g-PMeOx-g-PLA.

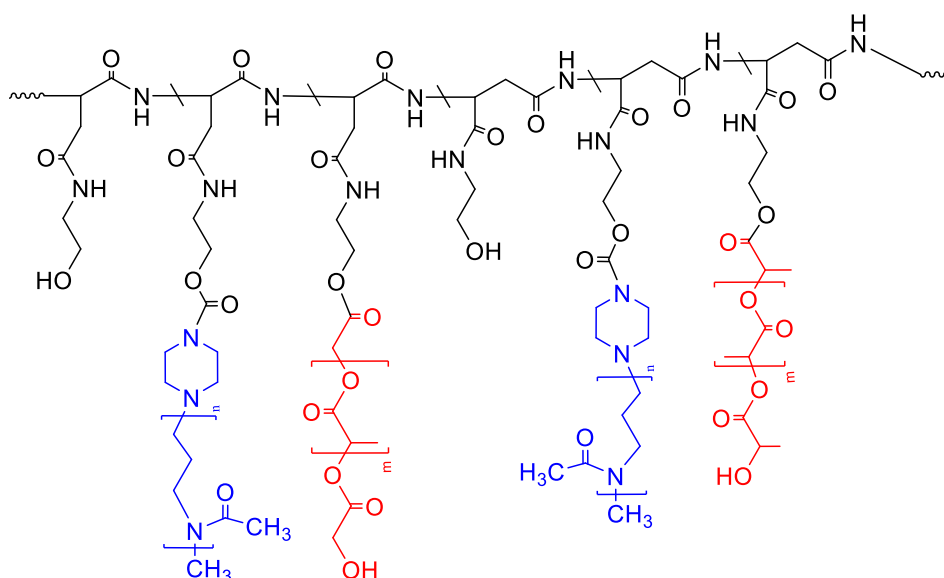


Figura 25 Struttura chimica del copolimero graft PHEA-g-PMEOz-g-PLA.

I copolimeri sintetizzati sono stati ampiamente caratterizzati con tecniche spettroscopiche e cromatografiche e successivamente sono stati studiati diversi metodi per la preparazione di nanoparticelle; una volta stabilita la tecnica migliore, sono state preparate nanoparticelle caricate con Zileuton.

Le nanoparticelle ottenute sono state caratterizzate dal punto di vista chimico-fisico, morfologico e biologico, ottenendo risultati promettenti.

Successivamente, al fine di superare il limite della somministrabilità per via inalatoria, è stata applicata la strategia Nano into Micro, incapsulando le nanoparticelle in microparticelle idrosolubili a base di mannitolo, tramite tecnica dello spray-drying.

Infine, è stato valutato il profilo di rilascio del farmaco e l'assenza di interazione con le mucine, tramite studi reologici e turbidimetrici.

Nel quanto ed ultimo studio l'attenzione è stata focalizzata sullo sviluppo di nanoparticelle mucopenetranti per la veicolazione inalatoria di Rapamicina, farmaco immunosoppressore che ha recentemente attirato l'attenzione per il trattamento dell'asma. Nel presente lavoro sono stati sviluppati nuovi copolimeri, costituiti da un backbone di poliaspartammide e catene PCL e di PEG in catena laterale.

Il PCL è stato scelto poiché, tra i poliesteri, è tra i materiali più attraenti in termini di biodegradabilità, biocompatibilità e processabilità; inoltre, esso mostra un'elevata versatilità nel modulare le sue proprietà chimiche, fisiche e meccaniche, che lo rende un ottimo candidato per applicazioni biomedicali[221].

Il PEG, invece, è stato scelto per aumentare l'idrofilia superficiale del sistema, riducendo così

le interazioni con le catene proteiche della mucina, conferendo capacità di muco penetrazione ai sistemi.

Tra i vari copolimeri ottenuti, il copolimero PHEA-g-RhB-g-SUCC-PCL_(F)-g-PEG è stato selezionato per lo sviluppo di nanosistemi polimerici, avendo mostrato idonee caratteristiche anfifiliche.

Sono state sviluppate dunque nanoparticelle successivamente caratterizzate dal punto di vista chimico-fisico e biologico.

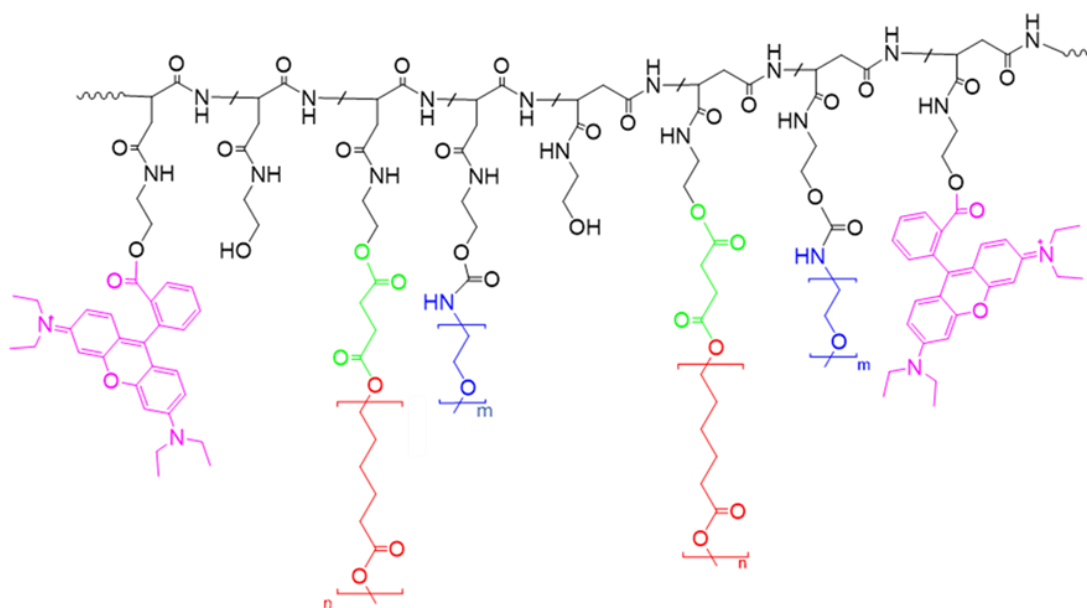


Figura 26 Struttura chimica del copolimero graft PHEA-g-RhB-g-SUCC-PCL-g-PEG.

Le nanoparticelle ottenute sono state infine incorporate in microparticelle idrosolubili a base di mannitolo, tramite tecnica dello spray-drying, ed è stato valutato il profilo di rilascio del farmaco, l'assenza di interazione con le mucine, tramite studi reologici e turbidimetrici, e la capacità di mucopenetrazione.

Infine, con la collaborazione del Laboratorio di Drug Delivery dell'Università di Napoli Federico II, è stata valutata la deposizione delle microparticelle nel tratto respiratorio tramite studi di aerosolizzazione in vitro, in accordo con quanto previsto dalle metodologie di Farmacopea Ufficiale Europea.

3. Risultati e discussioni

3.1 Nuovi copolimeri della poliaspartammide per il rilascio polmonare di siRNA nella terapia antiasmatica

3.1.1 Sintesi e caratterizzazioni dei polimeri

Per ottenere il silenziamento genico, un nanosistema capace di veicolare siRNA nel tessuto bersaglio, deve essere in grado di legare e rilasciare il siRNA nel citosol delle cellule bersaglio, superando prima la membrana della cellula e successivamente quella endosomiale-lisosomiale. I polimeri cationici (policationi) sintetici rappresentano, in linea di principio, candidati validi in questo campo, grazie al fatto che possono essere realizzati con proprietà strutturali e funzionali adeguate in grado di conferire caratteristiche specifiche necessarie per un vettore di materiale genetico. Per questo motivo, i ricercatori hanno esplorato la possibilità di produrre copolimeri protonabili con varie funzionalità al fine di conferire proprietà diverse a una singola macromolecola[204].

Nel presente lavoro è stato sviluppato un derivato della α , β -poli (N-2-idrossietil)-D, L-aspartammide (PHEA), coniugando chimicamente al backbone polimerico del PHEA l'1,2-Bis (3-amminopropilammino)etano (bAPAE), ottenendo il copolimero graft PHEA-g-bAPAE. Ciò ha consentito di realizzare un copolimero avente in catena laterale ammine protonabili, le quali conferiscono la capacità di complessare il materiale genetico mediante interazioni elettrostatiche.

La reazione ha comportato l'attivazione dei gruppi idrossilici del PHEA liberi con bis-nitrofenil carbonato (BNFC), scegliendo una stechiometria dei reagenti al fine di ottenere un rapporto molare tra BNFC e unità ripetitive di PHEA pari a 0.6. Tuttavia, poiché la bAPAE presenta due gruppi amminici primari ($-NH_2$), al fine di evitare possibili processi di reticolazione, è stato impiegato un largo eccesso di bAPAE nel secondo step della reazione. In queste condizioni sperimentali è stato ottenuto un grado di derivatizzazione in bAPAE (DD_{bAPAE}) del copolimero PHEA-g-bAPAE di circa il 35% in moli. Quest'ultimo è stato calcolato mediante analisi 1H -NMR usando il rapporto tra l'integrale dei segnali corrispondente a 4H di bAPAE (a δ 1.70 e 2.20 ppm), e l'integrale del segnale corrispondente a 2H di unità ripetitiva PHEA (a δ 2.73 ppm); questo dato è stato anche confermato dal saggio colorimetrico TNBS, che fornisce un valore DD% sovrapponibile a quello ottenuto dall'analisi 1H -NMR[222].

L'avvenuta coniugazione della bAPAE è stata dimostrata anche dalla comparsa del segnale a circa δ 4.1, correlata al CH_2 della catena laterale dell'unità ripetitiva PHEA funzionalizzata ($NHCH_2CH_2OCO-$) vicino al legame $CONH$. Lo schema di reazione è riportato nella Figura 27a.

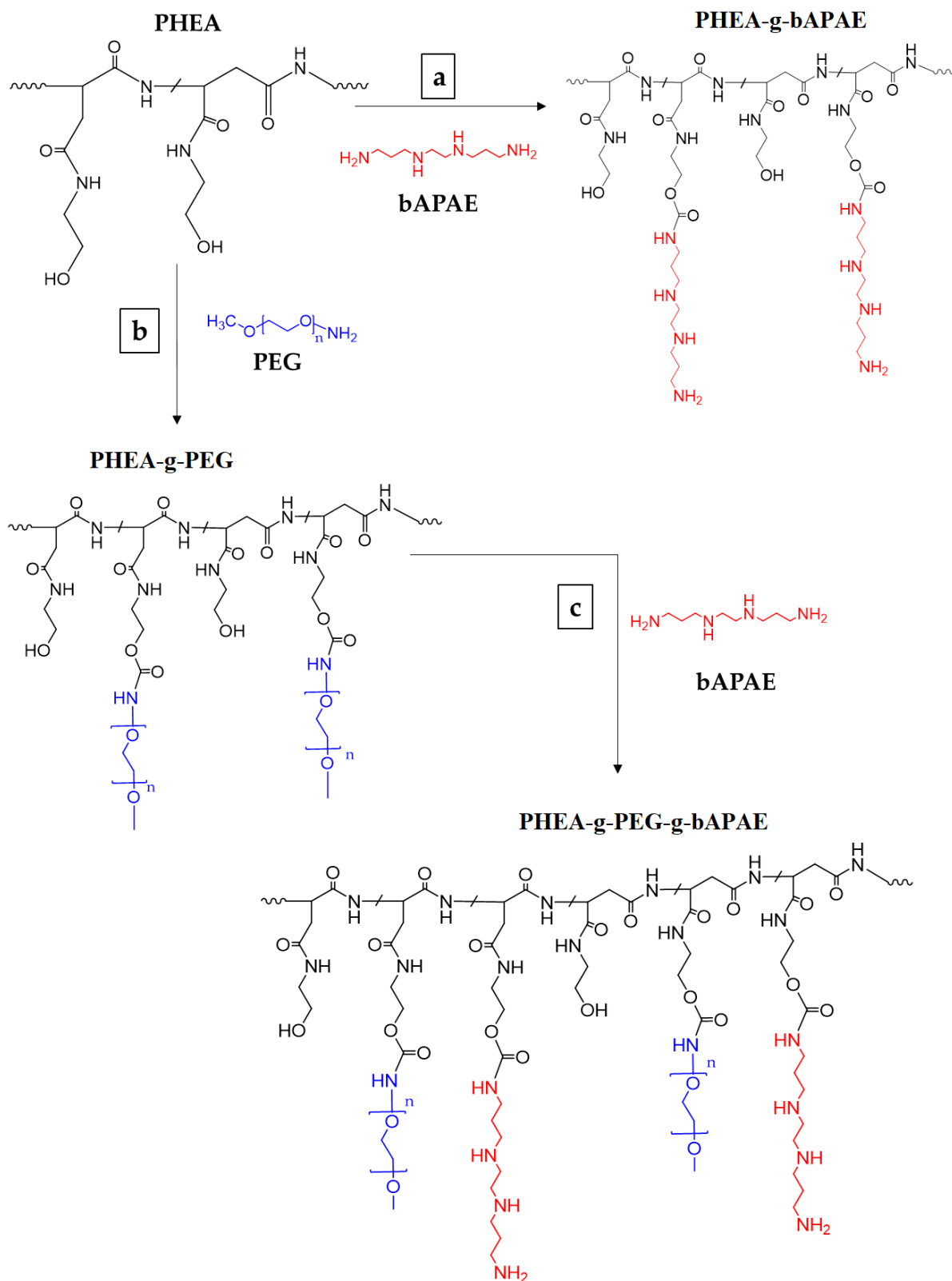


Figura 27 Schema di sintesi dei copolimeri PHEA-g-bAPAE (a), PHEA-g-PEG (b) e PHEA-gPEG-g-bAPAE (c) ($n=44$). Reagenti e condizioni sperimentali: a) a-DMF, BNFC, 4h a 40°C, 20h a 25°C; b) a-DMF, DSC, 4h a 40°C, 18h A 25°C; c) a-DMF, BNFC, 4h a 40°C, 20h a 25°C.

Il copolimero ottenuto è stato ulteriormente caratterizzato dall'analisi SEC in termini di peso molecolare medio ponderale (\bar{M}_w) e polidispersità (\bar{M}_w/\bar{M}_n), e i valori ottenuti sono riportati nella tabella 2, insieme al valore DD_{bAPAE} .

Tabella 2 Peso molecolare medio ponderale (\bar{M}_w), polidispersità (\bar{M}_w/\bar{M}_n) e composizione chimica dei copolimeri ottenuti.

Copolimeri	Peso molecolare		Grado di derivatizzazione (DD)	
	\bar{M}_w (g/mol)	\bar{M}_w/\bar{M}_n	DD _{PEG}	DD _{bAPAE}
PHEA	67500	1.24	---	---
PHEA-g-PEG(A)	82410	1.2	1.9	---
PHEA-g-PEG(B)	95360	1.3	2.7	---
PHEA-g-PEG(C)	110800	1.3	4.4	---
PHEA-g-bAPAE	20921	1.41	---	34
PHEA-g-PEG(A)-g-bAPAE	25400	1.32	1.9	35
PHEA-g-PEG(B)-g-bAPAE	32100	1.35	2.7	36
PHEA-g-PEG(C)-g-bAPAE	34700	1.41	4.4	33

Come precedentemente osservato per altre reazioni di coniugazione di ammine con il PHEA, il peso molecolare subisce una riduzione significativa, a causa della condizione sperimentale utilizzata per raggiungere un alto grado di funzionalizzazione[223]. Questo fatto potrebbe essere dovuto all'utilizzo di una grande quantità di ammina (quattro volte rispetto alle unità ripetitive di PHEA) per eseguire la reazione di funzionalizzazione di PHEA con bAPAE, che potrebbe rompere alcuni legami ammidici nella catena principale. Non può essere escluso che questo dato possa derivare da una variazione conformazionale del copolimero ottenuto nel mezzo acquoso utilizzato come fase mobile per la SEC. In ogni caso è opportuno considerare che l'uso di materiali con basso peso molecolare è spesso preferito come vettore polimerico per complessare materiale genetico[204].

La funzionalizzazione del PHEA con bAPAE è stata effettuata sia al fine di fornire al polimero cariche positive in quantità modulabili, in modo da poterlo utilizzare come vettore di materiale genetico, sia al fine di conferirgli di conferirgli una capacità tamponante, caratteristica principale per un vettore genetico, al fine di aumentare la possibilità di sfruttare *l'endosomal escape*, una volta interiorizzato dalle cellule, grazie al proton sponge effect [204][224].

Il comportamento tampone del copolimero PHEA-g-bAPAE è stato studiato mediante una titolazione acido-base. Il profilo di titolazione è stato ottenuto anche per PHEA o bAPAE, in dispersioni acquose, a concentrazioni ugualmente presenti nella dispersione di PHEA-g-bAPAE.

Come è possibile notare nel grafico in Figura 28, il copolimero PHEA-g-bAPAE mostra una capacità tamponante nell'intervallo di pH compreso tra 7.4 (pH extracellulare e citoplasmatico) e 5.1 (pH endosomiale/lisosomiale), importante per l'endosomal escaping tramite proton sponge effect [204], [224], [225]. Inoltre, il profilo di titolazione PHEA-g-bAPAE risulta abbastanza sovrapponibile a quello ottenuto dalla titolazione della bAPAE libera.

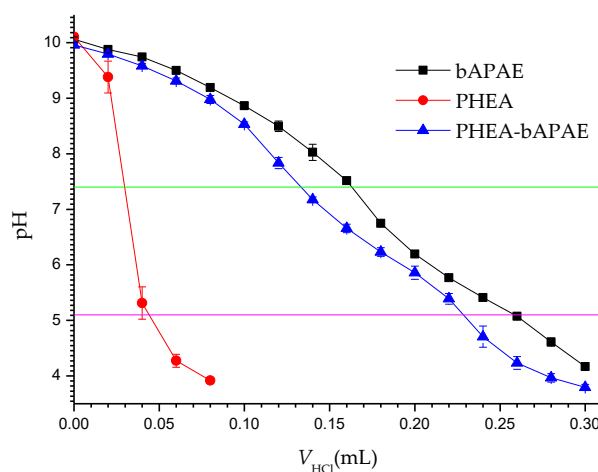


Figura 28 Profilo acido-base (pH vs volume di HCL) dei copolimeri PHEA-g-bAPAE (blu), PHEA (rosso) e delle catene di bAPAE(nero) (Dati riportati come media di 3 esperimenti differenti).

Al contrario, la curva di titolazione della dispersione di PHEA ha mostrato una rapida riduzione del valore del pH, suggerendo, come previsto, nessuna capacità di buffering. Questo risultato indica che la coniugazione dell'ammina conferisce al copolimero la capacità tamponante dell'ammina stessa.

È stata eseguita un'ulteriore titolazione potenziometrica per determinare le costanti K_a ; la curva ottenuta per la retrotitolazione è stata elaborata utilizzando il software Origin secondo il metodo De Levie per gli equilibri acido-base degli acidi e basi poliprotici, tenendo conto delle correzioni dell'*attività* attraverso l'espressione di Davies (1) [226]–[228] :

$$\log y = -0,5\left(\frac{\sqrt{I}}{1+\sqrt{I}} - 0,3I\right) \quad (1)$$

dove y è il coefficiente di attività e I è la forza ionica.

Per questa titolazione, la funzione di *curve fitting* ottenuta è la seguente (2):

$$V_B = - \frac{V_0[C_0(3\alpha_3+2\alpha_2+\alpha_1)+\Delta]+V_A(\Delta-C_A)}{\Delta+C_B} \quad (2)$$

$$\Delta = C_{H^+} - \frac{K_W}{C_{H^+} \cdot y^2} + C_B \quad (3)$$

dove V_B e C_B sono rispettivamente il volume e la molarità di NaOH utilizzato per la retrotitolazione, V_0 è il volume di NaCl utilizzato per dissolvere PHEA-g-bAPAE, C_0 è la molarità dell'analita, V_A e C_A sono rispettivamente il volume e la molarità di HCl utilizzati per la titolazione diretta, mentre $\alpha_3, \alpha_2, \alpha_1$ sono i gradi di protonazione, K_W è la costante di dissociazione dell'acqua e C_{H^+} è la concentrazione di H^+ .

Il profilo di titolazione e la funzione di *curve fitting* sono riportati in Figura 29.

I valori di pK_{a1} , pK_{a2} e pK_{a3} sono stati ottenuti dall'analisi del fitting della curva e sono, rispettivamente, pari a 4.8, 7.9 e 10.9.

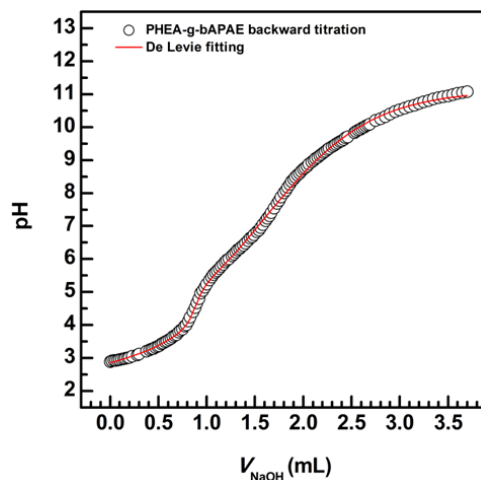


Figura 29 Retrotitolazione acido-base (pH versus Volume di NaOH) del copolimero PHEA-g-bAPAE e curve fitting del modello De Levie.

La conoscenza delle costanti acide ha permesso di poter studiare il grado di protonazione del copolimero in funzione del pH.

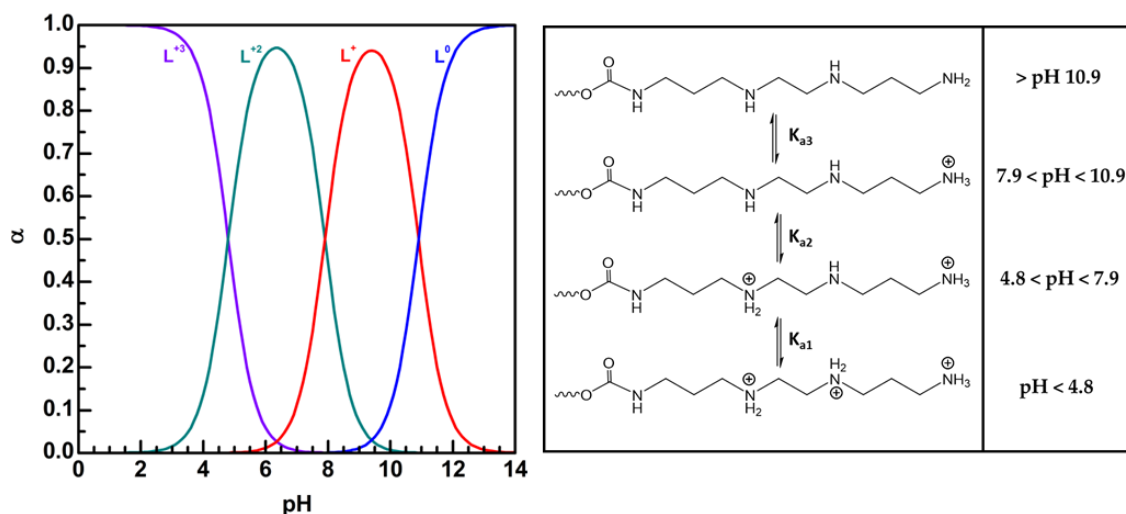


Figura 30 Curve di speciazione (α versus pH) ottenute per ogni stato di protonazione del copolimero PHEA-g-bAPAE (sinistra) e stato di protonazione del copolimero PHEA-g-bAPAE a differenti pH.

Come mostrato nella Figura 30, a pH 7.4 le specie di diprotonate (L^{+2}) sono le più presenti, mentre, man mano che il valore di pH del mezzo diminuisce, la quantità di specie di triprotonate (L^{+3}) inizia ad aumentare, fino a diventare le specie per lo più presenti ad un valore di pH di circa 4.5. La limitata protonazione a pH 7.4 è ragionevolmente spiegata dalla repulsione elettrostatica in forma di-protonata di unità 1,2-diamminoetano conosciuta come *effetto butano* (interazione a 3 legami)[229].

Questo comportamento potrebbe determinare un diverso effetto del copolimero sulle membrane biologiche in dipendenza dal pH del mezzo, cioè sulle membrane citosoliche a pH 7.4 e sulle membrane endosomiali a pH, dimostrato nel nostro prossimo studio.

3.1.2 Effetto pH dipendente sulle membrane biologiche del copolimero PHEA-g-bAPAE

Una volta evidenziata la capacità tamponante del copolimero, l'effetto dello stesso sulle membrane cellulari è stato valutato in funzione del pH del mezzo, cioè in base alla quantità di ammine protonate sulla sua struttura, imitando il citosol (pH 7.4) e il compartimento endosomiale (pH 5).

Pertanto, è stato condotto uno studio in vitro utilizzando cellule bronchiali umane (16HBE) come modello di membrane biologiche ed incubando queste cellule in presenza di copolimero PHEA-g-bAPAE in una dispersione acquosa a due diversi valori di pH del mezzo disperdente: 7.4 e 5. Il Trypan blu è usato nelle analisi biologiche come sonda per distinguere al microscopio le cellule sane da quelle che sono morte o in stato apoptotico, in quanto è una sonda in grado di entrare nelle cellule solo quando le membrane cellulari sono destabilizzate; per tale motivo è stato scelto come sonda per questo studio.

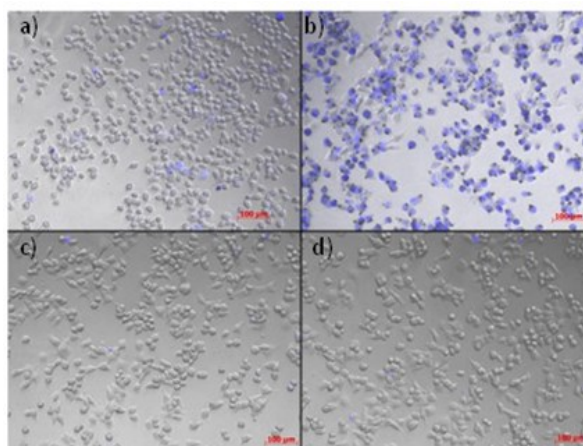


Figura 31 Immagini al microscopio di cellule 16HBE trattate nei seguenti modi: a) PHEA-g-bAPAE in DPBS pH 7.4, b) PHEA-g-bAPAE in MES 20mM pH 5 (isotonizzato con NaCl 130 mM); c) DPBS pH 7.4; d) MES 20mM pH 5 (isotonizzato con NaCl 130 mM).

Dopo un'incubazione di 20 minuti, le cellule sono state trattate con Trypan blue e le immagini sono state registrate e riportate nella Figura 31. Come mostrato in figura, una notevole destabilizzazione della membrana cellulare si verifica solo quando le cellule sono trattate con PHEA-g-bAPAE a pH 5 (Figura 31 b)), come dimostrato dal fatto che il Trypan blu ha libero accesso alla maggior parte delle cellule presenti nel pozzetto. Questo fenomeno è dovuto al

fatto che a pH 5, la maggior parte delle specie polimeriche in soluzione sono nello stato diprotonato (60%) e nello stato triprotonato (40%), mentre a pH 7.4 la maggior parte delle specie polimeriche in soluzione sono nello stato diprotonato (75%) e nello stato monoprotonato (25%), come mostrato nella Figura 30.

Per confermare questo risultato, è stata eseguita una quantificazione della quantità di Tripan blue mediante spettrofotometria ultravioletta e i valori ottenuti sono riportati nella Figura 32; i dati hanno mostrato la massima assorbanza quando le cellule sono trattate con PHEA-g-bAPAE, a pH 5. Anche se la quantificazione non riflette lo stesso comportamento osservato nelle immagini al microscopio, i risultati sono comunque in accordo con quanto ipotizzato, cioè un effetto destabilizzante del copolimero PHEA-g-bAPAE sulla membrana cellulare in funzione del pH.

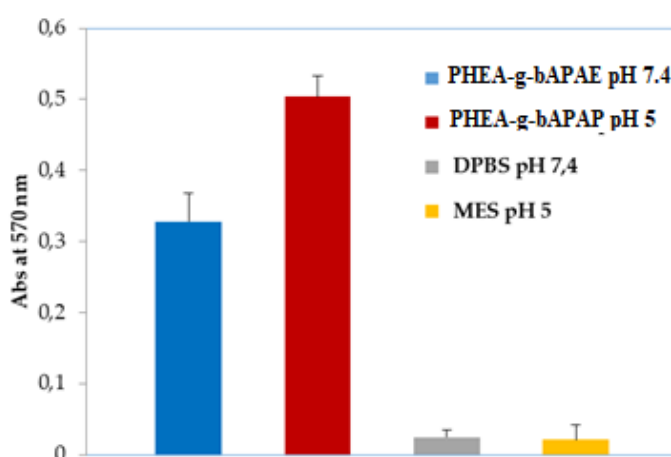


Figura 32 Assorbanza misurata a 570 nm (trypan blue) su lisato di 16HBE trattate con una dispersione di PHEA-g-bAPAE a differenti pH (Dati riportati come media di 3 esperimenti differenti).

3.1.3 Coniugazione con polietilenglicole(PEG)

La possibilità di utilizzare come polimero di partenza un materiale che può essere facilmente modificato mediante coniugazione con molecole appropriate è certamente un vantaggio nei casi in cui è necessario tenere conto della peculiarità del materiale da trasportare e delle barriere da superare dopo somministrazione in vivo. Lo scopo del presente lavoro è stato quello di sviluppare un polimero in grado di complessasse il siRNA per formare poliplessi da somministrare per inalazione e quindi localmente al polmone.

Il polietilenglicole (PEG) rappresenta un materiale adeguato a influenzare le proprietà del coniugato risultante, grazie alle loro proprietà come l'idrofilia e la biocompatibilità [230].

Nella maggior parte dei casi, la peghilazione dei poliplessi comporta il conferimento di proprietà stealth ed una riduzione della tossicità. Tuttavia, questi miglioramenti sono spesso

associati a una riduzione della capacità di complessazione di siRNA, comportando l'utilizzo di una maggiore quantità di polimero[204].

Per minimizzare potenzialmente il fenomeno di aggregazione tra i poliplessi e le interazioni con i componenti del muco dei polmoni, vale a dire la mucina, il PHEA è stato funzionalizzato con polietilenglicole (PEG) per ottenere il copolimero PHEA-g-PEG. È noto da studi precedenti che la capacità di penetrazione del muco dei vettori colloidali attraverso lo strato di muco è correlata al grado di peghilazione (DD_{PEG})[230]. Il copolimero PHEA-g-PEG-g-bAPAE è stato sintetizzato tramite due steps di reazione. Nella prima fase, il PHEA è stato lasciato reagire con molecole di PEG ($CH_3O-PEG-NH_2$) usando DSC come agente di coniugazione; mentre, nella seconda fase, il PHEA-g-PEG recuperato è stato lasciato reagire con bAPAE usando BNFC come agente di coniugazione. La rappresentazione schematica di entrambi i passaggi è riportata nelle Figure 27b e 27c.

Al fine di ottenere copolimeri con un diverso grado di peghilazione e valutare l'effetto delle quantità di PEG sulle interazioni dei poliplessi risultanti con la mucina, tre diversi valori teorici di rapporto molare tra molecole $CH_3O-PEG-NH_2$ ed unità ripetitive di PHEA ($R_1 = 0.03, 0.075$ e 0.12) sono stati usati per eseguire la reazione, ottenendo così tre diversi copolimeri PHEA-g-PEG con gradi crescenti di derivatizzazione (DD_{PEG} mol%): 1.9, 2.7 e 4.4 mol%, denominati rispettivamente PHEA-g-PEG(A), PHEA-g-PEG(B) e PHEA-g-PEG(C).

I valori DD sono stati calcolati mediante analisi ^1H-NMR come rapporto tra l'integrale dei segnali corrispondente ai protoni dell'unità ripetitiva di PEG (a δ 3.60 ppm), con l'integrale dei protoni corrispondenti a 2H dell'unità ripetitiva PHEA (a δ 3.24 ppm).

Tutti i copolimeri PHEA-g-PEG ottenuti sono stati caratterizzati in termini peso molecolare medio ponderale (\bar{M}_w) e indice di polidispersità (\bar{M}_w/\bar{M}_n) e i valori ottenuti sono riportati nella tabella 2, insieme alla composizione chimica espressa come DD_{PEG} . L'aumento del \bar{M}_w copolimero è conforme al valore teorico calcolato considerando il valore iniziale \bar{M}_w del PHEA e il DD_{PEG} di ciascun copolimero.

Nella seconda fase, i copolimeri PHEA o PHEA-g-PEG (A) - (C) sono stati ulteriormente funzionalizzati con bAPAE utilizzando BNFC, ottenendo un DD_{bAPAE} di ciascun copolimero PHEA-g-PEG-g-bAPAE di circa 35 mol %. Quest'ultimo è stato calcolato mediante analisi ^1H-NMR come riportato in precedenza per il copolimero PHEA-g-bAPAE. Lo spettro tipico ^1H-NMR di un copolimero PHEA-g-PEG-g-bAPAE è riportato in Figura 30.

Il DD_{bAPAE} mol% ottenuto è stato anche confermato dal dosaggio colorimetrico TNBS, che fornisce un valore DD% sovrapponibile a quello ottenuto dall'analisi ^1H-NMR . Tutti i copolimeri ottenuti sono stati caratterizzati in termini di peso molecolare medio ponderale (\bar{M}_w) e indice di polidispersità (\bar{M}_w/\bar{M}_n) e i valori ottenuti sono riportati nella tabella 2, insieme alla

composizione chimica espressa come DD_{PEG} e DD_{bAPAE} mol%. In questo caso, la riduzione del \bar{M}_w di ciascun copolimero di partenza PHEA-g-PEG è in accordo con quanto precedentemente descritto per PHEA a seguito della reazione con l'ammina bAPAE. Inoltre, le differenze tra i valori sperimentali e teorici \bar{M}_w dei copolimeri PHEA-g-PEG-g-bAPAE potrebbero essere attribuite a modifiche conformazionali dei copolimeri ottenuti nel mezzo acquoso, usato come fase mobile per l'analisi SEC, a seconda della quantità di PEG coniugata.

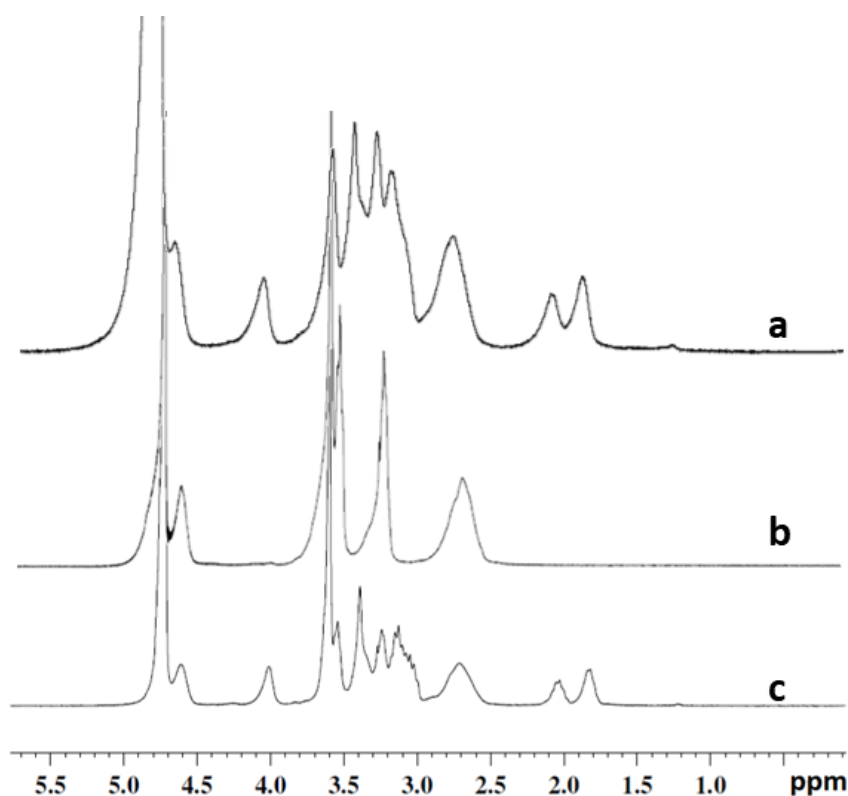


Figura 33 Spettri $^1\text{H-NMR}$ dei copolimeri a) PHEA-g-bAPAE(D_2O pH 5), PHEA-g-PEG(C)(D_2O) e PHEA-g-PEG(C)-g-bAPAE(D_2O pH 5).

3.1.4 Valutazione della vitalità cellulare

Considerando la potenziale applicazione dei copolimeri PHEA-g-bAPAE e PHEA-g-PEG-g-bAPAE come materiale di partenza per realizzare una formulazione per la somministrazione polmonare di siRNA, la citocompatibilità di tutti i copolimeri è stata valutata tramite saggio MTS su Cellule 16HBE a diverse concentrazioni, dopo 24 e 48 ore di incubazione. I risultati sono mostrati nelle Figura 34a e 34b.

Come si può vedere, anche dopo 48 ore di incubazione, tutti i copolimeri hanno mostrato una buona citocompatibilità a tutte le concentrazioni testate, mostrando una vitalità cellulare superiore all'80% rispetto all'esperimento di controllo, in cui le cellule sono incubate solo con DMEM.

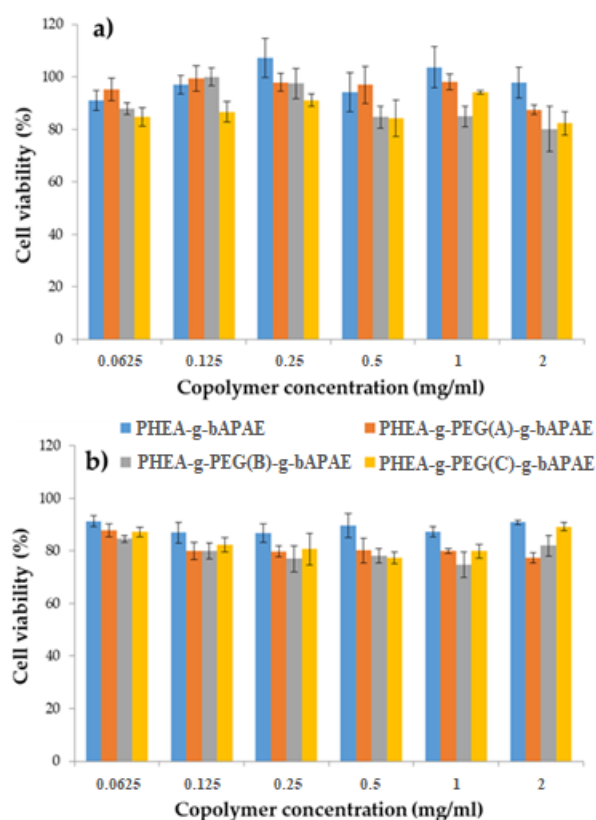


Figura 34 Vitalità cellulare dopo 24 (a) e 48 (b) ore di incubazione con i copolimeri sintetizzati (Dati riportati come media di 3 esperimenti differenti).

3.1.5 Studi di complessazione e caratterizzazione dei poliplessi

I copolimeri ottenuti, PHEA-g-bAPAE, PHEA-g-PEG(A)-g-bAPAE, PHEA-g-PEG(B)-g-bAPAE e PHEA-g-PEG(C)-g-bAPAE, possiedono nella loro struttura chimica una quantità uguale di ammina (circa il 35% in moli) ed una quantità crescente PEG (circa 0, 1.9, 2.7 e 4.4% in moli), che potrebbero ridurre la capacità dei poliplessi di interagire con i componenti del muco, ma allo stesso tempo, la capacità di interagire elettrostaticamente con siRNA e di essere interiorizzati dalle cellule target. Per questo motivo, per ogni copolimero sintetizzato è stata valutata la capacità di complessazione del siRNA. Come siRNA terapeutico, è stato scelto un siRNA in grado di ridurre l'espressione di STAT6, che regola la produzione di citochine Th2 e funzioni effettrici mediate dalle citochine Th2, che sembrano avere un ruolo importante nel meccanismo che avvia un attacco asmatico[231].

Per capire se ciascun copolimero sintetizzato può legare elettrostaticamente molecole di siRNA, sono stati condotti studi di complessazione. Per fare ciò, sono stati miscelati volumi uguali di due dispersioni, una contenente siRNA a concentrazione fissa e l'altra contenente una concentrazione crescente di ciascun copolimero, al fine di ottenere diversi rapporti peso (R) polimero / siRNA compresi tra 1 e 5. Per valutare la formazione di complessi stabili, è stata eseguita un'elettroforesi su gel di agarosio; i risultati sono riportati in Figura 35.

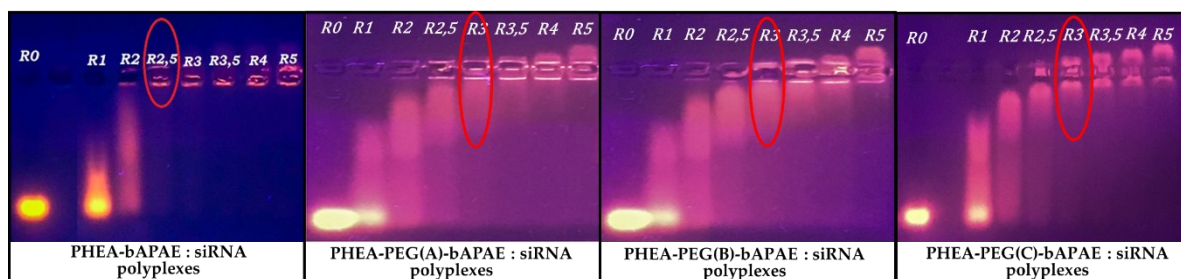


Figura 35 Elettroforesi in gel di agarosio dei poliplessi ottenuti in HEPES 10 mM a vari rapporti in peso copolimero / siRNA (R).

Come si può vedere, ciascun copolimero PHEA-g-PEG-g-bAPAE è stato in grado di ritardare la corsa elettroforetica delle molecole di siRNA a partire da un R pari a 3; d'altra parte, PHEA-g-bAPAE è stato in grado di ritardare la corsa elettroforetica delle molecole di siRNA a partire da un R pari a 2.5. Questa differenza è probabilmente dovuta al fatto che le stesse quantità (in peso) di copolimeri PHEA-g-bAPAE e PHEA-g-PEG-g-bAPAE contengono una diversa quantità di gruppi amminici, che sono più alti in PHEA-g-bAPAE a causa dell'assenza di catene PEG nel backbone polimerico. In effetti, se si considera il rapporto N/P, si avrà che il copolimero PHEA-g-bAPAE blocca la corsa del siRNA a N/P pari a 3.5, mentre per PHEA-g-PEG(A)-g-bAPAE, PHEA-g-PEG(B)-g-bAPAE e PHEA-g-PEG(C)-g-bAPAE tale effetto si ha in rapporti N/P di 3.5, 3.4 e 3 rispettivamente. Tale risultato indica che i copolimeri peghilati sono stati in grado di ritardare la corsa elettroforetica delle molecole di siRNA con rapporti N/P uguali o inferiori rispetto al copolimero PHEA-g-bAPAE e che aumentando la quantità di PEG questo comportamento migliora. In tutti i casi, la quantità di polimero necessaria per fermare la corsa elettroforetica del siRNA è piuttosto bassa se confrontata con altri copolimeri sintetici proposti come vettori non virali per la terapia con siRNA [204].

Al fine di confermare questi risultati, sono state misurate le dimensioni medie, il PDI ed il potenziale ζ dei poliplessi ottenuti a diversi R (compresi tra 1 e 10); i dati ottenuti sono riportati nella Figura 36.

Come previsto, per i poliplessi ottenuti con PHEA-g-bAPAE, viene registrato un potenziale negativo per il rapporto in peso più basso; il potenziale aumenta quindi all'aumentare di R, fino al punto di invertirsi. Per quanto riguarda il profilo dimensionale, vengono misurate dimensioni maggiori dei poliplessi quando questi presentano un potenziale vicino alla neutralità, mentre quando il potenziale aumenta si osserva una riduzione delle dimensioni; questo fenomeno è dovuto al fatto che quando il potenziale è prossimo allo zero, si verificano fenomeni di aggregazione tra i poliplessi, mentre quando il potenziale si discosta dalla neutralità, i fenomeni di repulsione causano una riduzione di questa aggregazione. Per i poliplessi ottenuti con copolimeri peghilati, viene registrato un comportamento leggermente diverso. Innanzitutto, per

quanto riguarda il potenziale, non vi sono valori elevati anche per i rapporti di peso più elevati, ma si osservano valori costanti nella regione di neutralità; questo fenomeno aumenta gradualmente con l'aumento della quantità di PEG presente nel backbone polimerico. Questo comportamento è probabilmente dovuto alla capacità delle catene PEG di formare uno shell idrofilo che scherma le cariche superficiali. Ma allo stesso tempo, questo guscio provoca una riduzione dei fenomeni di aggregazione; infatti, non si registrano grandi dimensioni per ogni R e comunque tali valori risultano abbastanza costanti, in particolare per i poliplessi ottenuti con PHEA-g-PEG (C) -g-bAPAE, dove la quantità di PEG è maggiore. Pertanto, la presenza di PEG nel copolimero consente di ottenere poliplessi che non aggregano pur mantenendo una carica vicina alla neutralità.

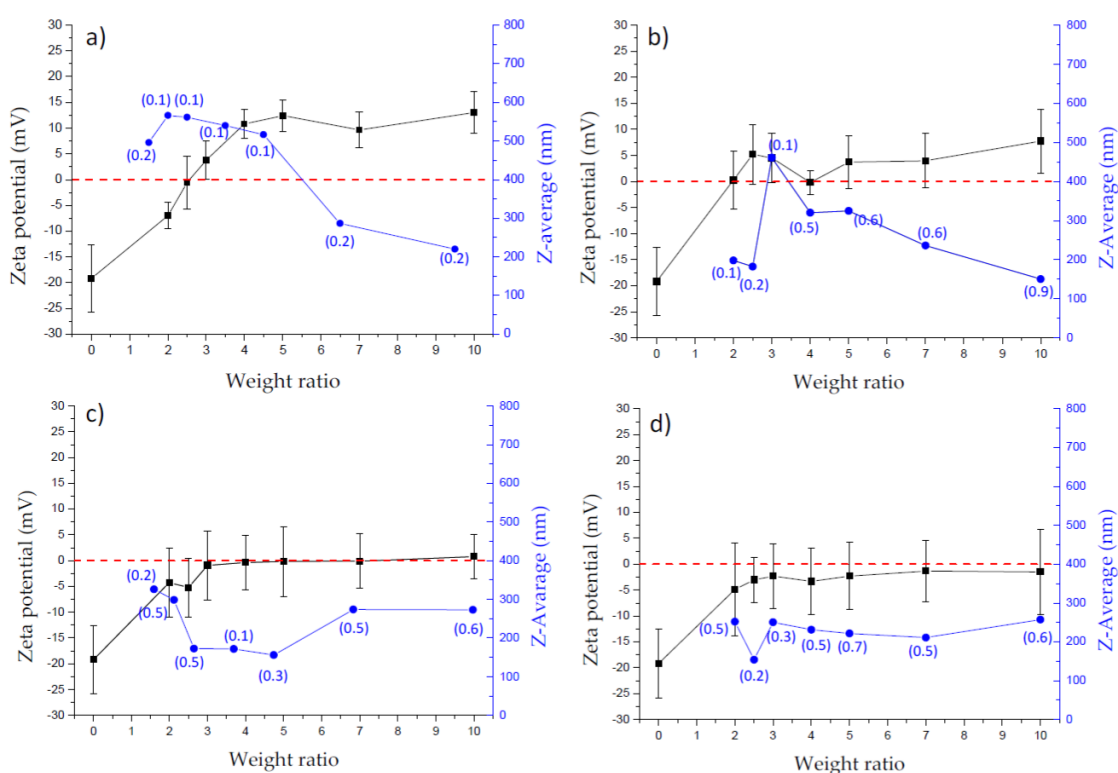


Figura 36 Z-Average (blu), PDI (valori inclusi tra parentesi) e potenziale zeta (nero) dei poliplessi formati da siRNA e dai copolimeri: a) PHEA-g-bAPAE; b) PHEA-g-PEG(A)-g-bAPAE; c) PHEA-g-PEG(B)-g-bAPAE; d) PHEA-g-PEG(C)-g-bAPAE a R compresi tra 1 e 10 (Dati riportati come media di 3 esperimenti differenti).

3.1.6 Studi di interazione dei poliplessi con la mucina

Essendo i poliplessi progettati per essere somministrati per via inalatoria, è stato necessario valutare se questi siano in grado di interagire con la mucina e se la presenza di PEG nella struttura del copolimero può influenzare efficacemente queste interazioni, dato che lo strato di muco rappresenta la barriera principale che le particelle inalate devono superare.

Il primo studio è stato condotto considerando che, data la natura polianionica della mucina (a causa della presenza di residui di acido sialico), può verificarsi uno scambio polianionico tra siRNA e mucina. Pertanto, è stato condotto uno studio valutando la mobilità elettroforetica del siRNA nei poliplessi in presenza di mucina nel mezzo di dispersione. In particolare, lo studio è stato condotto in presenza di mucina a una concentrazione di 1 mg mL^{-1} , incubando per 2 e 5 ore. Le immagini ottenute per $R = 5$ e 10 sono riportate nella Figura 37.

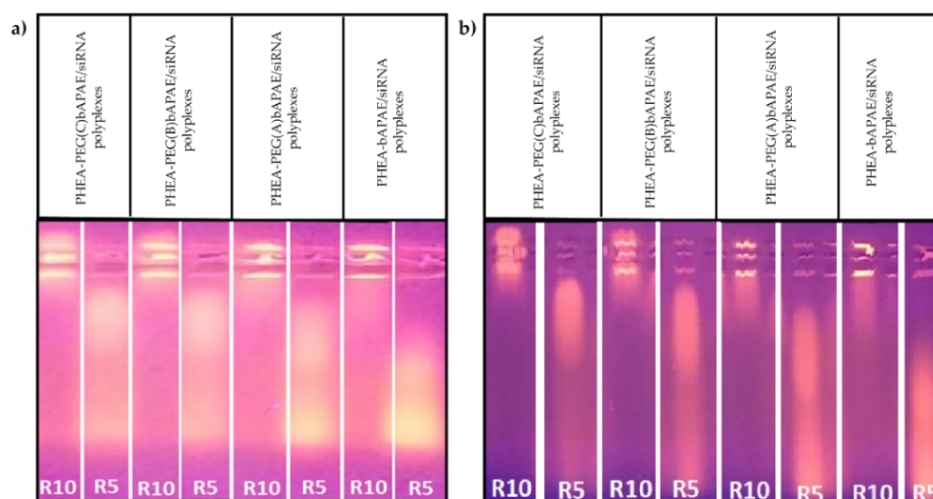


Figura 37 Gel retard assay in presenza di mucina, dopo 2 h (a) e 5h (b).

Come mostrato, per tutti i poliplessi non si verifica lo scambio polianionico tra siRNA e mucina solo al rapporto in peso più elevato ($R = 10$).

Pertanto, la mucina si dimostra capace di destabilizzare il sistema se non viene utilizzata una quantità di polimero elevata.

Al fine di ottenere maggiori informazioni sull'interazione specifica di ciascun copolimero, che forma il poliplesso, con la mucina, è stata condotta un'analisi turbidimetrica a tre diversi valori R (3, 5 e 10) in funzione del tempo di incubazione, considerando che il verificarsi interazioni *poliplessi-mucine*, comporta una riduzione della trasmittanza della dispersione. I dati, riportati nelle Figure 38 a-d, sono espressi come percentuale di trasmittanza (rispetto alla trasmittanza di una dispersione di mucina 1 mg mL^{-1}) in funzione del tempo di incubazione.

Come si può vedere, i poliplessi ottenuti con PHEA-g-bAPAE hanno mostrato un comportamento muco-adesivo, specialmente quando il valore del rapporto in peso R aumenta. La dipendenza da R è anche mostrata dai poliplessi ottenuti con i copolimeri peghilati. D'altra parte, per i poliplessi peghilati, la capacità di interazione con la mucina diminuisce quando la quantità di PEG nel backbone polimerico aumenta a tutti i valori R selezionati. I poliplessi ottenuti con PHEA-g-PEG(C)-g-bAPAE sembrano non essere sensibili alla presenza di mucina, mostrando valori di trasmittanza elevati a tutti i tempi di incubazione anche a concentrazione

più elevata (corrispondente a $R = 10$), che, come visto precedentemente, rappresenta anche il rapporto in peso minimo per evitare lo scambio polianionico siRNA-mucina.

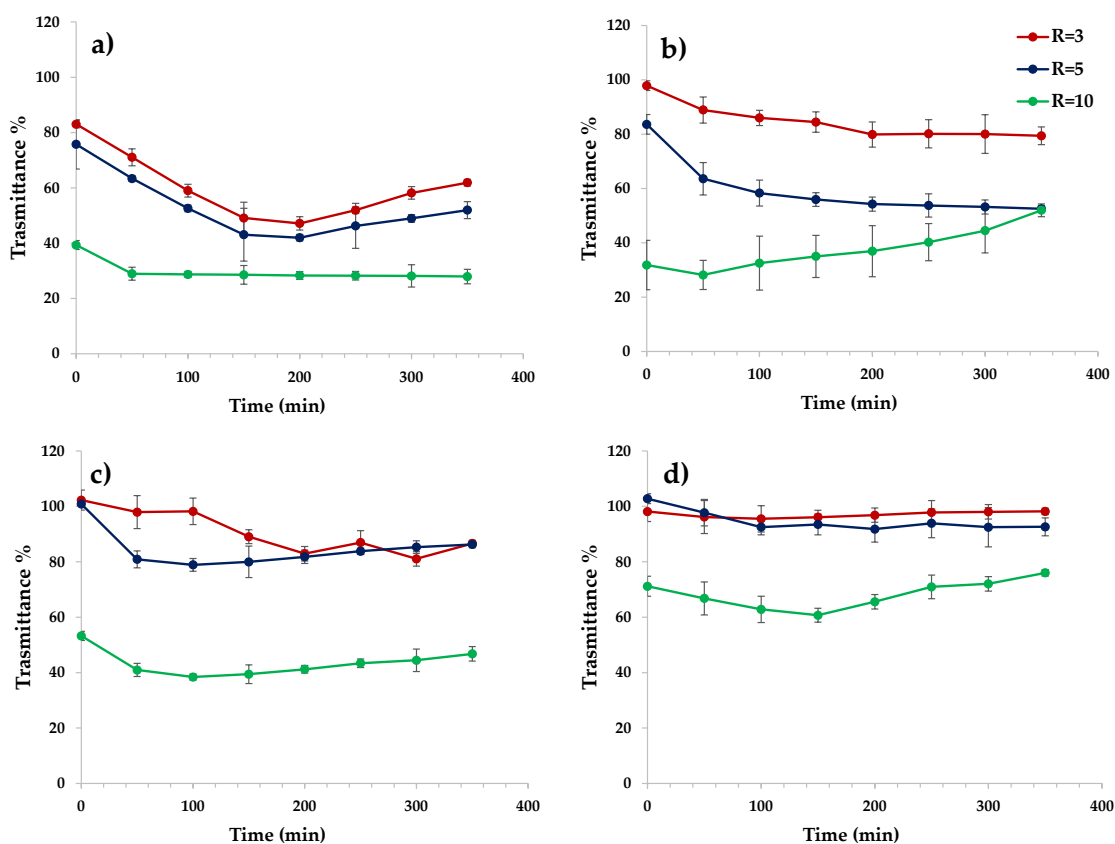


Figura 38 Analisi turbidimetrica. Trasmittanza a 500nm di dispersioni contenenti mucina in presenza di poliplessi formati da siRNA e dai copolimeri: a) PHEA-g-bAPAE; b) PHEA-g-PEG(A)-g-bAPAE; c) PHEA-g-PEG(B)-g-bAPAE; d) PHEA-g-PEG(C)-g-bAPAE, a R uguali a 3, 5, 10 (Dati riportati come media di 3 esperimenti differenti).

3.1.7 Saggio di silenziamento genico

Una volta dimostrato che questi poliplessi sono potenzialmente somministrati per via polmonare, è stata valutata la loro capacità di consentire l'internalizzazione cellulare. In particolare, la capacità di silenziamento genico dei poliplessi ottenuti è stata valutata mediante test ELISA in vitro su cellule 16HBE. Le cellule sono state trattate con: a) siRNA nudo e b) poliplessi ottenuti con ciascun copolimero e con tre R diversi, e quindi esposti a un agente infiammatorio (LPS). La produzione relativa di IL-4 (percentuale) è stata espressa come $(\text{Abs cellule trattate} / \text{Abs cellule del controllo positivo}) \times 100$. I valori ottenuti sono riportati nella Figura 39.

I risultati ottenuti mostrano che le cellule incubate con siRNA nudo producono una quantità di IL-4 non significativamente diversa da quella ottenuta con le cellule di controllo. Quando le

cellule vengono incubate in presenza di poliplessi, c'è una riduzione dell'espressione di IL-4 in tutti i casi, anche se non in modo massiccio.

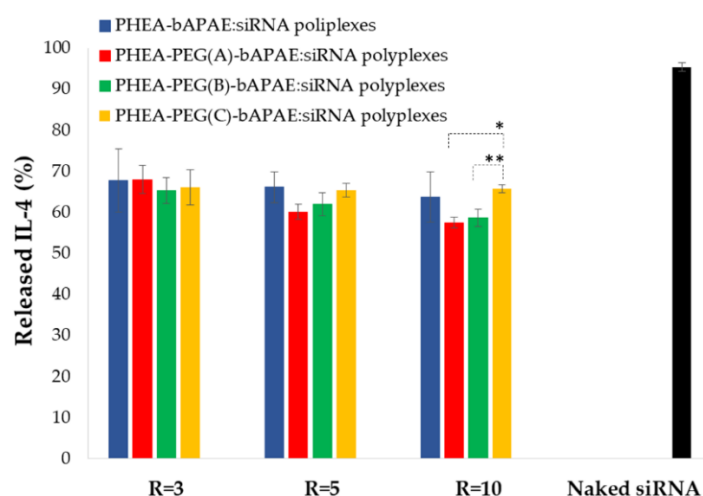


Figura 39 Rilascio % di IL-4 da 16HBE dopo trattamento con i poliplessi o con siRNA libero dopo 48 ore, rispetto al controllo positivo (* $p < 0.01$; ** $p < 0.001$) (Dati riportati come media di 3 esperimenti differenti).

Tuttavia, questo esperimento ha dimostrato che il vettore polimerico ha un ruolo fondamentale nel trasporto cellulare e nell'assorbimento di siRNA. Un altro importante risultato è dato dal fatto che la presenza di PEG non sembra ostacolare l'assorbimento cellulare dei poliplessi, come riscontrato per altri vettori polimerici non virali peghilati per siRNA[204]. Tuttavia, a $R = 10$, tra i poliplessi peghilati, la capacità di silenziamento genico è inversamente correlata alla quantità di PEG in modo significativo, mentre ad altri R non si osservano differenze significative.

3.1.8 Conclusioni

In questo lavoro, è stato progettato un copolimero portante in catena laterale oligoammine in grado di protonarsi e formare così dei policationi capaci di veicolare e rilasciare siRNA a livello bronchiale nel trattamento dell'asma. Come polimero di partenza è stato scelto di utilizzare il PHEA, polimero altamente funzionalizzabile, mentre come molecola da coniugare in catena laterale, capace di conferire le caratteristiche necessarie per ottenere un vettore di materiale genetico, è stata scelta un'oligoammina, il bAPAE. Quest'ultima è stata legata in una quantità adeguata per mezzo di una reazione facile da riprodurre. Poiché l'idea iniziale è stata quella di una somministrazione dei poliplessi direttamente al polmone, per via inalatoria, il vettore polimerico è stato opportunamente funzionalizzato con quantità variabili di PEG, poiché, come largamente noto, quest'ultimo è in grado di modulare l'idrofilia, schermare la carica dei materiali e conferire la capacità di penetrare attraverso uno strato di muco.

Tutti i copolimeri ottenuti, peghilati o meno, sono stati in grado di complessare il siRNA terapeutico a rapporti di peso relativamente bassi (R pari a 3), dando complessi nanometrici con una tendenza all'aggregazione inversamente proporzionale al grado di peghilazione. Questi poliplessi sembrano essere destabilizzati in presenza di mucina, realizzando sia uno scambio polianionico con il siRNA per rapporti in peso R bassi, e danno parziali interazioni con le mucine. Tuttavia, quest'ultime interazioni diminuiscono in funzione della quantità di PEG coniugato al backbone polimerico, risultando ridotta per i poliplessi ottenuti con PHEA-g-PEG(C)-g-bAPAE. Inoltre, la complessazione del siRNA con tutti i copolimeri sintetizzati aumenta significativamente la capacità di internalizzare il siRNA da parte di cellule dell'epitelio bronchiale. Pertanto, il copolimero PHEA-g-PEG(C)-g-bAPAE possiede un potenziale interessante come vettore di siRNA polmonare, non interagendo con le mucine e in grado di fornire poliplessi neutri con dimensioni abbastanza costanti in una vasta gamma di rapporto in peso. Inoltre, la performance del copolimero PHEA-g-PEG(C)-g-bAPAE, come vettore di siRNA, potrebbe migliorare introducendo nella struttura del copolimero altre frazioni come i *Cell Penetrating Peptide* (CPP), in grado di migliorare l'internalizzazione cellulare dei poliplessi.

3.2 Sviluppo di un nanocomplessi funzionalizzati con peptide TAT per la veicolazione inalatoria di siRNA nella terapia antiasmatica

3.2.1 Sintesi e caratterizzazioni dei polimeri

Un nanosistema capace di veicolare siRNA nel tessuto bersaglio, deve essere in grado di legare e rilasciare il siRNA nel citosol delle cellule bersaglio, superando prima la membrana della cellula e successivamente quella endosomiale-lisosomiale.

I polimeri cationici (policationi) sintetici rappresentano, in linea di principio, candidati validi in questo campo, grazie al fatto che possono essere realizzati con proprietà strutturali e funzionali adeguate in grado di conferire caratteristiche specifiche necessarie per un vettore di materiale genetico[204].

Nel presente lavoro è stato sviluppato un derivato della α , β -poli (N-2-idrossietil)-D, L-aspartammide (PHEA), coniugando chimicamente al backbone polimerico del PHEA l'1,2-Bis (3-amminopropilammino)etano (bAPAE), ottenendo il copolimero graft PHEA-g-bAPAE. Ciò ha consentito di realizzare un copolimero avente in catena laterale ammine protonabili, le quali conferiscono la capacità di complessare il materiale genetico mediante interazioni elettrostatiche.

Considerando che lo scopo del presente lavoro è stato quello di sviluppare un polimero in grado di complessare il siRNA per formare poliplessi da somministrare per inalazione e quindi localmente al polmone, si è scelto di funzionalizzare il PHEA-g-bAPAE ottenuto con Polietilenglicole, in modo da minimizzare potenzialmente il fenomeno di aggregazione tra i poliplessi e le interazioni con i componenti del muco dei polmoni, essendo noto da studi precedenti che la capacità di penetrazione del muco dei vettori colloidali attraverso lo strato di muco è correlata al grado di peghilazione (DD_{PEG})[230].

Inoltre, considerando che i poliplessi ottenuti devono essere in grado anche di attraversare la barriera rappresentata dall'epitelio bronchiale, si è scelto di funzionalizzare i poliplessi in superficie con il peptide TAT, un *cell penetrating peptide* (CPP) [140], sfruttando una reazione del tipo *tiolo-ene*, che essendo classificabile come *click chemistry* è rapida, efficiente e non produce sottoprodotti.

La sintesi del copolimero PHEA-g-bAPA (Fig. 40 step a) ha comportato l'attivazione dei gruppi idrossilici del PHEA liberi con bis-nitrofenil carbonato (BNFC), scegliendo una stechiometria dei reagenti al fine di ottenere un rapporto tra le moli di BNFC e le moli di unità ripetitiva di PHEA pari a 0.6.

Usando questa strategia si è ottenuta una quantità adeguata di gruppi ossidrilici attivati in grado di reagire ulteriormente con le funzioni amminiche di bAPAE. Tuttavia, essendo utilizzata

un'oligoammina che presenta due gruppi amminici primari (-NH_2), è stato impiegato un largo eccesso di bAPAE nel secondo step della reazione, evitando così la reticolazione che potrebbe eventualmente realizzarsi a causa di un attacco nucleofilo multiplo delle catene laterali. In queste condizioni sperimentali è stato ottenuto un grado di derivatizzazione in bAPAE (DD_{bAPAE}) del copolimero PHEA-g-bAPAE di circa il 35% in moli. Quest'ultimo è stato calcolato mediante analisi $^1\text{H-NMR}$ (Fig. 30 spettro a) usando il rapporto tra l'integrale dei segnali corrispondente a 4H di bAPAE (a δ 1.70 e 2.20 ppm), e l'integrale del segnale corrispondente a 2H di unità ripetitiva PHEA (a δ 2.73 ppm); questo dato è stato anche confermato dal saggio colorimetrico TNBS, che fornisce un valore DD% sovrapponibile a quello ottenuto dall'analisi $^1\text{H-NMR}$ [222].

L'avvenuta coniugazione di 1,2-Bis(3-amminopropilammino)etano (bAPAE) è stata dimostrata anche dalla comparsa del segnale a circa δ 4.1, attribuito al CH_2 della catena laterale dell'unità ripetitiva PHEA funzionalizzata ($\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OCO-}$) vicino al legame OCONH .

Con riferimento al PEG, al fine di avere un gruppo disponibile per la reazione *tiolo-ene*, è stato introdotto un doppio legame $\text{C}=\text{C}$ al terminale del PEG, poiché essendo più esposto nella superficie del poliplesso, statisticamente risulta più disponibile all'attacco nucleofilo di un tiolo.

L'introduzione di un doppio legame al terminale del PEG (Fig. 40 step b) è stata condotta sfruttando la reattività del gruppo amminico terminale del PEG ($\text{NH}_2\text{-PEG-COOH}$) verso l'estere succinimmidico dell'acido 4-Maleimidobutirrico (MLB-NHS).

Inoltre, al fine di evitare l'attacco nucleofilo del gruppo amminico al doppio legame della maleimide, il pH della reazione è mantenuto intorno a 7 utilizzando DPBS come solvente di reazione.

L'avvenuta coniugazione è stata dimostrata mediante analisi $^1\text{H-NMR}$ (Fig.41); in particolare confrontando l'integrale dei picchi relativi alla porzione butirrica della MLB (a δ 1.87 e 2.27 ppm), ciascuno corrispondente a 2H, con l'integrale del picco relativo all'unità ripetitiva del PEG (a δ 3.72 ppm), corrispondente a 176H, si evince che la totalità del PEG è stata funzionalizzata con la porzione maleimmidica.

La coniugazione del PEG-MLB ottenuto al copolimero PHEA-g-bAPAE (Fig.40 step c) ha comportato dapprima l'attivazione del gruppo carbossilico del PEG-MLB mediante l'utilizzo di EDC ed NHS, mantenendo il pH della miscela di reazione intorno a 6, e successivamente l'attacco nucleofilo di alcuni gruppi amminici primari del copolimero PHEA-g-bAPAE all'estere succinimmidico del NHS-PEG-MLB, mantenendo il pH della miscela di reazione intorno a 7.

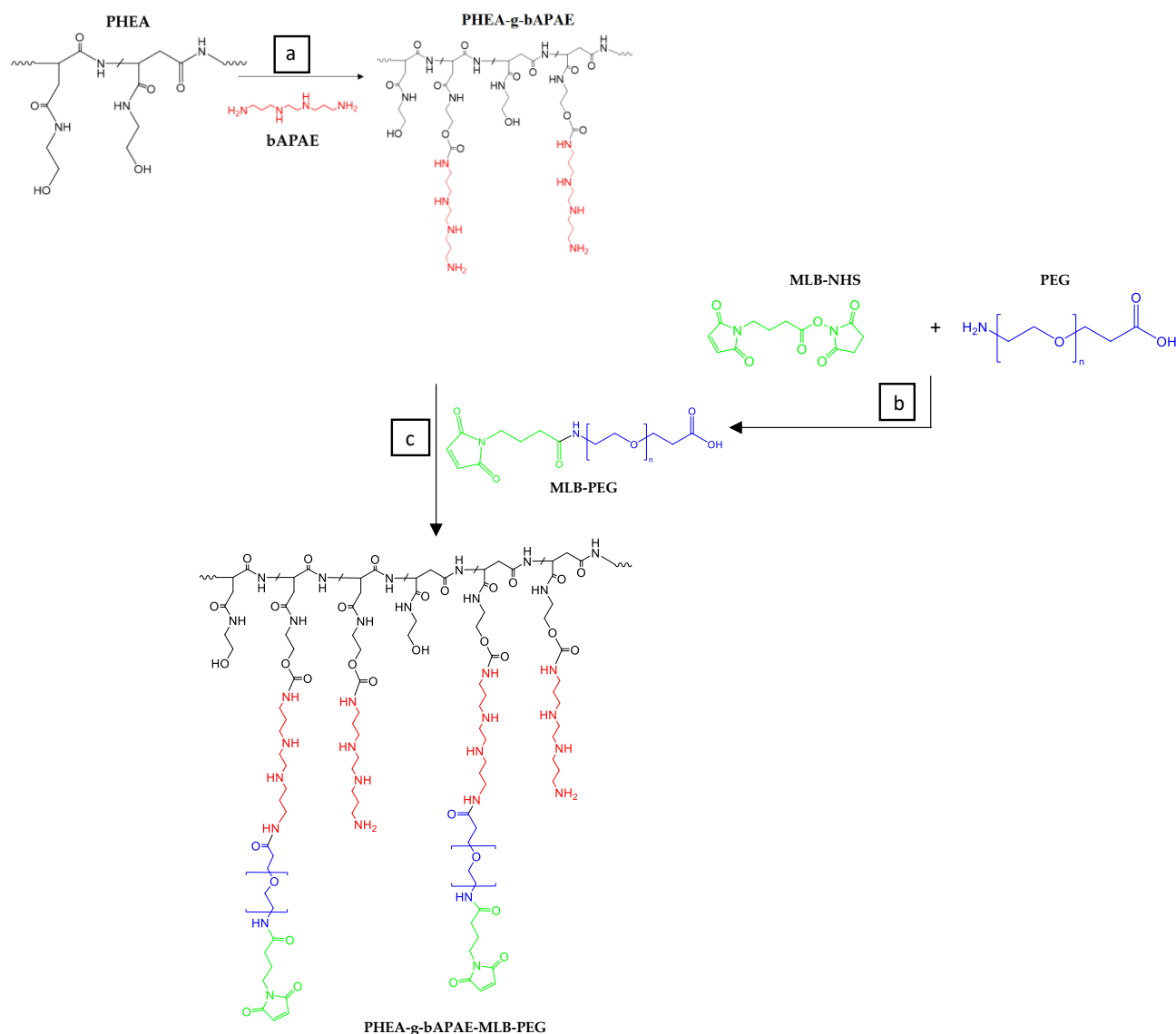


Figura 40 Schema di sintesi del copolimero PHEA-g-bAPAE (step a), PEG-MLB (step b) e PHEA-g-bAPAE-PEG-MLB. Reagenti e condizioni sperimentali: a) a-DMF, BNFC, 4h a 40°C, 20h a 25°C; b) DPBS overnight a 25°C; c) MES pH 6, EDC, NHS, 4h a 25°C, overnight a 25°C.

L'avvenuta coniugazione è stata dimostrata mediante analisi $^1\text{H-NMR}$ (Fig.42); in particolare il grado di derivatizzazione in PEG è stato calcolato ($\text{DD}\%_{\text{PEG}}$ 4.7) come rapporto tra l'integrale dei segnali corrispondente ai protoni dell'unità ripetitiva di PEG (a δ 3.60 ppm), con l'integrale dei protoni corrispondenti a 2H dell'unità ripetitiva PHEA (a δ 2.7 ppm).

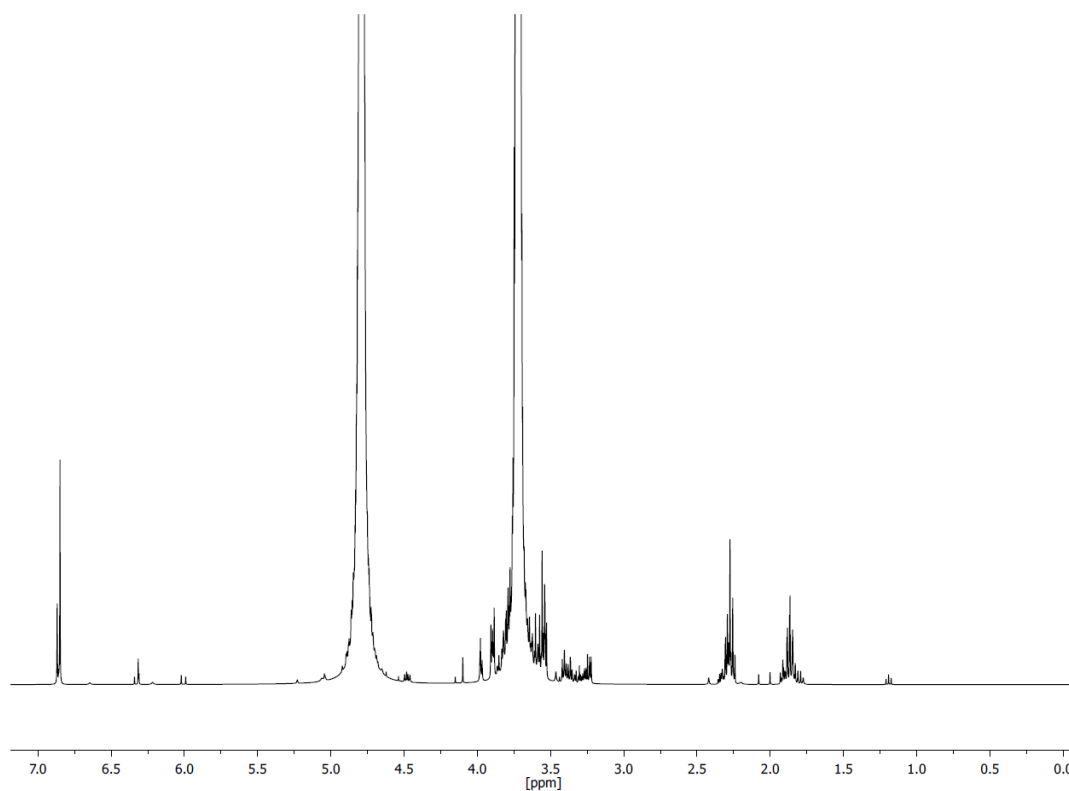


Figura 41 Spettro ^1H -NMR in D_2O del derivato PEG-MLB.

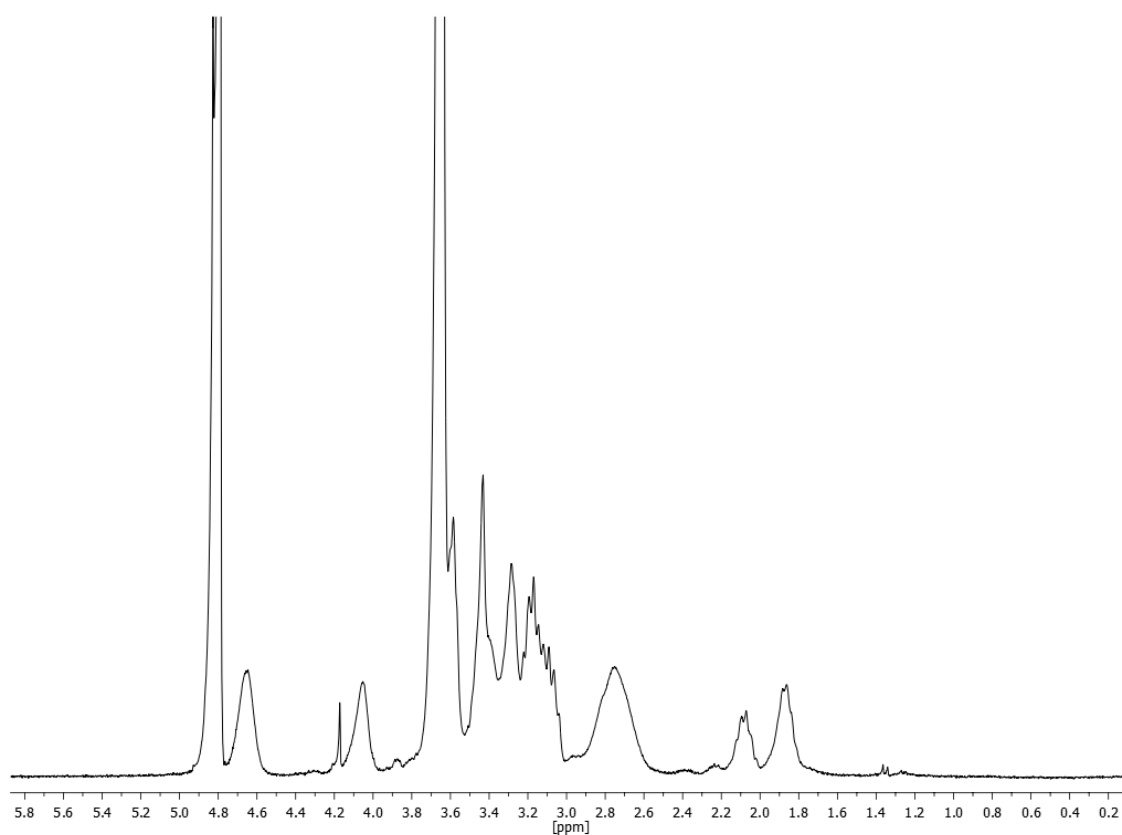


Figura 42 Spettro ^1H -NMR in D_2O del derivato PHEA-bAPAE-PEG-MLB.

3.2.2 Introduzione del gruppo tiolico nel peptide TAT

Al fine di poter sfruttare una reazione del tipo *tiolo-ene* per funzionalizzare i poliplessi in superficie con il peptide TAT, si è scelto di introdurre un gruppo tiolico nel peptide.

L'introduzione del gruppo tiolico è stata condotta sfruttando la reattività dei gruppi amminici presenti nel peptide verso l'estere succinimmidico dell'acido 3- (2-piridilditio) propionico (SPDP).

L'avvenuta funzionalizzazione è stata confermata dall'analisi ^1H -NMR (Fig. 43).

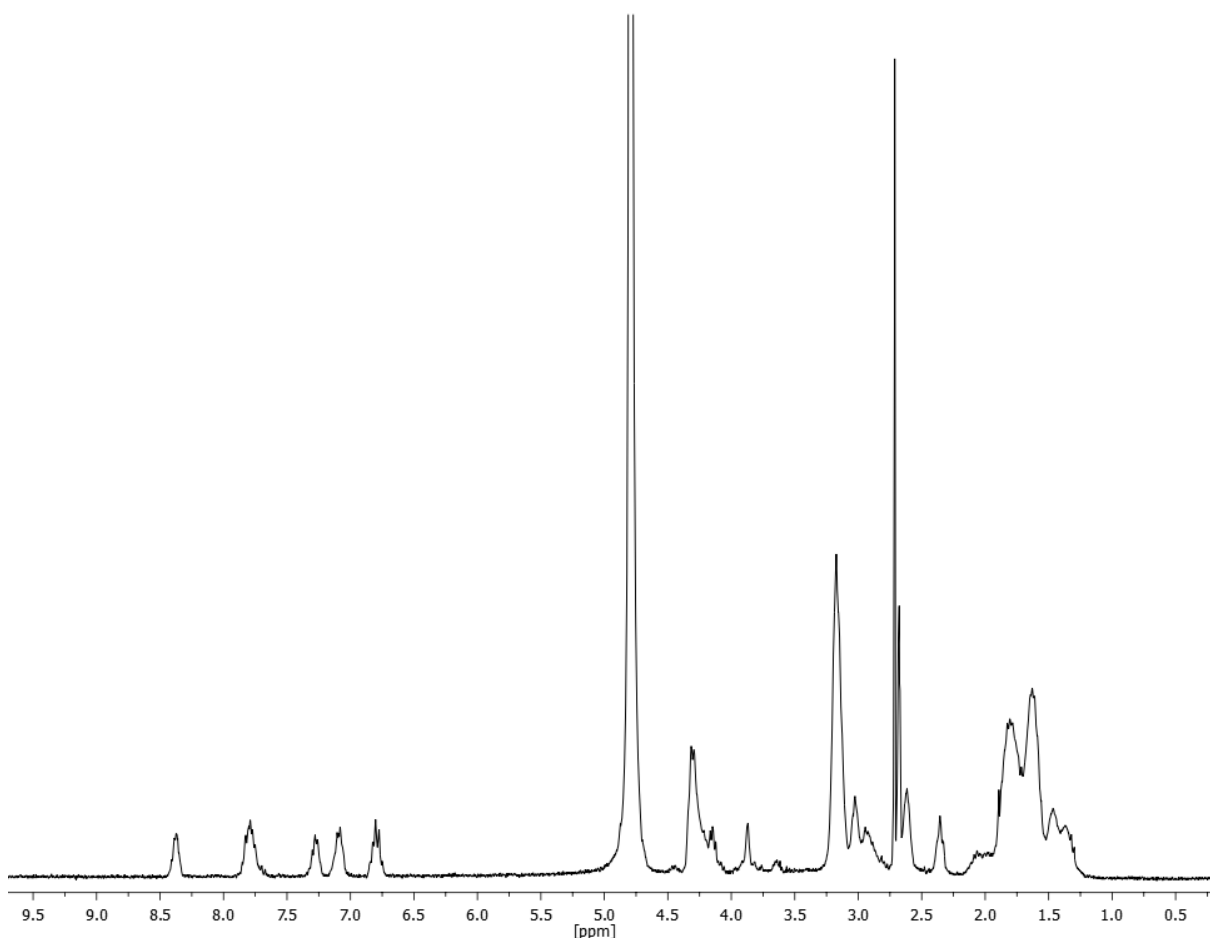


Figura 43 Spettro ^1H -NMR in D_2O del coniugato TAT-SPDP.

Confrontando i picchi corrispondenti a 4H alla porzione aromatica dell'acido 3- (2-piridilditio) propionico (4H) (δ 8.3, 7.7 e 7.2 ppm) con i picchi corrispondenti ai 4H della porzione p-idrossibenzilica della tirosina (δ 7.1 e 6.8 ppm) è possibile confermare la completa funzionalizzazione del peptide.

Il prodotto ottenuto è stato anche analizzato mediante spettroscopia FT-IR; confrontando lo spettro IR del coniugato TAT-SPDP con quello del peptide non modificato TAT (Fig. 44), si

osserva una riduzione della banda caratteristica del bending N-H (1650 cm^{-1}), indicando una riduzione dei gruppi amminici primari liberi presenti nel peptide.

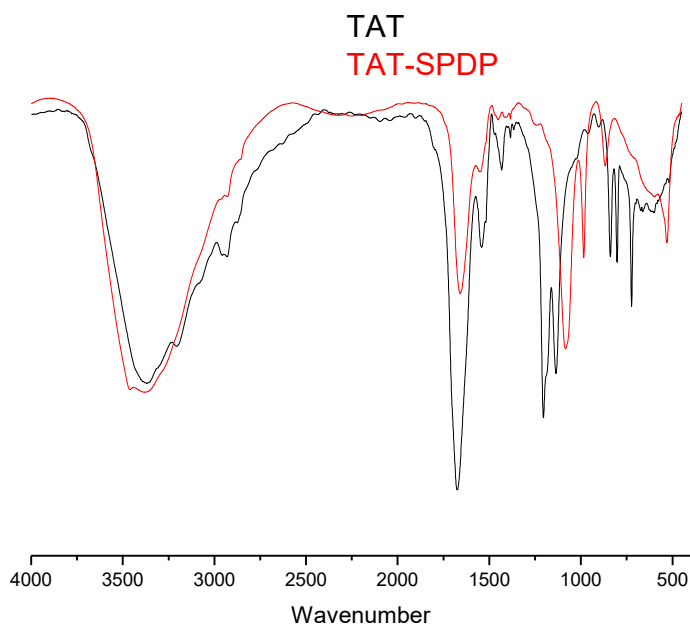


Figura 44 Spettro FT-IT del coniugato TAT-SPDP (rosso) e del peptide TAT₍₄₇₋₅₇₎ (nero).

Inoltre è stata condotta un'analisi HPLC sul derivato ottenuto che ha mostrato un tempo di ritenzione maggiore (13.87 min) rispetto al peptide non modificato (6.77 min).

La deprotezione del gruppo tiolico è avvenuta per rottura del ponte disolfuro ad opera dell'agente riducente ditioneitrato (DTT).

Il prodotto è stato ottenuto con una resa maggiore del 95% ed è stato conservato in atmosfera inerte a -20°C .

3.2.3 Studio di complessazione

Al fine di valutare l'efficienza di complessazione del copolimero sintetizzato è stata effettuata un'elettroforesi in gel di agarosio.

A tal proposito, sono stati miscelati volumi uguali di due dispersioni, una contenente siRNA a concentrazione fissa e l'altra contenente una concentrazione crescente del copolimero PHEA-g-bAPAE-PEG-MLB, al fine di ottenere diversi rapporti peso (R) polimero / siRNA compresi tra 1 e 5, e trascorso il tempo di incubazione è stata eseguita la corsa elettroforetica.

Come si può vedere nella Figura 45, il copolimero PHEA-g-bAPAE-PEG-MLB è stato in grado di ritardare la corsa elettroforetica delle molecole di siRNA a partire da un R pari a 3, corrispondente ad un rapporto N/P pari a 3.

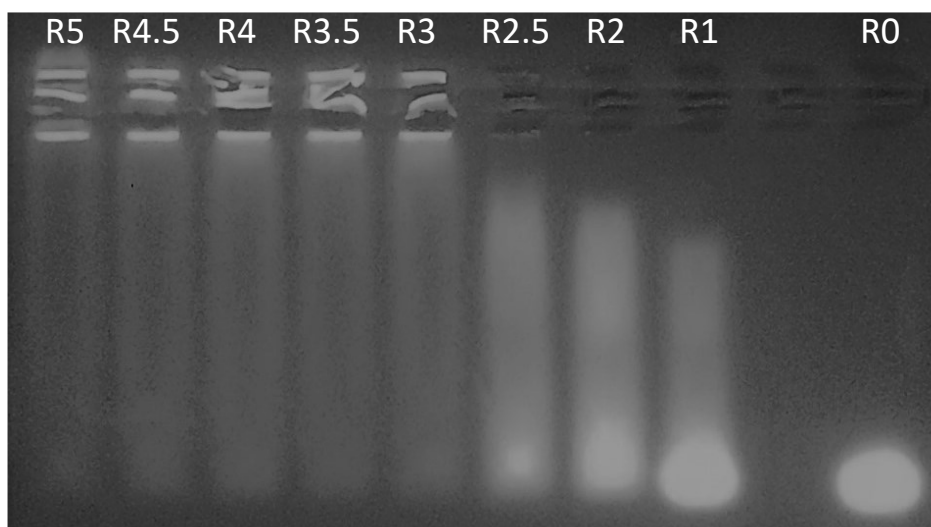


Figura 45 Elettroforesi in gel di agarosio dei poliplessi ottenuti in HEPES 10 mM a vari rapporti in peso PHEA-g-bAPAE-PEG-MLB / siRNA (R).

La quantità di polimero necessaria per fermare la corsa elettroforetica del siRNA è piuttosto bassa se confrontata con altri copolimeri sintetici proposti come vettori non virali per la terapia con siRNA [177].

Successivamente è stato necessario valutare se i poliplessi ottenuti potessero essere funzionalizzati in superficie con il peptide TAT, sfruttando una reazione del tipo *tiolo-ene*.

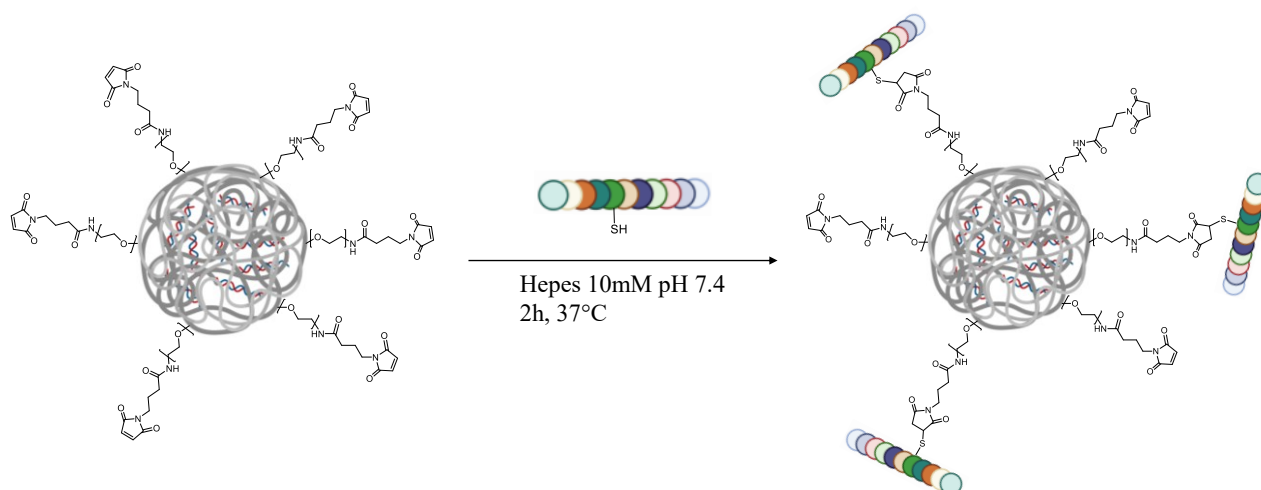


Figura 46 Rappresentazione schematica della funzionalizzazione di superficie tramite reazione *tiolo-ene*.

L'efficienza di funzionalizzazione è stata valutata facendo reagire un eccesso noto del peptide (60.5 nmol) con una determinata quantità di poliplessi che contenesse una quantità tale di maleimmide tale da legare il 50% del peptide aggiunto (30.25 nmol).

Dopo 2 ore di incubazione, la quantità di peptide TAT non legato è stata determinata tramite saggio di Ellman, considerando che l'avvenuta reazione tra l'insaturazione della maleimmide

ed il gruppo tiolico riduce il contenuto di gruppi tiolici quantificabili con il saggio colorimetrico utilizzato.

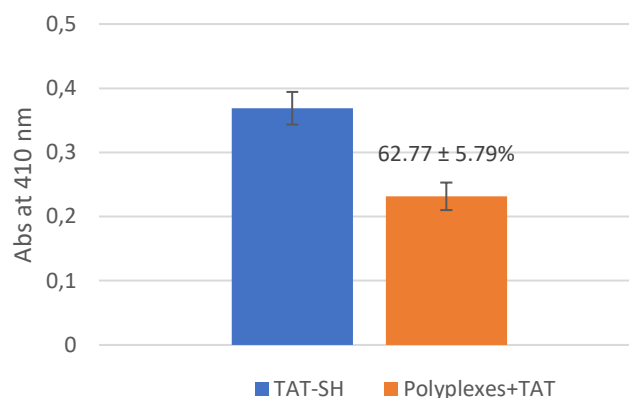


Figura 47 Determinazione quantitativa del peptide TAT prima e dopo funzionalizzazione dei poliplessi (Dati riportati come media di 3 esperimenti differenti).

In Figura 47 sono riportati i valori di assorbanza ottenuti dal saggio colorimetrico; in particolare si può osservare come l'assorbanza a 410 nm si riduca a circa il 60% del valore iniziale dopo 2 ore di incubazione del peptide con i poliplessi, indicando che pressoché il 40% del peptide TAT è stato coniugato al poliplesso. Considerando che la quantità massima coniugabile era del 50% (dovuta alle condizioni sperimentali utilizzate), si può considerare che la reazione di funzionalizzazione procede efficientemente per circa l'80%.

3.2.4 Valutazione della vitalità cellulare

Considerando la potenziale somministrazione polmonare dei poliplessi, la citocompatibilità del copolimero PHEA-g-bAPAE-PEG-MLB è stata valutata tramite saggio MTS su Cellule 16HBE, dopo 24 e 48 ore di incubazione, esprimendo il dato come % di vitalità cellulare rispetto all'esperimento di controllo, in cui le cellule sono incubate solo con mezzo OPTI-MEM (Fig. 48).

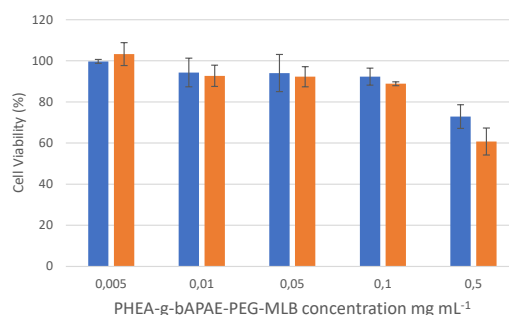


Figura 48 Vitalità cellulare dopo 24 (blu) e 48 (arancione) ore di incubazione con il copolimero PHEA-g-bAPAE-PEG-MLB a varie concentrazioni (Dati riportati come media di 3 esperimenti differenti).

Come si può vedere, sia dopo 24 che 48 ore di incubazione, soltanto per la concentrazione testata più alta (0.5 mg mL^{-1}) si registrano valori di vitalità cellulare inferiori al valore limite di citocompatibilità, mentre le altre concentrazioni testate mostrano una vitalità cellulare superiore all'80%, indicando una buona citocompatibilità.

Considerando che i siRNA esplicano il loro effetto inibitore in quantità dell'ordine delle picomoli[205], la quantità di polimero richiesta per la veicolazione di una quantità terapeutica di siRNA risulta molto bassa ($< 0.001 \text{ mg mL}^{-1}$), quantità per cui il copolimero PHEA-g-bAPAE-PEG-MLB mostra un'ottima citocompatibilità.

Infatti il saggio di vitalità effettuato su cellule incubate con i poliplessi (ottenuti in modo da avere una concentrazione finale di siRNA pari a 100 nM), sia funzionalizzati con peptide TAT che non funzionalizzati, mostrano ottimi valori di vitalità cellulare per tutti i rapporti in peso testati, sia dopo 24 che 48 ore di incubazione (Fig.49).

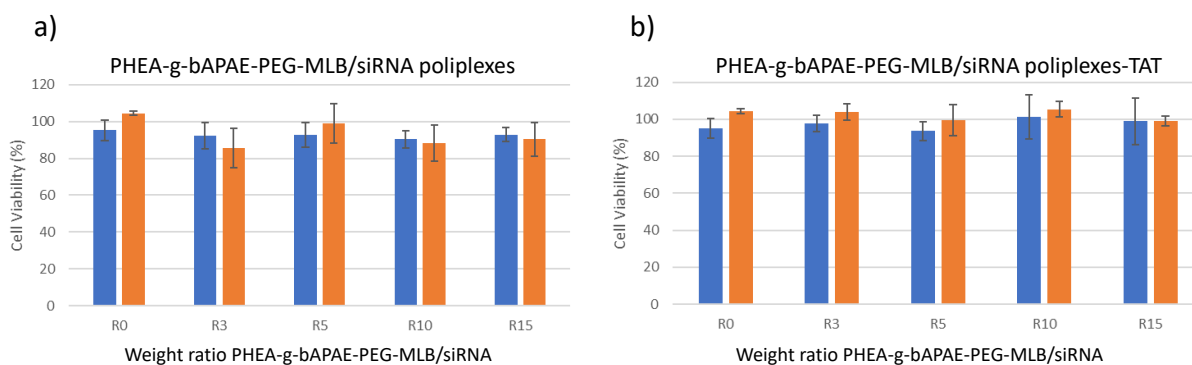


Figura 49 Vitalità cellulare dopo 24 (blu) e 48 (arancione) ore di incubazione con i poliplessi PHEA-g-bAPAE-PEG-MLB/ siRNA a vari rapporti in peso (R), non funzionalizzati (a) e funzionalizzati con peptide TAT (b). (Dati riportati come media di 3 esperimenti differenti)

3.2.5 Stabilità allo scambio polianionico

Essendo i poliplessi progettati per essere somministrati per via inalatoria, è stato necessario valutare se questi siano in grado di interagire con la mucina.

In particolare data la natura polianionica della mucina (a causa della presenza di residui di acido sialico), può verificarsi uno scambio polianionico tra siRNA e mucina. Pertanto, è stato condotto uno studio valutando la mobilità elettroforetica del siRNA nei poliplessi, ottenuti con R pari a 5 e 10, funzionalizzati o meno con il peptide TAT, in presenza di mucina nel mezzo di dispersione. Lo studio è stato condotto in presenza di mucina ad una concentrazione di 1 mg mL^{-1} , per un tempo di incubazione pari a 5 ore.

Come confronto, la corsa elettroforetica è stata eseguita sia su siRNA non complessato (R0), che sui poliplessi non incubati con la mucina.

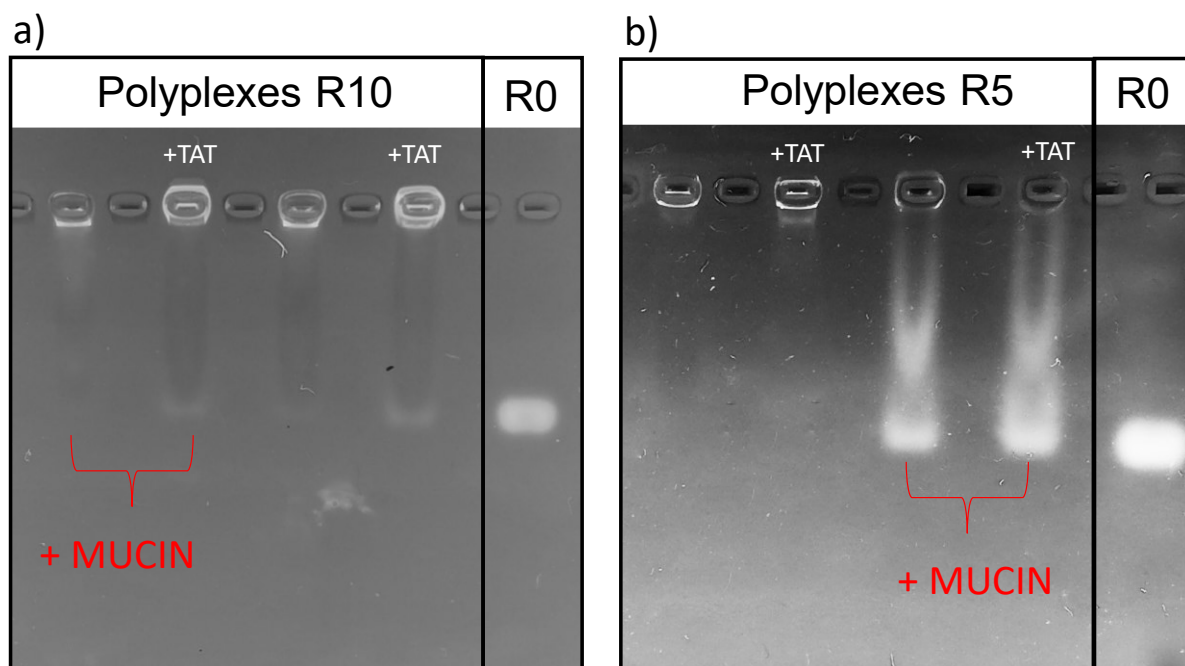


Figura 50 Valutazione della mobilità elettroforetica del siRNA contenuto nei poliplessi ottenuti con R10 (a) e R5 (b), funzionalizzati e non funzionalizzati con TAT, dopo 5h di incubazione con e senza mucina.

Come è possibile osservare in Figura 50, lo scambio polianionico tra siRNA e mucina non si verifica solo al rapporto in peso più elevato ($R = 10$); inoltre, la presenza del peptide TAT, nonostante sia un peptide cationico che potrebbe aumentare la stabilità dei poliplessi, non sembra influenzare questo fenomeno.

Dunque, considerando che soltanto i poliplessi ottenuti con rapporto in peso pari a 10 (R10) sono stabili in presenza di mucina, i successivi studi sono stati condotti esclusivamente su tali poliplessi.

3.2.6 *Dynamic Light Scattering*

Le dimensioni medie e la carica superficiale dei poliplessi, ottenuti con R pari a 10, sono state valutate mediante misure di dynamic light scattering.

Come riportato in tabella 3, i poliplessi PHEA-g- bAPAE-PEG-MLB/ siRNA hanno dimensioni leggermente maggiori di 100 nm ed una carica superficiale leggermente positiva, che consente, comunque, di evitare fenomeni di aggregazione.

Tabella 3 Z-average, indice di polidispersità, potenziale zeta dei poliplessi.

Poliplessi	Z-average (nm)	PDI	ζ potential (mV)
PHEA-g- bAPAE-PEG-MLB/ siRNA (R10)	107±14	0.366 ± 0.109	+10.9 ± 5.7
PHEA-g- bAPAE-PEG-MLB/ siRNA (R10) + TAT	124 ± 21	0.531 ± 0.043	+21.0 ± 13.8

In seguito alla funzionalizzazione con peptide TAT si osserva un leggero incremento del raggio idrodinamico di circa 17 nm ed un incremento della carica superficiale di circa 10 mV, correlato alla presenza dei diversi gruppi guanidinici presenti nel peptide.

3.2.7 Studio di interazione con le mucine

Considerando che la carica negativa della mucina può, non solo dare origine a fenomeni di scambio polianionico, ma anche fenomeni di aggregazione poliplessi-mucine, è stata condotta un'analisi turbidimetrica in funzione del tempo di incubazione, considerando che il verificarsi interazioni poliplessi-mucine, comporta una riduzione della trasmittanza della dispersione. I dati, riportati nella Figura 51, sono espressi come percentuale di trasmittanza (rispetto alla trasmittanza di una dispersione di mucina 1 mg mL⁻¹) in funzione del tempo di incubazione.

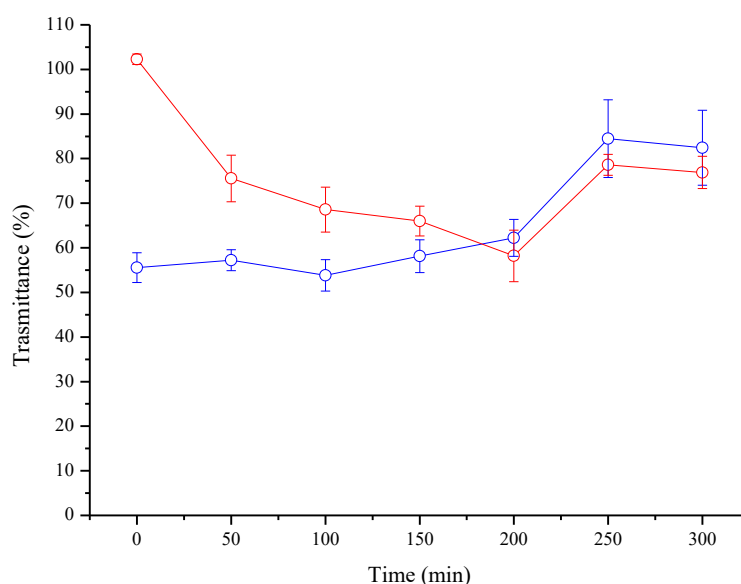


Figura 51 Trasmittanza a 500nm di dispersioni contenenti mucina in presenza di poliplessi PHEA-g-bAPAE-PEG-MLB/siRNA (R10), non funzionalizzati (linea rossa) e funzionalizzati con TAT (linea blu)m (Dati riportati come media di 3 esperimenti differenti).

Per i poliplessi ottenuti con PHEA-g-bAPAE-PEG-MLB, la riduzione pressoché lineare della % di trasmittanza indica una tendenza ad interagire con la mucina, in particolare nei primi 200

minuti; per tempi di incubazione maggiori, diversamente, si osserva l'inversione di questo andamento, indicando che le interazioni poliplessi-mucine si riducono nel tempo.

Per i poliplessi ottenuti con PHEA-g-bAPAE-PEG-MLB funzionalizzati in superficie con peptide TAT, la tendenza ad interagire con la mucina risulta più marcata nei primi tempi di incubazione (% trasmittanza pari a 55); questo comportamento è correlato alla carica maggiormente positiva dovuta alla presenza del TAT, come suggerito dai dati di potenziale zeta.

Come per i poliplessi non funzionalizzati, dopo 200 minuti di incubazioni si osserva una riduzione di questa tendenza.

La riduzione delle interazioni poliplessi-mucine in funzione del tempo, indica che queste interazioni sono reversibili e pertanto potrebbero, in linea di principio, non ostacolare la diffusione dei poliplessi nello stato di muco.

Per verificare se i poliplessi siano in grado di attraversare lo strato di muco, è stato eseguito un test di mucopenetrazione seguendo un protocollo riportato in letteratura[232], utilizzando inserti per piastre cellulari (Scaffdex, CellCrown™48), equipaggiati con una membrana in polipropilene idrofilo con pori da 0.45 μm , su cui è stata depositata una dispersione di mucina in modo da avere uno spessore di circa 1.3 mm.

La dispersione contenente i poliplessi PHEA-g-bAPAE-PEG-MLB/siRNA funzionalizzati con peptide TAT è stata depositata sopra la dispersione di mucina e l'intensità di fluorescenza λ di 665 nm del compartimento ricevente è stata misurata a tempi definiti.

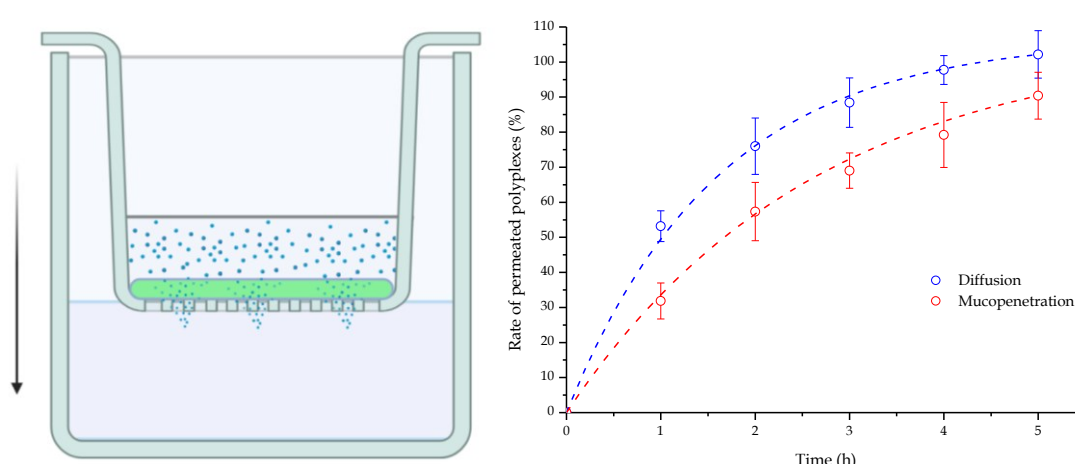


Figura 52 Schematica rappresentazione del sistema utilizzato e quantificazione dei poliplessi (%) che raggiungono il compartimento ricevente nel test di mucopenetrazione, comparata con la diffusione attraverso la membrana (Dati riportati come media di 3 esperimenti differenti).

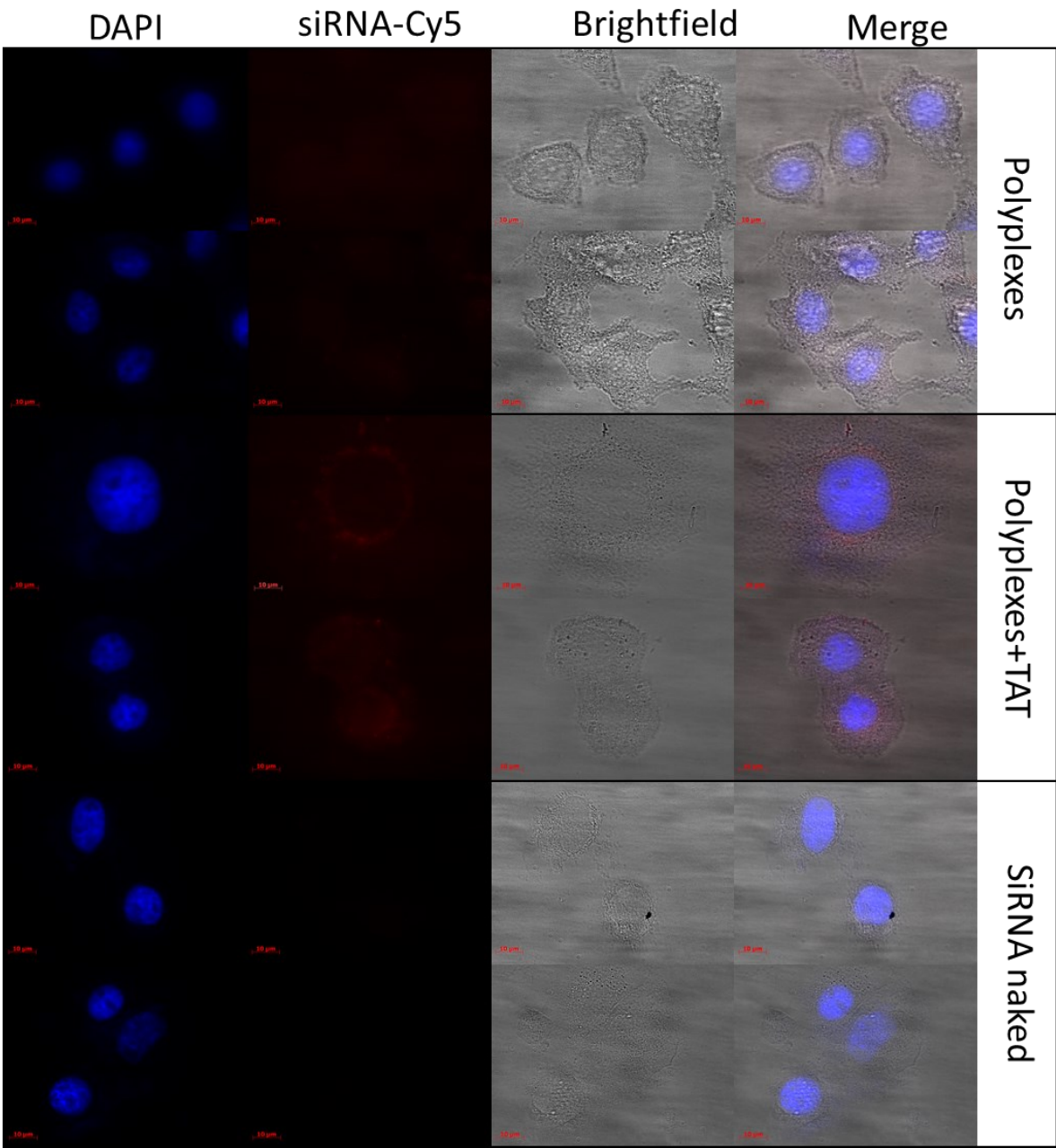
Come mostrato in Figura 52, comparando la cinetica di mucopenetrazione con quella di diffusione (valutata con lo stesso sistema, ma in assenza di mucina), si può notare come la

presenza di mucine nella dispersione non sia in grado di ostacolare il passaggio al compartimento ricevente, ma soltanto di rallentare la diffusione dei poliplessi. In particolare, si osserva che i poliplessi funzionalizzati con peptide TAT sono capaci di oltrepassare efficacemente la barriera rappresentata dal reticolo di mucine, raggiungendo il compartimento ricevente entro 5 ore in quantità corrispondenti a circa il 90% del totale.

3.2.8 Studi di uptake cellulare

Al fine di valutare se i poliplessi ottenuti fossero capaci di essere endocitati dalle cellule componenti l’epitelio bronchiale, sono stati condotti degli studi di uptake su cellule 16HBE.

a)



b)

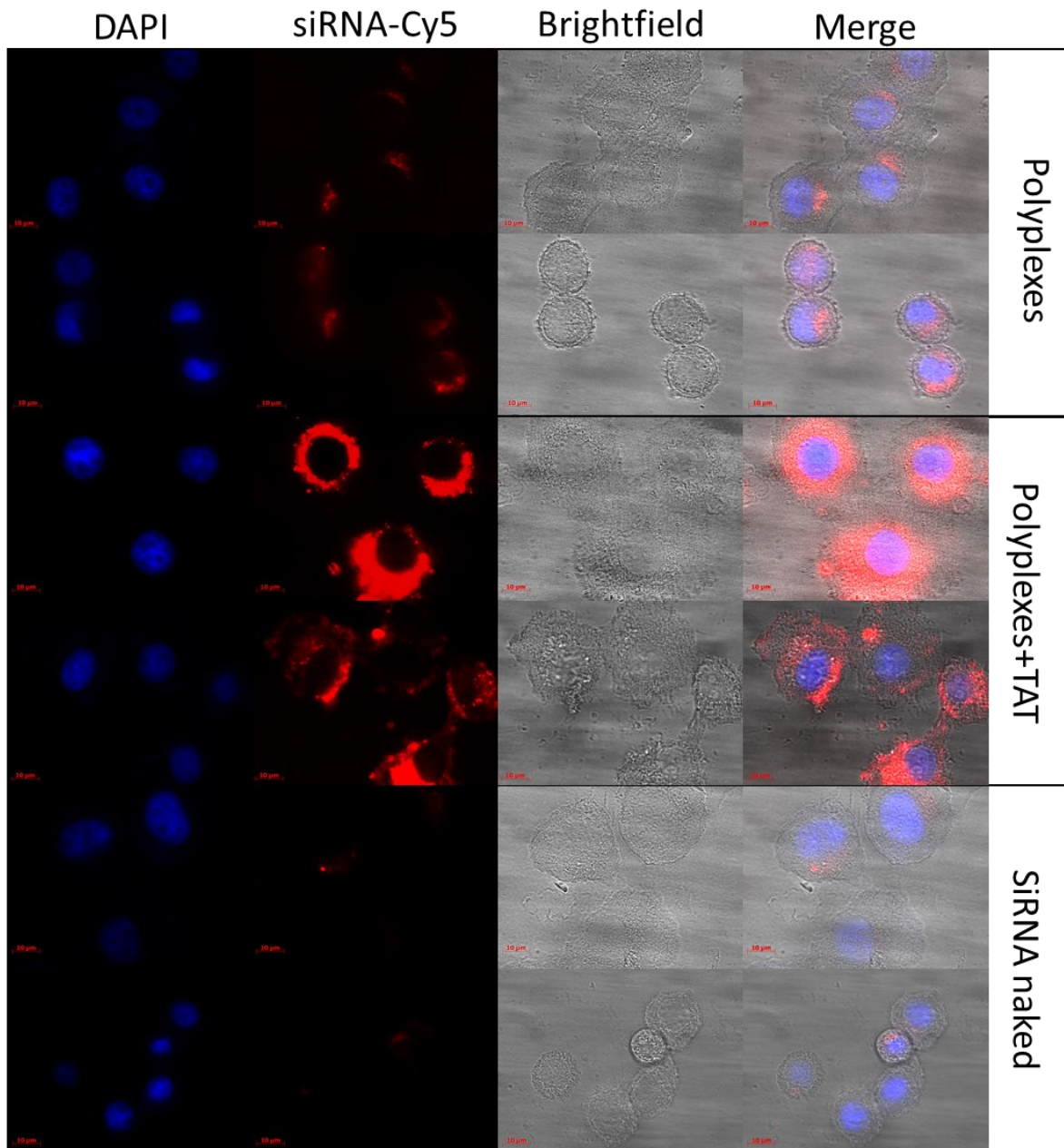


Figura 53 Uptake qualitativo dei poliplessi PHEA-g-bAPAE-PEG-MLB/siRNA-Cy5 su coltura cellulare di epitelio bronchiale umano (16HBE) dopo 4 h (a) e 24 h (b). Ingrandimento 100X.

Come possibile osservare in Figura 53, dopo 4 ore di incubazione i poliplessi funzionalizzati con il peptide TAT iniziano ed essere presenti nel citoplasma delle cellule, come indicato dalla debole fluorescenza visibile; al contrario, i poliplessi non funzionalizzati ed il siRNA non complessato non risultano visibili. Dopo 24 ore di incubazione, si osserva un incremento della fluorescenza, implicando che l'internalizzazione cellulare nelle 16-HBE è dipendente dal tempo. Inoltre, per i poliplessi funzionalizzati con il peptide TAT la fluorescenza risulta più marcata se messa a confronto con quella registrata per i poliplessi non funzionalizzati, indicando una loro maggiore internalizzazione cellulare. Allo stesso tempo la fluorescenza

registrata per i poliplessi non funzionalizzati risulta comunque maggiore di quella che si registra per le cellule incubate con siRNA non complessato.

In seguito sono stati condotti studi di uptake, dopo 4 e 24 ore di incubazione, valutando quantitativamente la fluorescenza del siRNA-Cy5 contenuto nel lisato cellulare.

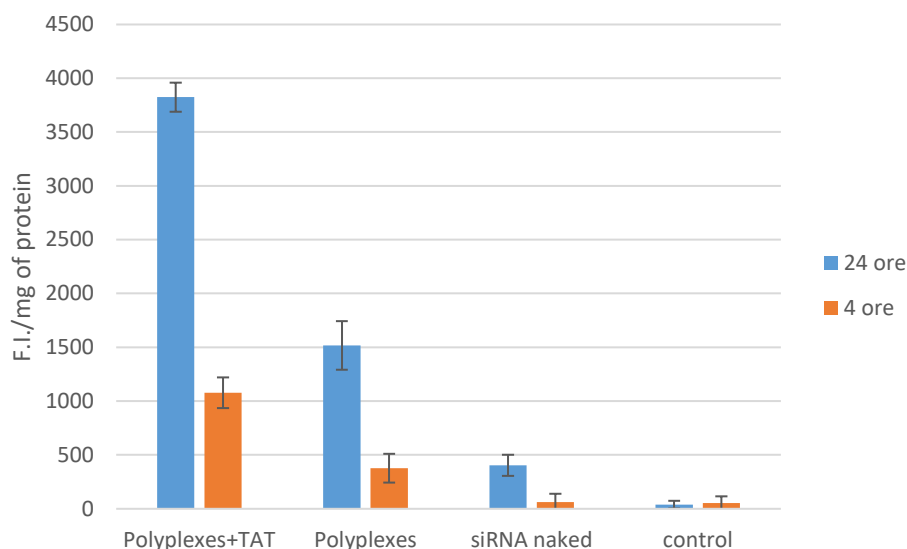


Figura 54 Uptake quantitativo dei poliplessi PHEA-g-bAPAE-PEG-MLB/siRNA-Cy5 su coltura cellulare di epitelio bronchiale umano (16HBE) dopo 4 h e 24 h (Dati riportati come media di 3 esperimenti differenti).

In Figura 54 è riportata l'intensità di fluorescenza normalizzata per mg di proteine contenute nello stesso lisato cellulare.

Dopo 4 ore di incubazione, la quantità di siRNA internalizzato dopo incubazione con i poliplessi funzionalizzati con il peptide TAT risulta maggiore di circa 3 volte rispetto a quella internalizzata dopo incubazione con i poliplessi non funzionalizzati.

Dopo 24 ore di incubazione, si registra un incremento dell'intensità di fluorescenza in entrambi i casi, confermando il comportamento tempo dipendente osservato tramite microscopia a fluorescenza (Fig. 86), ottenendo sempre una maggiore internalizzazione cellulare quando i poliplessi sono funzionalizzati con il peptide TAT.

3.2.9 Conclusioni

In questo lavoro, sono stati progettati dei poliplessi capaci di veicolare e rilasciare siRNA a livello bronchiale nel trattamento dell'asma, utilizzando un copolimero cationico derivato del PHEA.

Al fine di ottenere un copolimero protonabile, ma che sia in grado di conferire la capacità di penetrare attraverso uno strato di muco, il PHEA è stato coniugato dapprima con un oligoammina, la bAPAE, e successivamente con un'opportuna quantità di PEG, ché, come

largamente noto, capace di modulare l'idrofilia e schermare la carica dei nanocomplessi ottenuti.

Considerando inoltre che i poliplessi devono essere in grado di attraversare non solo la barriera di muco, ma anche la barriera rappresentata dall'epitelio bronchiale, si è scelto di funzionalizzare i poliplessi in superficie con il peptide TAT, sfruttando una reazione del tipo tiolo-ene, che essendo classificabile come click chemistry risulta rapida, efficiente e non produce sottoprodotti.

L'introduzione di un doppio legame al terminale del PEG è stata ottenuta utilizzando un derivato della maleimmide, ottenendo il derivato MLB-PEG-COOH che successivamente è stato coniugato al copolimero PHEA-g-bAPAE, utilizzando EDC ed NHS come agenti di coniugazione. L'introduzione del gruppo tiolico nella struttura del peptide è stata ottenuta utilizzando l'estere succinimmidico dell'acido 3- (2-piridilditio) propionico (SPDP).

Sono stati ottenuti, dunque, dei poliplessi citocompatibili, aventi dimensioni nanometriche (\approx 124 nm, funzionalizzati in superficie con il peptide TAT, capaci di trattenere il siRNA ad opportuno R di complessazione durante il processo di diffusione attraverso il muco.

Nonostante i poliplessi siano capaci di instaurare dei legami deboli con le catene muciniche, si sono dimostrati in grado di diffondere efficientemente attraverso uno strato di muco e quindi potenzialmente capaci di raggiungere l'epitelio bronchiale.

Infine, tramite studi di uptake cellulare, è stato possibile osservare come i poliplessi ottenuti siano capaci di penetrare efficacemente nel citoplasma delle cellule dell'epitelio bronchiale.

3.3 Sviluppo di nanoparticelle per la veicolazione inalatoria di Zileuton

3.3.1 Sintesi e caratterizzazione della 2-metil-2-ossazina

La sintesi della 2-metil-2-ossazina è stata effettuata seguendo il protocollo riportato in letteratura, come mostrato di seguito.

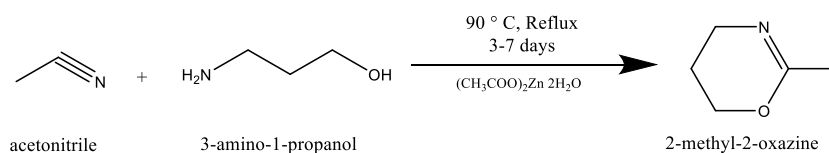


Figura 55 Schema di sintesi della 2-metil-2ossazina.

L'analisi $^1\text{H-NMR}$, mostrata di seguito, ha confermato l'ottenimento del composto desiderato.

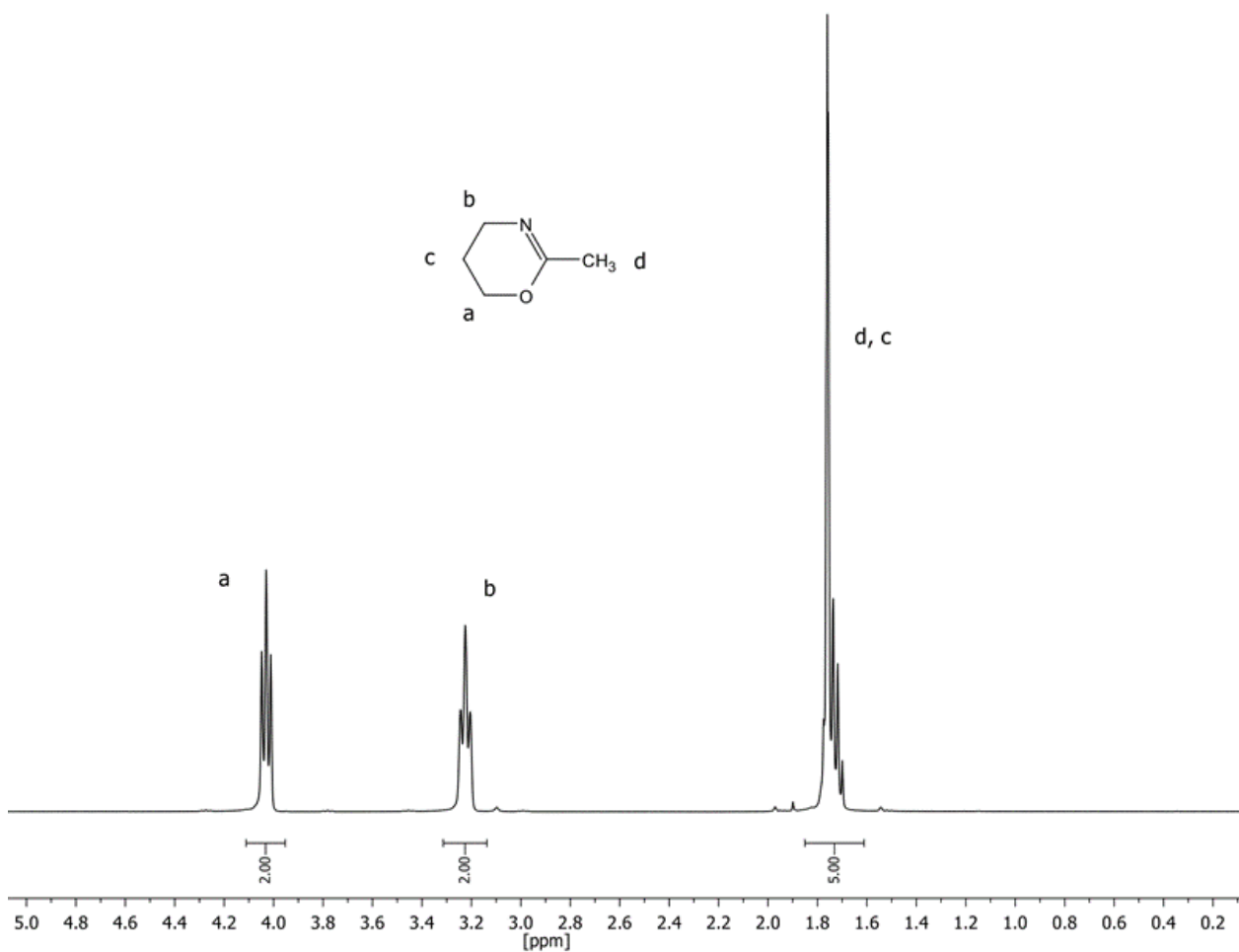


Figura 56 Spettro $^1\text{H-NMR}$ della 2-metil-2-ossazina (CDCl₃).

3.3.2 Sintesi della poli-2-metil-2-ossazolina (PMeOx) e della poli-2-metil-2-ossazina (PMeOzi) mediante Cationic Ring-Opening Polymerization (CROP)

La polimerizzazione mediante Cationic Ring-Opening Polymerization (CROP) di 2-ossazoline e 2-ossazine consiste in un tipico meccanismo di polimerizzazione a catena, attraverso l'inizio, la propagazione e la terminazione, in cui la terminazione indesiderata o il trasferimento di catena durante la polimerizzazione sono fenomeni minimi o assenti.

Nel processo di polimerizzazione la forza motrice è l'isomerizzazione dell'iminoetere ciclico in un'amide terziaria più stabile, risultante in una polimerizzazione spontanea dopo l'innesco. [233]

La purezza di ciascun componente della miscela di reazione è essenziale per la corretta reazione di polimerizzazione. Nessuna specie nucleofila (compresa l'acqua) può essere tollerata nella miscela di reazione, quindi sono necessarie estrema purezza e anidricità di solvente, iniziatore e monomeri per le condizioni di polimerizzazione ottimali [234]–[236]. Per questo motivo, solvente, iniziatore e monomeri vengono precedentemente trattati con CaH_2 , distillati in condizioni di atmosfera inerte e conservati in atmosfera inerte (Argon). L'avanzamento della reazione di polimerizzazione è stato controllato dall'analisi $^1\text{H-NMR}$; la scomparsa dei picchi dei monomeri indica la fine del processo di crescita della catena. Il meccanismo di polimerizzazione segue lo schema seguente.

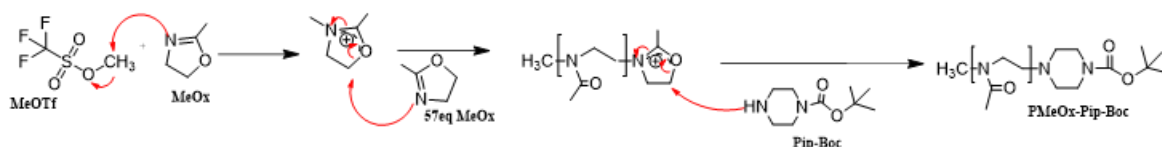


Figura 57 Schema di sintesi della PMeOx-Pip-Boc.

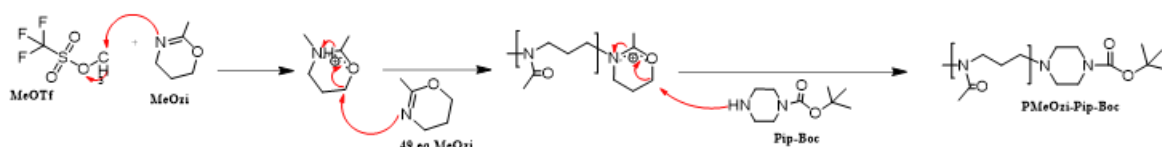


Figura 58 Schema di sintesi della PMeOzi-Pip-Boc,

La Piperazina-Boc è stata scelta come terminatore per avere, dopo opportuna deprotezione, un gruppo funzionale ($-\text{NH}$) disponibile per la reazione di coniugazione al PHEA. L'analisi $^1\text{H-NMR}$ sul composto puro ha confermato l'ottenimento di un peso molecolare di 5 kg/mol per entrambi gli omopolimeri confrontando l'integrale relativo ai protoni dell'iniziatore (3.05-3.03

e 2.94 ppm per PMeOx-Pip-Boc e 2.95-2.92 ppm per PMeOz-Pip-Boc) con quelli relativi ai protoni dell'unità ripetitiva (3.45-3.47 ppm per PMeOx-Pip-Boc e 2.00-1.95 ppm per PMeOz-Pip-Boc).

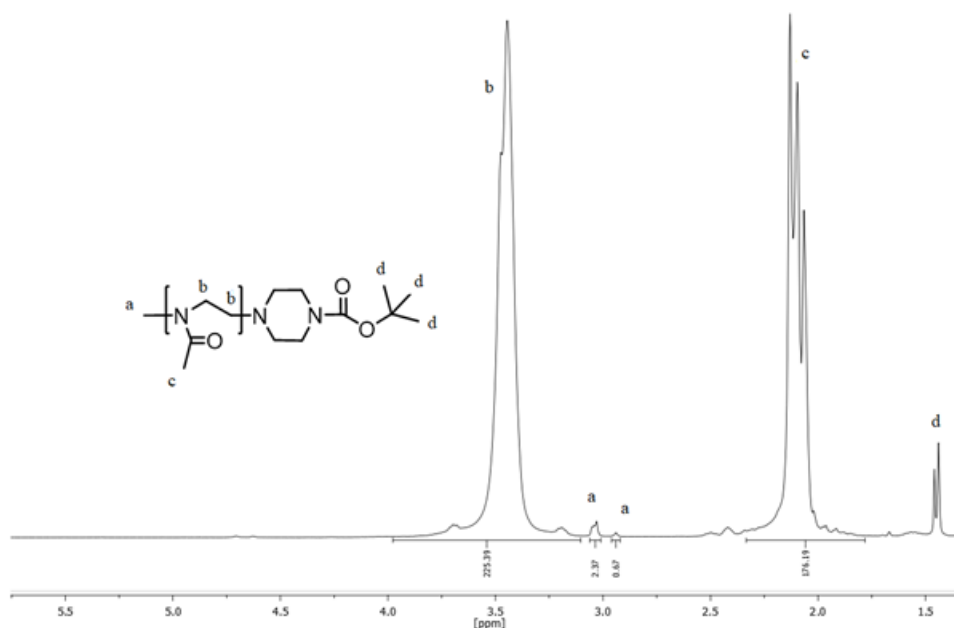


Figura 59 Spettro ^1H -NMR della PMeOx-Pip-Boc.

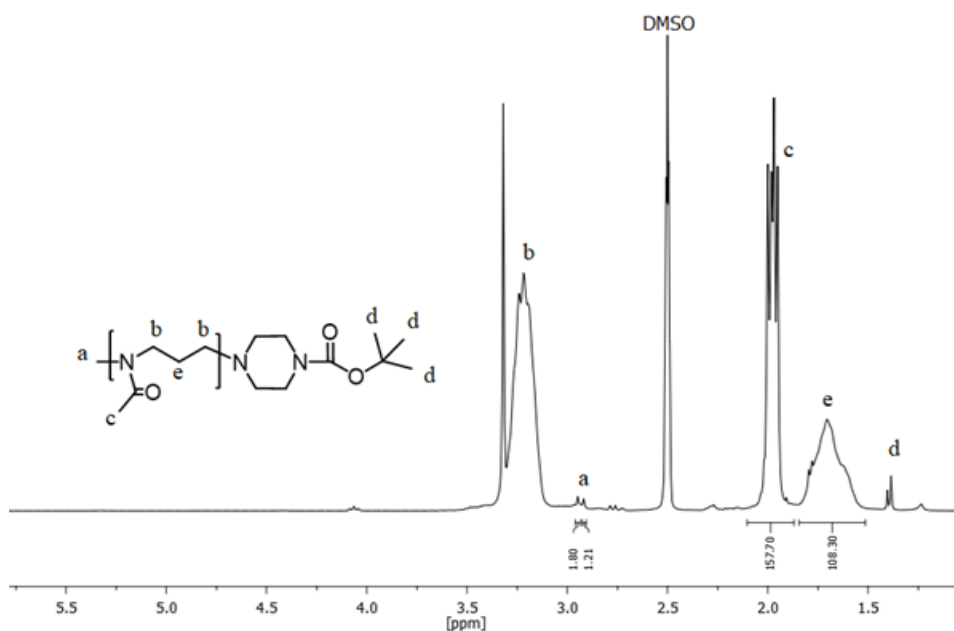


Figura 60 Spettro ^1H -NMR della PMeOz-Pip-Boc.

Gli omopolimeri ottenuti sono stati ulteriormente caratterizzati dall'analisi SEC in termini di peso molecolare medio ponderale (\bar{M}_w) e polidispersità (\bar{M}_w/\bar{M}_n), ed i valori ottenuti sono riportati nella tabella 4.

Tabella 4 Peso ponderale medio e polidispersita degli omopolimeri PMeOx-Pip-Boc e PMeOz-Pip-Boc.

Omopolimeri	Peso molecolare	
	\overline{M}_w (g/mol)	$\overline{M}_w/\overline{M}_n$
PMeOx-Pip-Boc	6200	1.12
PMeOz-Pip-Boc	6500	1.15

La rimozione del gruppo protettore terz-butilossicarbonile (BOC) è stata effettuata in un ambiente acido (HCl), seguendo una procedura riportata in letteratura.

La rimozione del gruppo di protettore BOC è stata confermata dall'analisi $^1\text{H-NMR}$, osservando la scomparsa del picco a circa 1.4 ppm, correlata ai metili del BOC; inoltre, non viene osservata idrolisi della catena laterale poiché il rapporto relativo tra i protoni della catena laterale (CH_3) e i protoni del backbone (CH_2) rimane costante.

3.3.3 Sintesi e caratterizzazione dei copolimeri

Considerando l'eccellente biocompatibilità e la biodegradabilità dell'acido polilattico (PLA)[139], la capacità delle poliossazoline di conferire alle nanoparticelle una maggiore diffusione attraverso lo strato di muco[159], [160] e l'eccellente biocompatibilità e versatilità chimica dell' α,β -poli(N-2-idrossietil)-D,L-aspartamide (PHEA) a reagire con polimeri diversi per ottenere copolimeri *graft*, lo scopo del presente lavoro riguarda la sintesi e la caratterizzazione di nuovi copolimeri anfifilici, aventi caratteristiche chimico-fisiche che li rendono adatti alla realizzazione di nanoparticelle in grado di attraversare la barriera del muco e rilasciare farmaci a livello dell'epitelio bronchiale.

I copolimeri PHEA-g-Pip-PMeOx-g-PLA e PHEA-g-Pip-PMeOz-g-PLA sono stati sintetizzati mediante una reazione a due steps. Nel primo step, il PHEA è stato coniugato con le catene di PMeOx o di PMeOz, mentre, nel secondo step, il copolimero ottenuto è stato fatto reagire con il PLA; la rappresentazione schematica di entrambi gli steps di funzionalizzazione è riportata nella Figure 46.

La coniugazione delle catene di PMeOx o PMeOz al backbone del PHEA ha comportato prima l'attivazione di gruppi idrossilici PHEA liberi con bis-nitrofenil carbonato (BNFC) e poi la reazione tra il gruppo ossidrilico attivato e la piperazina terminale della PMeOx o PMeOz (fase a Fig 61).

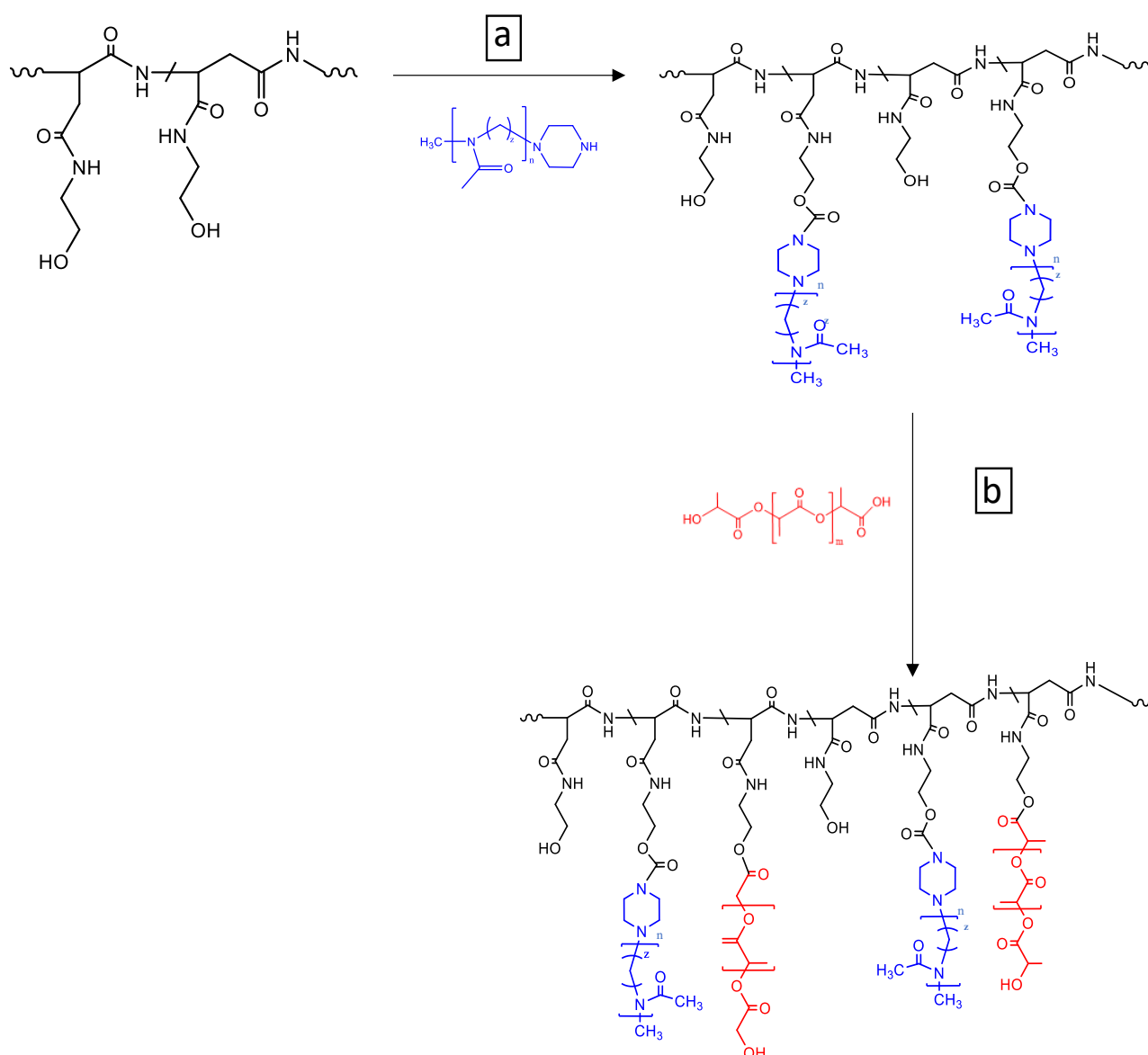


Figura 61 Schema di sintesi dei copolimeri PHEA-g-Pip-PMeOx, PHEA-g-Pip-PMeOz (a), PHEA-g-Pip-PMeOx-g-PLA e PHEA-g-Pip-PMeOz-g-PLA (b). (Per PMeOx-Pip $n=58$, $z=2$; Per PMeOz-Pip $n=50$, $z=3$).

In queste condizioni sperimentali è stato ottenuto un grado di derivatizzazione in PMeOx o PMeOz nei copolimeri PHEA-g-Pip-PMeOx e PHEA-g-Pip-PMeOz di circa il 3.5 mol%. Questo è stato calcolato mediante analisi $^1\text{H-NMR}$ usando il rapporto tra l'integrale dei segnali corrispondente al CH_3 della catena laterale della PMeOx o PMeOz (a circa δ 2.00 ppm), all'integrale del segnale corrispondente al CH dell'unità ripetitiva del PHEA (a δ 4.62 ppm). La coniugazione delle catene di PLA al backbone del PHEA-g-Pip-PMeOx e del PHEA-g-Pip-PMeOz ha comportato prima l'attivazione di gruppi carbossilici PLA liberi con carbonildiimidazolo (CDI) e poi la reazione tra il gruppo carbossilico attivato e i gruppi ossidrilici liberi del backbone polimerico, usando TEA come catalizzatore, (fase b Fig 61). In queste condizioni sperimentali, è stato ottenuto un grado di derivatizzazione in PLA dei copolimeri PHEA-g-Pip-PMeOx-g-PLA e PHEA-g-Pip-PMeOz-g-PLA di circa 2.0 moli%.

Questo è stato calcolato dall'analisi ^1H -NMR usando il rapporto tra l'integrale dei segnali corrispondente a CH_3 dell'unità ripetitiva del PLA (a circa δ 1.45 ppm), all'integrale del segnale corrispondente al CH dell'unità ripetitiva del PHEA (a δ 4.62 ppm); non è stata osservata alcuna riduzione del grado di derivatizzazione in PMeOx o PMeOz.

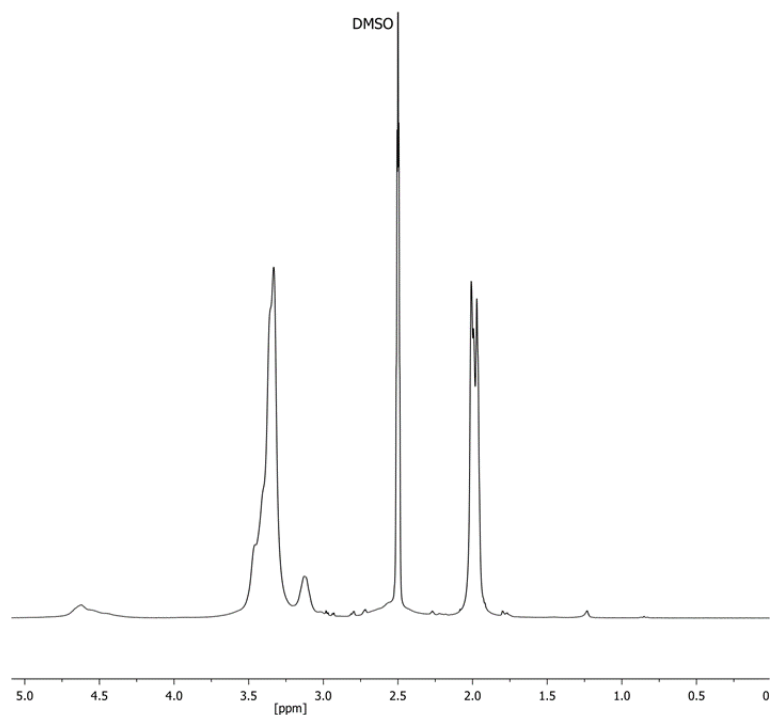


Figura 62 Spettro ^1H -NMR del copolimero PHEA-g-Pip-PMeOx.

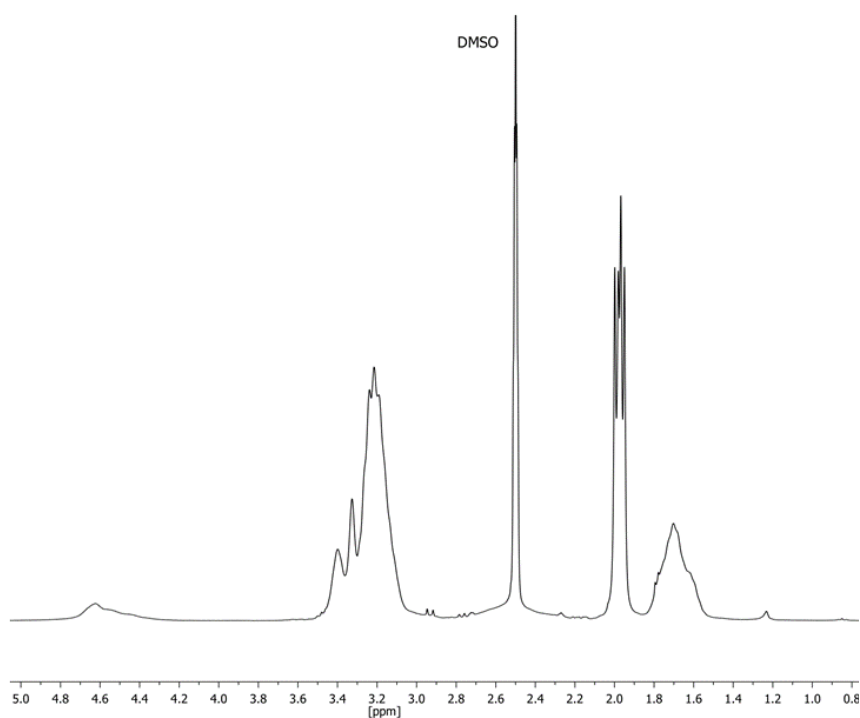


Figura 63 Spettro ^1H -NMR del copolimero PHEA-g-Pip-PMeOz.

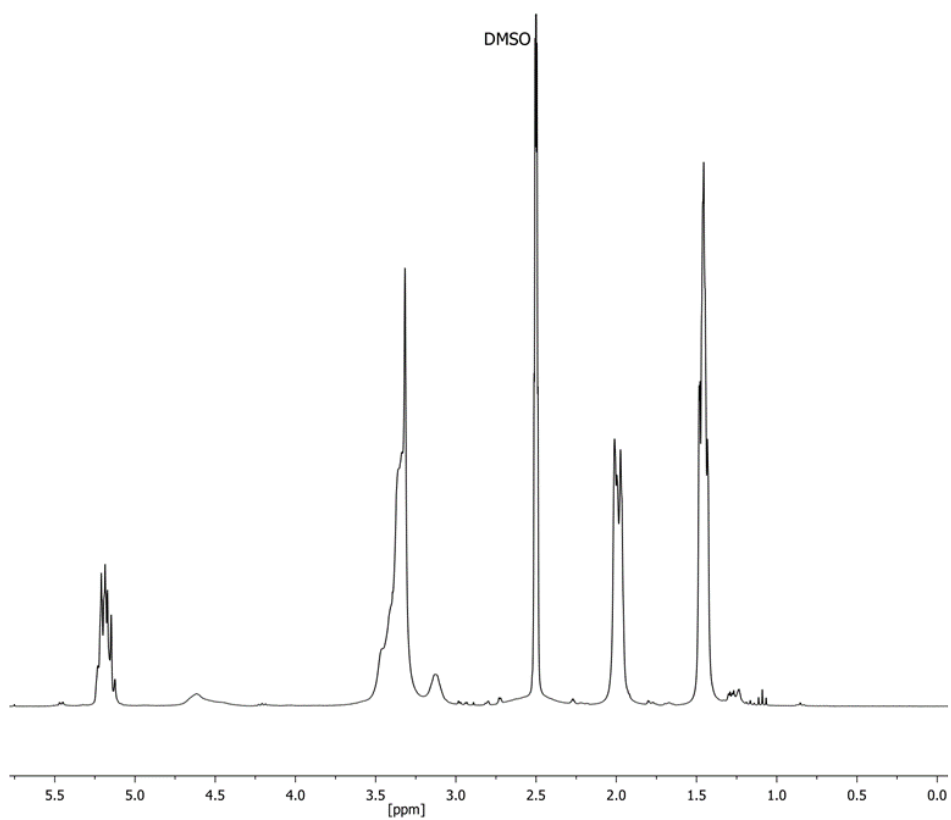


Figura 64 Spettro ^1H -NMR del copolimero PHEA-g-Pip-PMeOx-g-PLA.

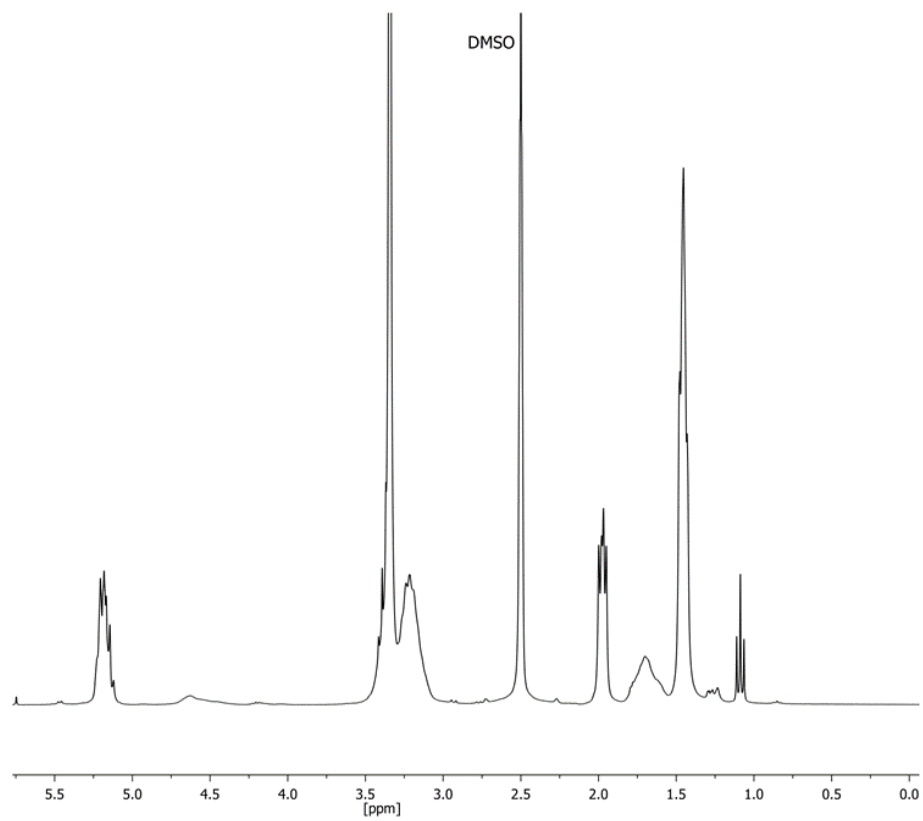


Figura 65 Spettro ^1H -NMR del copolimero PHEA-g-Pip-PMeOx-g-PLA.

Inoltre, su entrambi i copolimeri è stata effettuata una misura DOSY; in particolare, i risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli ottenuti analizzando una miscela fisica dei tre polimeri.

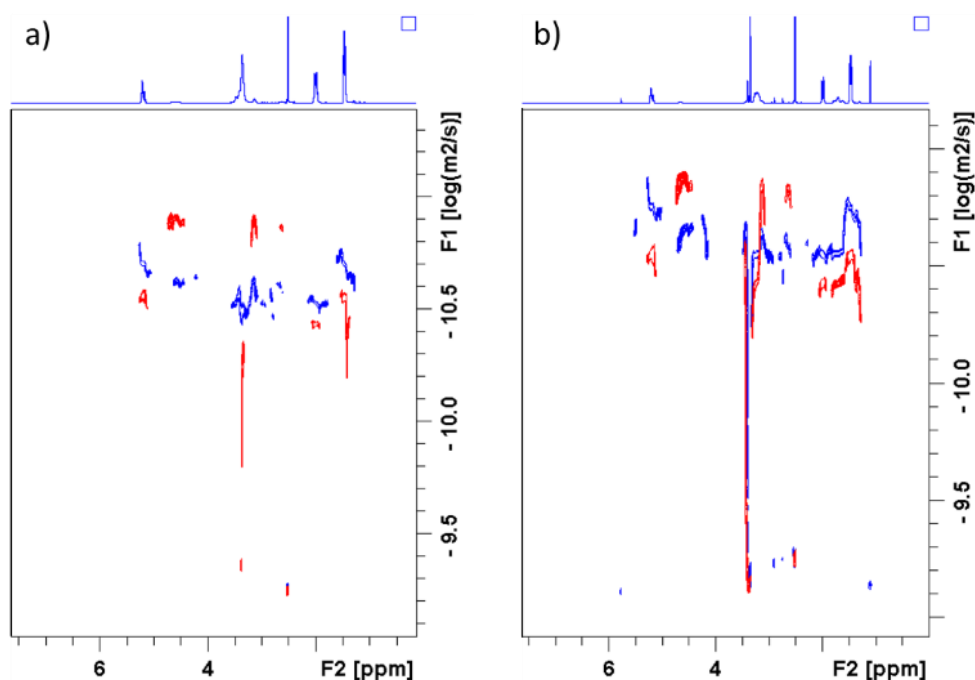


Figura 66 Spettri DOSY dei copolimeri PHEA-g-Pip-PMeOx-g-PLA (a) e PHEA-g-Pip-PMeOz-g-PLA (b) sintetizzati (spettro in blu) o in miscela fisica delle tre catene (spettro in rosso).

Come mostra la Figura 66 in entrambi i casi, non c'è corrispondenza tra gli spettri dei copolimeri sintetizzati e gli spettri della miscela fisica dei tre polimeri liberi; questo risultato suggerisce che le catene PLA e le catene PMeOx o PMeOz sono ancorate al backbone polimerico del PHEA.

Il \bar{M}_w dei copolimeri graft PHEA-g-Pip-PMeOz o PHEA-g-Pip-PMeOx subisce una riduzione piuttosto drastica, se confrontato con il \bar{M}_w del PHEA (Tab. 5); probabilmente, questo dato può essere attribuito alle condizioni sperimentali utilizzate, in quanto l'utilizzo di una quantità elevata di polimeri con terminale piperazinico per effettuare la reazione di funzionalizzazione del PHEA con PMeOx o PMeOz, potrebbe rompere alcuni legami ammidici nella catena principale.

Per PHEA-g-Pip-PMeOx-g-PLA e PHEA-g-Pip-PMeOz-g-PLA si può osservare un cromatogramma bimodale, che indica la presenza di due specie polimeriche, assimilabili a diverso grado di funzionalizzazione in catena laterale e quindi un diverso rapporto PLA: PMeOx o PMeOz.

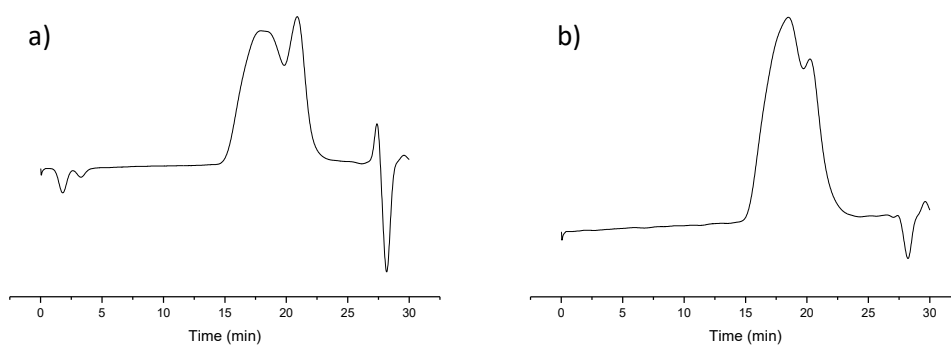


Figura 67 Cromatogramma SEC dei copolimeri PHEA-g-Pip-PMeOx-g-PLA (a) e PHEA-g-Pip-PMeOz-g-PLA (b).

Tabella 5 Pesì molecolari medi ponderali e polidispersità dei copolimeri determinati tramite SEC

	Pesì molecolari		
	\bar{M}_w (g/mol)		\bar{D}
PHEA	71000		1.4
PHEA-g-Pip-PMeOx	13000		1.3
PHEA-g-Pip-PMeOz	14000		1.3
PHEA-g-Pip-PMeOx-g-PLA	65000	23000	1.4
PHEA-g-Pip-PMeOz-g-PLA	56000	25000	1.4

3.3.4 Caratterizzazione delle nanoparticelle ottenute

Al fine di individuare quale fra nanoprecipitazione diretta, nanoprecipitazione mediante dialisi ed emulsione/evaporazione del solvente sia la tecnica migliore per ottenere con dimensioni, polidispersità e forma ottimali, sono state effettuate differenti prove utilizzando i copolimeri sintetizzati.

La nanoprecipitazione diretta comporta il gocciolamento di una soluzione organica di polimero, ottenuta solubilizzando una certa quantità di polimero in un solvente organico miscibile con acqua, in un grande eccesso di "non solvente". La rapida diffusione del solvente organico nell'acqua consente la formazione di nanoparticelle. Allo stesso modo, la nanoprecipitazione assistita da dialisi, d'altra parte, sfrutta la lenta diffusione del solvente organico attraverso una membrana per dialisi. Il metodo di emulsione ed evaporazione richiede l'uso di un solvente organico non miscibile con acqua, che se sottoposto a una vigorosa agitazione, determina la formazione di un'emulsione O/A in cui il polimero viene disperso all'interno della fase organica; questa emulsione viene quindi sottoposta a un trattamento idoneo a ridurre le dimensioni dei

globuli della fase organica, come la sonicazione. Infine, la rimozione della fase organica da parte di un evaporatore rotante consente la formazione di nanoparticelle.

Tutti i preparati ottenuti sono stati analizzati con la tecnica del Dynamic Light Scattering, al fine di valutare le dimensioni e la carica superficiale. Di seguito sono mostrate le curve distribuzione dimensionale ottenute e la tabella con i valori di Z-Average, PDI e Potenziale Zeta.

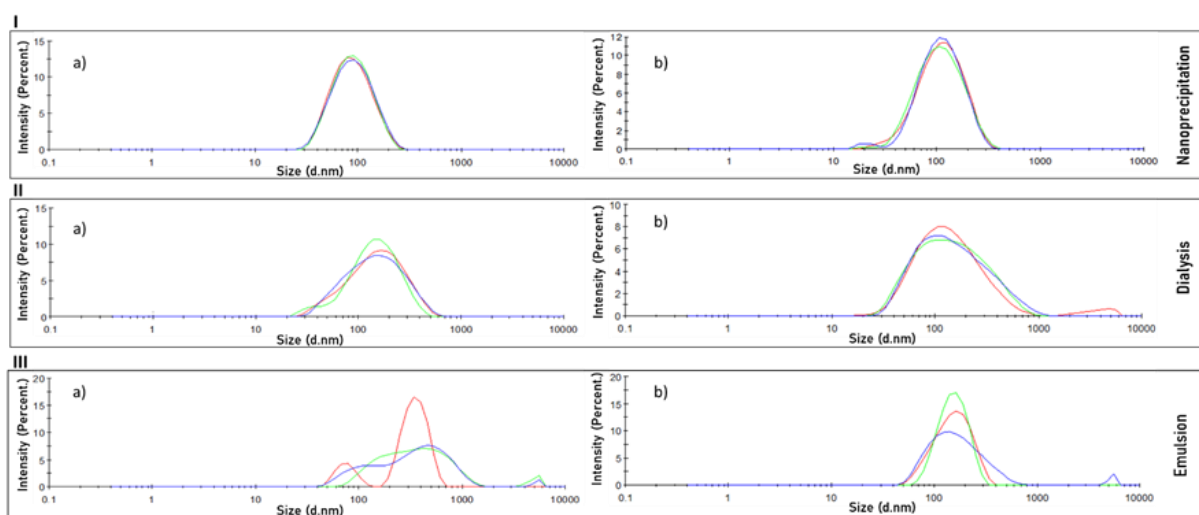


Figura 68 Curve di distribuzione dimensionale (intensità di scattering) di tre diversi campioni di nanoparticelle PHEA-g-Pip-PMeOx-g-PLA (a) e PHEA-g-Pip-PMeOz-g-PLA (b) ottenute mediante: nanoprecipitazione diretta (pannello I), nanoprecipitazione per dialisi (pannello II) ed emulsione ed evaporazione del solvente (pannello III). (Dati riportati come media di 3 esperimenti differenti).

Tabella 6 Z-Average, PDI e Potenziale Zeta delle nanoparticelle ottenute con diversi metodi

	Np PHEA-g-Pip-PMeOx-g-PLA			Np PHEA-g-Pip-PMeOz-g-PLA		
	Z-Average (nm)	PDI	Z-Potenzial (mV)	Z-Average (nm)	PDI	Z-Potenzial (mV)
Nanoprecipitazione diretta	77.74 ± 0.22	0.173	-5.76 ± 4.47	95.11 ± 0.41	0.203	-7.24 ± 4.74
Nanoprecipitazione mediante dialisi	122.1 ± 1.06	0.263		113.4 ± 0.68	0.330	
Emulsione/evaporazione	288.7 ± 50	0.471		188.5 ± 15	0.360	

Come mostrato in Figura 68, per entrambi i copolimeri, il metodo migliore per la preparazione delle nanoparticelle è la nanoprecipitazione diretta, poichè con questo metodo le nanoparticelle hanno dimensioni più ridotte ed una distribuzione dimensionale stretta. Le nanoparticelle preparate con nanoprecipitazione diretta sono state osservate anche mediante microscopia a scansione elettronica (Fig. 69), mostrando nanoparticelle con forma sferica; i valori dimensionali ottenuti sono inoltre paragonabili ai valori ottenuti attraverso l'analisi DLS (Tab. 6).

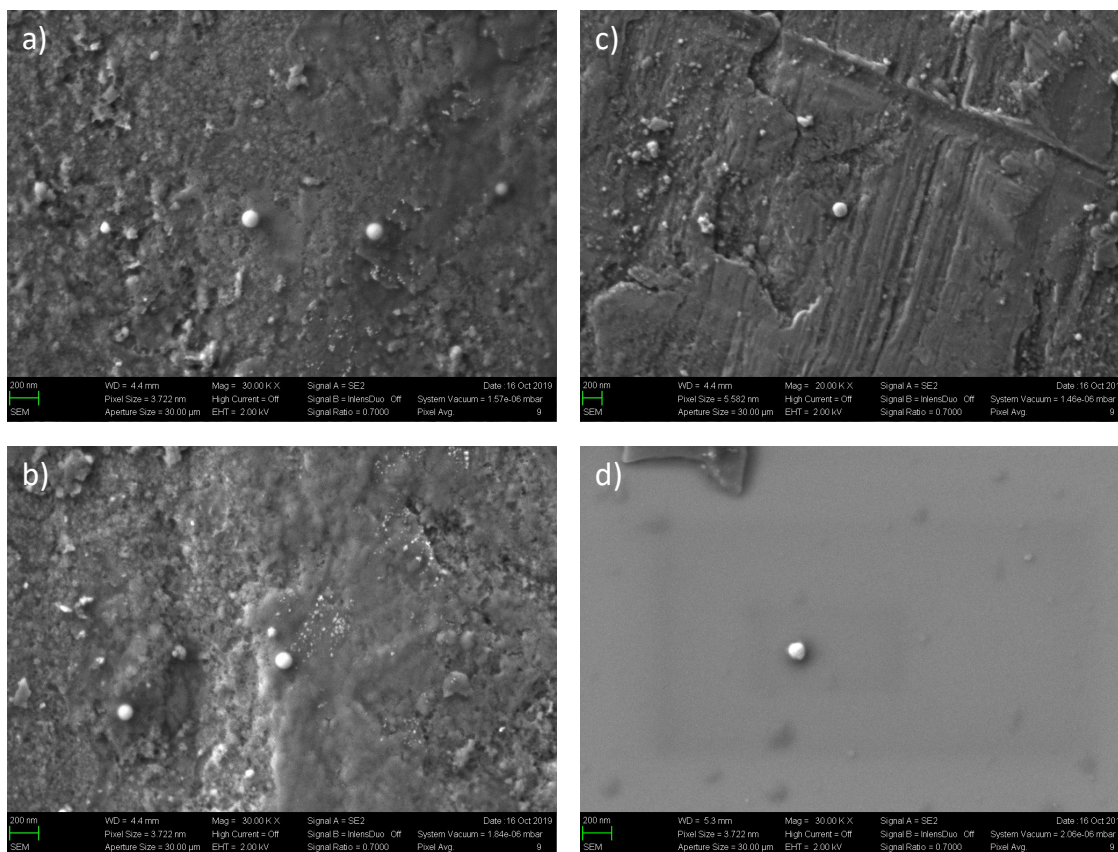


Figura 69 Immagini SEM delle nanoparticelle ottenute per nanoprecipitazione diretta dei copolimeri PHEA-g-PMcOx-g-PLA (a-b) e PHEA-g-PMcOz-g-PLA (c-d).

Alla luce dei risultati ottenuti, è stato scelto di preparare nanoparticelle caricate con Zileuton utilizzando la nanoprecipitazione diretta.

L'analisi DLS mostra particelle con un potenziale ζ vicino alla neutralità e dimensioni dell'ordine di 100 nanometri con una distribuzione dimensionale ristretta (Tab. 7). La quantità di Zileuton intrappolata nelle particelle, valutata mediante analisi HPLC, corrisponde ad un'efficienza di intrappolamento (EE) di circa il 75%.

Tabella 7 Z-Average, PDI, Zeta Potential, Drug Loading (DL%) ed Efficienza d'intrappolamento (EE%) delle nanoparticelle cariche di Zileuton.

	Z-average (nm)	PDI	ζ -potential (mV)	DL%	EE%
Np PHEA-g-Pip-PMcOx-g-PLA @Zileuton	101± 5	0.15	-3.8 ± 6.2	15.7±0.4	78.5±2
Np PHEA-g-Pip-PMcOz-g-PLA @Zileuton	106±3	0.12	-5.2 ± 5.4	14.9±0.6	74.5±3

3.3.5 Test di vitalità cellulare

Considerando la potenziale applicazione per via inalatoria delle nanoparticelle prodotte, è stato effettuato uno studio in vitro di citocompatibilità su cellule 16-HBE.

La citocompatibilità delle nanoparticelle caricate con Zileuton è stata valutata mediante il test MTS a diverse concentrazioni e confrontata con Zileuton libero e nanoparticelle vuote dopo 24 e 48 ore di incubazione (Figura 70). Le nanoparticelle vuote non hanno mostrato citotossicità dopo 24 ore, mentre dopo 48 ore solo le cellule trattate con la più alta concentrazione di nanoparticelle mostrano una vitalità leggermente inferiore all'80%.

D'altra parte, Zileuton libero risulta altamente citotossico a tutte le concentrazioni testate, anche dopo 24 ore, mentre le nanoparticelle caricate con Zileuton mostrano un effetto citotossico dose-dipendente, anche se in modo ridotto; questi risultati sottolineano come l'utilizzo del drug delivery system sia importante non solo per una migliore efficacia farmacologica ma anche per una riduzione della tossicità locale del farmaco.

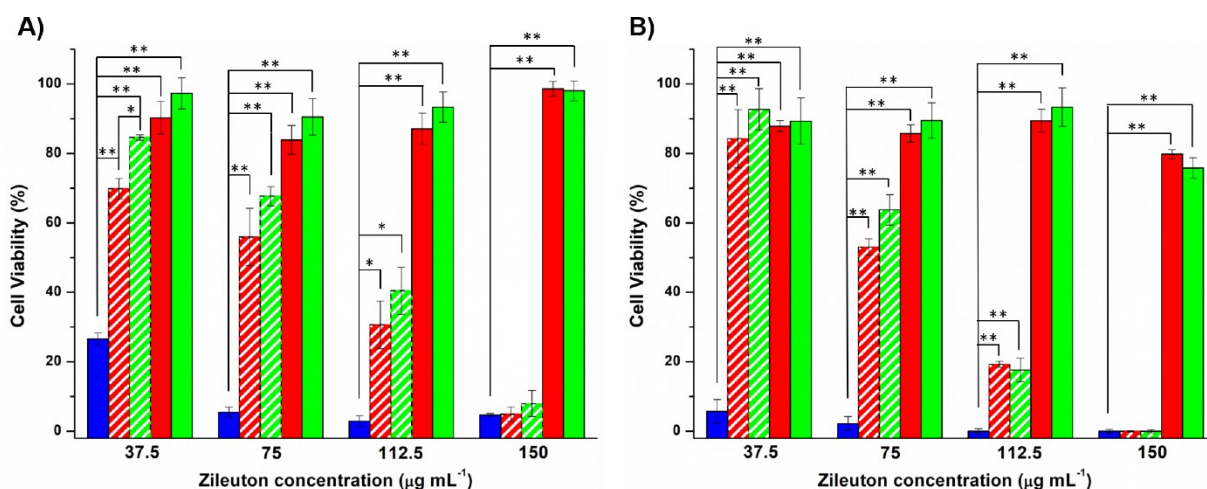


Figura 70 Vitalità % di 16HBE trattate con Np PHEA-g-Pip-PMEOx-g-PLA@Zileuton (verde tratteggiato), Np PHEA-g-Pip-PMEOz-g-PLA@Zileuton (rosso tratteggiato), Np PHEA-g-Pip-PMEOx-g-PLA (verde), Np PHEA-g-Pip-PMEOz-g-PLA (rosso) e Zileuton (blu) dopo 24 (a) e 48 (b) ore (* p < 0.005; ** p < 0.0005) (Dati riportati come media di 3 esperimenti differenti).

3.3.6 Caratterizzazione delle microparticelle

Per i sistemi nanoparticellari, la somministrazione polmonare diretta come polvere secca non è fattibile, poiché le nanoparticelle verrebbero esalate. Pertanto, uno degli approcci più promettenti per ottenere un sistema di somministrazione del farmaco veicolato in nanoparticelle, è la strategia Nano into Micro (NiM), dove le nanoparticelle sono incapsulate in microparticelle idrosolubili, che una volta a contatto con i fluidi polmonari si dissolvono e

rilasciano le nanoparticelle[149]. Per la preparazione delle microparticelle, è stata scelta la tecnica dello spray drying, essendo una tecnica facile, riproducibile e rapida.

Il mannitolo è spesso scelto come materiale per produrre microparticelle inalabili, per via della sua citocompatibilità e facilità d'impiego; inoltre, per la sua natura osmotica, è in grado di indurre l'afflusso di acqua dallo strato di cellule epiteliali al muco, con conseguente alterazione delle proprietà viscoelastiche del muco[237], [238].

Sono state preparate microparticelle, per entrambi i tipi di nanoparticelle con due differenti quantità di mannitolo, al fine di valutare se il mannitolo possa influenzare non solo la ridispersione di nanoparticelle secche ma anche la capacità delle nanoparticelle di muoversi negli strati di muco.

Le microparticelle sono state caratterizzate mediante SEM per valutare forma e diametro medio; come mostrato in Figura 71 tutte le microparticelle hanno forma sferica e diametro compreso tra 2 e 5 μm , mostrando un'ampia distribuzione dimensionale.

La ridispersibilità delle nanoparticelle è stata valutata tramite misure di DLS sciogliendo una certa quantità di polvere secca in acqua; il risultato mostra che la strategia NiM è un ottimo metodo di stabilizzazione delle nanoparticelle, perché, dopo la dissoluzione delle microparticelle, le dimensioni delle nanoparticelle sono rimaste sostanzialmente invariate.

È stata valutata anche la quantità di Zileuton intrappolata nelle microparticelle per valutare se il processo di spray drying potesse degradare il farmaco intrappolato.

Tutte le caratterizzazioni delle microparticelle sono state riassunte nella tabella 8.

Tabella 8 Riassunto caratteristiche delle microparticelle ottenute tramite spray-drying

	Nano: Mann (wt/wt)	MP Size (d. μm)	Resa (%)	Drug Content (%)	Np size (dopo ridispersione) (d. nm)	Np PDI (dopo ridispersione) (d. nm)
MPX1%	50:500	3.79 \pm 2.6	54	1.46 \pm 0.06	98.5	0.105
MPX3%	50:1500	4.49 \pm 1.1	57	0.51 \pm 0.03	103.9	0.176
MPZ1%	50:500	3.27 \pm 1.3	52	1.55 \pm 0.08	106.1	0.241
MPZ3%	50:1500	3.56 \pm 1.1	55	0.50 \pm 0.01	113.5	0.232

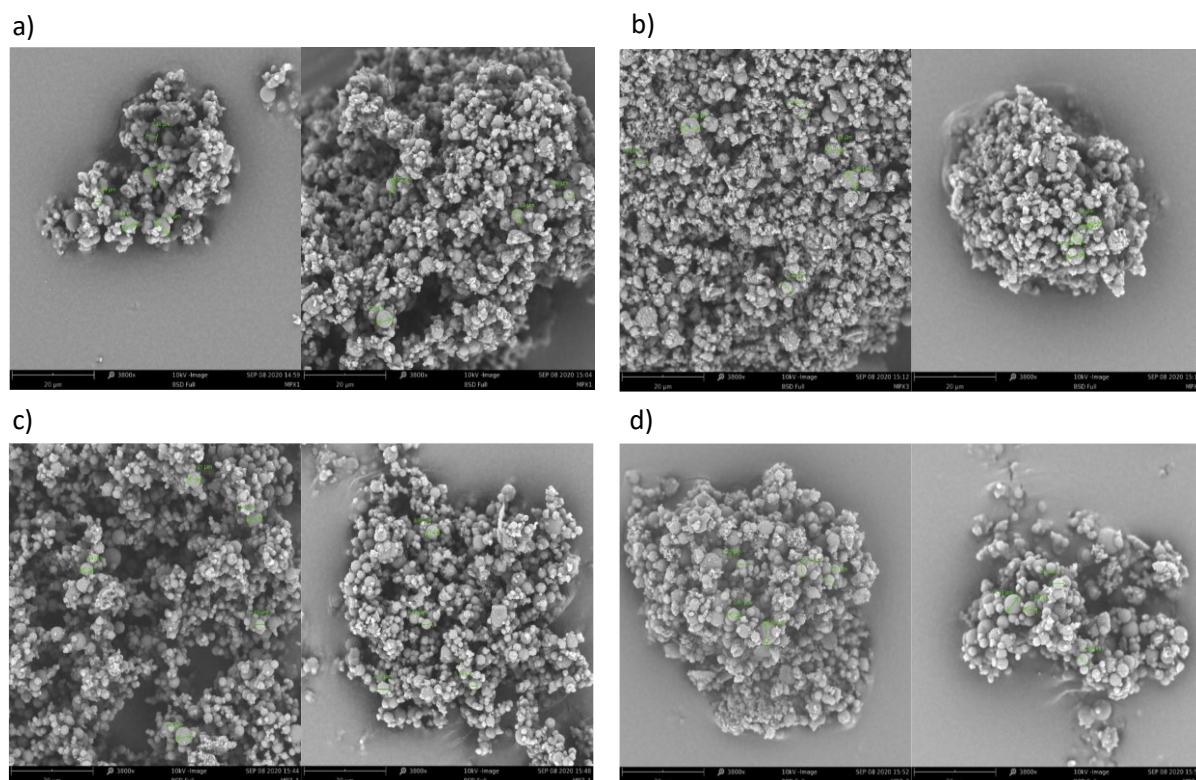


Figura 71 Immagini SEM delle microparticelle MPX1% (a), MPX3%(b), MPZ1%(c) e MPZ3%(d)

Il processo dello spray drying ha permesso di ottenere delle microparticelle sferiche di dimensioni comprese tra 3 e 5 μm ; inoltre non sono state alterate le proprietà tecnologiche delle particelle, le quali mantengono sostanzialmente inalterate sia le proprietà dimensionali che la quantità di Zileuton incorporata.

3.3.7 Cinetica di rilascio del farmaco

Il rilascio di zileuton è stato valutato in PBS a pH 7,4, utilizzando il metodo della dialisi, al fine di valutare la capacità delle nanoparticelle prodotte di trattenere il farmaco incorporato in condizioni *sink* e per garantire un rilascio prolungato.

Come mostrato dai profili di rilascio riportate nella Figura 72, non c'è differenza nella cinetica di rilascio tra le varie formulazioni, come previsto, ma ognuna di esse mostra un rilascio prolungato; infatti, dopo 24 ore di incubazione, la quantità di Zileuton rilasciata dai campioni è pari a circa il 70% in peso della quantità totale, mentre la diffusione libera del farmaco attraverso la membrana di dialisi ha raggiunto il 100% in peso dopo sole 5 ore.

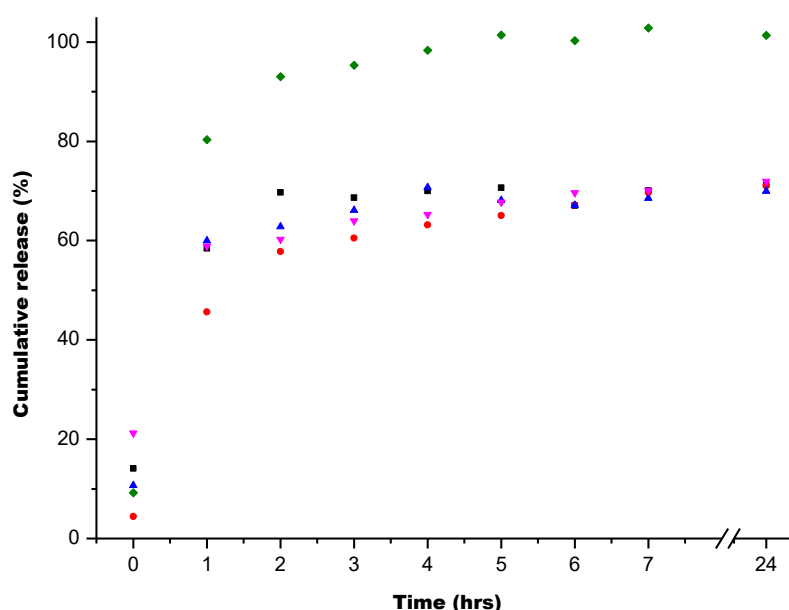


Figura 72 Percentuale di Zileuton rilasciata da MPX1%(nero), MPX3%(blu), MPZ1%(rosso) e MPZ3%(magenta) e profilo di diffusione dello Zileuton (verde) (Dati riportati come media di 3 esperimenti differenti).

3.3.8 Valutazione dell'interazione tra nanoparticelle e mucina

Essendo la formulazione pensata per essere somministrata per via inalatoria, è stato necessario valutare se queste nanoparticelle interagiscono con la mucina e se la presenza di Poly-2-methyl-2-oxazoline o Poly-2-methyl-2-oxazine nella struttura del copolimero possa influenzare efficacemente queste interazioni, dato che lo strato di muco rappresenta la principale barriera che le particelle inalate devono superare. Per questo motivo sono stati effettuati due diversi studi: saggio turbidimetrico e analisi reologica.

Il test turbidimetrico è un'analisi comune e facile per valutare l'interazione tra macromolecole, considerando che il verificarsi di interazioni nanoparticelle-mucina porta alla formazione di disomogeneità microscopiche, che a loro volta causano una riduzione della trasmittanza nel tempo. I dati sono riportati nella Figura 73, come trasmittanza % della miscela rispetto alla trasmittanza della dispersione di mucina in funzione del tempo di incubazione.

Come mostrato in figura, non si osservano riduzioni della trasmittanza percentuale delle dispersioni di mucina in presenza di tutte le nanoparticelle considerate, suggerendo che non si verificano interazioni tra nanoparticelle e mucina, indicando la potenzialità di queste nanoparticelle di penetrare attraverso lo strato di muco.

In particolare è possibile osservare come la trasmittanza dei campioni aumenta rispetto alla trasmittanza della mucina (% di trasmittanza superiore al 100%), soprattutto dopo 100 minuti di incubazione; questo comportamento è comunemente associato alla capacità del mannitolo di

interagire con le mucine, con conseguente aumento della macroporosità del reticolo mucopolimero [239].

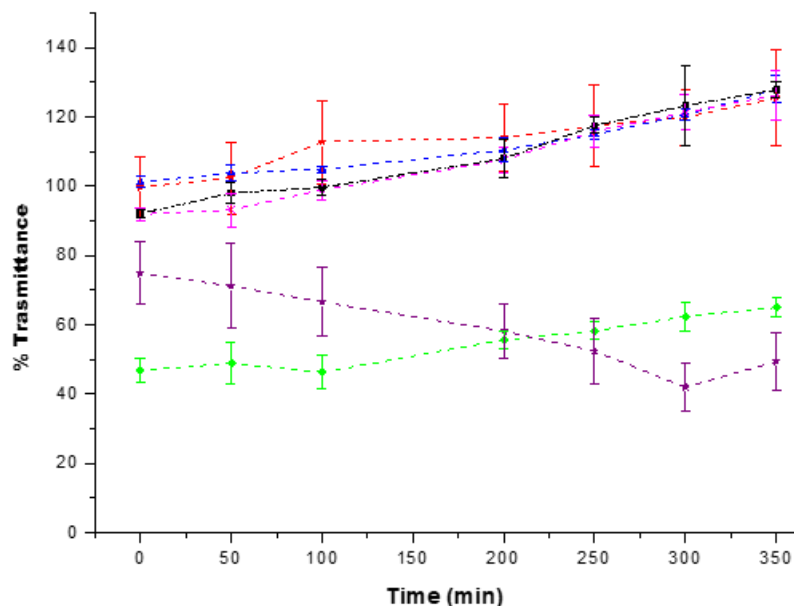


Figura 73 Trasmittanza a 500nm di dispersioni contenenti mucina in presenza di MPX 3%, (Nero), MPX 1% (rosso), MPZ 3%(blu), MPZ1%(magenta), chitosano (verde), NP PHEA-g-PLA (viola) (Dati riportati come media di 3 esperimenti differenti).

Al contrario, il chitosano di controllo positivo porta a una significativa diminuzione della trasmittanza.

A titolo di confronto è stato condotto anche uno studio su un campione di nanoparticelle basato sul copolimero PHEA-g-PLA in presenza di mannitolo. Come già dimostrato da Craparo e colleghi [230], le nanoparticelle ottenute con PHEA-g-PLA sviluppano notevoli interazioni con i componenti del muco, soprattutto all'aumentare del tempo di incubazione, dimezzando la trasmittanza del campione dopo circa due ore. Si può dunque ritenere che la presenza di PMeOx o PMeOzi sulla superficie delle nanoparticelle riduce lo sviluppo di interazioni nanoparticelle-muco.

Il secondo studio è stato condotto per valutare se la presenza di microparticelle potesse modificare le proprietà viscoelastiche della dispersione della mucina, considerando che se si verificano interazioni tra nanoparticelle e mucina, la viscosità della miscela aumenta.

La dispersione di mucina è stata incubata da sola o in presenza di microparticelle e quindi analizzata con un reometro rotazionale. La viscosità complessa (η^*) ottenuta per la dispersione di mucina trattata con tutte le formulazioni prodotte è stata confrontata con la dispersione di mucina non trattata e trattata con la stessa quantità di chitosano, come controllo positivo.

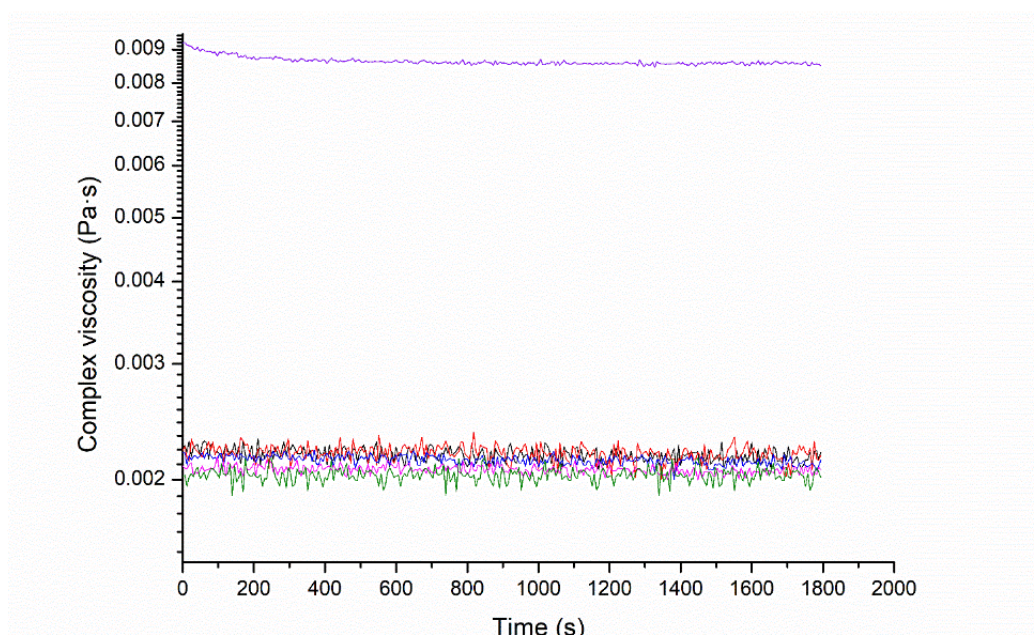


Figura 74 Viscosità complessa in funzione del tempo delle dispersioni contenenti mucina (nero) oppure mucina in presenza di MPX 3% (blu), MPX 1% (rosso), MPZ 3%(magenta), MPZ1%(verde), chitosano (viola)

Come mostrato in Figura 74 non si osserva alcuna interazione tra nanoparticelle e mucina, poichè la viscosità complessa non mostra rilevante incremento rispetto alla dispersione di sola mucina; si osserva invece un comportamento diverso quando si aggiunge chitosano alla dispersione di mucina, dove la viscosità è cinque volte superiore.

3.3.9 Conclusioni

Il presente lavoro si focalizza sullo sviluppo di una nuova formulazione inalatoria per la veicolare di Zileuton, un inibitore selettivo della 5-lipoossigenasi, il cui uso convenzionale per via orale è generalmente associato a fenomeni di epatotossicità e ad una scarsa compliance del paziente. Lo sviluppo di una formulazione a rilascio prolungato per la veicolazione inalatoria di Zileuton, propone la possibilità di fornire molteplici vantaggi in termini di riduzione degli effetti collaterali, migliore efficienza farmacologica e migliore compliance del paziente.

Per raggiungere questo obiettivo sono stati sviluppati due derivati anfifilici del PHEA. Come porzione idrofobizzante per entrambi i copolimeri si è scelto di usare acido polilattico (PLA), mentre come porzione idrofila si è scelto di utilizzare per un copolimero la poli-2-metil-2-ossazolina (PMeOx), e per il secondo copolimero la poli-2-metil-2-ossazina (PMeOz).

I copolimeri sintetizzati sono stati ampiamente caratterizzati con tecniche spettroscopiche e cromatografiche e successivamente sono stati studiati diversi metodi per la preparazione di nanoparticelle.

Tramite tecniche di dynamic light scattering è stato possibile osservare come la nanoprecipitazione diretta si sia rivelata la tecnica migliore, in termini di dimensioni e distribuzione dimensionale.

Sono state preparate dunque nanoparticelle caricate con Zileuton, che sono state caratterizzate dal punto di vista chimico-fisico, morfologico e biologico, ottenendo risultati promettenti.

Successivamente, al fine di superare il limite della somministrabilità per via inalatoria, è stata applicata la strategia Nano into Micro, incapsulando le nanoparticelle in microparticelle idrosolubili a base di mannitolo, tramite tecnica dello spray-drying.

Infine è stato dimostrato che queste microparticelle, una volta poste a contatto con fluidi simulanti il distretto polmonare, sono in grado di dissolversi e rilasciare nanoparticelle non aggregate, potenzialmente in grado di diffondersi attraverso il muco, rilasciando circa il 70% del farmaco in 24 ore.

3.4 Sviluppo di nanoparticelle per veicolazione inalatoria di Rapamicina

3.4.1 Sintesi e caratterizzazione di copolimeri

I potenziali vantaggi legati all'utilizzo di una nuova formulazione per la somministrazione polmonare di Rapamicina sono molteplici e riguardano sia il farmaco che la via di somministrazione.

La Rapamicina è un macrolide il cui principale bersaglio cellulare, il target della rapamicina nei mammiferi (mTOR), è uno dei regolatori centrali della crescita cellulare che regola il metabolismo cellulare, la crescita, la differenziazione e la sopravvivenza in molti tipi di cellule[240]. Nell'asma allergico, è stato osservato che la Rapamicina potrebbe inibire alcuni cambiamenti patologici come l'iper-reattività delle vie aeree (AHR), l'infiammazione delle vie aeree eosinofile, l'iperplasia delle cellule caliciformi e la produzione di IgE[241].

Nonostante queste innumerevoli potenzialità terapeutiche, le sue proprietà chimico-fisiche tra cui come l'instabilità chimica riducono fortemente la sua biodisponibilità al sito bersaglio[242]–[244]. Inoltre, alcuni effetti avversi dose-dipendenti correlati alla biodistribuzione non specifica del farmaco nell'organismo hanno limitato le altre applicazioni terapeutiche della Rapamicina. Pertanto, la somministrazione di Rapamicina attraverso forme di dosaggio convenzionali per trattare le malattie polmonari potrebbe essere associata a diversi inconvenienti, che sfociano in gravi effetti collaterali e inaccessibilità al sito bersaglio.

Per tale motivo, nel presente lavoro è stata sviluppata una formulazione a base di microparticelle da somministrare per inalazione, che entrando a contatto con i fluidi polmonari possono dissolversi e liberare nanoparticelle contenenti Rapamicina.

Data la ben nota possibilità di combinare materiali differenti per ottenere copolimeri con proprietà chimico-fisiche ottimali per uno specifico scopo, questo lavoro è anche focalizzato sulla sintesi e caratterizzazione di nuovi copolimeri graft anfifilici a base di PCL, aventi caratteristiche chimico-fisiche che li rendono potenzialmente sfruttabili per la realizzazione di sistemi inalabili a base di nanoparticelle.

In particolare, il PCL, un poliestere lineare idrofobo, è stato scelto per la sua biodegradabilità e per il fatto di essere già approvato da parte della Food and Drug Administration (FDA). Per aumentare la reattività del PCL per la reazione di coniugazione con i gruppi idrossilici PHEA, il gruppo ossidrilico terminale della catena del PCL è stato precedentemente succinilato con anidride succinica (AS), ottenendo il PCL-SUCC (Fig. 61, step a); successivamente il PCL-SUCC è stato coniugato al backbone del PHEA utilizzando 1,1 -carbonildiimidazolo (CDI) come agente di coniugazione.

In particolare, la prima fase della reazione (Fig 75) è stata ottimizzata valutando diverse condizioni sperimentali. La più alta percentuale di succinilazione PCL è stata ottenuta fissando il rapporto molare tra AS e PCL pari a 40, operando a 60 ° C per 24, utilizzando dimetilamminopiridina (DMAP) come catalizzatore.

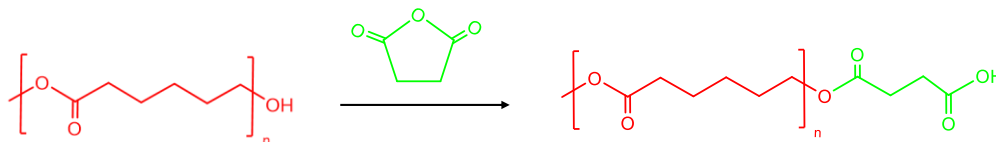


Figura 75 Schema di sintesi del PCL-SUCC; condizioni sperimentali: aDMF, AS, DMAP, 24 h a 60°C.

La reazione di coniugazione del PCL-SUCC agli ossidrili del PHEA (Fig 76) è stata condotta in DMF anidra a 40 ° C, attivando preventivamente i gruppi carbossilici terminali della catena di PCL-SUCC con CDI, in la presenza di dietilammina (DEA) come catalizzatore.

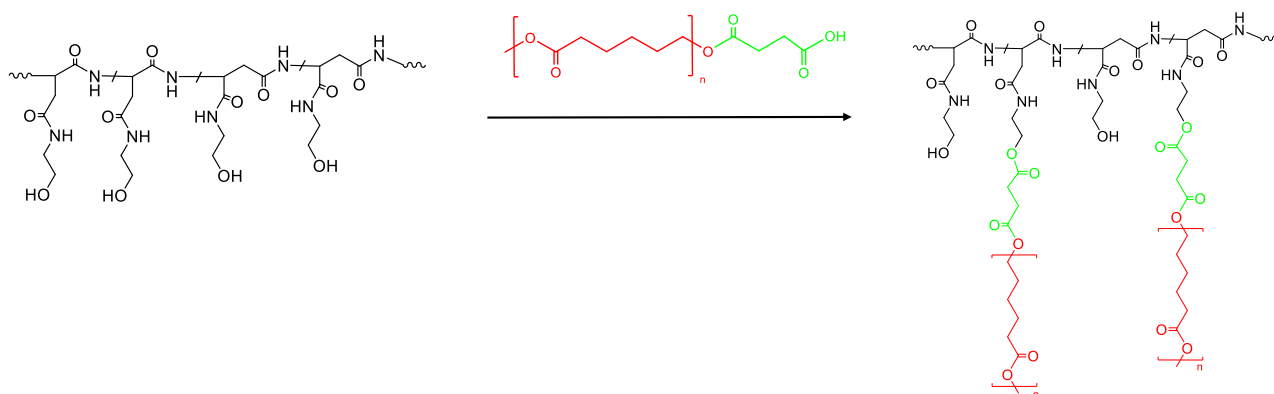


Figura 76 Schema di sintesi del copolimero PHEA-g-SUCC-PCL; condizioni sperimentali: aDMF, CDI, 5 h a 50°C, 24-68 h a 40°C.

Sono state condotte diverse reazioni variando alcune condizioni sperimentali in termini di tempi di reazione (t_{REACT}) e rapporti molari dei reagenti PCL-SUCC, PHEA, CDI e DEA. In questo modo, sono stati ottenuti facilmente diversi copolimeri con diversi gradi di derivatizzazione in catene PCL ($DD_{\text{PCL}}\%$). Le condizioni sperimentali e i rapporti molari dei reagenti scelti sono stati riassunti nella Tabella 9.

Tabella 9 Tempi di reazione, rapporti stechiometrici utilizzati e dati SEC (\bar{M}_w e \bar{M}_w/\bar{M}_n) dei copolimeri ottenuti

Copolimeri	Tempi reazione	Rapporti molari			Pesi molecolari	
	t_{REACT} (hrs)	R ₃	R ₄	R ₅	\bar{M}_w (kg/mol)	\bar{M}_w/\bar{M}_n
PHEA-g-SUCC-PCL _(A)	24	3	0.3	0.6	114.0	1.6
PHEA-g-SUCC-PCL _(B)	44	3	0.3	0.6	134.0	1.5
PHEA-g-SUCC-PCL _(C)	68	3	0.3	0.6	158.5	1.2
PHEA-g-SUCC-PCL _(D)	24	3	0.3	0.12	108.5	1.4
PHEA-g-SUCC-PCL _(E)	44	3	0.3	0.12	153.0	1.3
PHEA-g-SUCC-PCL _(F)	68	3	0.3	0.12	187.0	1.2

La quantità di catene PCL legate a PHEA ($DD_{PCL}\%$) è stata calcolata dagli spettri 1H -NMR in DMF deuterata.

In particolare, l'integrale dei picchi relativi ai protoni compresi tra δ 1.5 e 2.1 ($H = 732$) nonché i protoni a δ 2.,6 ($H = 244$) e a δ 4.3 ($H = 244$) appartenenti a catene PCL legate, è stato confrontato con l'integrale relativo ai protoni a δ 3.6 ($H = 2$) attribuito ai protoni dell'unità ripetitiva del PHEA.

Il DD_{PCL} è risultato essere 1.2 ± 0.3 , 2.0 ± 0.2 e $2.2 \pm 0.3\%$ in moli, rispettivamente, i copolimeri per PHEA-g-SUCC-PCL_(A), PHEA-g-SUCC-PCL_(B) e PHEAg-SUCC-PCL_(C). Per i copolimeri PHEA-g-SUCC-PCL_(D), PHEA-g- SUCC-PCL_(E) e PHEA-g-SUCC-PCL_(F), DD_{PCL} è risultato essere uguale a 1.1 ± 0.2 , 2.2 ± 0.2 , $4.4 \pm 0.3\%$ in moli, rispettivamente.

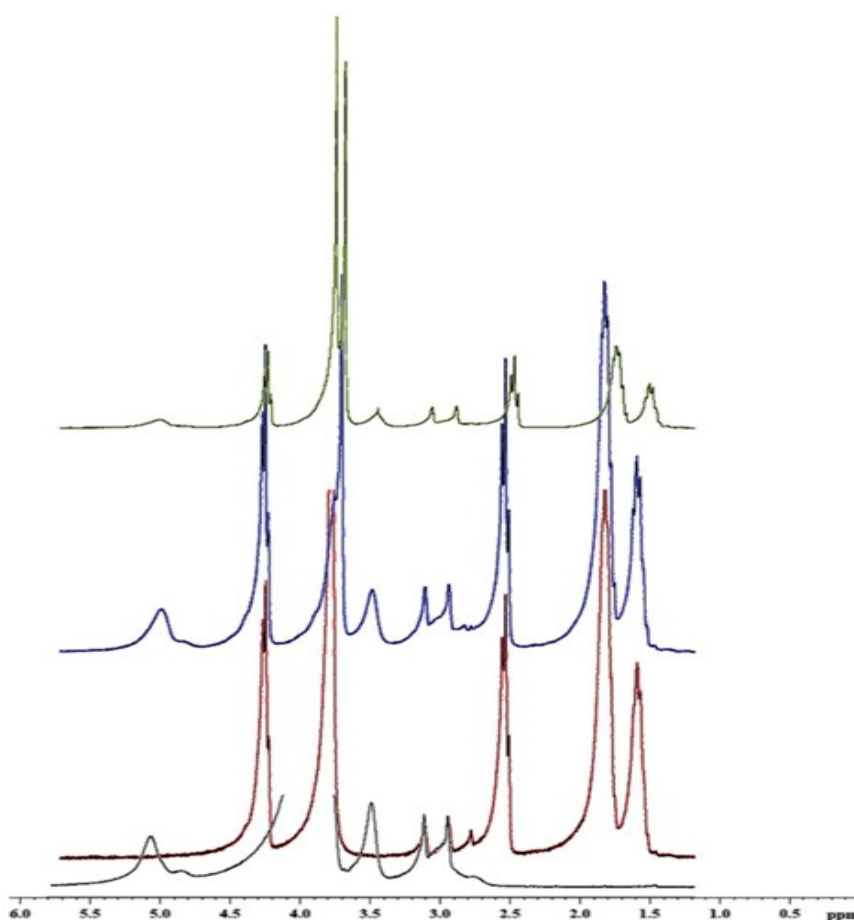


Figura 77 Spettri 1H NMR in DMF-d7 dei copolimeri: PHEA (nero), PCL-SUCC (rosso), PHEA-g-SUCC-PCL (blu), e PHEA-g-SUCC-PCL-g-PEG (rosso).

A t_{REACT} inferiori (24 h), il $DD_{PCL}\%$ dei copolimeri ottenuti non cambia all'aumentare di R_5 (cioè il rapporto molare tra PCL-SUCC / unità ripetitiva di PHEA), mentre a t_{REACT} più alti (68 h), il $DD_{PCL}\%$ aumenta, passando da 2.2 a 4.4 (con $R_5 = 0.06$ e 0.12, rispettivamente).

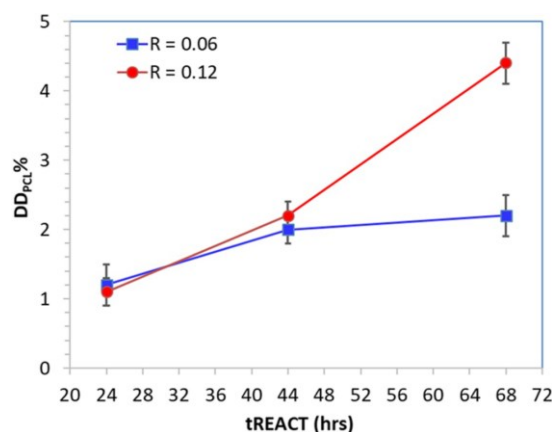


Figura 78 DD_{PCL}% dei copolimeri PHEA-g-SUCC-PCL (A) - (F) ottenuti in funzione del tempo di reazione (t_{REACT}) (ore) (Dati riportati come media di 3 esperimenti differenti).

Tutti i copolimeri sintetizzati sono stati caratterizzati mediante analisi SEC in solvente organico per la determinazione dei valori \bar{M}_w e \bar{M}_w/\bar{M}_n . I risultati sono riportati in Tabella 8. Considerando tutti i dati, il numero di catene PCL innestate su una singola catena di PHEA (con un peso molecolare medio di 43.7 kDa) può variare da 3 a circa 12, rispettivamente, da PHEA-g-SUCC-PCL_(A) a PHEA-g-SUCC-PCL_(F).

Sono state inoltre effettuate analisi FT-IR sui copolimeri ottenuti; la sovrapposizione degli spettri FT-IR evidenzia la presenza nello spettro del PHEA-g-SUCC-PCL di bande tipiche di entrambi i polimeri PHEA e PCL-SUCC.

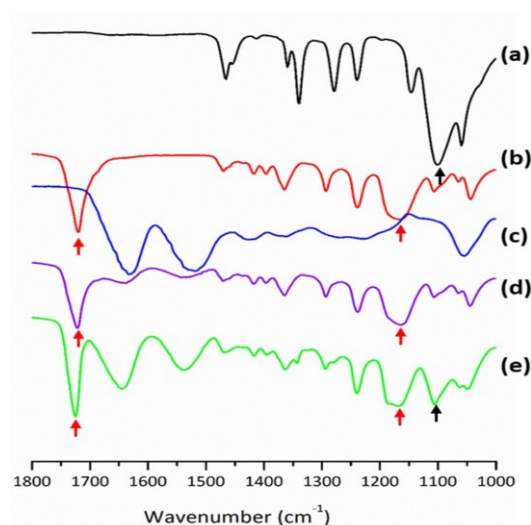


Figura 79 Spettri FT-IR di (a) PEG, (b) PCL-SUCC, (c) PHEA, (d) PHEA-g-SUCC-PCL e (e) PHEA-g-SUCC-PCL-g-PEG.

In particolare, lo spettro FT-IR del copolimero PHEA-g-SUCC-PCL (spettro d) ha mostrato le bande caratteristiche a 1645-1633 cm^{-1} (ammide I) e 1533-1518 cm^{-1} (ammide II), corrispondenti rispettivamente allo stretching asimmetrico C=O e al bending N-H del backbone del PHEA (spettro c), e due bande a 1721 e 1169 cm^{-1} attribuite, rispettivamente, allo stretching asimmetrico di C=O e C-O del PCL (spettro b).

Al fine di esplorare la possibilità di coniugare a questi copolimeri catene idrofile come il polietilenglicole (PEG) per ottenere copolimeri con proprietà anfifiliche e in grado di dare, potenzialmente, copolimeri utili per applicazioni biomediche e farmaceutiche, sono stati sintetizzati due derivati peghilato del PHEA-g-SUCC-PCL.

In particolare, tenendo in considerazione sia la resa ottenuta che il $DD_{PCL}\%$, PHEA-g-SUCC-PCL_(B) e PHEA-g-SUCC-PCL_(F) sono stati scelti come copolimeri di partenza; N, N' - disuccinimidil carbonato (DSC) è stato utilizzato agente di coniugazione per formare un legame uretanico tra i gruppi idrossilici di PHEA-g-SUCC-PCL ed il gruppo amminico di O-(2-amminoetile)-O'-metil poli (etilenglicole) (H₂N-PEG₂₀₀₀-OCH₃) con Mw di 2000 Da.

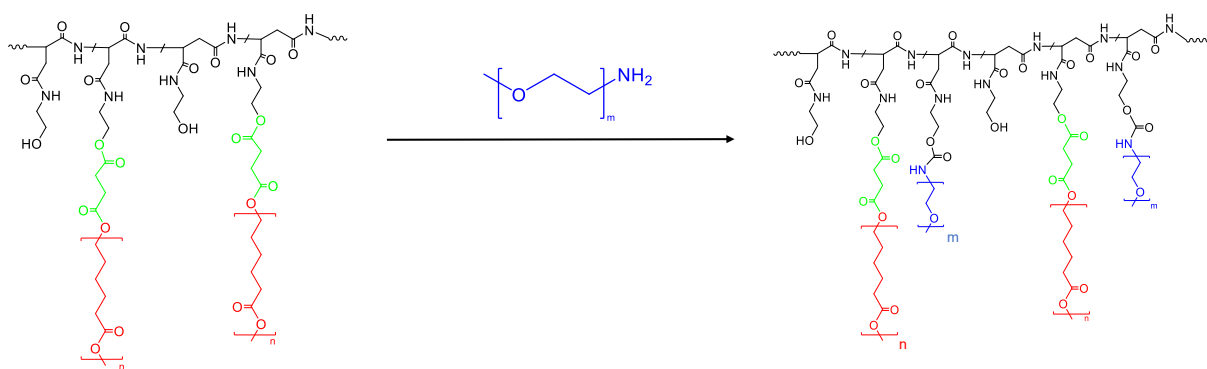


Figura 80 Schema di sintesi del copolimero PHEA-g-SUCC-PCL-g-PEG; condizioni dperimentali: aDMA, DSC, 4h a 40°, 18h a 25°C.

La resa per i copolimeri ottenuti è risultata di circa il 75% in peso rispetto ai materiali di partenza totali.

Il grado di derivatizzazione nelle catene PEG ($DD_{PEG}\%$) dei copolimeri ottenuti è stato calcolato dagli spettri ¹H NMR, rapportando l'integrale del picco relativo ai protoni del PEG (H = 176) a 3.7 δ con l'integrale relativo a protoni (H = 2) a δ 3.50 attribuiti a protoni dell'unità ripetitiva del PHEA. Il $DD_{PEG}\%$, espresso come media di tre valori, è risultato essere 3.9 ± 0.3 e $4.3 \pm 0.4\%$ mol, rispettivamente per PHEA-g-SUCC-PCL_(B) -g-PEG e PHEA-g-SUCC-PCL_(F)-g-PEG, quindi non significativamente differenti tra loro.

In altre parole, indipendentemente dalla quantità iniziale di PCL innestato, una quantità paragonabile di PEG può essere coniugata sulla backbone polimerico del PHEA.

I valori \bar{M}_w di entrambi i copolimeri risultano essere superiori rispetto ai copolimeri PHEA-g-SUCC-PCL di partenza, in accordo con l'incremento atteso considerando il DD_{PEG} ottenuto, essendo rispettivamente pari a 151.0 kDa (\bar{M}_w/\bar{M}_n 1.5) e 201.6 kDa (\bar{M}_w/\bar{M}_n 1.3) per i copolimeri PHEA-g-SUCC-PCL_(B) -g-PEG e PHEA-g-SUCC-PCL_(F) -g-PEG.

Inoltre, l'analisi FT-IR ha confermato l'introduzione del PEG nel copolimero di partenza, mostrando nello spettro FT-IR del copolimero ottenuto le bande tipiche a 1106 cm^{-1} attribuita alle catene PEG (spettro a, Fig. 79).

Tra i copolimeri prodotti, il copolimero PHEA-g-SUCC-PCL_(F)-g-PEG è stato selezionato per lo sviluppo di nanosistemi polimerici, avendo un più giusto equilibrio tra porzione idrofila e idrofobica; in particolare è stato sintetizzato il derivato fluorescente PHEA-g-RhB-g-SUCC-PCL_(F)-g-PEG, ottenuto utilizzando come polimero precursore il PHEA-g-RhB. La scelta di lavorare con un polimero fluorescente risiede nella possibilità di poter effettuare caratterizzazioni altrimenti non possibili.

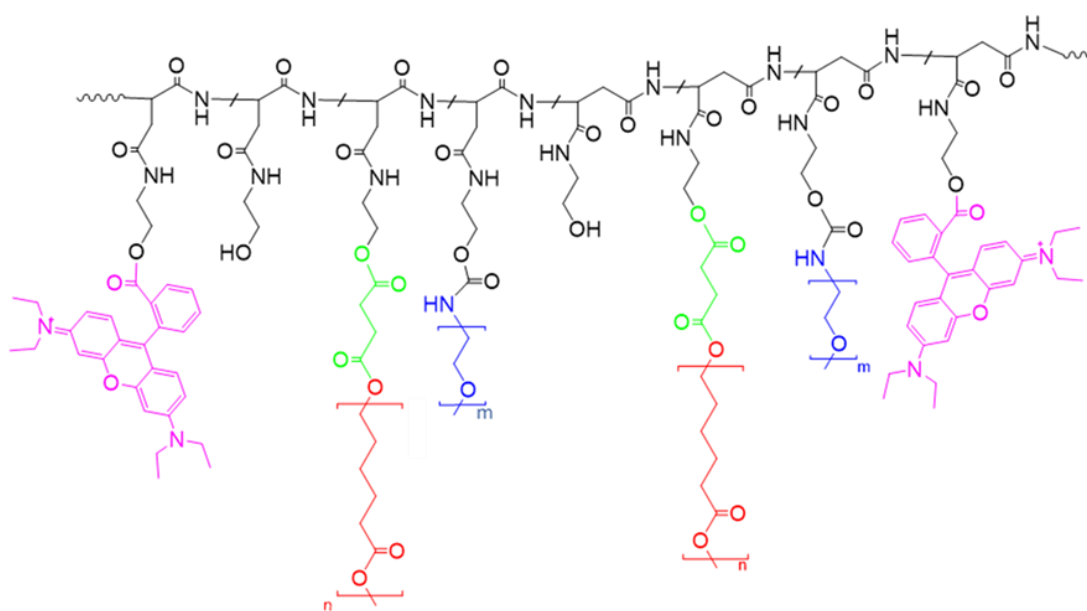


Figura 81 Struttura chimica del copolimero PHEA-g-RhB-g-SUCC-PCL-g-PEG.

3.4.2 Caratterizzazione delle nanoparticelle ottenute

Le nanoparticelle sono state preparate con il metodo della nanoprecipitazione diretta, che comporta il gocciolamento di una soluzione organica di polimero, ottenuta solubilizzando una certa quantità di polimero in un solvente organico miscibile all'acqua, in un grande eccesso di "non solvente". La rapida diffusione del solvente organico nell'acqua consente la formazione di nanoparticelle. La dispersione acquosa delle nanoparticelle è stata caratterizzata con la tecnica del Dynamic Light Scattering, al fine di valutare le dimensioni e la carica superficiale; sia le nanoparticelle vuote che quelle caricate con rapamicina mostrano una dimensione nanometrica e la presenza di una carica superficiale negativa, senza differenze significative tra i due campioni (Tabella 10).

Tabella 10 Z-Average, PDI e Potenziale zeta delle nanoparticelle ottenute prima e dopo il processo di essiccazione

	Z-average (nm)	PDI	ζ potential (mV ±S.D.)
PRE-SPRAY DRYING			
Np	54.7	0.34	-16.7 ± 7.8
Np@Rapa	51.1	0.20	-14.4 ± 4.6
POST-SPRAY DRYING			
Np	191.5	0.43	-13.8 ± 7.7
Np@Rapa	162.1	0.42	-12.2- ± 9.6

In particolare, in entrambi i casi, sia le particelle vuote che quelle caricate con rapamicina risultano essere inferiori a 100 nm, con un potenziale zeta negativo, che non è né influenzato dalla presenza di rapamicina, né dal processo di essiccazione.

La quantità di farmaco caricato, (Drug Loading, DL%), è stata valutata con un metodo HPLC appropriato ed è risultata pari al 14.4% in peso. Quest'ultimo corrisponde ad un'efficienza di intrappolamento (EE%) dell'82% in peso. Pertanto, il metodo scelto per produrre nanoparticelle caricate con Rapamicina risulta essere efficace.

La scelta di funzionalizzare con catene PEG il copolimero di partenza utilizzato per realizzare le nanoparticelle nasce dall'idea che durante il processo di nanoprecipitazione, le catene di PEG tendano ad esporsi sulla superficie del nanosistema. La valutazione della presenza di porzioni di PEG sulla superficie di nanoparticelle a base di PHEA-g-RhB-g-SUCC-PCL_(F)-g-PEG, è stata fatta mediante analisi di superficie utilizzando la tecnica della spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS). Per confronto, sono stati analizzati sia campioni di nanoparticelle non peghilate (PHEA-g-RhB-g-SUCC-PCL_(F)) che nanoparticelle di PCL.

La composizione chimica della superficie di tutti i campioni esaminati è riportata nella Tabella 11 come distribuzione relativa delle specie di carbonio, ossigeno e azoto sulla superficie delle particelle, determinata mediante una procedura di *curve-fitting* dei picchi del fotoelettrone. Da una semplice valutazione è evidente che la percentuale atomica relativa di C 1s su entrambe le nanoparticelle a base di derivati PHEA, è inferiore a quella riscontrata su nanoparticelle a base PCL, mentre negli stessi campioni è presente azoto, ad un'energia di legame pari a 399.7 eV, che dovrebbe essere attribuita al legame N–C/N–C(O) presente nel backbone del PHEA. Quest'ultimo picco, come previsto, è assente nel campione contenente esclusivamente PCL. Questo risultato indica che il PHEA è presente sulla superficie di queste particelle.

Tabella 11 Distribuzione relativa delle specie di carbonio, ossigeno e azoto sulla superficie delle particelle, determinata mediante una procedura di curve-fitting dei picchi del fotoelettrone

Nanoparticelle	C 1s	O 1s	N 1s
PCL	74.49	25.51	---
PHEA-g-RhB-g-SUCC-PCL _(F)	69.70	26.40	3.90
PHEA-g-RhB-g-SUCC-PCL _(F) -g-PEG	72.60	25.32	2.08

Al fine di ottenere informazioni più dettagliate sul tipo di legame in cui è coinvolto il carbonio, le distribuzioni relative delle specie di carbonio sulla superficie delle particelle sono state determinate mediante una procedura di *curve-fitting*, i cui risultati sono riportati nella Tabella 12.

Tabella 12 Distribuzione relativa delle specie di carbonio, ossigeno e azoto sulla superficie delle particelle, determinata mediante una procedura di curve-fitting dei picchi del fotoelettrone

		C-C/C-H	C-N	C-O	N-C=O	O-C=O
Nanoparticelle	BE (eV)	284.8	286.0	286.2	287.6	288.6
PCL		66.6	---	16.6	---	16.8
PHEA-g-RhB-g-SUCC-PCL _(F)		57.1	6.3	16.6	6.6	13.4
PHEA-g-RhB-g-SUCC-PCL _(F) -g-PEG		39.1	4.5	42.9	4.3	9.2

Come previsto, in entrambi i campioni ottenuti dai derivati del PHEA, lo spettro del livello di core C 1s mostra specie che hanno un'energia di legame (BE) di 286.0 e 287.6 eV, attribuite rispettivamente ai legami C-N e N-C=O (appartenenti al backbone del PHEA), che invece sono assenti nel campione ottenuto con solo PCL. È da notare che lo spettro del livello di core C 1s, l'abbondanza del legame C-O nel campione contenente particelle peghilate è più che doppio rispetto al campione contenente particelle non peghilate (42.9 vs 16.6%); l'abbondanza del legame C-O, dimostra la presenza di PEG sulla superficie delle nanoparticelle ottenute [124]. Nelle Figure 82a e 82b, sono riportati rispettivamente i curve fittings degli spettri C 1s dei campioni nanoparticellari.

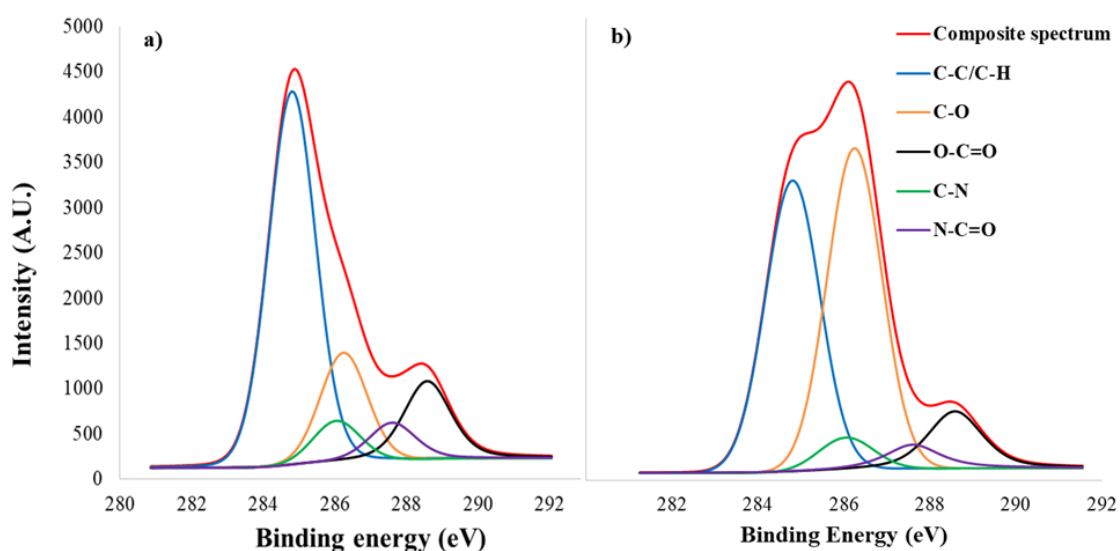


Figura 82 Curve-fitting dello spettro C 1s delle nanoparticelle di (a) PHEA-g-RhB-g-SUCC-PCL e (b) PHEA-g-RhB-g-SUCC-PCL-g-PEG.

Come previsto, in questi grafici, lo spettro del livello core C 1s al BE di 286,2 eV delle nanoparticelle peghilate è significativamente più alto e principalmente rappresentato rispetto a quello trovato sullo spettro delle particelle non peghilate.

3.4.3 Test di vitalità cellulare

Poiché le particelle ottenute sono state progettate e prodotte per la somministrazione di Rapamicina a livello polmonare, è stata valutata la citocompatibilità di queste particelle, vuote e caricate con il farmaco, su 16-HBE.

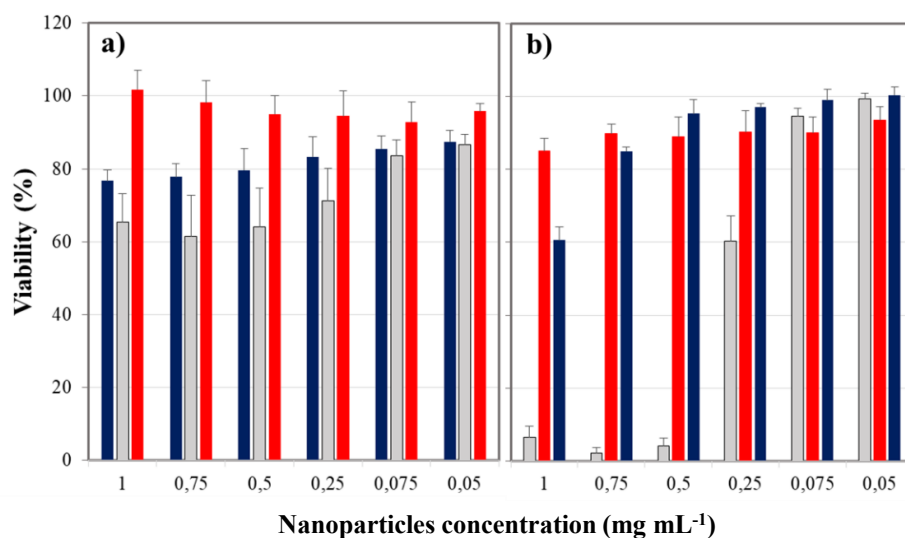


Figura 83 Vitalità % di cellule 16HBE dopo 24 (a) e 48 (b) ore di incubazione con Np (rosso), Np@Rapamicina (blu) e Rapamicina libera (grigio) (Dati riportati come media di 3 esperimenti differenti).

La citocompatibilità delle nanoparticelle caricate con Rapamicina è stata valutata mediante saggio MTS su cellule 16-HBE a diverse concentrazioni e confrontata con la citocompatibilità dello Rapamicina libera e delle nanoparticelle vuote dopo 24 e 48 ore di incubazione. I dati ottenuti sono riportati in Figura 83. I risultati mostrano che mentre le nanoparticelle vuote non hanno effetti sulla vitalità cellulare alle condizioni sperimentali scelte, quelle caricate con Rapamicina (Np@Rapamicina) mostrano effetti sulla vitalità a seconda dei tempi di incubazione e delle concentrazioni. In particolare, la vitalità cellulare diminuisce all'aumentare della concentrazione e del tempo di incubazione (24 vs 48 ore). Considerando l'assenza di effetti delle nanoparticelle vuote e l'effetto della Rapamicina libera sulla vitalità cellulare, si può dedurre che gli effetti dei sistemi carichi di farmaco sulla vitalità cellulare siano dovuti al farmaco rilasciato durante l'incubazione con le cellule. Tuttavia l'effetto sulla vitalità cellulare delle nanoparticelle caricate con Rapamicina è ridotto rispetto al farmaco libero, specie dopo 48 ore; questi risultati sottolineano come l'utilizzo del drug delivery system sia importante non solo per una migliore efficacia farmacologica ma anche per una riduzione della tossicità del farmaco.

3.4.4 Caratterizzazione delle microparticelle

Al fine di rendere questi sistemi somministrabili come polvere secca per via inalatoria, è stata applicata la strategia Nano into Micro (NiM), dove le nanoparticelle vengono incapsulate in microparticelle idrosolubili, che una volta a contatto con i fluidi polmonari si dissolvono e rilasciano le nanoparticelle[149].

Per la preparazione delle microparticelle, è stata scelta la tecnica dello spray drying, essendo una tecnica facile, riproducibile e rapida.

Il mannitolo è spesso scelto come materiale per produrre microparticelle inalabili; inoltre, per la sua natura osmotica, è in grado di indurre l'afflusso di acqua dallo strato di cellule epiteliali al muco, con conseguente alterazione delle proprietà viscoelastiche del muco

Per ottenere le microparticelle, alla dispersione di nanoparticelle appena preparata è stato aggiunto mannitolo in modo da avere una concentrazione 1% p/v. Le condizioni di funzionamento del Nano Spray Dryer B-90 HP sono state ottimizzate e impostate come segue: frequenza 120 KHz, pressione 30 hPa, temperatura ingresso 100 ° C e temperatura uscita 40 ° C, flusso 100-120 L min⁻¹, portata dello spray pari al 78% e portata della pompa pari al 66%.

Le microparticelle ottenute sono state raccolte dal collettore elettrostatico, pesate (ottenendo una resa del 67% in peso), e caratterizzate valutando la morfologia ed il diametro utilizzando

un microscopio a scansione elettronica (SEM) (analizzato come polvere), e da un microscopio ottico (MO) (analizzato dopo dispersione in paraffina). Le immagini rappresentative sono riportate nella Figura 84.

Il diametro medio delle particelle ottenute è stato calcolato da immagini SEM e OM con l'aiuto del software Imagej ed è risultato essere, rispettivamente, $1.53 \pm 0.26 \mu\text{m}$ e $1.71 \pm 0.36 \mu\text{m}$.

Come si può vedere, i valori dimensionali ottenute dall'analisi delle particelle tramite l'ausilio di due diversi microscopi sono pressoché confrontabili.

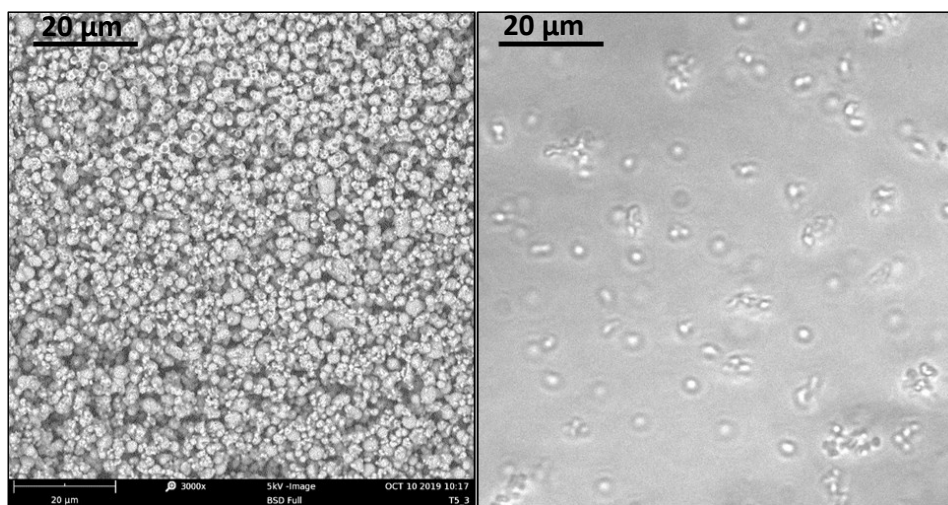


Figura 84 Immagini SEM (sinistra) e OM (destra) delle microparticelle ottenute.

Pertanto, le condizioni sperimentali e strumentali risultano adeguate per ottenere microparticelle con diametro compreso tra 1 e 5 μm , quindi potenzialmente adatte alla somministrazione polmonare ed alla deposizione a livello bronchiale.

La ridispersibilità delle nanoparticelle è stata valutata tramite misure di DLS sciogliendo una certa quantità di polvere secca in acqua.

I dati, riportati nella tabella 11, hanno dimostrato che la formulazione in polvere, a contatto con un mezzo acquoso, è in grado di disassemblarsi e liberare le nanoparticelle; quest'ultime mostrano dimensione media inferiore a 200 nm e potenziale ζ confrontabile con quello della dispersione di nanoparticelle originaria. Sebbene le dimensioni siano superiori rispetto a quelle della dispersione di nanoparticelle originaria, questi sono comunque accettabili considerando che le dimensioni medie sono inferiori a 200 nm e quindi potenzialmente in grado di permeare attraverso lo strato di muco.

È stata valutata anche la quantità intrappolata di Rapamicina nelle microparticelle per capire se

il processo di spray drying potesse degradare il farmaco intrappolato, che è risultata paragonabile.

3.4.5 Cinetiche di rilascio del farmaco

Il rilascio di rapamicina è stato valutato sia in PBS a pH 7.4 che in una miscela PBS: FBS 90:10 v/v, utilizzando il metodo di dialisi, al fine di valutare la capacità delle nanoparticelle prodotte di trattenere il farmaco incorporato in condizioni sink e garantire un rilascio prolungato.

Come controllo, lo stesso esperimento è stato condotto incubando una dispersione libera di farmaco nello stesso mezzo (alla stessa concentrazione di quello intrappolato nelle nanoparticelle). A intervalli di tempo scelti, la quantità di farmaco intatto è stata quantificata mediante HPLC e riportata nella Figura 85.

Come mostrato in figura, il rilascio del farmaco nelle condizioni sperimentali scelte è molto lento e non significativamente diverso in entrambi i terreni, raggiungendo circa il 6-8% in peso dopo 24 ore.

Parallelamente, considerato che la Rapamicina possiede una struttura macrolidica ed è associata a fenomeni di instabilità chimica nei fluidi fisiologici [36], è stato effettuato uno studio di stabilità del farmaco negli stessi mezzi in cui è stato valutato il rilascio.

Per ogni tempo di incubazione, è stato quantificato anche il farmaco intatto in soluzione; dopo 24 ore la quantità residua di rapamicina risulta essere pari a circa il 37.4% ed il 24.6% in peso nei mezzi DPBS e DPBS / FBS al 10% rispettivamente.

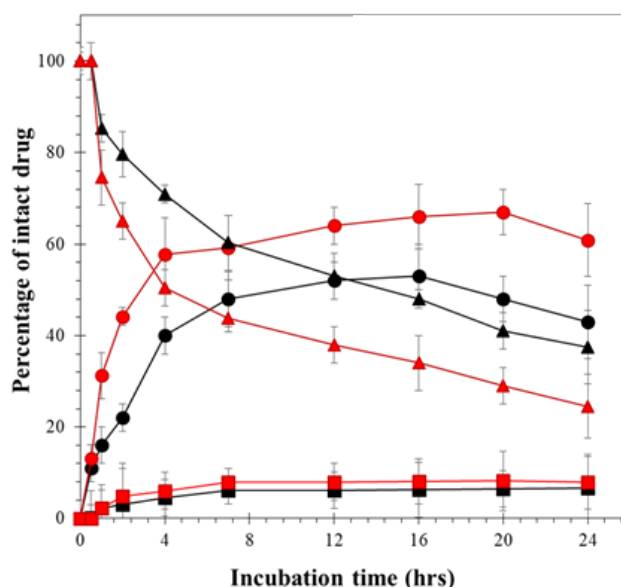


Figura 85 Stabilità Rapamicina (▲), profilo di diffusione attraverso la membrana di dialisi (●) e profili di rilascio da microparticelle (■) in: (a) DPBS (pH 7.4) (nero) e in DPBS / siero bovino fetale (FBS) (pH 7.4) (rosso) (Dati riportati come media di 3 esperimenti differenti).

Questo risultato è una conferma del fatto che i vantaggi associati all'utilizzo di veicoli colloidali per l'erogazione di farmaci instabili nei fluidi biologici sono molteplici, in quanto ci permettono di mantenere una quantità di farmaco nel sito di somministrazione maggiore di quella somministrata in forma libera. Inoltre la possibilità di avere un rilascio controllato è un ulteriore aspetto importante perché permette di effettuare meno dosi nel tempo e con minori quantità di farmaco.

3.4.6 Valutazione dell'interazione tra nanoparticelle e mucina

Al fine di valutare le possibili interazioni con i componenti del muco, le microparticelle contenenti nanoparticelle peghilate sono state incubate con una dispersione di mucina in PBS e la viscosità complessa è stata misurata per 30 min. L'esperimento è stato ripetuto anche in presenza di microparticelle contenenti nanoparticelle non peghilate. La viscosità complessa (η^*) ottenuta per la dispersione di mucina trattata con tutte le formulazioni prodotte è stata confrontata con quella misurata nella dispersione di mucina non trattata e trattata con la stessa quantità di chitosano, come controllo positivo.

I dati sono riportati nella Figura 86. Come si può vedere, non sono state riscontrate differenze significative nel comportamento reologico tra le particelle pegilate o meno, mentre il chitosano mostra una viscosità complessa significativamente più alta rispetto a tutti gli altri campioni.

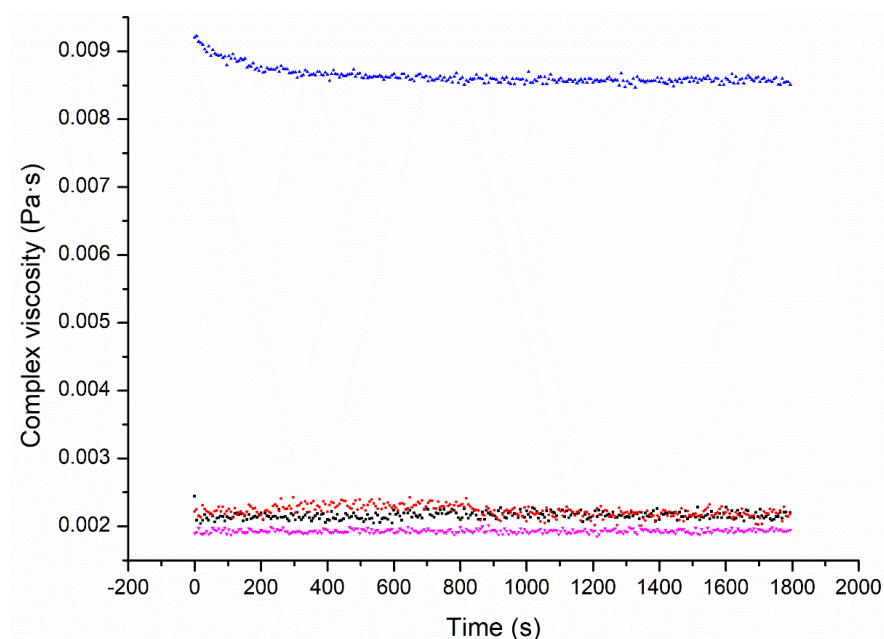


Figura 86 Viscosità complessa in funzione del tempo delle dispersioni contenenti mucina (nero) oppure mucina in presenza di NiM@NpPEG (rosso), Nim@Np (magenta) e chitosano (blu)

Come noto, la capacità di interazione di sistemi colloidali di varia natura può essere valutata anche mediante misure di torbidità, poiché tali interazioni comporterebbero una riduzione della trasmittanza della dispersione; pertanto, è stata misurata la trasmittanza a $\lambda = 650$ nm in funzione del tempo di incubazione delle dispersioni contenenti mucina e nanoparticelle.

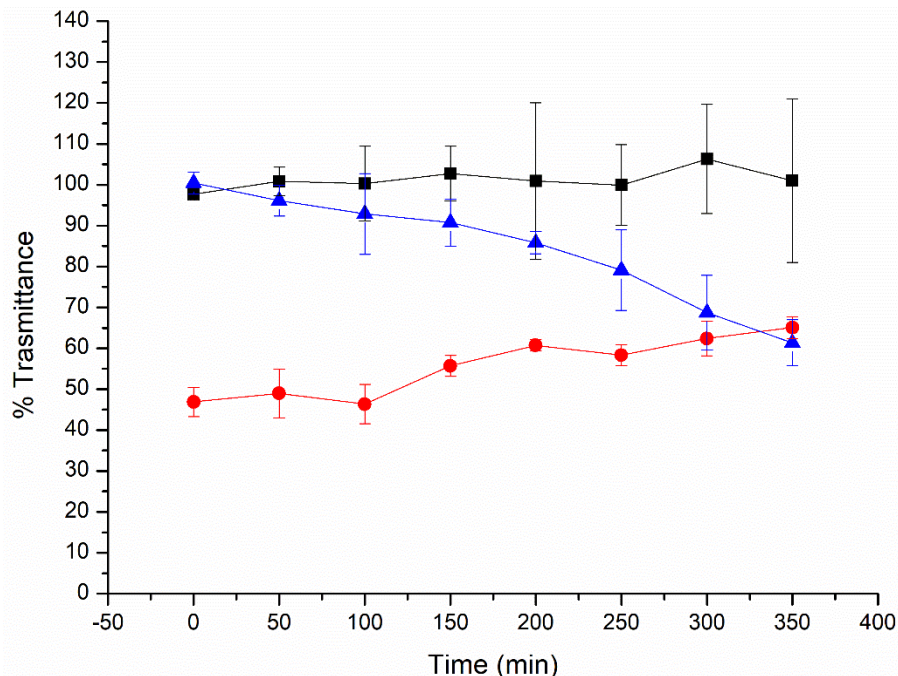


Figura 87 Trasmittanza a 500nm di dispersioni contenenti mucina in presenza di NiM@NpPEG (Nero), NiM@Np%(blu) e chitosano (rosso) (Dati riportati come media di 3 esperimenti differenti).

Come può essere valutato in Figura 87, le nanoparticelle peghilate hanno una bassa tendenza ad interagire con le mucine, dal momento che non si ha variazione significativa della trasmittanza nel tempo; si è osservato inoltre che tale assenza di interazioni non cambia in funzione del tempo. Al contrario, le nanoparticelle non peghilate mostrano una certa tendenza ad interagire con la mucina, che aumenta con il tempo di incubazione, come dimostrato dalla riduzione della trasmittanza nel tempo. Questo risultato dimostra che la pegilazione superficiale conferisce alle nanoparticelle la potenziale capacità di diffondersi attraverso il muco, una volta rilasciate dalle microparticelle.

Alla luce dei risultati incoraggianti finora ottenuti, è stato effettuato un test per studiare la capacità di penetrazione delle nanoparticelle nel muco, sfruttando l'assorbimento UV della rodamina presente nelle nanoparticelle. In particolare, è stato realizzato un sistema a strati composto da un gel di agarosio, che funge da compartimento accettore, ed in cima uno strato di dispersione di mucina in PBS 1 mg mL^{-1} .

Le dispersioni di nanoparticelle sono state collocate sopra lo strato di mucina e successivamente ciascun vial è stato incubato a 37°C ; ad intervalli di tempo definiti la dispersione di mucina è

stata rimossa ed i geli di agarosio sono stati risciacquati con acqua distillata, sciolti a 60 ° C e analizzati mediante spettrofotometria UV, registrando la trasmittanza alla λ di 561 nm (data dalla rodamina).

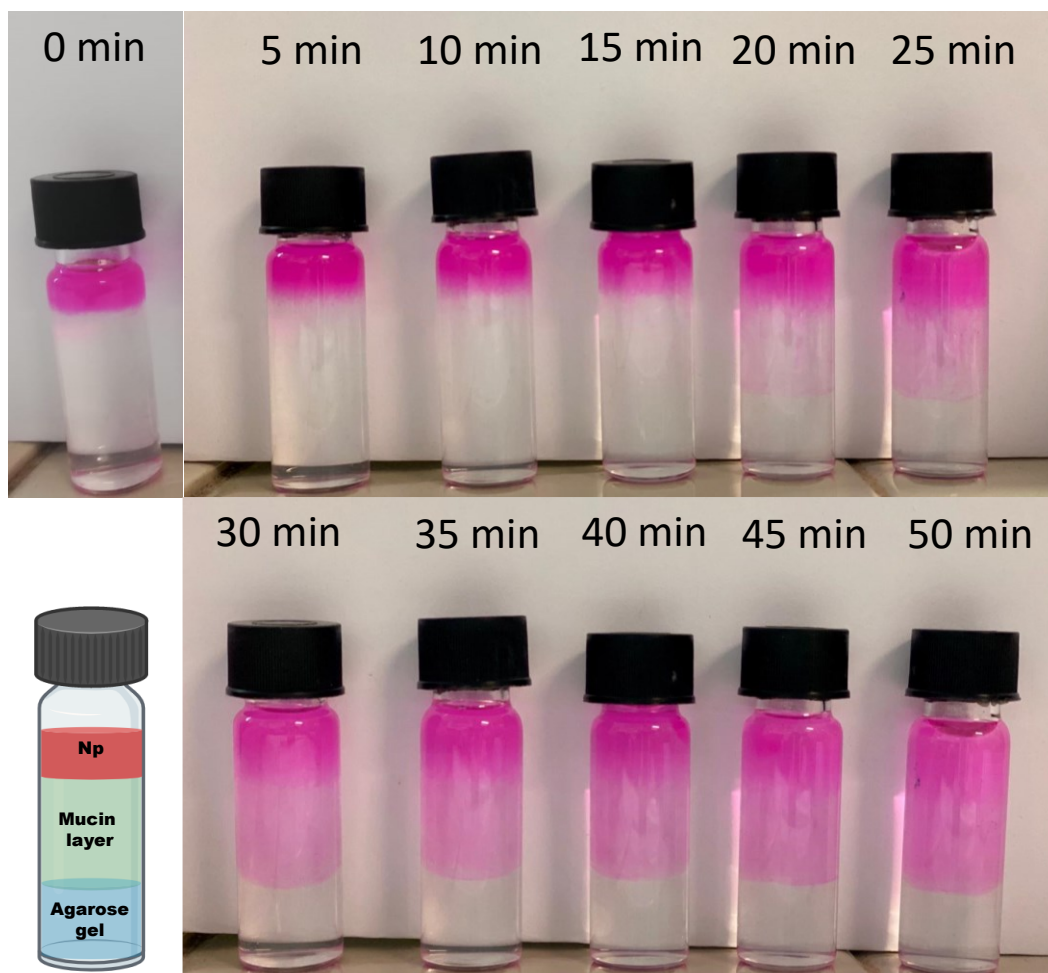


Figura 88 Test di mucopenetrazione. Diffusione delle nanoparticelle peghilate attraverso uno strato di mucina da 0 a 50 minuti successivi all'incubazione

In figura è riportata una fotografia dove è possibile notare la diffusione delle particelle attraverso lo strato di mucina nei primi 50 minuti dopo l'incubazione; già dopo 25 minuti è possibile osservare come alcune particelle abbiano attraversato l'intero strato di muco e raggiunto lo strato di agarosio.

L'analisi UV ha dimostrato che le nanoparticelle sono in grado di penetrare attraverso lo strato di mucina e raggiungere il gel di agarosio; la quantità di nanoparticelle che si diffondono aumenta in funzione del tempo di incubazione.

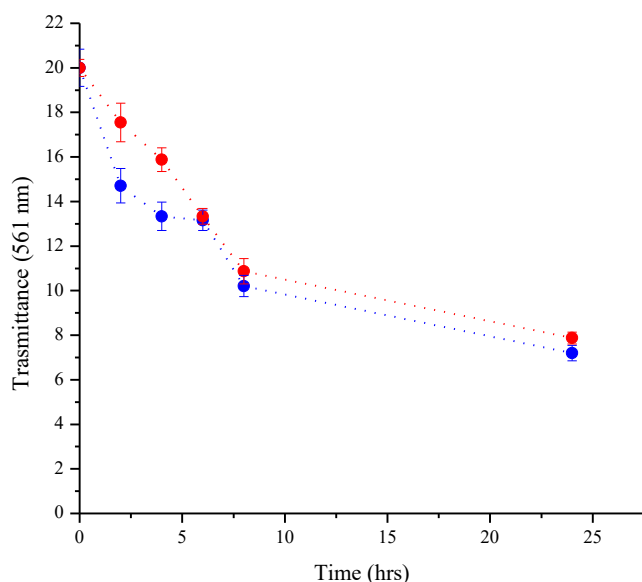


Figura 89 Trasmittanza a 561 nm dei gel di agarosio recuperati dopo incubazione con nanoparticelle di PHEA-g-RhB-g-SUCC-PCL-g-PEG (blu) e PHEA-g-RhB-g-SUCC-PCL (rosso) in funzione del tempo a 37 ° C (Dati riportati come media di 3 esperimenti differenti).

Infatti, misurando la trasmittanza a 561 nm sul gel di agarosio, dopo 2 h di incubazione si osserva una diminuzione della stessa rispetto a quella misurata per il gel di agarosio a tempo 0; tale risultato è attribuito alla presenza di nanoparticelle nel campione. Più aumenta il tempo di incubazione, più la trasmittanza si riduce, fino ad arrivare a circa un terzo, rispetto al valore di partenza, dopo 24 ore.

Per confronto è stata effettuata l'analisi anche con particelle non peghilate; come si può notare, nelle prime 5 ore la trasmittanza si riduce più velocemente per le particelle peghilate indicando che quest'ultime sono in grado di diffondere più velocemente nello strato di muco, dato che un maggior quantitativo di particelle ha raggiunto lo strato di agarosio.

3.4.7 Valutazione del comportamento aerodinamico delle microparticelle

Il comportamento aerodinamico delle microparticelle è stato valutato utilizzando un DPI a media resistenza (Turbospin®) ed un DPI a bassa resistenza (RS01, Plastiappe, Italia). I risultati mostrati nella Figura 72, indicano che il modello di deposizione NGI delle microparticelle varia in funzione della portata (cioè, 60 o 90 L min⁻¹) e della resistenza del DPI. Quando erogato attraverso Turbospin® ad una portata di 60 L min⁻¹ (Figura 72A), più del 70% del campione è stato recuperato dalla gola e dalla coppa 1 (MMAD > 8.06 µm), suggerendo scarse proprietà di aerosolizzazione. Inoltre, le microparticelle hanno mostrato un FPF (cioè frazione di particelle fini, aventi un MMAD inferiore a 4.46 µm) del 10.6 ± 2.8%, che aumenta se calcolato sulla quantità effettiva di polvere recuperata dall'impattatore (RF di 16.8 ± 2.5%).

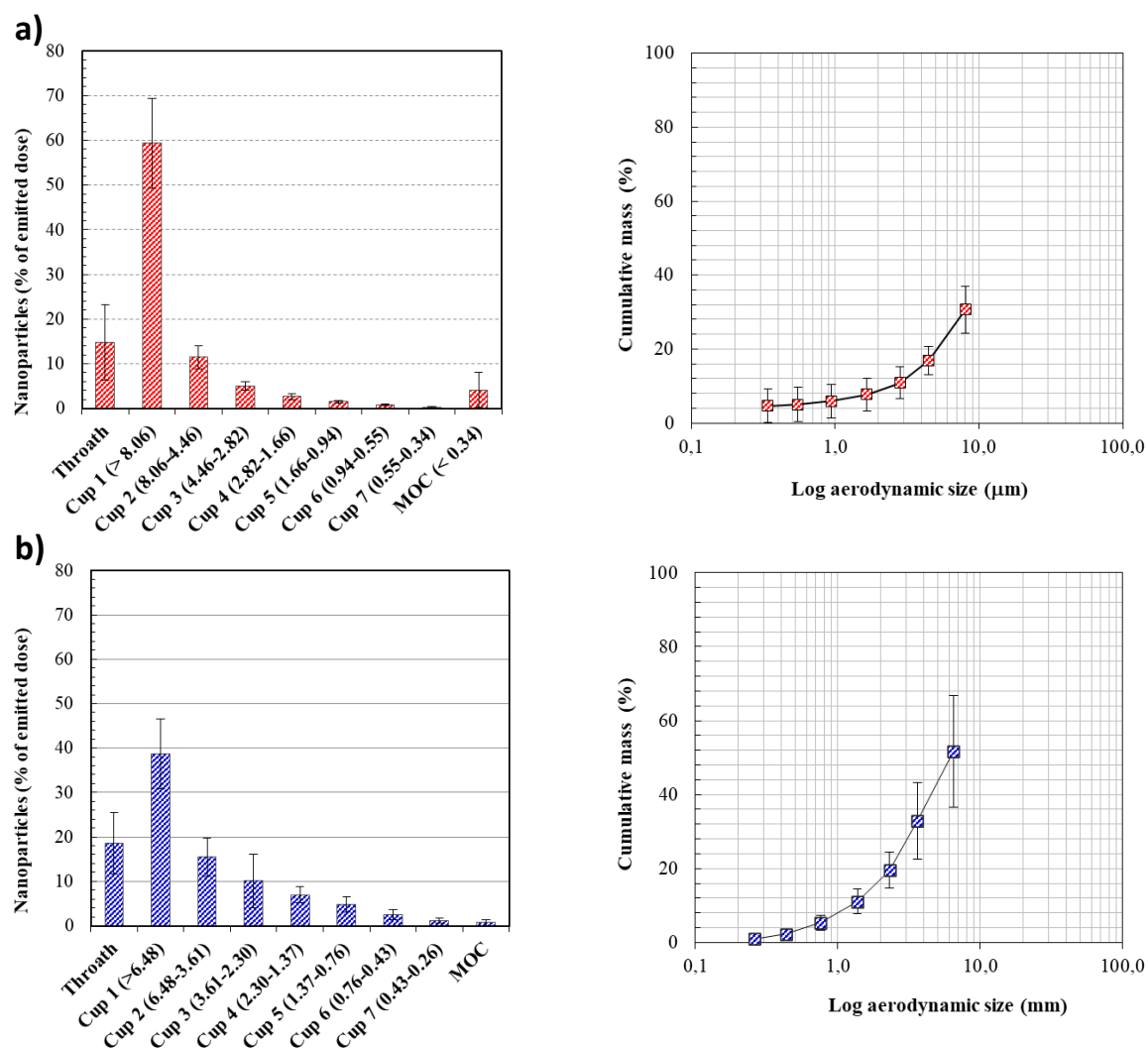


Figura 90 Prestazioni aerosol in vitro delle microparticelle erogate con DPI attivati dal respiro: A) Turbospin®; B) RS01. Pannelli di sinistra: modelli di deposizione NGI. Pannelli di destra: massa cumulativa recuperata in funzione del diametro di taglio del rispettivo stadio NGI. (Dati riportati come media di 3 esperimenti differenti).

Quando le microparticelle vengono erogate dal dispositivo RS01, si osserva una riduzione della quantità di microparticelle recuperata nella gola e nella coppa 1 dell'NGI ed un aumento della quantità recuperata delle coppe 2-7 e del MOC (MMAD <6.48 μm); la quantità recuperata dalle coppe 2-7 corrisponde ad oltre il 40% della dose recuperata (RF 42.5 ± 4.98).

Per le microparticelle erogate con il DPI a bassa resistenza, il MMADexp è risultato pari 7.09 ± 1.25 μm, suggerendo un buon potenziale di deposizione bronchiale.

3.4.8 Conclusioni

Nel presente lavoro sono stati ottenuti nuovi copolimeri, costituiti da un backbone di poliaspartammide e catene PCL e PEG in catena laterale. Per ottenere questi copolimeri, è stata eseguita una strategia sintetica in due fasi coniugando un derivato succinilato di PCL al PHEA,

variando i tempi di reazione e la quantità di PCL-SUCC. I copolimeri ottenuti sono stati funzionalizzati ulteriormente con polietilenglicole sfruttando i gruppi ossidrilici residui presenti nel backbone polimerico del PHEA.

Tra i copolimeri prodotti, il copolimero PHEA-g-RhB-g-SUCC-PCL(F) -g-PEG (DD_{PCL} e DD_{PEG} pari rispettivamente a 4.4 e 4.3% molare) è stato selezionato per lo sviluppo di nanosistemi polimerici, visto l'equilibrio tra porzione idrofila e idrofobica.

In particolare questo copolimero è stato utilizzato per la preparazione di un formulato in polvere potenzialmente utile per la somministrazione inalatoria di Rapamicina nel trattamento delle patologie infiammatorie come l'asma.

La strategia seguita per la realizzazione di tali sistemi è stato l'approccio Nano into Micro (NiM), dove dei sistemi di dimensione nanometrica vengono intrappolati all'interno di microparticelle idrosolubili.

Le nanoparticelle sono state ottenute mediante tecnica della nanoprecipitazione e l'analisi superficiale XPS ha evidenziato la presenza di PEG sulla superficie particellare, utile per schermare le interazioni tra le particelle ed il muco.

La formulazione NiM è stata ottenuta mediante tecnica dello spray-drying utilizzando mannitolo come eccipiente formulativo.

È stato dimostrato che queste microparticelle, una volta poste a contatto con fluidi mimanti il distretto polmonare, sono in grado di dissolversi e rilasciare nanoparticelle non aggregate, potenzialmente in grado di diffondersi attraverso il muco, rilasciando in modo controllato il farmaco caricato.

4. Parte Sperimentale

Materiali

Bis(4-nitrofenil)carbonato (BNFC), N,N'-dimetilformammide anidra (a-DMF), 1,2-Bis(3-amminopropilammino)etano (bAPAE), O-(2-amminoetile)-O'-metil poli (etilenglicole) 2000 ($\text{H}_2\text{N-PEG}_{2000}\text{-OCH}_3$) (0.4 mmol NH_2/g), disuccinimidilcarbonato (DSC), diclorometano, acetone, dietilere, 2,4,6-acido trinitrobenzensolfonico (TNBS), agarosio, etidio bromuro, la mucina dallo stomaco dei suini, metanolo, acetone, Poli- ϵ -caprolattone (PCL, $\bar{M}_w=10\text{-}18$ kDa), Acido polilattico (PLA, $\bar{M}_w=10\text{-}18$ kDa), anidride succinica (SA), dimetilaminopiridina (DMAP), 1,1'-carbonildiimidazolo (CDI), dimetilacetammide anidra (a-DMA), mannitolo, KOH, blu di timolo, Poly(etilene ossido) standards, Dulbecco's phosphate buffer saline (DPBS), NaOH, HEPES, MES, NaCl, tetraidrofurano (THF), Estere N-idrossisuccinimide dell'acido 4-maleimidobutirrico (MLB-NHS), ammino-PEG-acido carbossilico ($\text{H}_2\text{N-PEG}_{2000}\text{-OCH}_2\text{-COOH}$), peptide TAT dell'HIV-1₍₄₇₋₅₇₎ (Tyr-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg), Estere N-idrossisuccinimide dell'acido 3- (2-piridilditio) propionico, 1,4-ditiotreitolo, acetonitrile, 3-ammino-1-propanolo, zinco acetato diidrato, benzonitrile, 2-metil-2-ossazolina (MeOx), metil trifluorometansolfonato (MeOTf), sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (Milano, Italia).

HCl, Diethylamine (DEA), triethylamine (TEA), sono stati acquistati da Fluka (Italy).

La Rapamicina è stata acquistata da Accel Pharmatech (US).

Lo Zileuton è stato acquistato da Carbosynth (UK).

Tutti i reagenti utilizzati sono di grado analitico.

Il siRNA duplex ed il siRNA-Cy5 duplex sono stati acquistati da Biomers.net (Ulm, Germania).

Le sequenze (5'→3') sono: CAGUCCGCCACUUGCCAA (senso), UUGGCAAUGGCGGAACUG (antisense).

L' α , β -poli (N-2-idrossietil) -D, L-aspartamide (PHEA) è stato sintetizzato mediante reazione della polisuccinimide (PSI) con etanolamina in soluzione DMF e purificati secondo la procedura riportata [245]. I dati spettroscopici sono in accordo con la struttura attribuita.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, D_2O , 25°C , TMS): δ 2.71 (m, 2H PHEA, $-\text{COCH}_2\text{CONH}-$), δ 3.24 (m, 2H PHEA, $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), δ 3.55 (m, 2H PHEA, $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), δ 4.59 [m, 1H PHEA, $-\text{NHCH}(\text{CO})\text{CH}_2-$].

Colture cellulari

È stata utilizzata una linea cellulare epiteliale bronchiale normale immortalizzata (16-HBE) (fornita dall'Istituto Zoo-profilattico di Lombardia ed Emilia Romagna). Le cellule 16-HBE sono state mantenute in atmosfera umidificata del 5% di CO₂ in aria a 37 ° C, coltivata come monostrato aderente in Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM) (EuroClone), integrato con siero bovino fetale al 10% (FBS) (Gibco), 2 mM di l-glutammina (EuroClone), 100 U/mL di penicillina, 100 g/mL di streptomicina e 0.6 g/mL amfotericina B (Sigma – Aldrich, Milano, Italia).

Analisi statistica

Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato. Tutti i dati sono espressi come media \pm deviazione standard. Tutti i dati sono stati analizzati con il t-test di Student. Un valore $p < 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo, mentre un valore $p < 0.01$ o 0.001 è stato considerato altamente significativo.

4.1 Nuovi copolimeri della poliaspartammide per il rilascio polmonare di siRNA nella terapia antiasmatica

4.1.1 Sintesi e caratterizzazione del copolimero PHEA-g-bAPAE

La derivatizzazione del PHEA con 1,2-Bis(3-amminopropilammino) etano (bAPAE) è stata effettuata utilizzando Bis(4-nitrofenil) carbonato (BNFC) come agente di coniugazione. 200 mg di PHEA (corrispondenti a 1.26 mmol di unità ripetitive) sono stati solubilizzati in 4 ml di a-DMF; dopo completa solubilizzazione, sono stati aggiunti 230 mg di BNFC solido. La soluzione è stata mantenuta sotto continua agitazione a 40 ° C per 4 ore. Contemporaneamente, 922.71 µL di bAPAE sono stati miscelati con 7 ml di a-DMF. Trascorso il tempo di attivazione, la soluzione polimerica risultante è stata aggiunta goccia a goccia e lentamente alla soluzione bAPAE. La reazione è stata mantenuta sotto agitazione continua a 25 ° C per 20 ore. h. Le quantità di ogni reagente sono state determinate considerando i seguenti rapporti stechiometrici: $R_1 = (\text{mmol di BNFC} / \text{mmol di UR funzionalizzabile di PHEA}) = 0.6$ e $R_2 = (\text{mmol di bAPAE} / \text{mmol di UR funzionalizzabile di PHEA}) = 4$.

Trascorse 20 ore, il polimero è stato isolato dalla miscela di reazione mediante precipitazione in miscela dietilere/diclorometano 2:1 (v/v) ed il surnatante è stato rimosso mediante centrifugazione a 4 ° C per 8 minuti, a 9800 rpm. Il prodotto solido ottenuto è stato lavato con acetone, fino a quando il pH delle acque acetoniche risultasse neutro.

Quindi, il prodotto ottenuto è stato essiccato sotto vuoto. Il residuo solido è stato solubilizzato in acqua bidistillata e la soluzione è stata purificata mediante dialisi esaustiva (SpectraPor Dialysis Tubing, a MWCO 25 kDa), per due giorni contro acqua basica (NaOH) e per altri ulteriori giorni contro acqua bidistillata. In seguito a liofilizzazione, il copolimero PHEA-g-bAPAE è stato ottenuto con una resa dell'80% in peso rispetto alla quantità di PHEA iniziale. Il copolimero è stato caratterizzato tramite ¹H-NMR.

¹H-NMR (300 MHz, D₂O pD 5, 25°C, TMS): δ 1.70 - 2.20 (m, 4H_{bAPAE}, -NHCH₂CH₂CH₂NHCH₂CH₂NHCH₂CH₂NH-), δ 2.73 (m, 2H_{PHEA}, -COCHCH₂CONH-), δ 3,12 (m, 8H_{bAPAE}, -NHCH₂CH₂CH₂NHCH₂CH₂NHCH₂CH₂CH₂NH₂), δ 3.23 (m, 2H_{PHEA}, -NHCH₂CH₂O-), 3,38 (m, 4H_{bAPAE}, -CONHCH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂NH₂), δ 3.54 (m, 2H_{PHEA}, -NHCH₂CH₂OH), δ 4.02 (m, 2H_{PHEA}, -NHCH₂CH₂OCO-), δ 4.62 (m, 1H_{PHEA}, -NHCH(CO)CH₂-).

4.1.2 Sintesi e caratterizzazione dei copolimeri PHEA-g-PEG

La derivatizzazione del PHEA con $\text{H}_2\text{N-PEG-OCH}_3$, per ottenere i copolimeri PHEA-PEG con diversi gradi di derivatizzazione, denominati PHEA-g-PEG (A) e PHEA-g-PEG (B), PHEA-g-PEG (C), è stata effettuata utilizzando N,N'-disuccinimidilcarbonato (DSC) come agente di coniugazione. 500 mg di PHEA (corrispondenti a 6.32 mmol di unità ripetitive) sono stati solubilizzati in 10 ml di a-DMF a 40 ° C e quindi sono stati aggiunti una quantità adeguata di trietilammina (TEA), come catalizzatore, e N, N'-disuccinimidil carbonato (DSC); successivamente, la miscela di reazione è stata lasciata a 40 ° C per 4 ore.

Trascorso il tempo di attivazione, il PHEA attivato con DSC è stato aggiunto goccia a goccia a una soluzione di $\text{H}_2\text{N-PEG-OCH}_3$ in DMF alla concentrazione di 50 mg mL^{-1} ; le miscele di reazione ottenute sono state lasciate a 25 ° C per 18 ore.

Le quantità di TEA, DSC e PEG sono stati aggiunte secondo i rapporti riportati nella seguente tabella.

Tabella 13 Rapporti molari e mL di soluzione di PEG (50mg mL^{-1}) usati per le sintesi

Copolimeri	R ₃	R ₄	R ₅	Volume di soluzione di PEG (mL)	Quantità effettiva di PEG (mg)
PHEA-g-PEG(A)	0.03	0.04	1	4	200
PHEA-g-PEG(B)	0.075	0.1	1	9.5	475
PHEA-g-PEG(C)	0.12	0.16	1	15	750
R ₃ = mmol di PEG / mmol di UR funzionalizzabile di PHEA					
R ₄ = mmol di DSC / mmol di UR funzionalizzabile di PHEA					
R ₅ = mmol di TEA / mmol di DSC					

Successivamente, ogni copolimero è stato isolato dalla miscela di reazione mediante precipitazione in dietilere; il surnatante è stato rimosso mediante centrifugazione a 4 ° C per 8 minuti, a 9800 rpm. Il prodotto solido ottenuto è stato lavato con acetone una volta e successivamente essiccato sotto vuoto. Il residuo solido è stato solubilizzato in acqua bidistillata, la soluzione è stata purificata mediante dialisi (SpectraPor Dialysis Tubing, a MWCO 25 kDa) e dunque liofilizzata. I copolimeri PHEA-g-PEG sono stati ottenuti con una resa maggiore del 85% in peso rispetto alla somma delle quantità di PHEA e di PEG iniziale. Sono stati ottenuti tre differenti copolimeri PHEA-g-PEG, aventi un numero diverso di catene di PEG legate sul backbone del PHEA, chiamati PHEA-g-PEG(A), PHEA-g-PEG(B) e PHEA-g-PEG(C).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, D_2O , 25°C , TMS): δ 2.71 (m, 2H_{PHEA} , $-\text{COCH}_2\text{CONH}-$), δ 3.24 (m, 2H_{PHEA} , $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), δ 3.55 (m, 2H_{PHEA} , $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), δ 3.60 (m, 4H_{PEG} , $[\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}]_{44}-$), δ 4.59 (m, 1H_{PHEA} , $-\text{NHCH}(\text{CO})\text{CH}_2-$).

4.1.3 Sintesi dei copolimeri PHEA-g-PEG-g-bAPAE

La derivatizzazione di PHEA-g-PEG con 1,2-Bis(3-amminopropilammino) etano (bAPAE) è stata effettuata utilizzando BNFC come agente di coniugazione. Una certa quantità di PHEA-PEG(A) e PHEA-PEG(B), PHEA-PEG(C) (corrispondenti a 1.26 mmol di unità ripetitive di PHEA funzionalizzabili) è stata solubilizzata in 4 ml di a-DMF; dopo completa solubilizzazione, sono stati aggiunti 230 mg di BNFC solido. La soluzione è stata mantenuta sotto continua agitazione a 40°C per 4 ore. Parallelamente, 922.71 μL di bAPAE sono stati solubilizzati in 7 ml di a-DMF. Tascorso il tempo di attivazione, la soluzione polimerica risultante è stata aggiunta a gocce e lentamente alla soluzione bAPAE. La reazione dunque, è stata mantenuta sotto agitazione continua a 25°C per 20 ore. Le quantità di ogni reagente sono state determinate considerando i seguenti rapporti stechiometrici: $R_1 = (\text{mmol di BNFC} / \text{mmol di UR funzionalizzabile di PHEA}) = 0.6$ e $R_2 = (\text{mmol di bAPAE} / \text{mmol di UR funzionalizzabile di PHEA}) = 4$.

Successivamente, il polimero è stato isolato dalla miscela di reazione mediante precipitazione in miscela 2:1 v/v dietilere/diclorometano ed il surnatante è stato rimosso mediante centrifugazione a 4°C per 8 minuti, a 9800 rpm. Il prodotto solido ottenuto è stato lavato con acetone, fino a quando il pH delle acque acetoniche risultasse neutro.

Quindi, il prodotto ottenuto è stato essiccato sotto vuoto, il residuo solido ottenuto è stato solubilizzato in acqua bidistillata e quindi la soluzione è stata purificata mediante dialisi (SpectraPor Dialysis Tubing, a MWCO 25 kDa); successivamente la soluzione è stata liofilizzata. I copolimeri PHEA-g-PEG-g-bAPAE sono stati ottenuti con una resa dell'80% in peso sulla base del PHEA-g-PEG iniziale.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, D_2O pD 5, 25°C , TMS): δ 1.70-2.20 (m, 4H_{bAPAE} , $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$), δ 2.73 (m, 2H_{PHEA} , $-\text{COCH}_2\text{CONH}-$), δ 3.12 (m, 8H_{bAPAE} , $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), δ 3.23 (m, 2H_{PHEA} , $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), δ 3.38 (m, 4H_{bAPAE} , $-\text{CONHCH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), δ 3.54 (m, 2H_{PHEA} , $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), δ 3.60 (m, 4H_{PEG} , $[\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}]_{44}-$), δ 4.02 (m, 2H_{PHEA} , $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OCO}-$), δ 4.62 (m, 1H_{PHEA} , $-\text{NHCH}(\text{CO})\text{CH}_2-$).

4.1.4 Determinazione del contenuto di unità ripetitive funzionalizzate con ammina nei copolimeri PHEA-g-bAPAE e PHEA-g-PEG-g-bAPAE tramite saggio TNBS

Il contenuto di unità ripetitive funzionalizzate con ammine è stato anche determinato mediante saggio TNBS. Una soluzione madre di PHEA-g-bAPAE o di PHEA-g-PEG(A)-g-bAPAE o PHEA-g-PEG(B)-g-bAPAE o PHEA-g-PEG(C)-g-bAPAE (5 mg mL^{-1}) è stata preparata in tampone borato ($0.1 \text{ M Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$, pH 9.3). Un'aliquota di questa soluzione ($50 \text{ }\mu\text{L}$) è stata aggiunta ad una cuvetta contenente $900 \text{ }\mu\text{L}$ di tampone borato e $50 \text{ }\mu\text{L}$ di soluzione TNBS 0.03 M . Dopo 120 minuti di incubazione, è stata misurata l'assorbanza a 500 nm e confrontata con quella stimata per la reazione di $\text{H}_2\text{N-PEG-OCH}_3$ ($-\text{NH}_2$ nell'intervallo tra 0.01 e $0.001 \text{ mmol mL}^{-1}$) con TNBS.

4.1.5 Determinazione dei pesi molecolari dei copolimeri mediante Size Exclusion Chromatography

Peso molecolare medio ponderale (M_w) e polidispersità (M_w/M_n) di ciascun copolimero sono stati determinati da un'analisi cromatografica di esclusione dimensionale (SEC), eseguita utilizzando le colonne Tosho Bioscience TSK-Gel G4000 PWXL e G3000 PWXL collegate a un sistema GPC / SEC Agilent 1260 Infinity Multi-Detector e un rilevatore di indice di rifrazione. Le analisi sono state eseguite con tampone citrato-fosfato $0.15 \text{ M} + 0.1 \text{ M NaCl}$ a pH 5 come eluente con un flusso di 1 mL min^{-1} e poli-ossido di etilene standard (40 kDa) per ottenere la curva di calibrazione. La temperatura della colonna è stata impostata a 30°C .

4.1.6 Profilo acido-base del copolimero PHEA-g-bAPAE

Per studiare la capacità tamponante relativa del copolimero PHEA-g-bAPAE, è stata eseguita una titolazione acido-base. 6 mg di copolimero sono stati solubilizzati in 30 mL in $\text{NaCl } 0.1 \text{ N}$. Inizialmente, il pH è stato regolato a circa 10.0 con idrossido di sodio 0.1 N e quindi titolato aggiungendo gradualmente $20 \text{ }\mu\text{L}$ di $\text{HCl } 0.1 \text{ N}$ fino a raggiungere un pH di 3.0 . Successivamente, sono state anche eseguite le titolazioni di soluzioni di PHEA e bAPAE in quantità note e paragonabili a quelle presenti nella soluzione del copolimero PHEA-g-bAPAE analizzata.

Per tutte le titolazioni è stato utilizzato un elettrometro differenziale AMEL 631, che è stato calibrato con un set di tamponi standard ($2.50 \pm 0.01 \leq \text{pH} \leq 10.00 \pm 0.01$).

4.1.7 *Titolazione potenziometrica del copolimero PHEA-bAPAE.*

Per determinare i valori di pKa dei gruppi amminici presenti nel copolimero PHEA-g-bAPAE è stata eseguita una titolazione potenziometrica.

30 mg di copolimero sono stati solubilizzati in 30 mL in NaCl degassato 0.1 N, scelto come stabilizzatore di forza ionica, e termostatati a 25 ° C. La soluzione è stata quindi titolata in atmosfera di argon con HCl 0.05 M fino a pH 3; successivamente è stata eseguita una retrotitolazione con NaOH 0.05 M in atmosfera di Argon. Per tutte le titolazioni è stato utilizzato un elettrometro differenziale AMEL 631, che è stato calibrato con un set di tamponi standard ($2.50 \pm 0.01 \leq \text{pH} \leq 10.00 \pm 0.01$).

I valori di pKa dei gruppi amminici sono stati estrapolati usando il metodo De Levie di equilibri chimici acido-base per polielettroliti.

4.1.8 *Studio di destabilizzazione di membrane*

Cellule 16HBE sono state piastrate su una piastra a 48 pozzetti con una densità cellulare di 10,000 cellule per pozzetto, in DMEM contenente il 10% di FBS. Dopo 24 ore di incubazione, il mezzo di coltura è stato rimosso e quindi le cellule sono state incubate con 100 µl di DPBS (pH 7.4) o MES 20 mM (pH 5.5, 130 mM NaCl) contenente PHEA-g-bAPAE (0.5 mg mL^{-1}) per 20 min a 37 ° C; nelle stesse condizioni, è stata eseguita anche l'analisi del bianco. Trascorso questo tempo, 100 µl di Tripán Blue 0.2% sono stati aggiunti a ciascun pozzetto. Dopo 1 minuto di incubazione, il surnatante è stato rimosso e le cellule sono state osservate al microscopio (Axio Cam MRm, Zeiss). Tutte le analisi sono state eseguite in triplicato.

Allo stesso tempo, le cellule 16HBE sono state piastrate su una piastra a 24 pozzetti con una densità cellulare di 100,000 cellule per pozzetto in DMEM contenente il 10% di FBS. Dopo 24 ore di incubazione, il terreno è stato rimosso e quindi le cellule sono state incubate con 100 µl di DPBS (pH 7.4) o 20 mM MES (pH 5.5, 130 mM NaCl) contenente PHEA-bAPAE (0.5 mg mL^{-1}) per 20 min a 37 ° C; nelle stesse condizioni, è stata eseguita anche l'analisi del bianco. Dopo questo tempo sono stati aggiunti 500 µl di Tripsina in ciascun pozzetto e dopo 5 minuti il contenuto di 3 pozzetti, trattato con le stesse condizioni, è stato riunito in una piccola provetta da centrifuga e miscelato con 200 µl di Trypan Blue 0.2%. Dopo 1 minuto il surnatante è stato rimosso mediante centrifugazione a 2000 rpm e il pellet residuo è stato lavato con 2 ml di DPBS. Dopo il lavaggio, il surnatante è stato rimosso mediante centrifugazione a 2000 rpm e il pellet in ciascuna provetta è stato trattato con 250 µl di TRITON X100 1% e quindi piastrato su una piastra da 96 pozzetti. Dopo 1 ora di incubazione, l'assorbanza a 580 nm è stata letta

utilizzando un lettore di micropiastre (Multiskan Ex, Thermo Labsystems, Finlandia). Tutte le analisi sono state eseguite in duplicato.

4.1.9 Test di vitalità cellulare

La vitalità cellulare è stata valutata mediante un saggio MTS su cellule 16-HBE, utilizzando un kit disponibile in commercio (test di proliferazione cellulare con soluzione acquosa di una soluzione cellulare Titer 96, Promega) contenente 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -5- (3-carbossimetossifenil) -2- (4-solfenil) -2H-tetrazolio (MTS) e etosolfato di fenazina. Le cellule 16HBE sono state piastrate su una piastra a 96 pozzetti con una densità di 25,000 cellule per pozzetto in DMEM contenente il 10% di FBS. Dopo 24 ore di incubazione, il mezzo è stato rimosso e quindi le cellule sono state incubate con 200 µl per pozzetto con una dispersione acquosa (DMEM contenente 10% FBS) di ciascun copolimero a concentrazioni comprese tra 2 mg mL⁻¹ e 0.0625 mg mL⁻¹. Tutte le soluzioni dei copolimeri sono state sterilizzate mediante filtrazione con filtro da 220 nm in cellulosa acetato. Dopo 24 e 48 ore di incubazione, le soluzioni polimeriche sono state rimosse e ciascuna piastra è stata lavata con DPBS sterile; successivamente, le cellule di ciascun pozzetto sono state incubate con 100 µL di DMEM fresco e 20 µL di una soluzione MTS e le piastre sono state incubate per 2 ore a 37 ° C. L'assorbanza a 490 nm è stata letta usando un lettore di micropiastre (Multiskan Ex, Thermo Labsystems, Finlandia). La vitalità relativa delle cellule (percentuale) è stata espressa come (cellule trattate in Abs490 / cellule di controllo in Abs490) × 100, sulla base di tre esperimenti. Le cellule incubate con il mezzo sono state usate come controllo negativo.

4.1.10 Studio di complessazione

Gli studi di complessazione sono stati valutati mediante gel elettroforesi, Dynamic Light Scattering e misure del potenziale zeta.

I poliplessi sono stati formati aggiungendo una dispersione di copolimero avente diverse concentrazioni ad uno stesso volume di soluzione di siRNA con una concentrazione fissa, al fine di ottenere diversi rapporti peso polimero/siRNA (R); la miscela è stata miscelata pipettando delicatamente ed incubata 30 minuti a temperatura ambiente prima di ogni analisi. Per l'elettroforesi su gel, i poliplessi sono stati formati in tampone Hepes nuclease free 10 mM, a pH 7.4, contenente glucosio 5% (p/v). La concentrazione di siRNA utilizzata è stata 0.1 mg/ml e i rapporti peso polimero/siRNA (R) erano: 0, 1, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 5.

10 μ l di ciascun campione sono stati quindi caricati su un gel di agarosio all'1.5%, contenente 70 μ l di bromuro di etidio e fatti correre a 100 V in tampone trisacetato / EDTA (TAE) a pH 8 per 20 min. I gel sono stati quindi visualizzati tramite un transilluminatore UV e fotografati utilizzando una fotocamera digitale.

Per gli studi di Dynamic light scattering (DLS), i poliplessi sono stati formati in tampone Hepes nucleasi free 10 mM, a pH 7.4. La concentrazione di siRNA utilizzata è stata 0.05 mg/ml e i rapporti peso polimero/siRNA (R) erano 0, 1, 2, 2.5, 3, 4, 5, 7, 10. La misura DLS è stata eseguita su 50 μ l di campione a 25 ° C con un Malvern Zetasizer NanoZS dotato di un laser a 633 nm con un angolo di scattering fisso di 173 °, utilizzando il software Dispersion Technology Software 7.02.

Per il potenziale zeta, i poliplessi di siRNA/copolimero sono stati formati in tampone Hepes nucleasi free 10 mM, a pH 7.4. La concentrazione di siRNA utilizzata è stata di 0.2 mg/ml e i rapporti in peso polimero/siRNA (R) erano 0, 1, 2, 2.5, 3, 4, 5, 7, 10. 400 μ l di ciascun campione sono stati diluiti con tampone Hepes fino a 900 μ l prima della misura. Sono state eseguite misure di potenziale zeta mediante misure di elettroforesi acquosa, registrate a 25 ° C utilizzando lo stesso apparato del DLS. I valori di potenziale ζ (mV) sono stati calcolati dalla mobilità elettroforetica utilizzando la relazione Smoluchowski.

4.1.11 Stabilità allo scambio polianionico dei poliplessi in presenza di mucine

La stabilità dei poliplessi allo scambio polianionico è stata determinata dopo l'incubazione dei poliplessi con dispersione di mucina. I poliplessi sono stati preparati come descritto prima nel saggio elettroforetico; i poliplessi risultanti (30 μ l) sono stati miscelati con 5 μ l di dispersione di mucina (7 mg mL⁻¹), al fine di avere una concentrazione finale di mucina pari a 1 mg mL⁻¹, e i campioni sono stati incubati a temperatura ambiente per 2 o 5 ore. L'elettroforesi su gel è stata quindi eseguita come descritto nello studio di complessazione.

4.1.12 Valutazione interazioni poliplessi-mucine

Lo studio delle possibili interazioni tra poliplessi e mucine è stato condotto mediante turbidimetria. 50 μ l di poliplessi, preparati come descritto nel saggio elettroforetico, sono stati miscelati con 50 μ l di dispersione di mucine alla concentrazione di 2 mg mL⁻¹ in tampone Hepes 10 mM pH7.4. Dopo l'incubazione a 37 ° C, la torbidità è stata misurata ogni 50 minuti fino a

6 ore circa. L'assorbanza a λ di 500 nm è stata registrata dal lettore di micropiastre (Multiskan Ex, Thermo Labsystems, Finlandia).

4.1.13 Saggio di silenziamento genico

La valutazione della capacità di silenziamento genico è stata valutata mediante test ELISA, utilizzando un kit di kit ELISA umano IL-4 di Life Technologies.

Le cellule 16HBE sono state piastrate su una piastra a 96 pozzetti con una densità di 25,000 cellule per pozzetto in DMEM contenente il 10% di FBS. Dopo 24 ore di incubazione, il mezzo è stato rimosso e quindi le cellule sono state incubate con 200 μ l di poliplessi preparati a differenti R (3, 5, 10) per 48 ore; successivamente il surnatante è stato rimosso e le cellule sono state incubate con 200 μ l di LPS 500 ng ml⁻¹ per 6 ore.

Trascorso questo tempo le cellule sono state lavate con DPBS e trattate seguendo il protocollo fornito. Per questo studio i poliplessi sono stati allestiti in mezzo OPTIMEM usando un siRNA 0.1 μ M (0.01 nmol si siRNA per ogni pozzetto).

Le dispersioni polimeriche e la soluzione di siRNA sono state sterilizzate per filtrazione usando un filtro da 220 nm prima della preparazione dei poliplessi.

4.2 Sviluppo di un nanocomplessi funzionalizzati con peptide TAT per la veicolazione inalatoria di siRNA nella terapia antiasmatica

4.2.1 Sintesi del copolimero PHEA-g-bAPAE

La derivatizzazione del PHEA con 1,2-Bis(3-amminopropilammino)etano (bAPAE) è stata effettuata utilizzando Bis(4-nitrofenil)carbonato (BNFC) come agente di coniugazione. 200 mg di PHEA (corrispondenti a 1.26 mmol di unità ripetitive) sono stati solubilizzati in 4 ml di a-DMF; dopo completa solubilizzazione, sono stati aggiunti 230 mg di BNFC solido. La soluzione è stata mantenuta sotto continua agitazione a 40 ° C per 4 ore. Contemporaneamente, 922.71 µL di bAPAE sono stati miscelati con 7 ml di a-DMF. Trascorso il tempo di attivazione, la soluzione polimerica risultante è stata aggiunta a gocce e lentamente alla soluzione bAPAE. La reazione è stata mantenuta sotto agitazione continua a 25 ° C per 20 ore. Le quantità di ogni reagente sono state determinate considerando i seguenti rapporti stechiometrici: $R_1 = (\text{mmol di BNFC} / \text{mmol di UR funzionalizzabile di PHEA}) = 0.6$ e $R_2 = (\text{mmol di bAPAE} / \text{mmol di UR funzionalizzabile di PHEA}) = 4$.

Trascorso il tempo di reazione, il polimero è stato isolato dalla miscela di reazione mediante precipitazione in miscela 2: 1 v/v dietilere/diclorometano ed il surnatante è stato rimosso mediante centrifugazione a 4 ° C per 8 minuti, a 9800 rpm. Il prodotto solido ottenuto è stato lavato con acetone, fino a quando il pH delle acque acetoniche risultasse neutro. Quindi, il prodotto ottenuto è stato essiccato sotto vuoto. Il residuo solido è stato solubilizzato in acqua bidistillata e la soluzione è stata purificata mediante dialisi esaustiva (SpectraPor Dialysis Tubing, a MWCO 25 kDa), per due giorni contro acqua basica (NaOH) e per altri tre giorni contro acqua bidistillata. In seguito a liofilizzazione, il copolimero PHEA-g-bAPAE è stato ottenuto con una resa dell'80% in peso alla quantità di PHEA iniziale.

¹H-NMR (300 MHz, D₂O pD 5, 25°C, TMS): δ 1.70 - 2.20 (m, 4H_{bAPAE}, -NHCH₂CH₂CH₂NHCH₂CH₂NHCH₂CH₂CH₂NH-), δ 2.73 (m, 2H_{PHEA}, -COCHCH₂CONH-), δ 3,12 (m, 8H_{bAPAE}, -NHCH₂CH₂CH₂NHCH₂CH₂NHCH₂CH₂CH₂NH₂), δ 3.23 (m, 2H_{PHEA}, -NHCH₂CH₂O-), 3,38 (m, 4H_{bAPAE}, -CONHCH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂NH₂), δ 3.54 (m, 2H_{PHEA}, -NHCH₂CH₂OH), δ 3.60 (m, 4H_{PEG}, -[OCH₂CH₂O]₄₄-), δ 4.02 (m, 2H_{PHEA}, -NHCH₂CH₂OCO-), δ 4.62 (m, 1H_{PHEA}, -NHCH(CO)CH₂-).

Il contenuto di ammina è stato determinato anche tramite il saggio colorimetrico TNBS [246].

4.2.2 Sintesi del polimero MLB-PEG-COOH

La sintesi del polimero MLB-PEG-COOH è stata condotta sfruttando la reattività del gruppo amminico terminale dell'amino-PEG-acido (NH₂-PEG-COOH) verso l'estere succinimmidico dell'acido 4-Maleimidobutirrico (MLB-NHS). 100 mg di NH₂-PEG-COOH (0.0476 mmol) sono stati solubilizzati in 600 µl di DPBS e miscelati con 16 mg di MLB-NHS (0.0571 mmol), precedentemente solubilizzati in 1.4 ml di una miscela DPBS: DMSO (86:14 v/v), considerando il rapporto stechiometrico: $R1 = (\text{mmol di MLB-NHS} / \text{mmol di PEG}) = 1.2$.

La reazione è stata mantenuta sotto agitazione continua a 25 ° C overnight e successivamente il prodotto di reazione è stato purificato mediante cromatografia ad esclusione dimensionale, impiegando come fase stazionaria una Sephadex G15 e come fase mobile acqua bidistillata. Le frazioni raccolte sono, dunque, congelate e liofilizzate ottenendo una resa del 95% in peso rispetto alla somma delle quantità dei reagenti utilizzati.

¹H-NMR (300 MHz, D₂O 25°C, TMS): δ 1.8 (2H_{MLB}, -CH₂CH₂CH₂-COOH), δ 2.2 (2H_{MLB}, -CH₂CH₂CH₂-COOH), δ 3.70 (m, 4H_{PEG}, -[OCH₂CH₂O]₄₄-), δ 6.8 (m, 2H_{MLB}, -CO-CH=CH-CO).

4.2.3 Sintesi del copolimero PHEA-g-bAPAE-PEG-MLB

La derivatizzazione del PHEA-g-bAPAE con MLB-PEG-COOH è stata effettuata utilizzando 1-etil-3-(dimetilamminopropil)carbodiimide cloruro (EDC· HCl) ed N-idrossisuccinimide (NHS) come agenti di coniugazione.

50 mg di MLB-PEG-COOH sono stati solubilizzati in 300 µl di tampone MES (Acido 2- (N-morfolino) etansolfonico) 0.1 M, NaCl 0.5 M, pH 6.0. Successivamente sono stati aggiunti 3.84 mg di EDC· HCl e 2.83 mg di NHS precedentemente solubilizzati in 100 µl di tampone MES 0.1 M, NaCl 0.5 M, pH 6.0.

La miscela è stata mantenuta sotto continua agitazione per 4 ore a 25°C; parallelamente 100 mg di PHEA-g-bAPAE sono stati solubilizzati in 1 ml di BPBS, aggiustando il pH intorno a 7 usando HCl 30%.

Trascorso il tempo di attivazione di 4 ore, la soluzione di PEG è stata aggiunta lentamente sotto continua agitazione a quella di PHEA-g-bAPAE; la miscela ottenuta è stata mantenuta a 25°C overnight e infine è stata purificata mediante dialisi esaustiva utilizzando acqua acida (pH 5) come mezzo di scambio.

Le quantità di ogni reagente sono state determinate considerando i seguenti rapporti stechiometrici: $R_1 = (\text{mmol di EDC} / \text{mmol PEG}) = 1.1$, $R_2 = (\text{mmol di NHS} / \text{mmol PEG}) = 1.1$, $R_3 = (\text{mmol di PEG} / \text{mmol di UR di PHEA-g-bAPAE}) = 0.05$.

In seguito a liofilizzazione, il copolimero PHEA-g-bAPAE-PEG-MLB è stato ottenuto con una resa dell'70% in peso rispetto alla somma delle quantità iniziali di PHEA-g-bAPAE e MLB-PEG-COOH

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, D_2O pD 5, 25°C , TMS): δ 1.70-2.20 (m, 4H_{bAPAE} , - $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$), δ 2.73 (m, 2H_{PHEA} , - $\text{COCHCH}_2\text{CONH}-$), δ 3.12 (m, 8H_{bAPAE} , - $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), δ 3.23 (m, 2H_{PHEA} , - $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 3,38 (m, 4H_{bAPAE} , - $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2-$, - $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), δ 3.54 (m, 2H_{PHEA} , - $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), δ 3.60 (m, 4H_{PEG} , - $[\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}]_{44}-$), δ 4.02 (m, 2H_{PHEA} , - $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OCO}-$), δ 4.62 (m, 1H_{PHEA} , - $\text{NHCH}(\text{CO})\text{CH}_2-$).

4.2.4 Funzionalizzazione del peptide TAT con l'estere succinimmidico dell'acido 3-(2-piridilditio) propionico (SPDP)

10 mg di peptide TAT₍₄₇₋₅₇₎ (corrispondenti a 6.41 μmol) sono stati solubilizzati in 1 ml di tampone fosfato di sodio 50 mM, NaCl 0.15 M, pH 7.2 e successivamente sono stati aggiunti 442 μl di una soluzione di SPDP 20 mM in DMSO (corrispondenti a 8.77 μmol).

La miscela di reazione è stata mantenuta a 25°C overnight; successivamente la miscela è stata diluita con 1 ml di DMSO e purificata mediante dialisi esaustiva (*SpectraPor Dialysis Tubing, a MWCO 100-500 Da*) utilizzando acqua bidistillata come mezzo di scambio.

In seguito a liofilizzazione, il coniugato TAT-SPDP è stato ottenuto con una resa dell'80% in peso rispetto alla quantità iniziale di TAT.

Il prodotto ottenuto è stato caratterizzato mediante spettroscopia FT-IR ed analisi HPLC utilizzando una colonna Phenomenex Luna C18; la separazione cromatografia è stata effettuata mediante una analisi a gradiente con 2 solventi: $\text{H}_2\text{O} + 0.1\%$ TFA (solvente A) ed acetonitrile+ 0.1% TFA (solvente B) con una velocità di flusso di 1 mL/minuto. Il rapporto iniziale tra le fasi mobili A:B era 90:10 ed è stata incrementata gradualmente la quantità di solvente B fino ad ottenere il 100% di B in 60 minuti.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{D}_2\text{O}:\text{DMSO}$, 25°C , TMS): δ 1.4 (4H_{Lys} , $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$), δ 1.55-1.7 (20H_{Arg} $\text{CO-CH-CH}_2\text{-CH}_2-$; 8H_{Lys} $\text{CH-CH}_2\text{-CH}_2$; 2H_{Gln} $\text{CH}_2\text{-CO-NH}_2$), δ -2.25 (2H_{Gln} $\text{-CH}_2\text{-CO-NH}_2$), δ 2.86 (4H_{Lys} $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$), δ 3.1 (10H_{Arg} $\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2-$; 2H_{Tyr} $\text{-CH-CH}_2\text{-C-}$), δ 4.2 (2H_{Gly} $\text{CO-CH}_2\text{-NH-}$), δ 4.2 (5H_{Arg} -NH-CH-CO- ; 2H_{Lys} -NH-CH-CO- ; 1H_{Gln} -NH-

CH-CO-), δ 6.8 ($2H_{\text{Tyr}}$ CH-C-CH-), δ 7.0 ($2H_{\text{Tyr}}$ CH-C-CH-), δ 7.2 ($1H_{\text{SPDP}}$ -N-CH-CH-CH-CH), δ 7.7 ($2H_{\text{SPDP}}$ -N-CH-CH-CH-CH), δ 8.3 ($1H_{\text{SPDP}}$ -N-CH-CH-CH-CH).

4.2.5 Deprotezione del gruppo tiolico nel coniugato TAT-SPDP

La deprotezione del gruppo tiolico introdotto nel peptide TAT è stata condotta utilizzando ditione di treitolio (DTT) come agente riducente.

7.5 mg di TAT-SPDP sono stati solubilizzati in 500 μ l di tampone acetato di sodio 0.1 M, NaCl 0.1 M, a pH 4.5 e miscelati con 325 μ l di DTT 20 mg/ml in acetato di sodio 0.1 M, NaCl 0.1 M, pH 4.5. La miscela è stata mantenuta a 25°C per un'ora e successivamente è stata purificata mediante dialisi esaustiva esaustiva (*SpectraPor Dialysis Tubing, a MWCO 100-500 Da*) utilizzando acqua acida (pH 5) come mezzo di scambio, al riparo dalla luce.

L'effettiva deprotezione è stata confermata mediante saggio colorimetrico per l'analisi quantitativa dei tioli (saggio di Ellman).

4.2.6 Studio di complessazione

Gli studi di complessazione sono stati valutati mediante gel elettroforesi.

I poliplessi sono stati formati aggiungendo una dispersione di copolimero (10 μ l) avente diverse concentrazioni ad uno stesso volume di soluzione di siRNA (10 μ l) con una concentrazione fissa, al fine di ottenere diversi rapporti peso polimero/siRNA (R); la miscela è stata miscelata pipettando delicatamente ed incubata 30 minuti a temperatura ambiente prima di ogni analisi.

Per l'elettroforesi su gel, i poliplessi sono stati formati in tampone Hepes *nuclease free* 10 mM, a pH 7.4, contenente glucosio 5% (p/v). La concentrazione di siRNA utilizzata è stata 0.1 mg mL⁻¹ e i rapporti peso polimero/siRNA (R) erano: 0, 1, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 5.

15 μ l di ciascun campione sono stati quindi caricati su un gel di agarosio all'1.5%, contenente 70 μ l di bromuro di etidio e fatti correre a 100 V in tampone trisacetato / EDTA (TAE) a pH 8 per 20 min. I gel sono stati quindi visualizzati tramite un transilluminatore UV e fotografati utilizzando una fotocamera digitale.

4.2.7 Preparazione dei complessi rivestiti con peptide TAT

I poliplessi (200 μ l) sono stati formati aggiungendo una dispersione di copolimero ad uno stesso volume di soluzione di siRNA (0.2 mg mL⁻¹) al fine di ottenere rapporti peso polimero/siRNA (R) pari a 10; la miscela è stata miscelata pipettando delicatamente ed incubata 30 minuti.

Successivamente è stata aggiunta una quantità di peptide TAT (50 μ l, 60.5 nmol) doppia rispetto a quella necessaria per funzionalizzare tutte le catene di PEG (30.25 nmol); la miscela è stata miscelata pipettando delicatamente ed incubata 2 ore a 37°C.

La quantità di peptide coniugata è stata successivamente determinata per differenza, quantificando la quantità di peptide residuo non reagito, utilizzando il saggio colorimetrico per l'analisi quantitativa dei tioli (saggio di Ellman).

4.2.8 Stabilità allo scambio polianionico dei poliplessi in presenza di mucine

La stabilità dei poliplessi allo scambio polianionico è stata determinata dopo l'incubazione dei poliplessi con dispersione di mucina. I poliplessi sono stati preparati come in precedenza descritto, al fine di ottenere rapporti peso polimero/siRNA (R) pari a 5 e 10, aggiungendo successivamente 10 μ l di TAT 150 μ M o 10 μ l di Hepes 10 mM; dopo 2 ore, i poliplessi risultanti (30 μ l) sono stati miscelati con 5 μ l di dispersione di mucina (7 mg mL⁻¹), al fine di avere una concentrazione finale di mucina pari a 1 mg mL⁻¹, ed i campioni sono stati incubati a temperatura ambiente per 5 ore. L'elettroforesi su gel è stata quindi eseguita come descritto nello studio di complessazione.

4.2.9 Misure di Dynamic light scattering (DLS)

Per gli studi di Dynamic light scattering (DLS), i poliplessi sono stati formati in tampone Hepes *nucleasi free* 10 mM, a pH 7.4, ottenendo un rapporto in peso polimero/siRNA (R) pari a 10, utilizzando una concentrazione di siRNA utilizzata è stata 0.2 mg mL⁻¹. Dopo 30 minuti di incubazione, i poliplessi ottenuti (40 μ l) sono stati miscelati con il peptide TAT (20 μ l 300 μ M) o con Hepes 10 mM e sono stati incubati per 2 ore.

La misura DLS è stata eseguita su 50 μ l di campione a 25 °C con un Malvern Zetasizer NanoZS dotato di un laser a 633 nm con un angolo di scattering fisso di 173 °, utilizzando il software Dispersion Technology Software 7.02.

Successivamente, per il potenziale zeta, i poliplessi sono stati diluiti con acqua *nucleasi free* fino a 900 μ l prima della misura. Sono state eseguite misure di potenziale ζ mediante misure di

elettroforesi acquosa, registrate a 25 ° C utilizzando lo stesso apparato del DLS. I valori di potenziale zeta (mV) sono stati calcolati dalla mobilità elettroforetica utilizzando la relazione Smoluchowski.

4.2.10 Valutazione interazioni poliplessi-mucine

Lo studio delle possibili interazioni tra poliplessi e mucine è stato condotto mediante turbidimetria. 40 µl di poliplessi sono stati preparati miscelando volumi uguali (20 µl) di siRNA (0.1 mg mL⁻¹) e copolimero, ottenendo un rapporto in peso polimero/siRNA (R) pari a 10.

Dopo 30 minuti di incubazione, i poliplessi ottenuti (40 µl) sono stati miscelati con il peptide TAT (20 µl, 150 µM) o con Hepes 10 mM e sono stati incubati per 2 ore.

Successivamente sono stati aggiunti 60 µl di dispersione di mucine alla concentrazione di 2 mg mL⁻¹ in tampone Hepes 10 mM pH 7.4. Dopo l'incubazione a 37 ° C, la torbidità è stata misurata ogni 50 minuti fino a 6 ore circa. L'assorbanza a λ di 500 nm è stata registrata dal lettore di micropiastre (Multiskan Ex, Thermo Labsystems, Finlandia).

Allo stesso modo, l'assorbanza a λ di 500 nm è stata registrata per i poliplessi miscelati con 60 µl di tampone, al fine di sottrarre l'assorbanza dovuta a fenomeni di scattering.

4.2.11 Valutazione della capacità mucopenetrante dei poliplessi

Per determinare la diffusione attraverso uno strato muco è stato utilizzato un sistema opportunamente realizzato, costituito da un donatore ed un accettore[247].

I poliplessi sono stati formati miscelando volumi uguali (125 µl) di siRNA-Cy5 (0.105 mg mL⁻¹) e copolimero, ottenendo un rapporto in peso polimero/siRNA (R) pari a 10. Dopo 30 minuti di incubazione, i poliplessi ottenuti (250 µl) sono stati miscelati con il peptide TAT (50 µl 375 µM) e sono stati incubati per 2 ore.

Per la realizzazione del sistema sono stati utilizzati degli inserti per piastre cellulari (Scaffdex, CellCrownTM48), equipaggianti con una membrana in polipropilene idrofilo con pori da 0.45 µm.

Successivamente gli inserti sono stati posti in piastre da 24 pozzetti, contenenti un 1 ml di DPBS, utilizzando un supporto in plastica affinché la membrana sia in contatto con la superficie del liquido.

In seguito, sulla membrana sono stati posti prima 100 µl di una dispersione di mucina 1 mg mL⁻¹ e successivamente i poliplessi ottenuti in precedenza (300 µl).

Il sistema è stato dunque posto in incubatore a 37 ° C sotto continua agitazione (50 rpm). L'intensità di fluorescenza a λ di 665 nm del compartimento accettore è stata misurata ogni ora fino a 5 ore. Gli spettri di emissione sono stati registrati da uno spettrofluorimetro (Shimadzu RF-5301PC) (Milano, Italia) alla lunghezza d'onda di eccitazione di 600 nm. Per confronto lo stesso esperimento è stato ripetuto in assenza di mucina.

4.2.12 Test di vitalità cellulare

La vitalità cellulare è stata valutata mediante un saggio MTS su cellule 16-HBE, utilizzando un kit disponibile in commercio (test di proliferazione cellulare con soluzione acquosa di una soluzione cellulare Titer 96, Promega) contenente 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -5- (3-carbossimetossifenil) -2- (4-solfofenil) -2H-tetrazolio (MTS) e etosolfato di fenazina. Le cellule 16HBE sono state piastrate su una piastra a 96 pozzetti con una densità di 15,000 cellule per pozzetto in DMEM contenente il 10% di FBS. Dopo 24 ore di incubazione, il mezzo è stato rimosso e quindi le cellule sono state incubate con 200 μ l per pozzetto di OPTI-MEM contenente poliplessi. I poliplessi sono stati preparati con rapporti in peso di 3, 5, 10 e 15, aggiungendo o meno il peptide TAT ed ottenendo una concentrazione di siRNA finale di 100 nM.

Allo stesso modo, le cellule sono state incubate con solo il copolimero PHEA-g-bAPAE-PEG-MLB a concentrazioni comprese tra 0.5 mg mL⁻¹ e 0.005 mg mL⁻¹.

Tutte le soluzioni utilizzate sono state sterilizzate mediante filtrazione con filtro da 220 nm in cellulosa acetato prima della formazione dei complessi. Dopo 24 e 48 ore di incubazione, le soluzioni sono state rimosse e ciascun pozzetto è stato lavato con DPBS sterile; successivamente, le cellule di ciascun pozzetto sono state incubate con 100 μ L di DMEM fresco e 20 μ L di una soluzione MTS e le piastre sono state incubate per 2 ore a 37 ° C.

L'assorbanza a 490 nm è stata letta usando un lettore di piastre (Multiskan Ex, Thermo Labsystems, Finlandia). La vitalità relativa delle cellule (percentuale) è stata espressa come (cellule trattate in Abs490 / cellule di controllo in Abs490) \times 100, sulla base di tre esperimenti. Le cellule incubate con solo mezzo OPTI-MEM sono state usate come controllo negativo.

4.2.13 Uptake cellulare

La capacità di internalizzazione cellulare dei poliplessi è stata valutata tramite studi di uptake su 16HBE.

Le cellule sono state piastrate su una piastra a 8 pozzetti con una densità di 10,000 cellule per pozzetto in DMEM contenente il 10% di FBS. Dopo 24 ore di incubazione, il mezzo è stato rimosso e quindi le cellule sono state incubate con 200 µl per pozzetto di OPTI-MEM contenente poliplessi PHEA-g-bAPAE-PEG-MLB / siGL3-Cy5, ottenuti con un rapporto in peso pari a 10, aggiungendo o meno il peptide TAT ed ottenendo una concentrazione di siRNA finale di 200 nM.

Dopo 4 o 24 ore, le cellule sono state lavate con 300 µl di DPBS sterile e fissate con formaldeide al 4% per 10 min. Successivamente, la soluzione di formaldeide è stata rimossa ed i nuclei sono stati colorati con 100 µL di 4', 6-diamidino-2-fenilindolo (DAPI) in DPBS ad una concentrazione di 5×10^{-3} mg / mL. Dopo 3 minuti di incubazione, la soluzione DAPI è stata rimossa e le cellule sono state lavate tre volte con DPBS e osservate da un microscopio a fluorescenza Axio Vert.A1 (Zeiss). Le immagini sono state registrate utilizzando un Axio Cam MRm (Zeiss).

Per la determinazione quantitativa dell'uptake cellulare, le cellule 16HBE sono state seminate in una piastra a 24 pozzetti con una densità di 100,000 cellule per pozzetto. Dopo 24 ore di incubazione, il mezzo è stato rimosso e quindi le cellule sono state incubate con 300 µl per pozzetto di OPTI-MEM contenente poliplessi PHEA-g-bAPAE-PEG-MLB / siGL3-Cy5, ottenuti con un rapporto in peso pari a 10, aggiungendo o meno il peptide TAT ed ottenendo una concentrazione di siRNA finale di 200 nM.

Dopo 4 o 24 h di incubazione, le cellule sono state ampiamente lavate con DPBS sterile e lisate in 100 µL di tampone di lisi (2% SDS, 1% Triton X-100, in DPBS sterile). I lisati sono stati divisi in due parti: la prima (75 µL) è stata utilizzata per misurare l'intensità di fluorescenza da uno spettrofluorofotometro per PC Shimadzu RF-5301 (λ_{ex} : 600 nm; λ_{em} : 665 nm); il secondo (25 µl) è stato utilizzato per valutare la quantità totale di proteine mediante il saggio BCA. I risultati sono stati espressi come il rapporto intensità di fluorescenza per milligrammo di proteine.

4.3 Sviluppo di nanoparticelle per veicolazione inalatoria di Zileuton

4.3.1 Sintesi della 2-metil-2-ossazina

La 2-metil-2-ossazina è stata sintetizzata secondo una procedura già riportata[248].

1 eq di acetonitrile, 1.2 eq di 1 ammino-3-propanolo e 0.025 eq di zinco acetato diidrato vengono posti a reagire sotto continua agitazione e riscaldati a 90 ° C, a riflusso per 3-7 giorni, controllando l'avanzamento della reazione tramite spettroscopia FT-IR e ¹H-NMR. Il prodotto grezzo è stato distillato mediante distillazione frazionata sotto vuoto (50 mbar) raccogliendo la frazione la cui temperatura dei vapori sia pari a 54°C. Il prodotto puro (ottenuto con una resa di circa il 20%, in moli, rispetto alla quantità iniziale di acetonitrile) è stato caratterizzato mediante analisi di ¹H-NMR in CDCl₃.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, 25°C, TMS): δ 1.70-1.78 (m, 2H, -OCH₂CH₂CH₂N-), δ 1.76 (m, 3H, CH₃C-), δ 3.21-3.24 (m, 2H, -CH₂CH₂N-), δ 4.01-4.05 (m, 2H -CH₂CH₂O-).

4.3.2 Sintesi della poli-2-metil-2-ossazolina-Piperazina-Boc e della poli-2-metil-2-ossazina-Piperazina-Boc tramite Cationic Ring-Opening Polymerization (CROP)

La poli-2-metil-2-ossazolina-Piperazina-Boc (PMeOx-Pip-Boc) e la poli-2-metil-2-ossazina-Piperazina-Boc (PMeOz-Pip-Boc) sono state sintetizzate mediante Cationic Ring-Opening Polymerization (CROP) [249] in modo da ottenere un peso molecolare pari a 5 kg mol⁻¹. Il Metil trifluorometansolfonato (MeOTf), il benzonitrile ed i monomeri sono stati resi anidri con CaH₂ e successivamente distillati tramite distillazione a pressione ridotta e conservati in atmosfera di argon prima di usarli per la reazione di polimerizzazione.

1 eq di MeOTf anidro (180 mg) è stato introdotto in un pallone, precedentemente essiccato e condizionato con argon, e miscelato con la rispettiva quantità di benzonitrile anidro in modo da avere una concentrazione di monomero pari a 3 M. Successivamente sono stati aggiunti 58 eq di 2-metil-2-ossazolina anidra (MeOx) (5.35 g) o 50 eq di 2-metil-2-ossazina anidra (MeOz) (5.48 g) e la miscela di reazione è stata mantenuta sotto agitazione a 120 ° C per circa 3 ore. L'avanzamento della reazione è stato controllato dalla spettroscopia FT-IR e ¹H-NMR. Una volta scomparso il picco relativo al monomero, che indica il completo esaurimento dello stesso nella miscela di reazione, la miscela è stata raffreddata e successivamente sono stati aggiunti 3 eq di 1-Boc-piperazina anidra (Pip-Boc) (612.8 mg disciolti in 1.8 ml di benzonitrile), lasciando reagire a 50 ° C per almeno 4 ore. Infine, i polimeri sono stati isolati dalla miscela di reazione mediante precipitazione in dietilere freddo (0 ° C); la sospensione è stata quindi centrifugata ed il residuo è stato lavato una volta con dietilere. Quindi, il prodotto ottenuto è stato essiccato

sotto vuoto. Il residuo solido è stato solubilizzato in acqua bidistillata e quindi la soluzione è stata purificata mediante dialisi (Visking Dialysis Tubing 18/32 ", 1000 cut-off in peso molecolare). Dopo la dialisi la soluzione è stata filtrata e quindi liofilizzata. Il prodotto puro (ottenuto con una resa di circa il 97% in peso considerando la quantità iniziale di monomero) è stato caratterizzato dall'analisi $^1\text{H-NMR}$.

$^1\text{H-NMR}$ PMeOx-Pip-Boc (300 MHz, CDCl_3 , 25°C , TMS): δ 1.44-1.46 (m, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{CO}$), δ 2.07-2.13 (m, 174H, $[\text{CH}_3\text{CON-}]$), δ 2.94, δ 3.03-3.05 (m, 3H, $\text{CH}_3[\text{N-CH}_2\text{CH}_2]$), δ 3.45-3.47 (m, 232H $[-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N-}]$).

$^1\text{H-NMR}$ PMeOz-Pip-Boc (300 MHz, DMSO-d_6 , 25°C , TMS): δ 1.39-1.41 (m, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{CO}$), δ 1.7 (m, 100H, $[\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2]$), δ 1.95-2.00 (m, 150H, $[\text{CH}_3\text{CON-}]$), δ 2.92 - 2.95 (m, 3H, $\text{CH}_3[\text{N-CH}_2\text{CH}_2-]$), δ 3.19-3.24 (m, 232H $[-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N-}]$).

4.3.3 Rimozione del protettore BOC

Una quantità nota di PMeOx-Pip-Boc o di PMeOz-Pip-Boc è stata solubilizzata in una soluzione acquosa di HCl 4 M in modo da avere una concentrazione pari a 200 mg mL^{-1} , lasciando agitare per 4 ore a 30°C , avendo cura di lasciare l'ambiente di reazione in comunicazione con l'esterno. Trascorso tale tempo, si aggiunge una quantità necessaria di NaOH solido in modo da neutralizzare la soluzione; avvenuta la completa solubilizzazione del NaOH, la soluzione viene dunque dializzata contro acqua (Visking Dialysis Tubing 18 / 32", 1000 cut-off in peso molecolare) e successivamente il contenuto della dialisi è stato sottoposto a liofilizzazione.

Il prodotto puro (ottenuto con una resa di circa il 98%, in peso, rispetto alla quantità iniziale di polimero) è stato caratterizzato mediante analisi di $^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3 .

4.3.4 Sintesi dei copolimeri PHEA-g-Pip-PMeOx e PHEA-g-Pip-PMeOz

La derivatizzazione di PHEA con PMeOx-Pip o PMeOz-Pip è stata effettuata utilizzando Bis(4-nitrofenil) carbonato (BNFC) come agente di coniugazione. 200 mg di PHEA (corrispondenti a 1.26 mmol di unità ripetitive), sono stati solubilizzati in 3 ml di dimetilformammide anidra (DMFa); successivamente, sono stati aggiunti 31 mg di BNFC (0.1 mmol) precedentemente solubilizzati in 500 μl di DMFa (0.1 mmol; mmol di BNFC/mmol di UR funzionalizzabile su PHEA pari a 0.08). La miscela è stata mantenuta per 4 ore a $40 \pm 0,1^\circ\text{C}$, sotto atmosfera di argon. Successivamente, la miscela di reazione è stata aggiunta lentamente goccia a goccia ad una soluzione di PMeOzi-Pip o PMeOz-Pip preparata solubilizzando 855 mg di PMeOzi-Pip o

PMeOx-Pip (0.17 mmol) in 2 ml di DMFa. Le quantità di ogni reagente sono state determinate considerando i seguenti rapporti stechiometrici: $R_1 = (\text{mmol di BNFC} / \text{mmol di UR funzionalizzabile di PHEA}) = 0.08$ e $R_2 = (\text{mmol di Pip} / \text{mmol di UR funzionalizzabile di PHEA}) = 0.135$.

La miscela è stata mantenuta in agitazione per 2 ore a 25 ° C, sotto atmosfera di argon e successivamente è stata dializzata contro l'acqua (Visking Dialysis Tubing 18/32 ", cut-off di peso molecolare 1000) per almeno 5 giorni; Infine il contenuto della dialisi è stato filtrato e liofilizzato. Il prodotto puro (ottenuto con una resa di circa il 60% in peso considerando la somma delle quantità iniziale di PHEA e di PMeOx-Pip-Boc o PMeOz-Pip-Boc) è stato caratterizzato dall'analisi $^1\text{H-NMR}$ in DMSO-d.

$^1\text{H-NMR}$ PHEA-g-Pip-PMeOx (300 MHz, DMSO-d, 25°C, TMS): δ 1.97 (m, 174H_{PMeOx}, [CH₃CON]-), δ 3.13 (m, 2H_{PHEA}, -COCH₂CONH-), δ 3.33 (m, 232H_{PMeOx} [-CH₂CH₂N-]; 2H_{PHEA} -NH-CH₂-CH₂-O-; 2H_{PHEA} -NH-CH₂-CH₂-O-), δ 4.62 (m, 1H_{PHEA}, -NH-CH(CO)CH₂-).

$^1\text{H-NMR}$ PHEA-g-Pip-PMeOz (300 MHz, DMSO-d, 25°C, TMS): δ 1.7 (m, 100H, [NCH₂CH₂CH₂]), δ 1.95-2.00 (m, 150H, [CH₃CON-]), δ 3.19-3.4 (m, 232H [-CH₂CH₂CH₂N-]; 2H_{PHEA} -NH-CH₂-CH₂-O-; 2H_{PHEA} -NH-CH₂-CH₂-O-), δ 4.62 (m, 1H_{PHEA}, -NH-CH(CO)CH₂-).

4.3.5 Sintesi dei copolimeri PHEA-g-Pip-PMeOx-g-PLA e PHEA-g-Pip-PMeOz-g-PLA

La derivatizzazione di PHEA-g-Pip-PMeOx o PHEA-g-Pip-PMeOz con PLA, è stata effettuata utilizzando il 1,1'-carbonildiimidazolo (CDI) come agente di coniugazione. 700 mg di PLA (corrispondenti a 0.05 mmol), sono stati solubilizzati in 4 ml di dimetilformammide anidra (DMFa); 16.21 mg di CDI, precedentemente solubilizzati in 150 μl di DMFa, sono stati successivamente aggiunti a questa soluzione. La miscela è stata mantenuta per 4 ore a $40 \pm 0,1$ ° C, sotto atmosfera di argon. Successivamente, una soluzione di PHEA-g-Pip-PMeOx e trietilammina (TEA) o PHEA-g-Pip-PMeOz e TEA, preparato solubilizzando 295 mg di PHEA-g-Pip-PMeOx o PHEA-g-Pip-PMeOz in 4 ml di DMFa e aggiungendo 56 μL di TEA, è stata aggiunta goccia a goccia alla miscela di reazione lasciando ad agitare per 72 ore a 40 ° C, sotto argon. Le quantità di ogni reagente sono state determinate considerando i seguenti rapporti stechiometrici: $R_1 = (\text{mmol di CDI} / \text{mmol di PLA}) = 2$, $R_2 = (\text{mmol di PLA} / \text{mmol di UR funzionalizzabile di PHEA-g-Pip-PMeOx o PHEA-g-Pip-PMeOz}) = 0.06$ e $R_3 = (\text{mmol di TEA} / \text{mmol di PLA}) = 8$.

Infine il prodotto finale è stato isolato per precipitazione in una miscela dietilere/diclorometano (15: 1); il solido ottenuto è stato quindi lavato più volte con la stessa miscela e quindi essiccato. Il prodotto puro (ottenuto con una resa di circa il 60% in peso considerando la somma delle quantità iniziali di PHEA-g-Pip-PMeOx o PHEA-g-Pip-PMeOz e PLA) è stato caratterizzato dall'analisi $^1\text{H-NMR}$ in DMSO-d e con spettroscopia NMR DOSY in DMSO-d.

$^1\text{H-NMR}$ PHEA-g-Pip-PMeOx (300 MHz, DMSO-d, 25°C, TMS): δ 1.43-1.48 (2d, 582 H_{PLA} -O-CO-CH(CH₃)-O-), δ 1.97 (m, 174 H_{PMeOx} , [CH₃CON]-), δ 3.13 (m, 2 H_{PHEA} , -COCHCH₂CONH-), δ 3.33 (m, 232 H_{PMeOx} [-CH₂CH₂N-]; 2 H_{PHEA} -NH-CH₂-CH₂-O-; 2 H_{PHEA} -NH-CH₂-CH₂-O-), δ 4.62 (m, 1 H_{PHEA} , -NH-CH(CO)CH₂-), δ 5.15-5.21 (2d, 194 H_{PLA} -O-CO-CH(CH₃)-O-).

$^1\text{H-NMR}$ PHEA-g-Pip-PMeOz (300 MHz, DMSO-d, 25°C, TMS): δ 1.43-1.48 (2d, 582 H_{PLA} -O-CO-CH(CH₃)-O-), δ 1.7 (m, 100H, [NCH₂CH₂CH₂]), δ 1.95-2.00 (m, 150H, [CH₃CON-]), δ 3.19-3.4 (m, 232H [-CH₂CH₂CH₂N-]; 2 H_{PHEA} -NH-CH₂-CH₂-O-; 2 H_{PHEA} -NH-CH₂-CH₂-O-), δ 4.62 (m, 1 H_{PHEA} , -NH-CH(CO)CH₂-), δ 5.15-5.21 (2d, 194 H_{PLA} -O-CO-CH(CH₃)-O-).

4.3.6 Determinazione dei pesi molecolari dei copolimeri mediante Size Exclusion Chromatography

Peso molecolare medio ponderale (M_w) e la polidispersità (M_w/M_n) di ciascun copolimero sono stati determinati da un'analisi cromatografica di esclusione dimensionale (SEC), eseguita utilizzando le colonne Phenomenex Phenogel 5u 10E4A e 10E3A collegate a un sistema GPC / SEC Agilent 1260 Infinity Multi-Detector e un rilevatore di indice di rifrazione. Le analisi sono state eseguite usando DMF+ 0.1 M LiBr come eluente con un flusso di 1 mL min⁻¹ e poliossido di etilene standard (40 kDa) per la calibrazione. La temperatura della colonna è stata impostata a 50 ° C.

4.3.7 Preparazione nanoparticelle tramite nanoprecipitazione diretta

30 mg di PHEA-g-Pip-PMeOx-g-PLA o di PHEA-g-Pip-PMeOz-g-PLA sono stati solubilizzati in 3 ml di acetone. La soluzione organica di copolimeri è stata posta in una buretta e aggiunta goccia a goccia a 30 ml di acqua distillata sotto continua agitazione. La miscela è stata lasciata sotto agitazione per 1 ora; l'acetone e parte dell'acqua sono stati eliminati a 40 ° C a pressione

ridotta, mediante evaporatore rotante. La dispersione di nanoparticelle è stata successivamente diluita a 30 ml e conservata a 5 ° C.

4.3.8 Preparazione nanoparticelle tramite nanoprecipitazione mediante dialisi

30 mg di PHEA-g-Pip-PMeOx-g-PLA o di PHEA-g-Pip-PMeOz-g-PLA vengono solubilizzati in 6 ml di DMSO. La soluzione organica di copolimeri è stata posta a dializzare contro acqua (Visking Dialysis Tubing 18 / 32", 10000 cut-off in peso molecolare) per un giorno. La dispersione di nanoparticelle è stata successivamente diluita a 30 ml e conservata a 5 ° C.

4.3.9 Preparazione nanoparticelle tramite emulsione/evaporazione del solvente

34 mg di PHEA-g-Pip-PMeOx-g-PLA o di PHEA-g-Pip-PMeOz-g-PLA vengono solubilizzati in 2 ml di diclorometano. A completa solubilizzazione, la fase organica contenente il polimero viene aggiunta a 50 ml di acqua distillata sotto continua agitazione tramite agitatore a paletta, in modo da ottenere un'emulsione; sotto continua agitazione vengono aggiunti altri 50 ml di acqua distillata lasciando agitare per 5 minuti. Successivamente l'emulsione ottenuta viene sottoposta a sonicazione per 5 minuti; infine la fase organica è stata allontanata tramite evaporatore rotante.

4.3.10 Dynamic light scattering

La misura DLS è stata eseguita su 800 µl di campione fresco, preparato come descritto precedentemente, a 25 ° C con un Malvern Zetasizer NanoZS dotato di un laser a 532 nm con un angolo di scattering fisso di 173 °, utilizzando il software Dispersion Technology Software 7.02.

Sono state eseguite misure di potenziale ζ mediante misure di elettroforesi acquosa, registrate a 25 ° C utilizzando lo stesso apparato per la misura DLS. I valori di potenziale ζ (mV) sono stati calcolati dalla mobilità elettroforetica utilizzando la relazione Smoluchowski.

4.3.11 Microscopia a scansione elettronica (SEM)

Per gli studi morfologici, poche gocce di ciascuna dispersione nanoparticellare sono state poste su uno stub di acciaio inossidabile e dopo l'evaporazione dell'acqua, i residui sono stati osservati

utilizzando un microscopio elettronico a scansione Crossbeam 340 field emission scanning electron microscope (Carl Zeiss Microscopy, Oberkochen, Germany).

4.3.12 Preparazione di nanoparticelle caricate con Zileuton

Le nanoparticelle caricate con zileuton sono state preparate mediante nanoprecipitazione diretta; brevemente 100 mg di PHEA-g-PMeOX-g-PLA o PHEA-g-PMeOzi-g-PLA e 25 mg di Zileuton sono stati solubilizzati in 10 ml di acetone. La soluzione organica è stata aggiunta goccia a goccia a 100 ml di acqua distillata sotto continua agitazione. La miscela è stata lasciata sotto agitazione per 1 ora; l'acetone e parte dell'acqua sono stati eliminati a 40 ° C a pressione ridotta mediante evaporatore rotante. La dispersione di nanoparticelle è stata successivamente diluita a 100 ml e filtrata con filtro in acetato di cellulosa da 220 nm. Per determinare la quantità di Zileuton intrappolato, è stata eseguita l'analisi HPLC; le analisi sono state eseguite con una fase mobile costituita da una miscela di acqua e metanolo (30:70), utilizzando un flusso di 0.6 mLmin⁻¹. La temperatura della colonna (Phenomenex Luna 5u C18 100A) è stata mantenuta a 25 ° C e la lunghezza d'onda del detector UV è stata settata a 260 nm. L'area del picco ottenuta è stata confrontata con una curva di calibrazione ottenuta tracciando le aree rispetto alle concentrazioni della soluzione standard di Zileuton nell'intervallo 0.05-0.02 mg mL⁻¹ ($y = 41770x$, $R^2 = 0,9999$). I risultati della DL% sono stati espressi come il rapporto percentuale tra la massa del farmaco quantificato e la massa di sistema essiccata analizzata. L'efficacia dell'intrappolamento (EE%) è stata espressa come il rapporto percentuale in peso tra la quantità di farmaco effettivamente intrappolata nelle particelle e quella teorica.

4.3.13 Test di vitalità cellulare

La vitalità cellulare è stata valutata mediante un test MTS su cellule 16-HBE, utilizzando un kit disponibile in commercio (Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation assay, Promega) contenente 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -5- (3-carbossimetossifenil) -2- (4-sulfofenil) -2H-tetrazolio (MTS) e fenazina etosolfato. Le cellule 16HBE sono state piastrate su una piastra a 96 pozzetti a una densità cellulare di 15,000 cellule/pozzetto in DMEM contenente il 10% di FBS. Dopo 24 ore di incubazione, il mezzo è stato rimosso e quindi le cellule sono state incubate con 200 µl per pozzetto con una dispersione acquosa (DMEM contenente il 10% di FBS) di ciascun nanosistema a concentrazioni in Zileuton comprese tra 150 µg mL⁻¹ e 37.5 µg mL⁻¹. La vitalità cellulare è stata valutata anche per Zileuton libero e nanoparticelle vuote. Tutte le dispersioni sono state sterilizzate mediante filtrazione utilizzando

un filtro da 220 nm. Dopo 24 e 48 ore di incubazione, il surnatante è stato rimosso e ciascuna piastra è stata lavata con DPBS sterile; successivamente, le cellule in ciascun pozzetto sono state incubate con 100 μ L di DMEM fresco e 20 μ L di una soluzione MTS e le piastre sono state incubate per 2 ore a 37 ° C. L'assorbanza a 490 nm è stata letta utilizzando un lettore di micropiastre (Multiskan Ex, Thermo Labsystems, Finlandia).

La vitalità cellulare relativa (percentuale) è stata espressa come (cellule trattate con Abs490 / cellule di controllo Abs490) \times 100.

Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato e rapportati a un triplicato di cellule non trattate e usate, quindi, come controllo.

4.3.14 Preparazione di microparticelle mediante tecnica dello spray drying

Le microparticelle sono state preparate utilizzando un Nano Spray Dryer B-90 (Buchi, Italia). Ad un volume fisso (50 mL) di nanoparticelle caricate con zileuton (50 mg), è stata aggiunta una diversa quantità di mannitolo (ottenendo concentrazioni in mannitolo pari all'1% e 3% p/v); dopo la completa solubilizzazione del mannitolo, la miscela è stata filtrata con filtro in acetato di cellulosa da 450 nm prima di essere nebulizzata.

Le condizioni sperimentali dell'apparato per la produzione delle microparticelle sono state ottimizzate e impostate come segue: frequenza 120 kHz, pressione 28 hPa, temperatura ingresso 100 ° C e temperatura uscita 40 ° C, portata 105 L / min, spray, che corrisponde alla portata relativa portata dello spray, pari al 78%, la portata della pompa è stata impostata al 66%. Come gas essiccante è stata utilizzata aria filtrata e deumidificata.

Tabella 14 Quantità (mg) di nanoparticelle e di mannitolo utilizzati per la produzione delle microparticelle

	<i>mg di Mannitolo</i>	<i>mg di Polimero</i>
<i>MPX1%</i>	500	50
<i>MPX3%</i>	1500	50
<i>MPZ1%</i>	500	50
<i>MPZ3%</i>	1500	50

Le formulazioni contenenti nanoparticelle di PHEA-g-PMeOX-g-PLA sono state denominate MPX, mentre quelle contenenti nanoparticelle di PHEA-g-PMeOZi-g-PLA sono state denominate MPZ.

Dopo il processo di spray drying, le microparticelle raccolte sono state analizzate mediante DLS e analisi HPLC al fine di valutare se il processo di spray drying potesse influenzare la ridispersione delle nanoparticelle e la quantità di Zileuton intrappolato, e da analisi SEM per valutare la forma e le dimensioni delle microparticelle, utilizzando il microscopio Desktop SEM Phenom PRO X PHENOM.

Il programma ImageJ è stato utilizzato per calcolare il diametro medio di ciascun campione da immagini SEM analizzando un numero sufficientemente rappresentativo (> 500 particelle)

4.3.15 Cinetica di rilascio del farmaco

Per lo studio sul rilascio del farmaco, una certa quantità di campione microparticellare (corrispondente a 0.5 mg di Zileuton) è stata dispersa in 1 mL di PBS e posta in dialisi (MWCO 2 kDa) contro 9 mL di PBS a 37 ° C sotto continua agitazione (100 rpm) in orbital shaker.

A tempi di definiti, sono stati prelevati 0.2 mL del mezzo esterno e sostituiti con uguale volume di mezzo fresco. Lo zileuton libero è stato utilizzato come controllo del rilascio. La quantità di Zileuton rilasciata è stata calcolata mediante l'analisi HPLC come descritto per la determinazione della drug loading.

4.3.16 Analisi turbidimetrica

Le possibili interazioni tra nanoparticelle e mucina sono state determinate mediante turbidimetria. 100 µL di dispersione di nanoparticelle, preparata sciogliendo una certa quantità di campione microparticellare (corrispondente a 0.2 mg di nanoparticelle) in PBS, sono stati miscelati con 100 µL di dispersione di mucina alla concentrazione di 2 mg mL⁻¹ in PBS.

Dopo l'incubazione a 37 ° C, la torbidità è stata misurata ogni 50 minuti fino a circa 6 ore. L'assorbanza alla λ di 500 nm è stata registrata dal lettore di micropiastre (Multiskan Ex, Thermo Labsystems, Finlandia).

Come controllo positivo sono stati utilizzati una dispersione di nanoparticelle ottenute con il copolimero PHEA-g-PLA e chitosano, aventi stessa concentrazione dei campioni analizzati in precedenza.

4.3.17 Analisi reologica

Le possibili interazioni tra nanoparticelle e mucina sono state determinate anche mediante analisi reologica alla temperatura di 37 ° C utilizzando un reometro rotazionale (TA Instruments) dotato di geometria dei cilindri concentrici. Un'analisi strain sweep (5-30%) è stata eseguita sulla dispersione della mucina a 1.0 Hz per determinare la regione viscoelastica lineare, che è stata trovata nell'intervallo del 10-20%. Quindi, è stata eseguita un'analisi time sweep (30 min) per tutti i campioni con una deformazione costante del 15% e una frequenza costante di 1.0 Hz per determinare la viscosità complessa (η^*). Per le analisi della miscela mucina-nanoparticelle, una certa quantità di campione microparticellare (corrispondente a 14 mg di nanoparticelle) è stata aggiunta a 14 ml di dispersione di mucina in PBS (1 mg mL⁻¹) e miscelata delicatamente con una spatola per 20 s. I campioni sono stati caricati nel reometro e quindi equilibrati a 37 ° C per 20 min. Per prevenire la disidratazione durante le misurazioni reologiche, una trappola per solventi è stata posizionata sulla parte superiore della geometria.

4.4 Sviluppo di nanoparticelle per veicolazione inalatoria di Rapamicina

4.4.1 Sintesi e caratterizzazione del poli- ϵ -caprolattone-succinato (PCL-SUCC)

L'introduzione di un gruppo carbossilico terminale nel PCL è stata ottenuta mediante reazione dell'ossidrilico terminale del PCL con l'anello dell'anidride succinica.

Una determinata quantità di PCL-OH è stata solubilizzata in a-DMF (133.4 mg mL⁻¹) e successivamente sono state aggiunte dimetilamonipiridina (DMAP) ($R_1 = \text{mmol DMAP} / \text{mmol PCL}$ uguale a 1.2) e anidride succinica (AS) ($R_1 = \text{mmol AS} / \text{mmol PCL}$ uguale a 40). La miscela è stata lasciata reagire per 24 ore a 60°C sotto vigorosa agitazione. Successivamente, il prodotto è stato precipitato in dietilere freddo, essiccato sotto vuoto e lavato più volte con acqua bidistillata. Infine, il prodotto solido, è stato solubilizzato in acetone e dunque dializzato contro acqua (MWCO 12–14 kDa); la sospensione ottenuta è stata liofilizzata.

Il grado di carbossilazione del PCL è stato valutato titolando una quantità adeguata di PCL-SUCC (20 mg mL⁻¹) in THF con una soluzione metanolica di KOH (35.6 mM), utilizzando una blu di timolo (5 mg mL⁻¹) come indicatore.

4.4.2 Sintesi e caratterizzazione del copolimero PHEA-g-SUCC-PCL

La derivatizzazione del PHEA con PCL-SUCC, per ottenere i copolimeri graft PHEA-g-SUCC-PCL, è stata ottenuta utilizzando CDI come agente di coniugazione. Una quantità calcolata di CDI è stata aggiunta alla soluzione PCL-SUCC in a-DMF (66.5 mg mL⁻¹) ($R_3 = \text{mmol CDI} / \text{mmol PCL-SUCC}$ uguale a 3). La miscela di reazione viene mantuta sotto agitazione a 40 ° C per 5 ore in atmosfera di argon.

Contemporaneamente, una determinata quantità di PHEA è stata solubilizzata in a-DMF (33 mg mL⁻¹) a 40 ° C sotto atmosfera di argon e successivamente è stata aggiunta DEA, come catalizzatore, ($R_4 = \text{mmol DEA} / \text{mmol unità ripetitive di PHEA che trasportano gruppi idrossilici}$ pari a 0.3). Dopo il tempo di attivazione, la soluzione PHEA risultante è stata aggiunta goccia a goccia a quella contenente PCL-SUCC attivato da CDI, seguendo due rapporti stechiometrici ($R_5 = \text{mmol PCL-SUCC} / \text{mmol unità ripetitive di PHEA che hanno gruppi idrossilici liberi}$ uguale a 0.06 o 0.12).

La reazione procede sotto continua agitazione a 40 ° C per vari tempi (24, 44 o 68 h).

Trascorso il tempo di reazione, la miscela di reazione è stata precipitata goccia a goccia in etere dietilico ed il prodotto solido è stato separato mediante centrifugazione (a 4 ° C per 15 min, a 10111 g); successivamente il residuo solido è stato lavato tre volte con una miscela dietilere:

diclorometano (4: 1 v/v). Il prodotto ottenuto è stato solubilizzato in DMA, dializzato contro acqua bidistillata (MWCO 12–14 kDa) ed infine liofilizzato.

Sono stati ottenuti così sei differenti copolimeri graft PHEA-g-SUCC-PCL.

Tabella 15 Riassunto dei rapporti stechiometrici R_5 e tempi di reazione per le varie sintesi

Copolimeri	R_5	Tempo di reazione (h)
PHEA-g-SUCC-PCL_(A)	0.06	24
PHEA-g-SUCC-PCL_(B)	0.06	48
PHEA-g-SUCC-PCL_(C)	0.06	68
PHEA-g-SUCC-PCL_(D)	0.12	24
PHEA-g-SUCC-PCL_(E)	0.12	48
PHEA-g-SUCC-PCL_(F)	0.12	68

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMF-d, 25°C, TMS): δ 1.5 and 2.1 (m, $6\text{H}_{\text{PCL}} - \text{O}(\text{O})\text{CCH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2]$ ₁₂₂₋); δ 2.5 (2d, $2\text{H}_{\text{PCL}} - [\text{O}(\text{O})\text{CCH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2]$ ₁₂₂₋); δ 2.8 (m, $2\text{H}_{\text{PHEA}} - \text{C}(\text{O})\text{CHCH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}-$); δ 3.2 (t, $2\text{H}_{\text{PHEA}} - \text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$); δ 3.50 (t, $2\text{H}_{\text{PHEA}} - \text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$); δ 4.3 (t, $2\text{H}_{\text{PCL}} - [\text{O}(\text{O})\text{CCH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2]$ ₁₂₂₋), and δ 5.0 (m, $1\text{H}_{\text{PHEA}} - \text{NHCH}(\text{CO})\text{CH}_2-$).

4.4.3 Sintesi e caratterizzazione dei copolimeri PHEA-g-SUCC-PCL-g-PEG

Il copolimero PHEA-g-SUCC-PCL_(B) o PHEA-g-SUCC-PCL_(F) è stato solubilizzato in a-DMA (64 mg mL⁻¹) in presenza di TEA come catalizzatore. A questa soluzione è stata aggiunta una quantità adeguata di DSC e la miscela risultante è stata lasciata reagire a 40 °C per 4 h; trascorso tale tempo, la miscela di reazione è stata aggiunta ad una soluzione di H₂N-PEG-OCH₃ in a-DMA (12 mg mL⁻¹).

Le quantità di reagenti sono state calcolate secondo i rapporti stechiometrici riportati in tabella.

Tabella 16 Riassunto dei rapporti stechiometrici utilizzati per le sintesi

R₆	mmol PEG/ mmol OH	0.075
R₇	mmol DSC / mmol OH	0.1
R₈	mmol TEA / mmol DSC	1

*mmol OH = mmol UR PHEA-g-SUCC-PCL con OH liberi

La miscela è stata lasciata per 18 ore a 25 ° C, quindi dializzata (MWCO 12-14 kDa) contro acqua distillata e liofilizzata per recuperare il copolimero ottenuto.

I copolimeri PHEA-g-SUCC-PCL_(B) -g-PEG e PHEA-g-SUCC-PCL_(F) -g-PEG sono stati ottenuti con una resa di circa il 90% in peso considerando la somma delle quantità iniziali di PHEA-g-SUCC-PCL_(B) o del PHEA-g-SUCC-PCL_(F) e PEG.

¹H-NMR (300 MHz, DMF-d, 25°C, TMS): δ 1.5 and 2.1 (m, 6H_{PCL} -O(O)CCH₂(CH₂)₃CH₂]₁₂₂-); δ 2.5 (2d, 2H_{PCL} -[O(O)CCH₂(CH₂)₃CH₂]₁₂₂-); δ 2.8 (m, 2H_{PHEA} -C(O)CHCH₂C(O)NH-); δ 3.2 (t, 2H_{PHEA} -NHCH₂CH₂O-); δ 3.50 (t, 2H_{PHEA} -NHCH₂CH₂O-); δ 3.7 (t, 4H_{PEG} -[CH₂CH₂O]₄₄-); δ 4.3 (t, 2H_{PCL} -[O(O)CCH₂(CH₂)₃CH₂]₁₂₂-), and δ 5.0 (m, 1H_{PHEA} -NHCH(CO)CH₂-).

Allo stesso modo è stato sintetizzato il derivato PHEA-g-RhB-g-SUCC-PCL_(F)-g-PEG usando PHEA-g-RhB come polimero di partenza, sintetizzato seguendo procedure già riportate in letteratura[250].

4.4.4 Determinazione dei pesi molecolari dei copolimeri mediante Size Exclusion Chromatography

L'analisi SEC è stata eseguita con un sistema Waters (Waters, Mildford, MA), utilizzando colonne Phenomenex Phenogel 5u 10E4A e 10E3A, e un rifrattometro differenziale come rilevatore, a 50 °C. Come eluente è stata utilizzata una soluzione LiBr DMF 0.01 M con un flusso di 0.8 ml min⁻¹ e standard PEG (intervallo 145-1.5 kDa).

4.4.5 Analisi FT-IR

Ciascun copolimero liofilizzato è stato analizzato mediante FT-IR, utilizzando uno spettrometro Bruker ALPHA FT-IR (Bruker, Milano, Italia).

4.4.6 Preparazione di nanoparticelle tramite tecnica della nanoprecipitazione diretta

Una dispersione in DMA del copolimero PHEA-g-RhB -g-SUCC-PCL_(F) -g-PEG (1.5% p / v) è stata posta in una buretta e aggiunta goccia a goccia ad acqua distillata (1:10 v / v). La miscela è stata lasciata sotto agitazione per 2 ore, quindi dializzata contro acqua distillata. La dispersione ottenuta è stata conservata a 5 ° C per un'ulteriore caratterizzazione. Per produrre nanoparticelle caricate con farmaco, la stessa procedura è stata seguita aggiungendo

Rapamicina nella fase organica (0.32% p/v) contenente il copolimero. Per ottenere nanoparticelle non peghilate, vuote e caricate con farmaci, la procedura di nanoprecipitazione è stata seguita utilizzando il copolimero PHEA-RhB-SUCC-PCL_(F).

4.4.7 *Dynamic light scattering*

Le nanoparticelle sono state caratterizzate in termini di diametro idrodinamico (Z-Average), PDI e potenziale ζ , utilizzando un Malvern Zetasizer Nano ZSP (Malvern Instrument, Malvern, UK)., Un laser He-Ne a $\lambda = 633$ nm e con un angolo di diffusione fisso di 175° . Il diametro idrodinamico medio dell'intensità e l'indice di polidispersità (PDI) sono stati ottenuti mediante analisi cumulativa della funzione di correlazione.

Il potenziale Zeta (mV) è stato calcolato dalla mobilità elettroforetica utilizzando la relazione di Smoluchowsky e assumendo che $Ka \gg 1$ (dove K e a sono rispettivamente il parametro di Debye-Hückel e il raggio della particella).

4.4.8 *Analisi di spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS)*

La composizione superficiale di ciascun campione liofilizzato è stata determinata mediante analisi XPS. Gli spettri XPS sono stati registrati utilizzando un PHI 5000 VersaProbe II (ULVAC-PHI, Inc.) ed una radiazione monocromatica Al-K α ($h\nu = 1486,6$ eV) da una sorgente di raggi X operante a una dimensione dello spot di 200 μm , una potenza di 50 W e una tensione di accelerazione di 15 kV.

4.4.9 *Determinazione della Drug Loading (DL%)*

La quantità di Rapamicina caricata è stata determinata mediante HPLC utilizzando un sistema Waters Brexex System dotato di un autocampionatore Waters 717 Plus (volume di iniezione 40 μL) e di un Shimadzu UV – vis rilevatore HPLC in linea con postazione computerizzata. La rapamicina è stata estratta solubilizzando una quantità nota di ciascun campione prima in DMA e, completata la dissoluzione delle nanoparticelle, aggiungendo metanolo (1: 9 v / v, 2.5 mg mL^{-1}), lasciando sotto agitazione per quasi 2 ore. La dispersione ottenuta è stata filtrata (0.45 μm) e quindi iniettata. La temperatura della colonna (Phenomenex Luna 5u C18 100A) è stata mantenuta a 25°C e la lunghezza d'onda del detector UV è stata settata a 277 nm.; le analisi sono state eseguite con una fase mobile costituita da una miscela di metanolo e acqua 70:30 v / v con una velocità di flusso di 1 mL min^{-1} . L'area dei picchi ottenuta a 14 min è stata

confrontata con una curva di calibrazione ottenuta tracciando le aree rispetto alle concentrazioni della soluzione standard di Rapamicina in metanolo nell'intervallo di 0.1 – 0.005 mg mL⁻¹ ($y = 136513x$, $R^2 = 0.9994$).

I risultati della DL% sono stati espressi come il rapporto percentuale tra la massa del farmaco quantificato e la massa di sistema essiccata analizzata. L'efficacia dell'intrappolamento (EE%) è stata espressa come il rapporto percentuale in peso tra la quantità di farmaco effettivamente intrappolata nelle particelle e quella teorica.

4.4.10 Stabilità del farmaco

La stabilità della Rapamicina è stata valutata determinando la quantità di farmaco intatto nel tempo dopo l'incubazione in condizioni adeguate. In particolare, è stata solubilizzata una quantità esatta di farmaco in metanolo e successivamente 50 µl (corrispondenti 0.09 mg di farmaco) sono stati aggiunti a 30 ml di DPBS, o ad una miscela tra DPBS: siero bovino fetale (FBS) (90:10 v v).

La dispersione ottenuta è stata incubata in un agitatore orbitale a 37 ° C e, a tempi predeterminati (0, 1, 2, 4, 7, 12, 16 e 24 ore), sono stati prelevati 3 ml e sono state aggiunte aliquote uguali di mezzo fresco. Ciascun volume prelevato è stato quindi liofilizzato, trattato con 1,5 ml di metanolo e centrifugato. Infine, il supernatante è stato filtrato con filtri di acetato di cellulosa da 0.2 µm e analizzato mediante analisi HPLC, usando le condizioni descritte in precedenza per la determinazione della drug loading.

4.4.11 Test di vitalità cellulare

La vitalità cellulare è stata valutata mediante un test MTS su cellule 16-HBE, utilizzando un kit disponibile in commercio (Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation assay, Promega) contenente 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -5- (3-carbossimetossifenil) -2- (4-solfifenil) -2H-tetrazolio (MTS) e fenazina etosolfato.

Le cellule 16HBE sono state piastrate su una piastra a 96 pozzetti a una densità cellulare di 15.000 cellule / pozzetto in DMEM contenente il 10% di FBS. Dopo 24 ore di incubazione, il terreno è stato rimosso e quindi le cellule sono state incubate con 200 µl per pozzetto con una dispersione acquosa (DMEM contenente 10% FBS) nanoparticelle a concentrazioni comprese tra 1 mg mL⁻¹ e 0.05 mg mL⁻¹. La vitalità cellulare è stata valutata anche per la Rapamicina libera e per le nanoparticelle vuote. Tutte le dispersioni sono state sterilizzate mediante filtrazione utilizzando un filtro da 220 nm. Dopo 24 e 48 ore di incubazione, il surnatante è

stato rimosso e ciascuna piastra è stata lavata con DPBS sterile; successivamente, le cellule in ciascun pozzetto sono state incubate con 100 µL di DMEM fresco e 20 µL di una soluzione MTS e le piastre sono state incubate per 2 ore a 37 ° C. L'assorbanza a 490 nm è stata letta utilizzando un lettore di micropiastre (Multiskan Ex, Thermo Labsystems, Finlandia).

La vitalità cellulare relativa (percentuale) è stata espressa come (cellule trattate con Abs490 / cellule di controllo Abs490) × 100, sulla base di esperimenti condotti in triplicato. Le cellule incubate con il terreno sono state utilizzate come controllo negativo.

4.4.12 Produzione di microparticelle mediante strategia Nano in Micro (NiM)

Le formulazioni NiM sono state preparate utilizzando un Buchi Nano Spray Dryer B-90.25.

In dettaglio, il processo di spray drying è stato effettuato utilizzando come alimentazione liquida una dispersione acquosa contenente nanoparticelle (0.75 mg mL⁻¹) e mannitolo (1 g 100 mL⁻¹) (nanoparticelle / mannitolo 1: 13 rapporto in peso).

Prima dell'uso, ciascuna dispersione è stata filtrata usando un filtro da 1.2 µm e successivamente è stata atomizzata mantenendo le condizioni operative dello strumento costanti (T:100 ° C; flusso:120 L/min; pressione:28 hPa; pompa:66%; spray:78%). Come gas essiccante è stata utilizzata aria filtrata e deumidificata.

Ogni campione NiM raccolto è stato adeguatamente conservato a -20 ° C prima delle analisi. La quantità di farmaco caricata in ciascun campione è stata determinata mediante HPLC, usando le condizioni descritte in precedenza per la determinazione della drug loading.

4.4.13 Caratterizzazione delle microparticelle NiM mediante microscopio elettronico a scansione (SEM) e microscopio ottico (OM)

Per l'analisi al microscopio elettronico a scansione, il campione è stato posizionato su un nastro biadesivo, precedentemente applicato su un supporto di acciaio inossidabile, che è stato quindi rivestito con oro prima dell'esame al microscopio e quindi osservato utilizzando un microscopio a scansione elettronico Desktop SEM Phenom PRO X PHENOM.

L'analisi OM è stata condotta registrando immagini di trasmittanza del campione disperso in olio di paraffina con un microscopio ottico ZEISS, utilizzando il software AxioVision.

Il programma ImageJ è stato utilizzato per calcolare il diametro medio di ciascun campione da immagini SEM o OM analizzando un numero sufficientemente rappresentativo (> 500 particelle).

4.4.14 Cinetiche di rilascio

Una quantità nota di microparticelle (corrispondenti a 0.09 mg di Rapamicina) è stata dispersa in 1 ml di DPBS filtrato. La dispersione ottenuta è stata posta in una dialisi (MWCO di 12-14 kDa), posta a scambiare contro 30 ml di DPBS o una miscela DPBS: FBS (90:10 v / v). Per determinare la curva di dissoluzione attraverso la membrana del Rapamicina, una dispersione di farmaco (0.09 mg) è stata inserita in una dialisi e incubata nelle stesse condizioni.

A tempi predeterminati, 3 ml del mezzo esterno sono stati rimossi e sostituiti con le stesse aliquote di mezzo fresco. Ciascun campione è stato congelato, liofilizzato, trattato con 1.5 ml di metanolo e centrifugato. Infine, il surnatante è stato filtrato con filtri di acetato di cellulosa da 0.2 μm e analizzato mediante analisi HPLC, usando le condizioni descritte in precedenza per la determinazione della drug loading. Anche il contenuto all'interno della dialisi è stato liofilizzato e successivamente analizzato per l'analisi HPLC trattando il solido recuperato con 400 μl di DMA e poi 9.6 ml di metanolo.

4.4.15 Analisi turbidimetrica

Le possibili interazioni tra nanoparticelle e mucina sono state determinate mediante turbidimetria. 190 μl di ciascuna dispersione di campione in PBS (preparata in modo da avere una concentrazione in nanoparticelle pari a 1 mg mL^{-1}), sono stati miscelati con 10 μl di dispersione di mucina alla concentrazione di 20 mg mL^{-1} in PBS. Sono state analizzate sia nanoparticelle peghilate che nanoparticelle non peghilate, e chitosano come controllo positivo. Dopo l'incubazione a 37 ° C, la torbidità è stata misurata ogni 50 min fino a 6 h. L'assorbanza alla λ di 650 nm è stata registrata dal lettore di micropiastre (Multiskan Ex, Thermo Labsystems, Finlandia). I dati sono stati espressi come rapporto percentuale tra la trasmittanza del campione e la trasmittanza della dispersione di mucina 1 mg mL^{-1} .

4.4.16 Analisi reologica

Le possibili interazioni tra nanoparticelle e mucina sono state determinate anche mediante analisi reologica alla temperatura di 37 ° C utilizzando un reometro rotazionale (TA Instruments) dotato di geometria dei cilindri concentrici. Un'analisi strain sweep (5-30%) è stata eseguita sulla dispersione della mucina a 1,0 Hz per determinare la regione viscoelastica lineare, che è stata trovata nell'intervallo del 10-20%. Quindi, è stata eseguita un'analisi time sweep (30 min) per tutti i campioni con una deformazione costante del 15% e una frequenza

costante di 1.0 Hz per determinare la viscosità complessa (η^*). Per le analisi della miscela mucina-nanoparticelle, una certa quantità di campione microparticellare (corrispondente a 14 mg di nanoparticelle) è stata aggiunta a 14 ml di dispersione di mucina in PBS (1 mg mL^{-1}) e miscelata delicatamente con una spatola per 20 s. I campioni sono stati caricati nel reometro e quindi equilibrati a 37°C per 20 min. Per prevenire la disidratazione durante le misure reologiche, è stata posizionata una trappola per solventi sulla parte superiore della geometria.

4.4.17 Test di mucopenetrazione

La capacità di penetrazione del muco nanoparticelle è stata valutata utilizzando un test di penetrazione, facendo riferimento ad una procedura riportata in letteratura[230], con gli opportuni accorgimenti. 60 mg di agarosio sono stati dispersi in 20 mL di acqua distillata e la dispersione è stata riscaldata fino ad ottenimento di una soluzione limpida. 1.3 mL di questa soluzione sono stati depositati in diversi vials da 4 mL, lasciati indurire a temperatura ambiente e conservati a 4°C fino all'utilizzo. Successivamente, 2 mL di dispersione di mucina (1 mg mL^{-1} in PBS) sono stati posti sul gel di agarosio indurito e 600 μL di una dispersione di nanoparticelle (peghilate e non) in acqua (5 mg mL^{-1}) sono stati posti sullo strato di mucina e incubati a 37°C . A intervalli di tempo regolari (2, 4, 6 e 24 h), lo strato di mucina contenente le nanoparticelle è stato prelevato; i geli di agarosio rimanenti sono stati risciacquati tre volte con 2 mL di acqua distillata, sciolti a 60°C ed analizzati mediante spettrofotometria UV, alla λ di 561 nm.

4.4.18 Comportamento aerodinamico delle NiM

Le proprietà di aerosolizzazione di NiM@NpPEG (Rapa), contenenti nanoparticelle caricate con farmaco, sono state testate dopo l'erogazione da DPI riutilizzabili attivati dal respiro, contenenti la polvere secca racchiusa in una capsula singola, utilizzando un Next Generation Impactor (NGI) (Copley Scientific, UK) secondo Ph. Eur.10 ° Ed. Sono stati testati due dispositivi con diverse resistenze al flusso d'aria: il DPI RS01 a bassa resistenza (Plastiape, Italia) e il DPI Turbospin® a media resistenza (PH&T Pharma, Italia). Per ogni test, una capsula di gelatina dura (misura 2, Capsugel, USA) è stata riempita con quantità note di polvere (circa 20 mg) e posta nel DPI. L' NGI è stato attivato a 60 o 90 L min^{-1} .

La polvere depositata sulle sette coppe di raccolta NGI, nella camera di induzione e nel collettore del micro-orifizio (MOC) è stata recuperata quantitativamente mediante dissoluzione in una quantità appropriata di DMF. La quantità di NiM nei campioni è stata determinata

mediante analisi spettrofluorimetrica a $\lambda_{\text{ex}}=520$ nm, utilizzando una curva di calibrazione di NiM (2.5 mg mL^{-1}) in DMF (intervallo di concentrazione $0.0125\text{-}1.25 \text{ mg / mL}$, $R^2 \geq 0.99$).

Il diametro aerodinamico mediano di massa sperimentale (MMAD_{exp}) è stato calcolato secondo Ph.Eur. derivando un grafico della massa cumulativa di polvere depositata in ciascuna coppa di raccolta rispetto al diametro di taglio del rispettivo stadio. La frazione di particelle fini (FPF) è stata calcolata considerando la quantità effettiva di NiM depositati su stadi con MMAD $<5 \text{ }\mu\text{m}$ rispetto alla quantità iniziale caricata nel DPI (dose nominale di NiM). La frazione respirabile (RF) è stata definita come la percentuale di NiM depositati su stadi con MMAD $<5 \text{ }\mu\text{m}$ rispetto alla dose totale di NiM depositati nell'NGL.

Ringraziamenti

Gli esperimenti di Cromatografia ad Esclusione Dimensionale, di Microscopia a Scansione Elettronica e di Spettroscopia Fotoelettronica a raggi X sono stati effettuati con il supporto delle strumentazioni del Laboratorio di Preparazione ed Analisi dei Biomateriali e del Laboratorio Superfici, Film Sottili e Dispositivi dell'*Advanced Technologies Network Center* (ATeN Center) dell'università degli studi di Palermo.

5. Bibliografia

- [1] “Global Initiative for Asthma - GINA.” .
- [2] L. Annunziato and G. . Di Renzo, “Farmaci attivi sull’apparato respiratorio, Sezione XI,” in *Trattato di Farmacologia*, IDELSON-GNOCCHI, pp. 1038–1060.
- [3] Robbins and Cotran, “Obstructive Lung Disease,” in *Pathologic Basis of Disease*, pp. 679–682.
- [4] S. E. Weinberger, B. A. Cockrill, and J. Mandel, “Asthma,” in *Principles of Pulmonary Medicine*, Elsevier, 2014, pp. 74–90.
- [5] F. L. M. Ricciardolo, P. J. Sterk, B. Gaston, and G. Folkerts, “Nitric oxide in health and disease of the respiratory system,” *Physiological Reviews*, vol. 84, no. 3. American Physiological Society, pp. 731–765, Jul-2004.
- [6] “Malattie respiratorie croniche: Asma Bronchiale | Blog AbanoMed.” [Online]. Available: <https://www.abanomed.it/malattie-respiratorie-croniche-asma-bronchiale/>. [Accessed: 17-Apr-2021].
- [7] P. T. Macklem, “The physiology of small airways,” *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 157, no. 5 II SUPPL. American Thoracic Society, pp. 181–183, 14-Dec-1998.
- [8] J. E. Gern and W. W. Busse, “Relationship of viral infections to wheezing illnesses and asthma,” *Nature Reviews Immunology*, vol. 2, no. 2. European Association for Cardio-Thoracic Surgery, pp. 132–138, 2002.
- [9] P. K. Jeffery, “Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease.,” *American journal of respiratory and critical care medicine*, vol. 164, no. 10 Pt 2. Am J Respir Crit Care Med, 2001.
- [10] J. V. Fahy, “Type 2 inflammation in asthma-present in most, absent in many,” *Nature Reviews Immunology*, vol. 15, no. 1. Nature Publishing Group, pp. 57–65, 01-Jan-2015.
- [11] S. E. Wenzel, “Asthma phenotypes: The evolution from clinical to molecular approaches,” *Nature Medicine*, vol. 18, no. 5. Nat Med, pp. 716–725, May-2012.
- [12] K. F. Chung, “Asthma phenotyping: A necessity for improved therapeutic precision and new targeted therapies,” *Journal of Internal Medicine*, vol. 279, no. 2. Blackwell Publishing Ltd, pp. 192–204, 01-Feb-2016.
- [13] M. Saetta and G. Turato, “Airway pathology in asthma,” *Eur. Respir. J.*, vol. 18, no. 1, pp. 18–23, Jul. 2001.
- [14] A. B. Kay, “The role of eosinophils in the pathogenesis of asthma,” *Trends in Molecular Medicine*, vol. 11, no. 4. Elsevier Ltd, pp. 148–152, 01-Apr-2005.
- [15] M. Kraft, R. J. Martin, S. Wilson, R. Djukanovic, and S. T. Holgate, “Lymphocyte and eosinophil influx into alveolar tissue m nocturnal asthma,” *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 159, no. 1, pp. 228–234, Jan. 1999.
- [16] C. von Garnier *et al.*, “Anatomical Location Determines the Distribution and Function of Dendritic Cells and Other APCs in the Respiratory Tract,” *J. Immunol.*, vol. 175, no. 3, pp. 1609–1618, Aug. 2005.
- [17] H. Hammad and B. N. Lambrecht, “Recent progress in the biology of airway dendritic cells and implications for understanding the regulation of asthmatic inflammation,” *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 118, no. 2. Elsevier, pp. 331–336, 01-Aug-2006.
- [18] R. J. Riese and H. A. Chapman, “Cathepsins and compartmentalization in antigen presentation,” *Current Opinion in Immunology*, vol. 12, no. 1. Elsevier Current Trends, pp. 107–113, 01-Feb-2000.

- [19] J. Y. Humrich *et al.*, "Mature monocyte-derived dendritic cells respond more strongly to CCL19 than to CXCL12: consequences for directional migration," *Immunology*, vol. 117, no. 2, pp. 238–247, Feb. 2006.
- [20] J. E. Pease and T. J. Williams, "Chemokines and their receptors in allergic disease," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 118, no. 2. Elsevier, pp. 305–318, 01-Aug-2006.
- [21] J. J. Smit and N. W. Lukacs, "A closer look at chemokines and their role in asthmatic responses," *European Journal of Pharmacology*, vol. 533, no. 1–3. Elsevier, pp. 277–288, 08-Mar-2006.
- [22] G. Garcia, V. Godot, and M. Humbert, "New chemokine targets for asthma therapy," *Current Allergy and Asthma Reports*, vol. 5, no. 2. Current Science Ltd, pp. 155–160, 2005.
- [23] T. Kallinich *et al.*, "Chemokine-receptor expression on T cells in lung compartments of challenged asthmatic patients," *Clin. Exp. Allergy*, vol. 35, no. 1, pp. 26–33, Jan. 2005.
- [24] S. Ying *et al.*, "Expression of IL-4 and IL-5 mRNA and protein product by CD4⁺ and CD8⁺ T cells, eosinophils, and mast cells in bronchial biopsies obtained from atopic and nonatopic (intrinsic) asthmatics," *J. Immunol.*, vol. 158, no. 7, 1997.
- [25] A. B. Kay, "The role of T lymphocytes in asthma," *Chemical Immunology and Allergy*, vol. 91. S. Karger AG, pp. 59–75, 2006.
- [26] H. J. Ryu *et al.*, "Gene-based single nucleotide polymorphisms and linkage disequilibrium patterns of 29 asthma candidate genes in the chromosome 5q31-33 region in Koreans," *Int. Arch. Allergy Immunol.*, vol. 139, no. 3, pp. 209–216, Mar. 2006.
- [27] N. C. Gunawardana and S. R. Durham, "New approaches to allergen immunotherapy," *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, vol. 121, no. 3. American College of Allergy, Asthma and Immunology, pp. 293–305, 01-Sep-2018.
- [28] Y. Ogawa and W. J. Calhoun, "The role of leukotrienes in airway inflammation," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 118, no. 4. Elsevier, pp. 789–798, 01-Oct-2006.
- [29] P. Bradding, Y. Okayama, P. H. Howarth, M. K. Church, and S. T. Holgate, "Heterogeneity of human mast cells based on cytokine content," *J. Immunol.*, vol. 155, no. 1, 1995.
- [30] S. J. Wilson, J. K. Shute, S. T. Holgate, P. H. Howarth, and P. Bradding, "Localization of interleukin (IL) -4 but not IL-5 to human mast cell secretory granules by immunoelectron microscopy," *Clin. Exp. Allergy*, vol. 30, no. 4, pp. 493–500, 2000.
- [31] Y. Okayama, C. Tkaczyk, D. D. Metcalfe, and A. M. Gilfillan, "Comparison of FcεRI- and FcγRI-mediated degranulation and TNF-α synthesis in human mast cells: selective utilization of phosphatidylinositol-3-kinase for FcγRI-induced degranulation," *Eur. J. Immunol.*, vol. 33, no. 5, pp. 1450–1459, May 2003.
- [32] T. J. Williams and P. J. Jose, "Role of eotaxin and related CC chemokines in allergy and asthma," *Chemical Immunology*, vol. 78. S. Karger AG, pp. 166–177, 2000.
- [33] A. M. Sun Ying, Qiu Meng, Kyriaki Zeibecoglou, Douglas S. Robinson and A. B. K. Marc Humbert, "Eosinophil Chemotactic Chemokines (Eotaxin, Eotaxin-2, RANTES, Monocyte Chemoattractant Protein-3 (MCP-3), and MCP-4), and C-C Chemokine Receptor 3 Expression in Bronchial Biopsies from Atopic and Nonatopic (Intrinsic) Asthmatics," *J Immunol*, vol. 163, pp. 6321–6329, 1999.
- [34] M. E. Strek, "Difficult asthma," *Proceedings of the American Thoracic Society*, vol. 3, no. 1. pp. 116–123, 01-Mar-2006.
- [35] J. Beale *et al.*, "Rhinovirus-induced IL-25 in asthma exacerbation drives type 2 immunity and allergic pulmonary inflammation," *Sci. Transl. Med.*, vol. 6, no. 256, pp. 256ra134-256ra134, Oct. 2014.

- [36] C. M. Lloyd, "IL-33 family members and asthma - bridging innate and adaptive immune responses," *Current Opinion in Immunology*, vol. 22, no. 6. Elsevier Current Trends, pp. 800–806, 01-Dec-2010.
- [37] Mms. Michael E. Wechsler, MD and F. Amit D. Parulekar, MD, MS, "Severe Asthma Reference Guide Phenotypes, Endotypes, Biomarkers, and Treatment A CME/CE-certified supplement to CHEST ® Physician 2 / SEVERE ASTHMA REFERENCE GUIDE: PHENOTYPES, ENDOTYPES, BIOMARKERS, AND TREATMENT Severe Asthma Reference Guide," p. 16, 2018.
- [38] P. L. Paggiaro, "Guida Pocket Per La Gestione E La Prevenzione Dell'Asma 2019," 2019th ed., M. Medico, Ed. 2019.
- [39] P. J. Barnes, "How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture 2005," *British Journal of Pharmacology*, vol. 148, no. 3. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 245–254, 01-Jun-2006.
- [40] P. Chanez, A. Bourdin, I. Vachier, P. Godard, J. Bousquet, and A. M. Vignola, "Effects of inhaled corticosteroids on pathology in asthma and chronic obstructive pulmonary disease.," *Proceedings of the American Thoracic Society*, vol. 1, no. 3. pp. 184–190, 01-Nov-2004.
- [41] B. N. Feltis, D. Wignarajah, D. W. Reid, C. Ward, R. Harding, and E. H. Walters, "Effects of inhaled fluticasone on angiogenesis and vascular endothelial growth factor in asthma," *Thorax*, vol. 62, no. 4, pp. 314–319, Apr. 2007.
- [42] M. J. Abramson, J. Walters, and E. H. Walters, "Adverse effects of β -agonists: Are they clinically relevant?," *American Journal of Respiratory Medicine*, vol. 2, no. 4. Adis International Ltd, pp. 287–297, 20-Aug-2003.
- [43] W. R. Henderson, E. R. Banerjee, and E. Y. Chi, "Differential effects of (S)- and (R)-enantiomers of albuterol in a mouse asthma model," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 116, no. 2, pp. 332–340, Aug. 2005.
- [44] M. Kato, K. Komamura, and M. Kitakaze, "Tiotropium, a Novel Muscarinic M3 Receptor Antagonist, Improved Symptoms of Chronic Obstructive Pulmonary Disease Complicated by Chronic Heart Failure," *Circ. J.*, vol. 70, no. 12, pp. 1658–1660, 2006.
- [45] G. J. Rodrigo and J. A. Castro-Rodriguez, "Anticholinergics in the treatment of children and adults with acute asthma: A systematic review with meta-analysis," *Thorax*, vol. 60, no. 9. BMJ Publishing Group, pp. 740–746, 01-Sep-2005.
- [46] R. Dahl, "Systemic side effects of inhaled corticosteroids in patients with asthma," *Respiratory Medicine*, vol. 100, no. 8. Elsevier, pp. 1307–1317, 01-Aug-2006.
- [47] E. Israel, T. R. Banerjee, G. M. Fitzmaurice, T. V. Kotlov, K. LaHive, and M. S. LeBoff, "Effects of Inhaled Glucocorticoids on Bone Density in Premenopausal Women," *N. Engl. J. Med.*, vol. 345, no. 13, pp. 941–947, Sep. 2001.
- [48] H. K. Reddel *et al.*, "A summary of the new GINA strategy: A roadmap to asthma control," *European Respiratory Journal*, vol. 46, no. 3. European Respiratory Society, pp. 622–639, 01-Sep-2015.
- [49] Kenneth G Saag, Daniel E Furst, and Peter J Barnes., "Major side effects of inhaled glucocorticoids - UpToDate." [Online]. Available: <https://www.uptodate.com/contents/major-side-effects-of-inhaled-glucocorticoids>. [Accessed: 01-Nov-2020].
- [50] K. F. Chung *et al.*, "International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma," *Eur. Respir. J.*, vol. 43, no. 2, pp. 343–373, Feb. 2014.
- [51] I. M. E. Beck, W. Vanden Berghe, L. Vermeulen, K. R. Yamamoto, G. Haegeman, and K. De Bosscher, "Crosstalk in inflammation: The interplay of glucocorticoid receptor-based mechanisms and kinases and phosphatases," *Endocrine Reviews*, vol. 30, no. 7. Oxford Academic, pp. 830–882, 01-Dec-2009.

- [52] I. Sulaiman, J. C. W. Lim, H. L. Soo, and J. Stanslas, "Molecularly targeted therapies for asthma: Current development, challenges and potential clinical translation," *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*, vol. 40. Academic Press, pp. 52–68, 01-Oct-2016.
- [53] A. K. Ali and A. G. Hartzema, "Assessing the association between omalizumab and arteriothrombotic events through spontaneous adverse event reporting," *J. Asthma Allergy*, vol. 5, pp. 1–9, 2012.
- [54] M. M. Del Giudice *et al.*, "Leukotriene modifiers in the treatment of asthma in children," *Therapeutic Advances in Respiratory Disease*, vol. 3, no. 5. SAGE PublicationsSage UK: London, England, pp. 245–251, 12-Oct-2009.
- [55] C. H. Fanta, "Drug therapy: Asthma," *N. Engl. J. Med.*, vol. 360, no. 10, pp. 1002–1014, Mar. 2009.
- [56] B. J. O'Connor, C. G. Löfdahl, M. Balter, A. Szczeklik, L. P. Boulet, and C. B. Cairns, "Zileuton added to low-dose inhaled beclomethasone for the treatment of moderate to severe persistent asthma," *Respir. Med.*, vol. 101, no. 6, pp. 1088–1096, Jun. 2007.
- [57] M. Aulton and K. Taylor, *Pharmaceutics The Design and Manufacture of Medicines*, 5th ed., vol. 53, no. 9. 2018.
- [58] Patrick Sinko, *MARTIN'S PHYSICAL PHARMACY AND PHARMACEUTICAL SCIENCES*, 6th ed., vol. 110, no. 9. 2006.
- [59] "Anatomia dell'apparato respiratorio," in *La respirazione artificiale*, Springer Milan, 2007, pp. 1–18.
- [60] J. F. Tomashefski and C. F. Farver, "Anatomy and histology of the lung," in *Dail and Hammar's Pulmonary Pathology*, vol. 1, Springer New York, 2008, pp. 20–48.
- [61] "Apparato respiratorio: anatomia in sintesi, struttura e funzioni | MEDICINA ONLINE." [Online]. Available: <https://medicinaonline.co/2016/12/23/apparato-respiratorio-anatomia-in-sintesi-funzioni/>. [Accessed: 17-Apr-2021].
- [62] A. Mottais *et al.*, "Enhancement of lung gene delivery after aerosol: A new strategy using non-viral complexes with antibacterial properties," *Bioscience Reports*, vol. 37, no. 6. Portland Press Ltd, 22-Dec-2017.
- [63] R. Bansil and B. S. Turner, "The biology of mucus: Composition, synthesis and organization," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 124. Elsevier B.V., pp. 3–15, 15-Jan-2018.
- [64] A. Fernández Tena and P. Casan Clarà, "Deposition of Inhaled Particles in the Lungs," *Archivos de Bronconeumologia*, vol. 48, no. 7. Elsevier BV, pp. 240–246, 01-Jul-2012.
- [65] C. Loira-Pastoriza, J. Todoroff, and R. Vanbever, "Delivery strategies for sustained drug release in the lungs," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 75. Elsevier, pp. 81–91, 30-Aug-2014.
- [66] J. Zhang, L. Wu, H. K. Chan, and W. Watanabe, "Formation, characterization, and fate of inhaled drug nanoparticles," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 63, no. 6. Elsevier, pp. 441–455, 30-May-2011.
- [67] M. Ibrahim, R. Verma, and L. Garcia-Contreras, "Inhalation drug delivery devices: Technology update," *Medical Devices: Evidence and Research*, vol. 8. Dove Medical Press Ltd, pp. 131–139, 12-Feb-2015.
- [68] B. K. Rubin and R. W. Williams, "Emerging aerosol drug delivery strategies: From bench to clinic," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 75. Elsevier, pp. 141–148, 30-Aug-2014.
- [69] B. L. Laube *et al.*, "What the pulmonary specialist should know about the new inhalation therapies," *European Respiratory Journal*, vol. 37, no. 6. Eur Respir J, pp. 1308–1331, 01-Jun-2011.
- [70] S. W. Stein, P. Sheth, P. D. Hodson, and P. B. Myrdal, "Advances in metered dose inhaler technology: Hardware development," *AAPS PharmSciTech*, vol. 15, no. 2. Springer New York LLC, pp. 326–338, 20-Dec-2014.

- [71] S. P. Newman, "Principles of Metered-Dose Inhaler Design," *Respir. Care*, vol. 50, no. 9, 2005.
- [72] H. D. C. Smyth, "The influence of formulation variables on the performance of alternative propellant-driven metered dose inhalers," in *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2003, vol. 55, no. 7, pp. 807–828.
- [73] N. Islam and E. Gladki, "Dry powder inhalers (DPIs)-A review of device reliability and innovation," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 360, no. 1–2. Elsevier, pp. 1–11, 06-Aug-2008.
- [74] Y. Komase, A. Asako, A. Kobayashi, and R. Sharma, "Ease-of-use preference for the ELLIPTA® dry powder inhaler over a commonly used single-dose capsule dry powder inhaler by inhalation device-naïve Japanese volunteers aged 40 years or older," *Int. J. COPD*, vol. 9, pp. 1365–1375, Dec. 2014.
- [75] P. J. Atkins, "Dry Powder Inhalers: An Overview," *Respir. Care*, vol. 50, no. 10, 2005.
- [76] L. Baginski, G. Tachon, F. Falson, J. S. Patton, U. Bakowsky, and C. Ehrhardt, "Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Analysis of Proteolytic Enzymes in Cultures of Human Respiratory Epithelial Cells," *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.*, vol. 24, no. 2, pp. 89–101, Apr. 2011.
- [77] J. Todoroff and R. Vanbever, "Fate of nanomedicines in the lungs," *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, vol. 16, no. 3. Elsevier, pp. 246–254, 01-Jun-2011.
- [78] I. Roy and N. Vij, "Nanodelivery in airway diseases: Challenges and therapeutic applications," *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, vol. 6, no. 2. Elsevier, pp. 237–244, 01-Apr-2010.
- [79] B. D. Kurmi, J. Kayat, V. Gajbhiye, R. K. Tekade, and N. K. Jain, "Micro- and nanocarrier-mediated lung targeting," *Expert Opinion on Drug Delivery*, vol. 7, no. 7. Informa Healthcare, pp. 781–794, 2010.
- [80] E. Rytting *et al.*, "In vitro and in vivo performance of biocompatible negatively-charged salbutamol-loaded nanoparticles," *J. Control. Release*, vol. 141, no. 1, pp. 101–107, Jan. 2010.
- [81] W. H. Roa, S. Azarmi, M. H. D. K. Al-Hallak, W. H. Finlay, A. M. Magliocco, and R. Löbenberg, "Inhalable nanoparticles, a non-invasive approach to treat lung cancer in a mouse model," *J. Control. Release*, vol. 150, no. 1, pp. 49–55, Feb. 2011.
- [82] A. H. L. Chow, H. H. Y. Tong, P. Chattopadhyay, and B. Y. Shekunov, "Particle engineering for pulmonary drug delivery," *Pharmaceutical Research*, vol. 24, no. 3. pp. 411–437, Mar-2007.
- [83] G. Bonacucina, M. Cespi, M. Misici-Falzi, and G. F. Palmieri, "Colloidal soft matter as drug delivery system," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 98, no. 1. John Wiley and Sons Inc., pp. 1–42, Jan-2009.
- [84] M. Beck-Broichsitter, M. Rieger, R. Reul, T. Gessler, W. Seeger, and T. Schmehl, "Correlation of drug release with pulmonary drug absorption profiles for nebulizable liposomal formulations," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 84, no. 1, pp. 106–114, May 2013.
- [85] M. Beck-Broichsitter, O. M. Merkel, and T. Kissel, "Controlled pulmonary drug and gene delivery using polymeric nano-carriers," *Journal of Controlled Release*, vol. 161, no. 2. Elsevier, pp. 214–224, 20-Jul-2012.
- [86] S. Fredenberg, M. Wahlgren, M. Reslow, and A. Axelsson, "The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems - A review," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 415, no. 1–2. Elsevier, pp. 34–52, 30-Aug-2011.
- [87] T. Lebhardt, S. Roesler, M. Beck-Broichsitter, and T. Kissel, "Polymeric nanocarriers for drug delivery to the lung," *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, vol. 20, no. 3. Editions de Sante, pp. 171–180, 01-Jan-2010.
- [88] E. Rytting, J. Nguyen, X. Wang, and T. Kissel, "Biodegradable polymeric nanocarriers for pulmonary

- drug delivery,” *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 5, no. 6, pp. 629–639, Jun. 2008.
- [89] G. Pilcer and K. Amighi, “Formulation strategy and use of excipients in pulmonary drug delivery,” *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 392, no. 1–2, Elsevier, pp. 1–19, 15-Jun-2010.
- [90] L. A. Dailey *et al.*, “Investigation of the proinflammatory potential of biodegradable nanoparticle drug delivery systems in the lung,” *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 215, no. 1, pp. 100–108, Aug. 2006.
- [91] R. H. Müller, S. Gohla, and C. M. Keck, “State of the art of nanocrystals - Special features, production, nanotoxicology aspects and intracellular delivery,” *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 78, no. 1, Elsevier, pp. 1–9, 01-May-2011.
- [92] A. Mahapatro and D. K. Singh, “Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines,” *Journal of nanobiotechnology*, vol. 9, no. 1, BioMed Central, p. 55, 28-Nov-2011.
- [93] I. Bala, S. Hariharan, and M. N. V. R. Kumar, “PLGA nanoparticles in drug delivery: The state of the art,” *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, vol. 21, no. 5, Begel House Inc., pp. 387–422, 2004.
- [94] C. E. Astete and C. M. Sabliov, “Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles,” *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, vol. 17, no. 3, VSP BV, pp. 247–289, 2006.
- [95] L. A. Dailey and T. Kissel, “New poly(lactic-co-glycolic acid) derivatives: Modular polymers with tailored properties,” *Drug Discovery Today: Technologies*, vol. 2, no. 1, Elsevier Ltd, pp. 7–13, 2005.
- [96] L. A. Dailey, M. Wittmar, and T. Kissel, “The role of branched polyesters and their modifications in the development of modern drug delivery vehicles,” in *Journal of Controlled Release*, 2005, vol. 101, no. 1-3 SPEC. ISS., pp. 137–149.
- [97] F. Ungaro *et al.*, “Dry powders based on PLGA nanoparticles for pulmonary delivery of antibiotics: Modulation of encapsulation efficiency, release rate and lung deposition pattern by hydrophilic polymers,” *J. Control. Release*, vol. 157, no. 1, pp. 149–159, Jan. 2012.
- [98] V. F. Fiore *et al.*, “Polyketal microparticles for therapeutic delivery to the lung,” *Biomaterials*, vol. 31, no. 5, pp. 810–817, Feb. 2010.
- [99] J. Nguyen *et al.*, “Nanocomposites of lung surfactant and biodegradable cationic nanoparticles improve transfection efficiency to lung cells,” *J. Control. Release*, vol. 140, no. 1, pp. 47–54, Nov. 2009.
- [100] B. Porsio *et al.*, “Inhalable nano into micro dry powders for ivacaftor delivery: The role of mannitol and cysteamine as mucus-active agents,” *Int. J. Pharm.*, vol. 582, p. 119304, May 2020.
- [101] Y. He, Y. Liang, R. Han, W. L. Lu, J. C. W. Mak, and Y. Zheng, “Rational particle design to overcome pulmonary barriers for obstructive lung diseases therapy,” *Journal of Controlled Release*, vol. 314, Elsevier B.V., pp. 48–61, 28-Nov-2019.
- [102] C. C. Ruge, J. Kirch, and C. M. Lehr, “Pulmonary drug delivery: From generating aerosols to overcoming biological barriers-therapeutic possibilities and technological challenges,” *The Lancet Respiratory Medicine*, vol. 1, no. 5, Lancet Publishing Group, pp. 402–413, Jul-2013.
- [103] M. García-Díaz, D. Birch, F. Wan, and H. M. Nielsen, “The role of mucus as an invisible cloak to transepithelial drug delivery by nanoparticles,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 124, Elsevier B.V., pp. 107–124, 15-Jan-2018.
- [104] G. Lamblin *et al.*, “Human airway mucin glycosylation: a combinatorial of carbohydrate determinants which vary in cystic fibrosis,” *Glycoconj J*, vol. 18, pp. 661–684, 2001.
- [105] R. Shogren, T. A. Gerken, and N. Jentoft, “Role of Glycosylation on the Conformation and Chain

- Dimensions of O-Linked Glycoproteins: Light-Scattering Studies of Ovine Submaxillary Mucin,” *Biochemistry*, vol. 28, no. 13, pp. 5525–5536, Jun. 1989.
- [106] M. Rose and J. Voynow, “Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease,” *Physiol Rev*, vol. 86, pp. 245–278, 2006.
- [107] R. A. Cone, “Barrier properties of mucus,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 61, no. 2. Elsevier, pp. 75–85, 27-Feb-2009.
- [108] O. W. Williams, A. Sharafkhaneh, V. Kim, B. F. Dickey, and C. M. Evans, “Airway Mucus From Production to Secretion.”
- [109] L. M. Kuyper *et al.*, “Characterization of airway plugging in fatal asthma,” *Am. J. Med.*, vol. 115, no. 1, pp. 6–11, Jul. 2003.
- [110] J. V. Fahy, “Goblet cell and mucin gene abnormalities in asthma,” in *Chest*, 2002, vol. 122, no. 6 SUPPL., pp. 320S–326S.
- [111] C. L. Ordoñez *et al.*, “Mild and moderate asthma is associated with airway goblet cell hyperplasia and abnormalities in mucin gene expression,” *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 163, no. 2, pp. 517–523, 2001.
- [112] L. Bonser and D. Erle, “Airway Mucus and Asthma: The Role of MUC5AC and MUC5B,” *J. Clin. Med.*, vol. 6, no. 12, p. 112, Nov. 2017.
- [113] D. A. Groneberg *et al.*, “Expression of respiratory mucins in fatal status asthmaticus and mild asthma,” *Histopathology*, vol. 40, no. 4, pp. 367–373, 2002.
- [114] S. Kirkham, J. K. Sheehan, D. Knight, P. S. Richardson, and D. J. Thornton, “Heterogeneity of airways mucus: Variations in the amounts and glycoforms of the major oligomeric mucins MUC5AC and MUC5B,” *Biochem. J.*, vol. 361, no. 3, pp. 537–546, Feb. 2002.
- [115] B. S. Schuster, J. S. Suk, G. F. Woodworth, and J. Hanes, “Nanoparticle diffusion in respiratory mucus from humans without lung disease,” *Biomaterials*, vol. 34, no. 13, pp. 3439–3446, Apr. 2013.
- [116] J. A. Whitsett, “PERSPECTIVE SERIES Innate defenses in the lung,” *J. Clin. Invest.*, vol. 109, p. 571, 2002.
- [117] S. Bhattacharjee *et al.*, “Nanoparticle passage through porcine jejunal mucus: Microfluidics and rheology,” *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 13, no. 3, pp. 863–873, Apr. 2017.
- [118] S. K. Lai, Y. Y. Wang, D. Wirtz, and J. Hanes, “Micro- and macrorheology of mucus,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 61, no. 2. Elsevier, pp. 86–100, 27-Feb-2009.
- [119] S. Girod, J. M. Zahm, C. Plotkowski, G. Beck, and E. Puchelle, “Role of the physicochemical properties of mucus in the protection of the respiratory epithelium,” *Eur. Respir. J.*, vol. 5, no. 4, pp. 477–487, 1992.
- [120] J. G. Widdicombe, “Role of lipids in airway function,” *European Journal of Respiratory Diseases*, vol. 71, no. SUPPL. 153, pp. 197–204, 1987.
- [121] S. Lai, Y. Wang, D. Wirtz, and J. Hanes, “Micro- and macrorheology of mucus,” *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 61, pp. 86–100, 2009.
- [122] C. A. Steiner, M. Litt, and R. Nossal, “Effect of Ca^{++} on the structure and rheology of canine tracheal mucin,” *Biorheology*, vol. 21, no. 1–2, pp. 235–252, 1984.
- [123] R. S. Crowther, C. Marriott, and S. L. James, “Cation induced changes in the rheological properties of purified mucus glycoprotein gels,” *Biorheology*, vol. 21, no. 1–2, pp. 253–263, 1984.
- [124] B. D. E. Raynal, T. E. Hardingham, J. K. Sheehan, and D. J. Thornton, “Calcium-dependent protein interactions in MUC5B provide reversible cross-links in salivary mucus,” *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 31,

- pp. 28703–28710, Aug. 2003.
- [125] I. Carlstedt and J. K. Sheehan, “Macromolecular properties and polymeric structure of mucus glycoproteins,” *Ciba Found. Symp.*, vol. 109, pp. 157–172, 1984.
 - [126] F. A. Meyer and A. Silberberg, “The rheology and molecular organization of epithelial mucus,” in *Biorheology*, 1980, vol. 17, no. 1–2, pp. 163–168.
 - [127] C. Evans, K. Kim, M. Tuvim, and B. Dickey, “Mucus hypersecretion in asthma: causes and effects,” *Curr Opin Pulm Med*, vol. 15, pp. 4–11, 2009.
 - [128] D. Serisier, M. Carroll, J. Shute, and S. Young, “Macrorheology of cystic fibrosis, chronic obstructive pulmonary disease & normal sputum,” *Respir Res*, vol. 10, p. 63, 2009.
 - [129] J. Charman and L. Reid, “Sputum viscosity in chronic bronchitis, bronchiectasis, asthma and cystic fibrosis,” *Biorheology*, vol. 9, pp. 185–199, 1972.
 - [130] J. Suk *et al.*, “N-acetylcysteine enhances cystic fibrosis sputum penetration and airway gene transfer by highly compacted DNA nanoparticles,” *Mol Ther*, vol. 19, pp. 1981–1989, 2011.
 - [131] M. Dawson, D. Wirtz, and J. Hanes, “Enhanced Viscoelasticity of Human Cystic Fibrotic Sputum Correlates with Increasing Microheterogeneity in Particle Transport,” *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 50, pp. 50393–50401, Dec. 2003.
 - [132] S. S. Olmsted, J. L. Padgett, A. I. Yudin, K. J. Whaley, T. R. Moench, and R. A. Cone, “Diffusion of macromolecules and virus-like particles in human cervical mucus,” *Biophys. J.*, vol. 81, no. 4, pp. 1930–1937, 2001.
 - [133] W. M. Saltzman, M. L. Radomsky, K. J. Whaley, and R. A. Cone, “Antibody diffusion in human cervical mucus,” *Biophys. J.*, vol. 66, no. 2, pp. 508–515, 1994.
 - [134] S. K. Lai *et al.*, “Rapid transport of large polymeric nanoparticles in fresh undiluted human mucus,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 5, pp. 1482–1487, Jan. 2007.
 - [135] S. K. Lai, Y. Y. Wang, R. Cone, D. Wirtz, and J. Hanes, “Altering mucus rheology to ‘solidify’ human mucus at the nanoscale,” *PLoS One*, vol. 4, no. 1, Jan. 2009.
 - [136] S. Yuan *et al.*, “Oxidation increases mucin polymer cross-links to stiffen airway mucus gels,” *Sci Transl Med*, vol. 7, p. 276ra27, 2015.
 - [137] G. Duncan *et al.*, “Microstructural alterations of sputum in cystic fibrosis lung disease,” *JCI Insight*, 2016.
 - [138] N. Kim, G. A. Duncan, J. Hanes, and J. S. Suk, “Barriers to inhaled gene therapy of obstructive lung diseases: A review Graphical abstract HHS Public Access,” *J Control Release*, vol. 240, pp. 465–488, 2016.
 - [139] I. d’Angelo, C. Conte, M. I. La Rotonda, A. Miro, F. Quaglia, and F. Ungaro, “Improving the efficacy of inhaled drugs in cystic fibrosis: Challenges and emerging drug delivery strategies,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 75. Elsevier, pp. 92–111, 30-Aug-2014.
 - [140] S. T. Holgate, “The airway epithelium is central to the pathogenesis of asthma,” *Allergology International*, vol. 57, no. 1. Japanese Society of Allergology, pp. 1–10, 01-Jan-2008.
 - [141] C. C. Ruge, J. Kirch, and C. M. Lehr, “Pulmonary drug delivery: From generating aerosols to overcoming biological barriers-therapeutic possibilities and technological challenges,” *The Lancet Respiratory Medicine*, vol. 1, no. 5. Lancet Publishing Group, pp. 402–413, Jul-2013.
 - [142] Q. T. Zhou, S. S. Y. Leung, P. Tang, T. Parumasivam, Z. H. Loh, and H. K. Chan, “Inhaled formulations and pulmonary drug delivery systems for respiratory infections,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 85, pp. 83–99, 2015.

- [143] J. J. Neves *et al.*, “Interactions of Microbicide Nanoparticles with a Simulated Vaginal Fluid,” 2012.
- [144] F. Laffleur, F. Hintzen, G. Shahnaz, D. Rahmat, K. Leithner, and A. Bernkop-Schnürch, “Development and in vitro evaluation of slippery nanoparticles for enhanced diffusion through native mucus,” *Nanomedicine*, vol. 9, no. 3, pp. 387–396, Apr. 2014.
- [145] L. M. Ensign, R. Cone, and J. Hanes, “Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: The gastrointestinal mucus barriers,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 64, no. 6. Elsevier, pp. 557–570, 01-May-2012.
- [146] M. Boegh, M. García-Díaz, A. Müllertz, and H. M. Nielsen, “Steric and interactive barrier properties of intestinal mucus elucidated by particle diffusion and peptide permeation,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 95, pp. 136–143, Sep. 2015.
- [147] D. A. Norris and P. J. Sinko, “Effect of size, surface charge, and hydrophobicity on the translocation of polystyrene microspheres through gastrointestinal mucin,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 63, no. 11, pp. 1481–1492, Mar. 1997.
- [148] L. Wu, W. Shan, Z. Zhang, and Y. Huang, “Engineering nanomaterials to overcome the mucosal barrier by modulating surface properties,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 124. Elsevier B.V., pp. 150–163, 15-Jan-2018.
- [149] B. Porsio, E. F. Craparo, N. Mauro, G. Giammona, and G. Cavallaro, “Mucus and Cell-Penetrating Nanoparticles Embedded in Nano-into-Micro Formulations for Pulmonary Delivery of Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 10, no. 1, pp. 165–181, Jan. 2018.
- [150] M. Yang *et al.*, “Biodegradable nanoparticles composed entirely of safe materials that rapidly penetrate human mucus,” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 50, no. 11, pp. 2597–2600, Mar. 2011.
- [151] J. S. Suk *et al.*, “The penetration of fresh undiluted sputum expectorated by cystic fibrosis patients by non-adhesive polymer nanoparticles,” *Biomaterials*, vol. 30, no. 13, pp. 2591–2597, May 2009.
- [152] K. Yoncheva, S. Gómez, M. A. Campanero, C. Gamazo, and J. M. Irache, “Bioadhesive properties of pegylated nanoparticles,” *Expert Opinion on Drug Delivery*, vol. 2, no. 2. Taylor & Francis, pp. 205–218, Mar-2005.
- [153] N. d’Avanzo *et al.*, “Immunogenicity of Polyethylene Glycol Based Nanomedicines: Mechanisms, Clinical Implications and Systematic Approach,” *Advanced Therapeutics*, vol. 3, no. 3. Blackwell Publishing Ltd, 01-Mar-2020.
- [154] T. T. H. Thi, E. H. Pilkington, D. H. Nguyen, J. S. Lee, K. D. Park, and N. P. Truong, “The importance of Poly(ethylene glycol) alternatives for overcoming PEG immunogenicity in drug delivery and bioconjugation,” *Polymers*, vol. 12, no. 2. MDPI AG, 01-Feb-2020.
- [155] R. Hoogenboom, “Poly(2-oxazoline)s: A polymer class with numerous potential applications,” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 48, no. 43, pp. 7978–7994, Oct. 2009.
- [156] O. Sedlacek, B. D. Monnery, S. K. Filippov, R. Hoogenboom, and M. Hruby, “Poly(2-oxazoline)s - Are they more advantageous for biomedical applications than other polymers?,” *Macromol. Rapid Commun.*, vol. 33, no. 19, pp. 1648–1662, Oct. 2012.
- [157] T. X. Viegas *et al.*, “Polyoxazoline: Chemistry, properties, and applications in drug delivery,” *Bioconjug. Chem.*, vol. 22, no. 5, pp. 976–986, May 2011.
- [158] M. N. Macgregor-Ramiasa, A. A. Cavallaro, and K. Vasilev, “Properties and reactivity of polyoxazoline plasma polymer films,” *J. Mater. Chem. B*, vol. 3, no. 30, pp. 6327–6337, Aug. 2015.
- [159] E. D. H. Mansfield, K. Sillence, P. Hole, A. C. Williams, and V. V. Khutoryanskiy, “POZylation: a new

- approach to enhance nanoparticle diffusion through mucosal barriers,” *Nanoscale*, vol. 7, no. 32, pp. 13671–13679, Aug. 2015.
- [160] E. D. H. Mansfield *et al.*, “Side chain variations radically alter the diffusion of poly(2-alkyl-2-oxazoline) functionalised nanoparticles through a mucosal barrier,” *Biomater. Sci.*, vol. 4, no. 9, pp. 1318–1327, Sep. 2016.
- [161] E. A. Mun, A. C. Williams, and V. V. Khutoryanskiy, “Adhesion of thiolated silica nanoparticles to urinary bladder mucosa: Effects of PEGylation, thiol content and particle size,” *Int. J. Pharm.*, vol. 512, no. 1, pp. 32–38, Oct. 2016.
- [162] T. X. Viegas *et al.*, “Polyoxazoline: Chemistry, properties, and applications in drug delivery,” *Bioconjug. Chem.*, vol. 22, no. 5, pp. 976–986, May 2011.
- [163] F. C. Gaertner, R. Luxenhofer, B. Blechert, R. Jordan, and M. Essler, “Synthesis, biodistribution and excretion of radiolabeled poly(2-alkyl-2-oxazoline)s,” *J. Control. Release*, vol. 119, no. 3, pp. 291–300, Jun. 2007.
- [164] S. I. Weiss *et al.*, “Uronic acids functionalized polyethyleneimine (PEI)-polyethyleneglycol (PEG)-graft-copolymers as novel synthetic gene carriers,” *Biomaterials*, vol. 27, no. 10, pp. 2302–2312, Apr. 2006.
- [165] M. Elfinger, C. Maucksch, and C. Rudolph, “Characterization of lactoferrin as a targeting ligand for nonviral gene delivery to airway epithelial cells,” *Biomaterials*, vol. 28, no. 23, pp. 3448–3455, Aug. 2007.
- [166] J. Geiger *et al.*, “Targeting of the prostacyclin specific IP1 receptor in lungs with molecular conjugates comprising prostaglandin I2 analogues,” *Biomaterials*, vol. 31, no. 10, pp. 2903–2911, Apr. 2010.
- [167] R. Ranganathan *et al.*, “Nanomedicine: Towards development of patient-friendly drug-delivery systems for oncological applications,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 7, pp. 1043–1060, 2012.
- [168] V. M. McDonald *et al.*, “Severe asthma: Current management, targeted therapies and future directions-A roundtable report,” *Respirology*, vol. 22, no. 1, pp. 53–60, Jan. 2017.
- [169] W. Busse *et al.*, “Omalizumab, anti-IgE recombinant humanized monoclonal antibody, for the treatment of severe allergic asthma,” *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 108, no. 2, pp. 184–190, 2001.
- [170] D. Inführ, R. Cramer, R. Lamers, and G. Achatz, “Molecular and cellular targets of anti-IgE antibodies,” *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 60, no. 8, pp. 977–985, Aug-2005.
- [171] F. Menzella, M. Lusuadi, C. Galeone, and L. Zucchi, “Tailored therapy for severe asthma,” *Multidisciplinary Respiratory Medicine*, vol. 10, no. 1, BioMed Central Ltd., 2015.
- [172] S. D. Sullivan and F. Turk, “An evaluation of the cost-effectiveness of omalizumab for the treatment of severe allergic asthma,” *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 63, no. 6, pp. 670–684, Jun-2008.
- [173] B. E. Bloom, “Creating new economic incentives for repurposing generic drugs for unsolved diseases using social finance,” *Assay and Drug Development Technologies*, vol. 13, no. 10, Mary Ann Liebert Inc., pp. 606–611, 01-Dec-2015.
- [174] D. W. Carley, “Drug repurposing: identify, develop and commercialize new uses for existing or abandoned drugs. Part I,” *IDrugs : the investigational drugs journal*, vol. 8, no. 4, England, pp. 306–309, Apr-2005.
- [175] T. T. Ashburn and K. B. Thor, “Drug repositioning: Identifying and developing new uses for existing drugs,” *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 3, no. 8, Nature Publishing Group, pp. 673–683, 2004.
- [176] C. W. Hendrix *et al.*, “Safety, pharmacokinetics, and antiviral activity of AMD3100, a selective CXCR4

- receptor inhibitor, in HIV-1 infection,” *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, vol. 37, no. 2, pp. 1253–1262, Oct. 2004.
- [177] S. M. Devine *et al.*, “Rapid mobilization of functional donor hematopoietic cells without G-CSF using AMD3100, an antagonist of the CXCR4/SDF-1 interaction,” *Blood*, vol. 112, no. 4, pp. 990–998, Aug. 2008.
- [178] G. Jin and S. T. C. Wong, “Toward better drug repositioning: Prioritizing and integrating existing methods into efficient pipelines,” *Drug Discovery Today*, vol. 19, no. 5. Elsevier Ltd, pp. 637–644, 2014.
- [179] A. W. Thomson, H. R. Turnquist, and G. Raimondi, “Immunoregulatory functions of mTOR inhibition,” *Nature Reviews Immunology*, vol. 9, no. 5. Nat Rev Immunol, pp. 324–337, May-2009.
- [180] W. Hua *et al.*, “Rapamycin inhibition of eosinophil differentiation attenuates allergic airway inflammation in mice,” *Respirology*, vol. 20, no. 7, pp. 1055–1065, Oct. 2015.
- [181] J. N. de Francischi, D. M. Conroy, K. Maghni, and P. Sirois, “Inhibition by rapamycin of leukocyte migration and bronchial hyperreactivity induced by injection of Sephadex beads to guinea-pigs,” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 110, no. 4, pp. 1381–1386, 1993.
- [182] E. M. Mushaben, E. L. Kramer, E. B. Brandt, G. K. Khurana Hershey, and T. D. Le Cras, “Rapamycin Attenuates Airway Hyperreactivity, Goblet Cells, and IgE in Experimental Allergic Asthma,” *J. Immunol.*, vol. 187, no. 11, pp. 5756–5763, Dec. 2011.
- [183] T. Mujtaba and Q. P. Dou, “Advances in the understanding of mechanisms and therapeutic use of bortezomib,” *Discovery medicine*, vol. 12, no. 67. Discov Med, pp. 471–480, 2011.
- [184] A. M. Gomez *et al.*, “Proteasome Inhibition with Bortezomib Depletes Plasma Cells and Specific Autoantibody Production in Primary Thymic Cell Cultures from Early-Onset Myasthenia Gravis Patients,” *J. Immunol.*, vol. 193, no. 3, pp. 1055–1063, Aug. 2014.
- [185] M. Wegmann, L. Lunding, Z. Orinska, D. M. Wong, R. A. Manz, and H. Fehrenbach, “Long-term bortezomib treatment reduces allergen-specific IgE but fails to ameliorate chronic asthma in mice,” *Int. Arch. Allergy Immunol.*, vol. 158, no. 1, pp. 43–53, Apr. 2012.
- [186] P. M. Nair *et al.*, “Targeting PP2A and proteasome activity ameliorates features of allergic airway disease in mice,” *Allergy*, vol. 72, no. 12, pp. 1891–1903, Dec. 2017.
- [187] B. J. Druker *et al.*, “Efficacy and Safety of a Specific Inhibitor of the BCR-ABL Tyrosine Kinase in Chronic Myeloid Leukemia,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 344, no. 14, pp. 1031–1037, Apr. 2001.
- [188] D. Wolf, H. Tilg, H. Rumpold, G. Gastl, and A. Wolf, “The Kinase Inhibitor Imatinib - An Immunosuppressive Drug?,” *Curr. Cancer Drug Targets*, vol. 7, no. 3, pp. 251–258, May 2007.
- [189] A. Juurikivi *et al.*, “Inhibition of c-kit tyrosine kinase by imatinib mesylate induces apoptosis in mast cells in rheumatoid synovia: A potential approach to the treatment of arthritis,” *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 64, no. 8, pp. 1126–1131, Aug. 2005.
- [190] R. Seggewiss *et al.*, “Imatinib inhibits T-cell receptor-mediated T-cell proliferation and activation in a dose-dependent manner,” *Blood*, vol. 105, no. 6, pp. 2473–2479, Mar. 2005.
- [191] A. A. Berlin and N. W. Lukacs, “Treatment of cockroach allergen asthma model with imatinib attenuates airway responses,” *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 171, no. 1, pp. 35–39, Jan. 2005.
- [192] C. K. Rhee *et al.*, “Effect of imatinib on airway smooth muscle thickening in a murine model of chronic asthma,” *Int. Arch. Allergy Immunol.*, vol. 155, no. 3, pp. 243–251, Jun. 2011.
- [193] C. Roos *et al.*, “Clinical imatinib mesylate treatment induces early normalisation of aberrant neutrophil leukotriene C4 synthase expression and activity in chronic myeloid leukaemia,” *British Journal of*

- Haematology*, vol. 142, no. 6. Br J Haematol, pp. 992–995, Sep-2008.
- [194] V. C. Jordan, “Molecular mechanisms of antiestrogen action in breast cancer,” *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 31, no. 1, pp. 41–52, Jan. 1994.
 - [195] Y. Cai, J. Zhou, and D. C. Webb, “Estrogen stimulates Th2 cytokine production and regulates the compartmentalisation of eosinophils during allergen challenge in a mouse model of asthma,” *Int. Arch. Allergy Immunol.*, vol. 158, no. 3, pp. 252–260, Jun. 2012.
 - [196] S. M. Duffy, W. J. Lawley, D. Kaur, W. Yang, and P. Bradding, “Inhibition of human mast cell proliferation and survival by tamoxifen in association with ion channel modulation,” *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 112, no. 5, pp. 965–972, 2003.
 - [197] J. Komi and O. Lassila, “Nonsteroidal anti-estrogens inhibit the functional differentiation of human monocyte-derived dendritic cells,” *Blood*, vol. 95, no. 9, pp. 2875–2882, May 2000.
 - [198] B. Perez *et al.*, “Tamoxifen as a new therapeutic tool for neutrophilic lung inflammation,” *Respirology*, vol. 21, no. 1, pp. 112–118, Jan. 2016.
 - [199] J. Stokholm *et al.*, “Azithromycin for episodes with asthma-like symptoms in young children aged 1-3 years: A randomised, double-blind, placebo-controlled trial,” *Lancet Respir. Med.*, vol. 4, no. 1, pp. 19–26, Jan. 2016.
 - [200] S. L. Johnston *et al.*, “Azithromycin for acute exacerbations of asthma: The AZALEA randomized clinical trial,” *JAMA Intern. Med.*, vol. 176, no. 11, pp. 1630–1637, Nov. 2016.
 - [201] P. G. Gibson *et al.*, “Effect of azithromycin on asthma exacerbations and quality of life in adults with persistent uncontrolled asthma (AMAZES): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial,” *Lancet*, vol. 390, no. 10095, pp. 659–668, Aug. 2017.
 - [202] U. Koli, R. A. Krishnan, P. Pofali, R. Jain, and P. Dandekar, “SiRNA-based therapies for pulmonary diseases,” *Journal of Biomedical Nanotechnology*, vol. 10, no. 9. American Scientific Publishers, pp. 1953–1997, 01-Sep-2014.
 - [203] A. M. Gorabi, N. Kiaie, S. Aslani, T. Jamialahmadi, T. P. Johnston, and A. Sahebkar, “Prospects for the potential of RNA interference in the treatment of autoimmune diseases: Small interfering RNAs in the spotlight,” *Journal of Autoimmunity*, vol. 114. Academic Press, p. 102529, 01-Nov-2020.
 - [204] G. Cavallaro, C. Sardo, E. F. Craparo, B. Porsio, and G. Giammona, “Polymeric nanoparticles for siRNA delivery: Production and applications,” *Int. J. Pharm.*, vol. 525, no. 2, pp. 313–333, Jun. 2017.
 - [205] G. Cavallaro, C. Sardo, E. F. Craparo, B. Porsio, and G. Giammona, “Polymeric nanoparticles for siRNA delivery: Production and applications,” *Int. J. Pharm.*, vol. 525, no. 2, pp. 313–333, Jun. 2017.
 - [206] M. Wills-Karp, “The gene encoding interleukin-13: A susceptibility locus for asthma and related traits,” *Respir. Res.*, vol. 1, no. 1, pp. 19–23, Apr. 2000.
 - [207] S. Sel, W. Henke, A. Dietrich, U. Herz, and H. Renz, “Treatment of Allergic Asthma by Targeting Transcription Factors Using Nucleic-Acid Based Technologies,” *Curr. Pharm. Des.*, vol. 12, no. 25, pp. 3293–3304, Sep. 2006.
 - [208] G. D. Healey, N. Evans, J. M. Hopkin, G. Davies, and W. Walker, “Evaluation of nasal epithelium sampling as a tool in the preclinical development of siRNA-based therapeutics for asthma,” *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 17, no. 3, pp. 356–364, Mar. 2013.
 - [209] L. Zhu, Q. Zhu, X. Zhang, and H. Wang, “The Correlation Analysis of Two Common Polymorphisms in STAT6 Gene and the Risk of Asthma: A Meta-Analysis,” *PLoS One*, vol. 8, no. 7, Jul. 2013.
 - [210] R. M. Séguin and N. Ferrari, “Emerging oligonucleotide therapies for asthma and chronic obstructive

- pulmonary disease,” *Expert Opinion on Investigational Drugs*, vol. 18, no. 10. Expert Opin Investig Drugs, pp. 1505–1517, Oct-2009.
- [211] H. Meinicke, Y. Darcan, and E. Hamelmann, “Targeting Allergic Airway Diseases by siRNA: An Option for the Future?,” *Curr. Mol. Med.*, vol. 9, no. 4, pp. 483–494, Apr. 2009.
- [212] Z. Y. Huang, M. K. Kim, T. H. Kim-Han, Z. K. Indik, and A. D. Schreiber, “Effect of locally administered Syk siRNA on allergen-induced arthritis and asthma,” *Mol. Immunol.*, vol. 53, no. 1–2, pp. 52–59, Jan. 2013.
- [213] G. R. Stenton *et al.*, “Aerosolized Syk Antisense Suppresses Syk Expression, Mediator Release from Macrophages, and Pulmonary Inflammation,” *J. Immunol.*, vol. 164, no. 7, pp. 3790–3797, Apr. 2000.
- [214] S. Miyamoto *et al.*, “Intra-airway administration of small interfering RNA targeting plasminogen activator inhibitor-1 attenuates allergic asthma in mice,” *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.*, vol. 301, no. 6, pp. L908–L916, Dec. 2011.
- [215] Y. Darcan-Nicolaisen *et al.*, “Small Interfering RNA against Transcription Factor STAT6 Inhibits Allergic Airway Inflammation and Hyperreactivity in Mice,” *J. Immunol.*, vol. 182, no. 12, pp. 7501–7508, Jun. 2009.
- [216] D. W. Y. Sah, “Therapeutic potential of RNA interference for neurological disorders,” *Life Sciences*, vol. 79, no. 19. Life Sci, pp. 1773–1780, 04-Oct-2006.
- [217] S. Akhtar and I. F. Benter, “Nonviral delivery of synthetic siRNAs in vivo,” *Journal of Clinical Investigation*, vol. 117, no. 12. J Clin Invest, pp. 3623–3632, Dec-2007.
- [218] J. Gil and M. Esteban, “Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): Mechanism of action,” *Apoptosis*, vol. 5, no. 2. Kluwer Academic Publishers, pp. 107–114, 2000.
- [219] M. Kumar and G. G. Carmichael, “Antisense RNA: Function and Fate of Duplex RNA in Cells of Higher Eukaryotes,” *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 62, no. 4, pp. 1415–1434, Dec. 1998.
- [220] G. Cavallaro, E. F. Craparo, C. Sardo, G. Lamberti, A. A. Barba, and A. Dalmoro, “PHEA-PLA biocompatible nanoparticles by technique of solvent evaporation from multiple emulsions,” *Int. J. Pharm.*, vol. 495, no. 2, pp. 719–727, Nov. 2015.
- [221] T. K. Dash and V. B. Konkimalla, “Poly-ε-caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review,” *Journal of Controlled Release*, vol. 158, no. 1. J Control Release, pp. 15–33, 28-Feb-2012.
- [222] S. Di Gioia *et al.*, “Cationic polyaspartamide-based nanocomplexes mediate siRNA entry and down-regulation of the pro-inflammatory mediator high mobility group box 1 in airway epithelial cells,” *Int. J. Pharm.*, vol. 491, no. 1–2, pp. 359–366, Jul. 2015.
- [223] E. F. Craparo, D. Triolo, G. Pitarresi, G. Giammona, and G. Cavallaro, “Galactosylated micelles for a ribavirin prodrug targeting to hepatocytes,” *Biomacromolecules*, vol. 14, no. 6, pp. 1838–1849, Jun. 2013.
- [224] “The Proton Sponge a Trick to Enter Cells the Viruses Did - Technische Informationsbibliothek (TIB).” [Online]. Available: <https://www.tib.eu/en/search/id/BLSE%3ARN021960457/The-Proton-Sponge-a-Trick-to-Enter-Cells-the-Viruses/>. [Accessed: 18-Apr-2020].
- [225] S. Patel, J. Kim, M. Herrera, A. Mukherjee, A. V. Kabanov, and G. Sahay, “Brief update on endocytosis of nanomedicines,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 144, pp. 90–111, 2019.
- [226] R. De Levie, *How to use excel® in analytical chemistry and in general scientific data analysis*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2001.
- [227] N. Mauro, C. Fiorica, P. Varvarà, G. Di Prima, and G. Giammona, “A facile way to build up branched

- high functional polyaminoacids with tunable physicochemical and biological properties,” *Eur. Polym. J.*, vol. 77, pp. 124–138, Apr. 2016.
- [228] P. Ferruti *et al.*, “Amphoteric, Prevailingly Cationic α -Arginine Polymers of Poly(amidoamino acid) Structure: Synthesis, Acid/Base Properties and Preliminary Cytocompatibility and Cell-Permeating Characterizations,” *Macromol. Biosci.*, vol. 14, no. 3, pp. 390–400, Mar. 2014.
- [229] K. Miyata *et al.*, “Polyplexes from Poly(aspartamide) Bearing 1,2-Diaminoethane Side Chains Induce pH-Selective, Endosomal Membrane Destabilization with Amplified Transfection and Negligible Cytotoxicity.”
- [230] E. F. Craparo, B. Porsio, C. Sardo, G. Giammona, and G. Cavallaro, “Pegylated Polyaspartamide–Polylactide-Based Nanoparticles Penetrating Cystic Fibrosis Artificial Mucus,” 2016.
- [231] T. Miyake, T. Miyake, M. Sakaguchi, H. Nankai, T. Nakazawa, and R. Morishita, “Prevention of Asthma Exacerbation in a Mouse Model by Simultaneous Inhibition of NF- κ B and STAT6 Activation Using a Chimeric Decoy Strategy,” *Mol. Ther. - Nucleic Acids*, vol. 10, no. March, pp. 159–169, 2018.
- [232] J. Y. Lock, T. L. Carlson, and R. L. Carrier, “Mucus models to evaluate the diffusion of drugs and particles,” *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2018.
- [233] B. Verbraeken, B. D. Monnery, K. Lava, and R. Hoogenboom, “The chemistry of poly(2-oxazoline)s,” *European Polymer Journal*, vol. 88. Elsevier Ltd, pp. 451–469, 01-Mar-2017.
- [234] B. Guillermin, S. Monge, V. Lapinte, and J. J. Robin, “How to modulate the chemical structure of polyoxazolines by appropriate functionalization,” *Macromolecular Rapid Communications*, vol. 33, no. 19, pp. 1600–1612, 15-Oct-2012.
- [235] K. Lava, B. Verbraeken, and R. Hoogenboom, “Poly(2-oxazoline)s and click chemistry: a versatile toolbox towards multi-functional polymers.”
- [236] E. Rossegger, V. Schenk, and F. Wiesbrock, “Design Strategies for Functionalized Poly(2-oxazoline)s and Derived Materials,” *Polymers (Basel)*, vol. 5, no. 3, pp. 956–1011, Jul. 2013.
- [237] Y. Yang, M. D. Tsifansky, S. Shin, Q. Lin, and Y. Yeo, “Mannitol-Guided delivery of ciprofloxacin in artificial cystic fibrosis mucus model,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 108, no. 6, pp. 1441–1449, Jun. 2011.
- [238] E. F. Craparo *et al.*, “Polyanion-tobramycin nanocomplexes into functional microparticles for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis,” *Nanomedicine*, vol. 12, no. 1, pp. 25–42, Jan. 2017.
- [239] E. F. Craparo *et al.*, “Polyanion-tobramycin nanocomplexes into functional microparticles for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis,” *Nanomedicine*, vol. 12, no. 1, pp. 25–42, Jan. 2017.
- [240] M. Laplante and D. M. Sabatini, “mTOR signaling in growth control and disease,” *Cell*, vol. 149, no. 2, pp. 274–293, 13-Apr-2012.
- [241] K. Yamaki and S. Yoshino, “Preventive and therapeutic effects of rapamycin, a mammalian target of rapamycin inhibitor, on food allergy in mice,” *Allergy*, vol. 67, no. 10, pp. 1259–1270, Oct. 2012.
- [242] Y. V. Il'ichev, L. Alquier, and C. A. Maryanoff, “Degradation of rapamycin and its ring-opened isomer: Role of base catalysis,” *Arkivoc*, vol. 2007, no. 12, pp. 110–131, May 2007.
- [243] D. J. A. R. Moes, H. J. Guchelaar, and J. W. De Fijter, “Sirolimus and everolimus in kidney transplantation,” *Drug Discovery Today*, vol. 20, no. 10. Elsevier Ltd, pp. 1243–1249, 01-Oct-2015.
- [244] A. Haeri, M. Osouli, F. Bayat, S. Alavi, and S. Dadashzadeh, “Nanomedicine approaches for sirolimus delivery: a review of pharmaceutical properties and preclinical studies,” *Artificial Cells, Nanomedicine*

- and Biotechnology*, vol. 46, no. sup1. Taylor and Francis Ltd., pp. 1–14, 31-Oct-2018.
- [245] G. Giammona, B. Carlisi, and S. Palazzo, “Reaction of α,β -poly(N-hydroxyethyl)-DL-aspartamide with derivatives of carboxylic acids,” *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, vol. 25, no. 10, pp. 2813–2818, Oct. 1987.
 - [246] G. Cavallaro *et al.*, “Galactosylated polyaspartamide copolymers for siRNA targeted delivery to hepatocellular carcinoma cells,” *Int. J. Pharm.*, vol. 525, no. 2, pp. 397–406, Jun. 2017.
 - [247] J. Griebinger *et al.*, “Methods to determine the interactions of micro- and nanoparticles with mucus,” *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 96. Elsevier, pp. 464–476, 01-Oct-2015.
 - [248] H. Witte and W. Seeliger, “Cyclische Imidsäureester aus Nitrilen und Aminoalkoholen,” *Justus Liebigs Ann. Chem.*, vol. 1974, no. 6, pp. 996–1009, Jul. 1974.
 - [249] M. M. Lü, L. Hahn, S. Haider, and R. Luxenhofer, “Drug Specificity, Synergy and Antagonism in Ultrahigh Capacity Poly(2-oxazoline)/Poly(2-oxazine) based Formulations,” 2017.
 - [250] E. F. Craparo *et al.*, “Hepatocyte-targeted fluorescent nanoparticles based on a polyaspartamide for potential theranostic applications,” *Polymer (Guildf)*, vol. 70, pp. 257–270, 2015.