



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PALERMO



Ministero dell'Università e della Ricerca
Scientifica e Tecnologica

Università degli studi di Palermo

FACOLTA' DI FARMACIA

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Molecolari e Biomolecolari

DOTTORATO DI RICERCA

in

“Tecnologie delle sostanze biologicamente attive”

XXIII CICLO, A.A. 2008/2009

SSD CHIM/09

NUOVI COPOLMERI BIOCOMPATIBILI A BASE DI
POLI-IDROSSIETILASPARTAMMIDE PER IL NON-
VIRAL GENE DELIVERY

Coordinatore:

Ch.mo Prof. Gaetano Giammona

Tesi di Dottorato di Ricerca di:

Giovanni Amato

Tutor:

Ch.ma Prof.ssa Gennara Cavallaro

INDICE

1.	INTRODUZIONE	
1.1.	La terapia genica	1
1.2.	I vettori virali	4
1.3.	I vettori non virali	6
1.4.	Problematiche di distribuzione dei poliplessi e relative strategie di risoluzione	9
1.4.1.	Strategie di Shielding	11
1.4.2.	Meccanismo di uptake	12
1.4.3.	Uptake mediato dai ligandi e targeting attivo	13
1.5.	Meccanismi d'uscita dell'endosoma	17
1.5.1.	Effetto proton sponge	18
1.5.2.	Peptidi per il rilascio endosomiale. Peptidi fusogenici	22
1.5.3.	Vettori polimerici con segmenti fusogenici	25
1.6.	Proprietà strutturali e funzionali dei polimeri usati in terapia genica	27
1.7.	Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP)	37
1.7.1.	Iniziatori per ATRP	42
1.7.2.	Sistema catalitico	46
1.7.3.	Effetto della temperatura e del tempo	

sull' ATRP	50
1.7.4. Consecutive ATRPs	51
2. SCOPO DELLA TESI	54
3. RISULTATI E DISCUSSIONI	
3.1. Sintesi del copolimero α,β -poli(N-2-idrossietil- bromoisobutirrato)-DL-aspartammide (PHEA-BIB)	65
3.2. Sintesi dei copolimeri PHEA-IB-pDEAEMA	68
3.3. Studi di complessazione con il DNA	73
3.4. Proprietà biofisiche dei poliplessi	75
3.5. Saggi di Citotossicità dei poliplessi ottenuti con i copolimeri PHEA-IB-pDEAEMA.	79
3.6. Studi di efficienza di transfezione dei vettori PHEA-IB- PDEAEMA	80
3.7. Sintesi dei copolimeri PHEA-IB-pDEAEMA-pPEGMA	82
3.8. Studi di complessazione del DNA con i copolimeri ottenuti mediante consecutive ATRP	87
3.9. Proprietà biofisiche dei poliplessi ottenuti con i copolimeri PHEA-IB-pDEAEMA-pPEGMA	89
3.10. Saggi di citotossicità dei poliplessi ottenuti con i copolimeri PHEA-IB-pDEAEMA-pPEGMA a' e b'	92
3.11. Studi di transfezione	93

3.12. Sintesi e Caratterizzazione dei Copolimeri PHEA-IB-DMAEMA con un basso grado grafting per la veicolazione di small interfering RNA (siRNA).	95
3.13. Studi preliminari di complessazione con il DNA	99
3.14. Studi preliminari di dimensioni e potenziale- ζ con un plasmide modello	101
3.15. Studi di stabilità dei poliplessi attraverso scambio polianionico	103
3.16. Test preliminari di citotossicità dei complessi (MTS)	105
3.17. Test di transfezione con complessi ottenuti tra copolimeri e siRNA	106
3.18. Studi di vitalità cellulare dopo trattamento con il siRNA	109
3.19. Sintesi e caratterizzazione del copolimero PHEA-sLPEI e PHEA-PEG-sLPEI	110
3.20. Studi di complessazione con il DNA	117
3.21. Dimensioni e potenziale ζ	118
3.22. Test di citotossicità dei complessi (MTS)	122
3.23. Saggio d'espressione genica	123
4. CONCLUSIONI	126
5. PARTE SPERIMENTALE	
5.1. Materiali e metodi	132

5.2. Sintesi dell' α,β -poli(N-2-idrossietil)(α -Bromoisobutirrato) -D,L-aspartammide(PHEA-BIB)	134
5.3. Procedura generale per la sintesi e la caratterizzazione dell' α,β -poli(N-2-idrossietil)-D,L-aspartammide-g-poli-N,N-dietilammino-etiltmetacrilato (PHEA-IB-pDEAEMA).	136
5.4. Procedura generale per la sintesi e la caratterizzazione dell' α,β -poli(N-2-idrossietil)-D,L-aspartammide-g-poli-N,N-dietilammino-etiltmetacrilato-b-poli-PEG-metacrilato (PHEA-IB-pDEAEMA-pPEGMA) via Consecutive Atom Transfer Radical Polymerization.	138
5.5. Procedura generale per la sintesi e la caratterizzazione dell' α,β -poli(N-2-idrossietil)-D,L-aspartammide-g-poli-N,N-dietilammino-etiltmetacrilato (PHEA-IB-pDEAEMA).	141
5.6. Sintesi del copolimer polietilenimmina-g- α,β -poli(N-2-idrossietil)-D,L-aspartammide (PHEA-sLPEI)	141
5.7. Sintesi del PHEA-PEG	143
5.8. Procedura generale per la sintesi del PHEA-PEG-sLPEI	144
5.9. Analisi della mobilità elettroforetica dei complessi copolimero/DNA	145
5.10. Dynamic light scattering e potenziale-Z dei poliiplessi	146
5.11. Studi di stabilità dei poliiplessi ottenuti con i copolimeri PHEA-IB ₁₃ -pDEAEMA ₁₀ e PHEA-IB ₄ -pDEAEMA ₄	

in presenza di albumina.	147
5.12.Citotossicità dei complessi copolimero/plasmide (MTS)	148
5.13.Test di espressione genica	149
5.14.Colture cellulare (HuH7)	151
5.15.Preparazione complessi PHEA-IB13-pDEAEMA10/siRNA	151
5.16.Saggio di transfezione con il complesso PHEA-IB13-pDEAEMA10/siRNA	152
6. BIBLIOGRAFIA	154

1. INTRODUZIONE

1.1. LA TERAPIA GENICA

La terapia genica (*Gene Therapy*) è un potente approccio per il trattamento di malattie potenzialmente letali come il cancro e le malattie genetiche.

Per terapia genica si intende l'inserzione di materiale genetico (ad esempio il DNA) all'interno delle cellule al fine di poter curare delle patologie. Questa tecnica è stata concepita a seguito del grande progresso delle metodiche di biologia molecolare sviluppatasi dagli anni 80. Tali tecniche consentirono il clonaggio ed il sequenziamento di vari geni. Ciò comportò la precisa identificazione di molte alterazioni geniche in diverse patologie e la capacità, grazie alle tecniche del DNA ricombinante, di modificare microorganismi (come batteri o funghi) per poter far loro esprimere delle molecole d'interesse.

In particolare, la terapia genica consiste nel trasferimento di uno o più geni sani in una cellula malata, al fine di curare una patologia causata dall'assenza o dal difetto di uno o più geni (mutati). Dunque, è necessario in primo luogo identificare il singolo gene o i diversi geni responsabili della malattia genetica. In secondo luogo si può tentare

(almeno per alcune malattie) la sostituzione dei geni malati sfruttando, un adatto vettore mediante il quale si può poi "correggere" il DNA, rimpiazzando le sequenze difettose, in modo tale che la cellula sintetizzi correttamente le proteine necessarie al corretto funzionamento metabolico. Tale tecnica è nota come transfezione.

La terapia genica riguarda non solo molecole di DNA di grandi dimensioni (plasmidi, pDNA) ma anche oligonucleotidi, ONs, RNA come ad esempio gli small interfering (siRNA) o RNA messaggero (mRNA) [Midoux P. et al., 2009]. Malgrado l'enorme potenziale di tale approccio ci sono ancora numerose difficoltà da superare prima che sia tentata un'efficiente applicazione clinica. Infatti, gli acidi nucleici non possono essere somministrati come tali a causa di una breve emivita plasmatica provocata dalla degradazione da parte di nucleasi sieriche. In secondo luogo, essendo macromolecole di elevate dimensioni e peso molecolare, nonché cariche negativamente, non sono in grado di attraversare la membrana delle cellule, normalmente caricata negativamente per la presenza di glicoproteine, proteoglicani e glicerofosfati. Ad oggi, la sintesi o la produzione biotecnologica degli acidi nucleici è diventata realizzabile su larga scala, ma la mancanza di un efficace delivery system è il principale ostacolo al progresso di questa terapia innovativa. Per tali ragioni si rende

necessario somministrare il materiale genetico mediante l'ausilio di vettori che soddisfino particolari requisiti [Pouton C.W. et al., 2001; Lendley T.S. et al., 1994] quali:

- Stabilità plasmatica;
- Capacità di proteggere il materiale genetico dalla degradazione durante il trasporto al sito d'azione;
- Capacità di evitare la captazione da parte dei componenti del sistema del reticolo endoteliale (RES);
- Selettività per un tessuto o cellula bersaglio (targeting attivo e/o passivo);
- Capacità di rilasciare il materiale genetico all'interno delle cellule target evitando la degradazione da parte degli enzimi lisosomali;
- Capacità di trasportare il materiale genetico fino al nucleo;
- Biocompatibilità ed assenza di immunogenicità.

Generalmente sono due gli approcci che possono essere utilizzati per il rilascio degli acidi nucleici nella terapia genica:

- *Vettori virali* che vengono ingegnerizzati e manipolati in modo da sfruttarne le capacità naturali di penetrare all'interno delle cellule, evitando però che sviluppino la malattia;

- *Vettori non virali*, tra i quali i polimeri cationici, che rappresentano agenti di veicolazione molto interessanti e promettenti.

1.2. I VETTORI VIRALI

L'ingresso del materiale genetico nelle cellule può avvenire mediante l'utilizzo di vettori virali, sfruttando la naturale capacità dei virus d'infettare le cellule bersaglio, di trasferire il loro materiale genetico al suo interno e di esprimere un gene eterologo. Il tropismo è determinato, in buona parte dall'espressione di specifici recettori sulla superficie della cellula ospite, che consentono l'ancoraggio del virus infettante, facilitandone l'internalizzazione. L'espressione di un gene eterologo richiede la penetrazione del genoma virale all'interno del nucleo della cellula ospite, la sua trascrizione e traduzione. Affinché i vettori virali possano essere utilizzati, è necessario modificarli geneticamente in modo da eliminare la loro virulenza e la loro capacità replicativa, senza però alterarne quella transfettante. Inoltre, è necessario eliminare parte del materiale genetico virale per fare spazio al gene da veicolare; perciò questi sistemi sono costituiti da virus ricombinanti contenenti il gene terapeutico ed il materiale genetico

virale necessario alla transfezione [Rogers C.S. et al., 2001; El-Aneed A. et al., 2004].

Ad oggi i vettori virali più utilizzati ed in avanzata fase di sperimentazione sono retrovirus murini, aviari e lentivirus [El-Aneed A. et al., 2004], adenovirus [Cossu G. et al. , 2006] virus adeno-associati ed herpes virus [Rogers C.S. et al. , 2001]. I vettori virali hanno mostrato ottime capacità di transfezione sia in vitro che in vivo; sfortunatamente, l'uso clinico di tali vettori è associato all'insorgere di numerose problematiche, le quali includono, principalmente l'induzione di una risposta di tipo immunitaria, che si manifesta dopo somministrazioni ripetute, a causa dello sviluppo nell'organismo ricevente di strategie atte a distruggere i virus, riconosciuti come potenziali minacce. Inoltre, è possibile una ricombinazione del virus utilizzato come vettore con virus wild-type presenti nell'organismo ospite e conseguente riconversione virulenta del vettore [Zhang X. et al., 2006; McTaggart S. et al., 2002; Gorecki D.C. et al., 2001]. Un ulteriore limite sta nelle dimensioni del DNA (relativamente piccole) che può essere introdotto nel capsido virale, e dunque veicolato, e la difficoltà di produrre tali sistemi su larga scala e con le precise caratteristiche di purezza che una somministrazione clinica richiede. [Lehrman S. et al., 1999; Liu Q. et al., 2003; Sun J.Y. et al., 2003;

Donahue R.E. et al.,1992; Gore M.E. et al., 2003]. Per tali ragioni nella comunità scientifica si è assistito ad un sempre crescente impulso verso la ricerca di sistemi vettoriali, in grado di veicolare il materiale genetico, che siano diversi dai virus.

1.3. I VETTORI NON VIRALI

La scelta di utilizzare dei *vettori non virali*, ha l'obiettivo di creare sistemi che agiscono come virus sintetici che mostrino un'alta specificità per le cellule target, alta efficienza di transfezione e rischi per la salute controllabili. Per quanto riguarda i vantaggi dei vettori non virali rispetto ai virus è ovvio che possiedono grandi prospettive in terapia genica. Infatti tali vettori hanno il merito di possedere bassa immunogenicità, bassi costi di produzione, alta riproducibilità e possono essere sintetizzati in modo tale da rispondere a specifiche necessità terapeutiche, sebbene necessitano maggiori ricerche per la loro ottimizzazione [Lee M. et al., 2005].

In terapia genica i vettori non virali più diffusi sono i polimeri cationici ed i lipidi cationici. Tra questi i vettori polimerici possiedono moltissimi vantaggi, infatti possono veicolare grandi quantità di materiale genetico e possono essere derivatizzati chimicamente in

modo da ottenere sistemi specificamente orientati verso particolari tessuti bersaglio. Ciò può essere ottenuto sia mediante l'utilizzo di opportuni ligandi per il targeting attivo, sia sfruttando il cambiamento delle caratteristiche chimico-fisiche dei vari microambienti biologici (pH, presenza di agenti riducenti ecc.) che possono essere usate per favorire il processo di rilascio del materiale genetico solo nell'ambiente intracellulare, evitandone il prematuro rilascio nel torrente ematico e la conseguente degradazione da parte delle DNAsieriche.

I polimeri utilizzati nella veicolazione di materiale genetico hanno carattere policationico. Tale caratteristica è conferita da gruppi amminici protonabili a pH fisiologico o neutro, consentendo loro di interagire con le numerose cariche negative del DNA, conferite dalla presenza dei gruppi fosfato e prevenendo in tal modo la repulsione elettrostatica che si instaura tra DNA e superficie cellulare. Si formano così dei complessi, grazie ad interazioni reversibili di tipo elettrostatico, chiamati poliplessi. Tali interazioni dipendono dalla: densità di carica, dimensione, forma e flessibilità/rigidità dei polimeri. Inoltre, altre interazioni conferiscono maggiore stabilità ai poliplessi, come i legami ad idrogeno [Prevette L.E. et al., 2007] e le interazioni idrofobiche [Philipp A. et al., 2009], anche se un'elevata affinità degli

acidi nucleici per i poliplessi non necessariamente è correlata ad un'alta efficienza di transfezione del carrier polimerico. Infatti, dati riportati in letteratura mostrano i differenti destini intracellulari dei poliplessi ottenuti con la LPEI (22kDa) e la BPEI (25kDa). Da questi studi si evince che i più efficaci, ma meno stabili poliplessi ottenuti con la LPEI, quando raggiungono il citosol rilasciano più velocemente il pDNA di quelli ottenuti con la BPEI [Matsumoto Y. et al., 2009]. Ciò indica che un limitato rilascio del pDNA nel nucleo rappresenta uno dei principali fattori limitanti dell'espressione genica [Matsumoto Y. et al., 2009]. D'altra parte, i poliplessi ottenuti con LPEI sono risultati instabili in vivo, per il verificarsi del rilascio prematuro del materiale genetico per reazione di scambio dei poliplessi con le proteine sieriche o glicosaminoglicani presenti in circolo. Per tale motivo per superare questo problema si sono studiati polimeri bioresponsivi, cioè in grado di formare poliplessi stabili nel torrente ematico e capaci di rilasciare il materiale genetico una volta raggiunto il citoplasma. Una strategia incoraggiante è quella di progettare polimeri con alto peso molecolare biodegradabili che, nell'ambiente intracellulare si degradino in frammenti non tossici di basso peso molecolare. Legami utili a tale scopo sono: esteri idrolizzabili [Forrest M.L. et al., 2003; Kloeckner J. et al., 2006; Zugates G.T. et al., 2007],

legami di tipo acetalico che si degradano al pH dell'ambiente endosomiale [Knorr V. et al., 2008 (A); Knorr V. et al., 2008 (B)] o ponti disolfuro che si riducono nel citosol a causa delle sue caratteristiche riducenti ivi presenti [Read M.L. et al., 2003; Hoon, J.J. et al., 2007; Lin C. et al., 2008].

1.4. PROBLEMATICHE DI DISTRIBUZIONE DEI POLIPLESSI E RELATIVE STRATEGIE DI RISOLUZIONE

I poliplessi generalmente sono caricati positivamente (figura 1.1), ciò comporta un'aumentata interazione con la superficie delle cellule, ma presentano numerosi problemi quando somministrati per via sistemica. Il principale problema associato a questo tipo di vettori è la loro carica cationica superficiale, che porta a numerose interazioni aspecifiche con componenti cellulari del sangue, dell'endotelio dei vasi e con le proteine plasmatiche [Ogris M. et al., 1999]. Per i complessi con un'elevata carica positiva di superficie queste interazioni riducono notevolmente il tempo di emivita plasmatica [Oupicky D. et al., 1999].

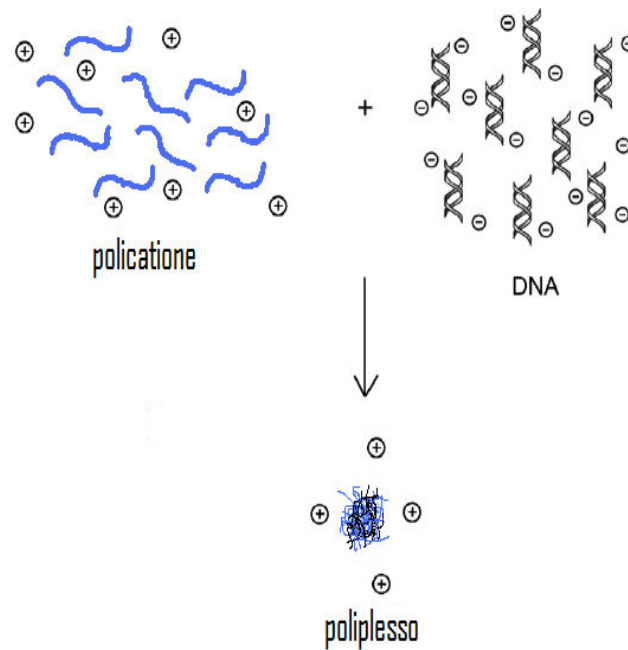


Figura 1.1. Formazione dei poliplessi: i vettori polimerici utilizzati nel gene delivery hanno carattere policationico. Tale caratteristica consente l'interazione con le numerose cariche negative del DNA.

La formazione di aggregati nel sangue tra poliplessi e componenti plasmatiche, siano esse cellule circolanti o proteine, ne influenza la biodistribuzione. In particolare, subito dopo l'iniezione l'80-90 % della dose si trova accumulata nel polmone, poi a causa della scarsa stabilità degli aggregati, i complessi vengono nuovamente rilasciati in circolo, dando luogo ad una ridistribuzione secondaria che porta a un'alta concentrazione dei complessi nelle cellule di Kupffer del fegato. Significative quantità di complesso sono inoltre accumulate nei tessuti endoteliali di altri organi, quali per esempio la milza o il midollo osseo [Verban F.J. et al., 2001; Kunath K. et al.,

2002]. Ciò riduce il tempo di emivita e rende inattuabile il targeting verso specifici tessuti, rendendo limitata l'effettiva applicazione terapeutica di tali sistemi.

1.4.1. Strategie di shielding

Una soluzione che consente di aumentare il tempo di permanenza dei complessi in circolo è dunque quella di schermarne la carica superficiale residua creando ad esempio una barriera sterica in superficie. Questo è attuabile legando ai complessi polimero/DNA un polimero idrofilico, il quale è in grado di conferire ai poliplessi:

- un aumento della solubilità;
- ridotta interazione con le proteine sieriche (per esempio, albumina), i fattori del complemento ed eritrociti;
- migliore biocompatibilità;
- prolungata circolazione ematica.

Un polimero altamente studiato per questi scopi è il polietilenglicole (PEG), ma anche altri polimeri idrofilici come il poli-idrossipropilmetacrilato (pHPMA) [Fisher K.D. et al., 2000; Carlisle R.C. et al., 2004], l'acido ialuronico [Hornof M. et al., 2008] o la proteina sierica transferrina [Kircheis R. et al., 2001] sono stati utilizzati per ridurre la carica superficiale dei poliplessi.

1.4.2. Meccanismo di uptake

I sistemi per la veicolazione di materiale genetico di tipo non virale non possono attraversare la membrana cellulare per semplice diffusione a causa delle loro elevate dimensioni, essi pertanto sono solitamente catturati dalle cellule ed internalizzati in vescicole attraverso un processo noto come endocitosi. Mentre per la maggior parte dei lipidi cationici, l'uptake dei lipoplessi risultanti avviene maggiormente attraverso un meccanismo endocitotico clatrina-dipendente, è stato visto che per i poliplessi il meccanismo di uptake è maggiormente condizionato dal polimero utilizzato e dalla linea cellulare [Midoux P. et al., 2008]. Un meccanismo identificato per l'uptake dei poliplessi è anche quello mediato da caveole. In generale appare che l'uptake dei poliplessi può avvenire con entrambi i meccanismi (clatrina-mediato e caveola-mediato) e che i due processi non sono comunque esclusivi e possono avvenire simultaneamente nella stessa cellula [Midoux P. et al., 2009].

La presenza di porzioni idrofiliche presenti nel policatione, atte a schermare le cariche positive del complesso formato col materiale genetico, può anche diminuire l'efficienza di transfezione, ciò a causa della riduzione delle interazioni dei poliplessi con la membrana cellulare della cellula target [Edinger D. et al., 2011].

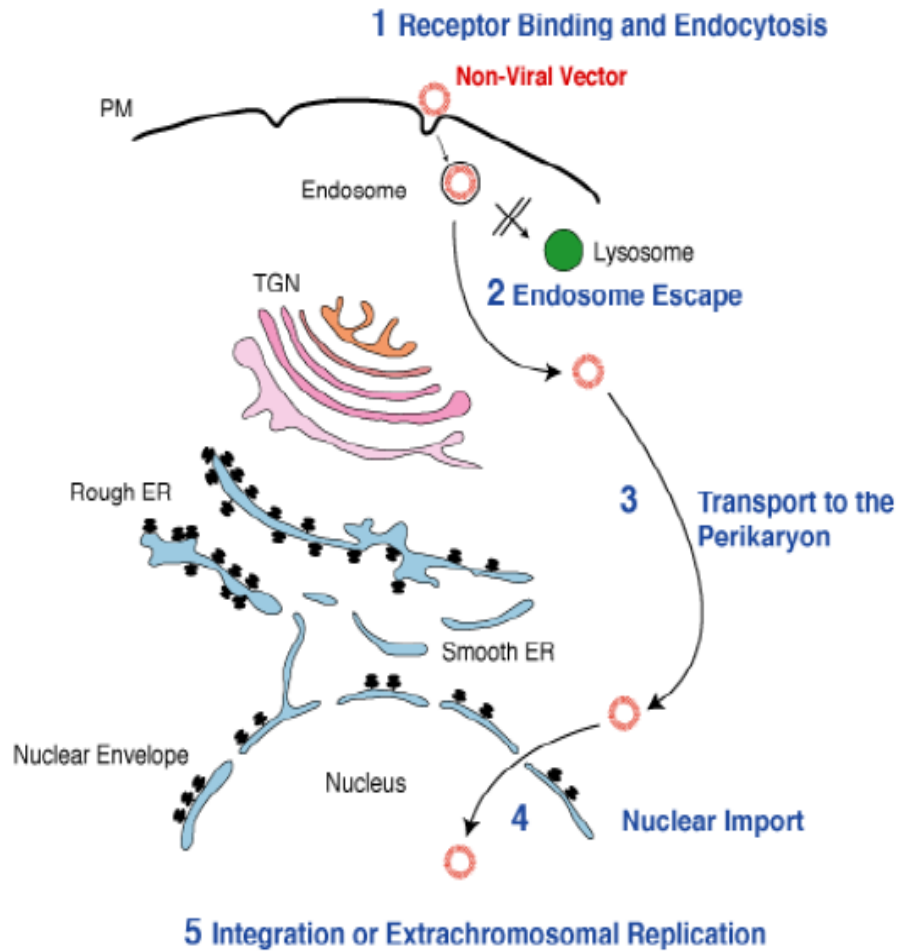


Figura 1.2. Rappresentazione schematica dei momenti principali della transfezione.

1.4.3. Uptake mediato da ligandi e targeting attivo

Per risolvere il problema della riduzione dell'efficienza di transfezione dovuta alle minori interazioni con la superficie cellulare è possibile utilizzare dei ligandi chimicamente legati alla struttura dei poliplessi e capaci di indurre non solo un'augmentata efficienza di internalizzazione ma anche specificità cellulare. In tal modo il gene terapeutico può

essere veicolato in cellule specifiche ottenendo così un direzionamento attivo (targeting attivo). Infatti, la presenza di un opportuno ligando nel policoniugato offre la possibilità di indirizzare i policoniugati ottenuti verso definite cellule target. In effetti specifiche interazioni tra ligandi ed i recettori sulla membrana cellulare possono mediare l'endocitosi recettore-dipendente dei policoniugati attraverso un meccanismo clatrina dipendente, come precedentemente spiegato, risultante in un aumentato uptake cellulare [Bareford L.M. et al., 2007].

I ligandi utilizzati a tale scopo possono essere endogeni (quindi molecole fisiologicamente presenti nell'organismo, ad es. acido folico, transferrina, fattori di crescita ecc...), carboidrati (galattosio, mannosio), anticorpi o cell penetrating peptides (CPP). La scelta del ligando opportuno è legata a diversi fattori. I ligandi endogeni, per esempio, sono molto utilizzati grazie alla loro biocompatibilità, alla ben conosciuta distribuzione del loro recettore a livello cellulare e alla disponibilità a basso costo. Comunque, la loro natura di molecole fisiologiche genera competizione tra ligando libero, normalmente presente nell'organismo, e ligando usato come agente direzionante, cosa che diminuisce l'effetto desiderato. Di contro, i ligandi esogeni, come peptidi e anticorpi, non presentano tale inconveniente ma,

essendo riconosciuti dal sistema immunitario come not-self, possono produrre risposte immunitarie che ne limitano fortemente l'uso [Schatzlein A.G. et al., 2003]. In tabella 1.1 è mostrato un elenco dei ligandi sopracitati che sono stati coniugati ai polimeri, per un efficiente rilascio del materiale genetico terapeutico in specifiche cellule che esprimono l'opportuno recettore.

Tabella 1.1. Elenco dei ligandi utilizzati per il targeted uptake in gene delivery.

Target ligand	Polimero	Recettore target	Cellula/tessuto target
Peptide	Peptide RGD	PEI PEI-PEG Poli(β -amino estere)	Integrina $\alpha_v\beta_3$ Cellule di melanoma umano
	Peptide LHRH	siRNA-PEG PAMAM	Recettore LHRH Tessuto tumorale
Proteina	Lactoferrina	PAMAM-PEG	Recettore lactoferrina cervello
	Transferrina	PEI	Recettore per la transferrina Cellule di epitelio bronchiale
	EGF RAP (recettore associato alle proteine)	PAMAM-PEG PLL, PDL	Recettore EGF Recettore LDL Cervello Tessuto tumorale Cellule di epatoma umano
Anticorpi	Anti-JL1	PLL	JL-1 Cellule T leucemia umana
	Recettore chimerico anti EGF	PAMAM	Recettore EGF Tessuto tumorale
	Anti-CD90	PEI	CD90 Fibroblasti
Zuccheri	Galattosio, lattosio	PEI-PVP	Asialglicoproteine Cellule di epatoma
	Mannosio	siRNA-PEG PLL	Recettore per il mannosio Macrofagi Cellule dendritiche
Vitamine	Folato	Chitosano PLL-PEG PEI-PEG	Recettore per il folato Tessuto tumorale

I modi con cui è possibile legare questi ligandi ai poliplessi sono principalmente distinguibili in quattro tipologie:

- coniugati ligando-policatione;
- coniugati ligando-spaziatore-policatione;

- coniugati ligando-acido nucleico;
- coniugati ligando-spaziatore-acido nucleico.

Varie molecole di ligandi sono comunemente legati ai polimeri con o senza uno spaziatore (figura 1.3). Lo spaziatore generalmente utilizzato è il polietilenglicole (PEG), in cui le molecole dei ligandi sono legate all'estremità più lontana per esporle sulla superficie dei polimeri, mantenendo costante la loro stabilità. Il coniugato PEG-ligando formato è poi legato al polimero.

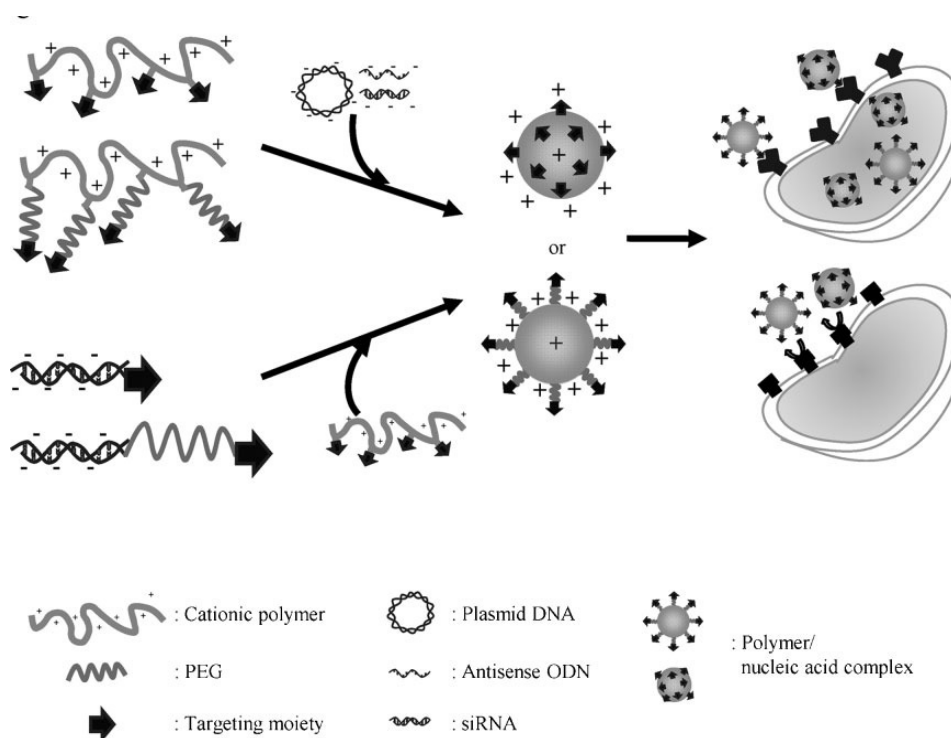


Figura 1.3. Illustrazione schematica per il targeted delivery dei complessi polimero/acido nucleico usando quattro tipologie di strategie via endocitosi mediata dal recettore [Mok H. et al., 2009].

La coniugazione diretta di un ligando ad una corta catena di oligodesossinucleotide o ad una molecola di siRNA piuttosto che ad un plasmide (pDNA), spesso esibisce un uptake anche senza l'ausilio di un carrier polimerico, sebbene si potrebbe parzialmente compromettere l'attività dell'acido nucleico durante il processo di coniugazione [Chu T.C. et al., 2006]. Si è inoltre notato che i coniugati diretti agli acidi nucleici possono presentare difficoltà nel rilascio dall'endosoma (endosomal escaping) nel citosol, comportando un limitato effetto terapeutico [Derfus A.M. et al., 2007].

1.5. MECCANISMI D'USCITA DALL'ENDOSOMA

Quando i poliplessi sono internalizzati per endocitosi mediata da clatrina, essi vengono sequestrati in una vescicola endosomica e possono essere degradati per fusione di questa con un lisosoma che contiene un complesso pool di enzimi. La fuga dall'endolisosoma, prima che avvenga la degradazione del poliplesso è pertanto un punto essenziale nel gene delivery (figura 1.4). Vi sono diverse metodiche che permettono al poliplesso di sottrarsi alla degradazione lisosomiale, tra le quali l'incorporazione, nella struttura polimerica costituente il vettore, di ammine protonabili a pH dell'endolisosoma, di peptidi di

rilascio endosomico chiamati peptidi fusogenici e mediante l'utilizzo di vettori che presentano segmenti fusogenici.

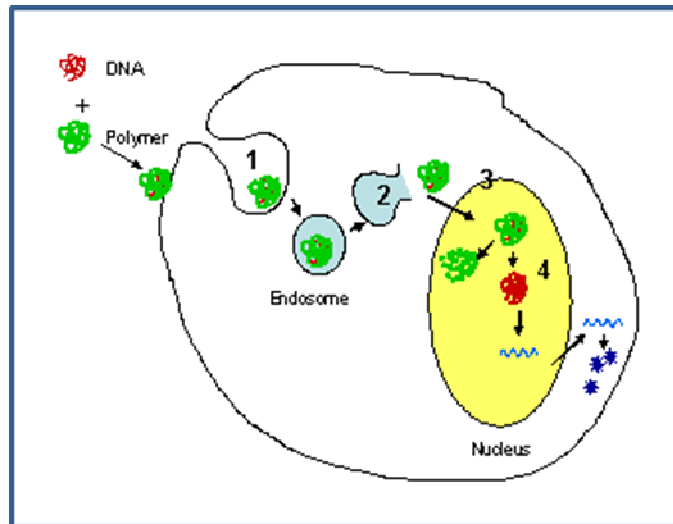


Figura 1.4. Meccanismo di transfezione, come è possibile vedere in figura nel punto 1 si ha l'invaginazione della membrana cellulare che porta alla formazione dell'endosoma. Nel punto 2 si può vedere l'uscita dall'endosoma del poliploso il quale rappresenta un passaggio fondamentale nel gene delivery. Ciò consente di sottrarsi alla degradazione evitando che l'endosoma si trasformi in endolisosoma.

1.5.1. Effetto proton sponge

Indipendentemente dal meccanismo di uptake endocitotico, i poliplessi seguono invariabilmente lo schema del percorso endolisosomiale [Remy-Kristensen A. et al., 2001]. Il lisosoma, tappa ultima del percorso endolisosomiale, è caratterizzato da un basso pH (approssimativamente uguale a 5) e dalla presenza di nucleasi in grado di distruggere il DNA contenuto nei poliplessi. Quindi, per poter avere una efficacia terapeutica, una frazione dei complessi (anche la sola componente acido-nucleica) deve evitare tale percorso e rilasciare il

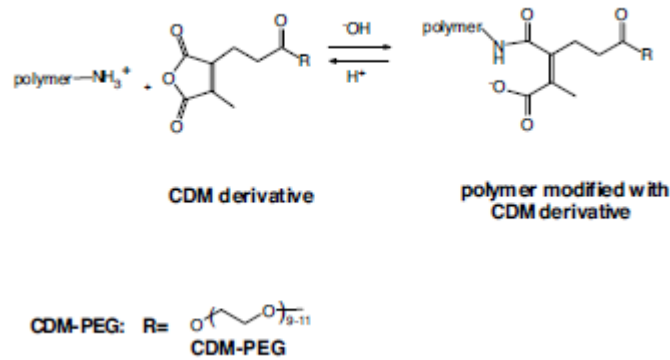
DNA rapidamente, prima che intervengano i processi degradativi [Merdan T. et al., 2002]. Molto importanti a tal proposito sono quei sistemi che possono “sfuggire” all’endosoma mediante un fenomeno chiamato “proton sponge effect” (spugna protonica). Quest’effetto si basa sulle capacità tamponante di molti sistemi polimerici che una volta dentro l’endosoma tendono ad alzare il pH inattivando gli enzimi lisosomiali che richiedono un pH acido ottimale per essere attivi e provocando un aumento dell’influsso di protoni e ioni cloruro a causa del temporaneo effetto di protonazione di gruppi funzionali degli stessi polimeri [Boussif O. et al., 1995]. Ciò si traduce in un incremento della pressione osmotica intravesicolare che causa il richiamo di acqua per diffusione passiva dall’ambiente citosolico. Il conseguente swelling della vescicola porta alla rottura o all’indebolimento dell’endosoma stesso che rilascia il suo contenuto nel citoplasma [Boussif O. et al., 1995].

Questo è stato dimostrato per polimeri come la Polietilenimina (PEI), che contiene gruppi aminici protonabili, agenti da base debole in mezzo acido. La PEI è in grado non solo di complessare il DNA in particelle sferiche omogenee (100nm), ma anche di transfettare efficacemente sia in vitro che in vivo [Boussif O. et al., 1995; Campeau P. et al., 2001].

Grazie alla sua protonabilità a pH 6, anche l'anello imidazolico dell'istidina si è dimostrato un utile promotore del proton sponge effect qualora venisse inserito nella struttura di un copolimero. Ne sono esempi: la polilisina istidilata (HPK) [Pichon C. et al., 2000]; il chitosano imidazol-modificato [Kim T.H. et al., 2003; Jin H. et al., 2006; Jin H. et al., 2008]; il poli dimetilaminoetilamina(His-(Boc)-OMe)fosfazano (PDHP). Quest'ultimo è un interessante sistema sintetizzato coniugando residui di His(Boc)O-Me e dimetilaminoetilamina (DMAEA) sul backbone del poli(diclorofosfazano) [Yang Y. et al., 2008]. Tale copolimero istidilato, di peso molecolare 17,1 KDa, contiene un rapporto molare His(Boc)-OMe/DMAEA di 0.4/1.6, ed è in grado di dare poliplessi di dimensioni di 110 nm a rapporti polimero/DNA di 10/1 (p/p). Tali sistemi per il gene delivery hanno mostrato una efficienza di transfezione superiore rispetto a poliplessi costituiti utilizzando poliistidina e PEI, mantenendo bassa citotossicità [Midoux P. et al., 2009].

La presenza di porzioni idrofiliche nel policatione atte a schermare le cariche positive non solo riduce l'efficienza di transfezione per il motivo precedentemente detto, ma si ha un ulteriore contributo alla riduzione della transfezione a causa di un minore effetto proton sponge. Questo problema può essere risolto utilizzando

delle strategie di deshielding, sfruttando specifiche variazioni chimico-fisiche dei microambienti, usufruendo quindi di un legame tra il PEG ed il carrier polimerico che sia stabile nel torrente ematico e che venga rimosso rapidamente all'interno delle cellule bersaglio. Ciò è realizzabile utilizzando ponti disolfuro che sono ridotti nell'ambiente riduttivo intracellulare [Carlisle R.C. et al., 2004], o sfruttando legami pH sensibili come quelli acetalici o mediante un derivato PEGilato dell'anidride maleica (schema 1.1 e figura 1.5), i quali nell'ambiente acido dell'endosoma si idrolizzano liberando il poliplesso e ripristinando la capacità del polimero di dare effetto proton sponge [Walker G.F. et al., 2005; Oishi M. et al., 2005; Fella C. et al., 2008; Knorr V. et al., 2007]. Ciò comporta un aumento dell'efficienza di transfezione fino a valori 100 volte (ed anche più) superiore rispetto ai poliplessi ottenuti con derivati PEGilati che presentano legami stabili al pH endosomiale.



Schema 1.1 Formazione di un derivato PEGilato pH sensibile (CDM= anidride carbossidimetil maleica).

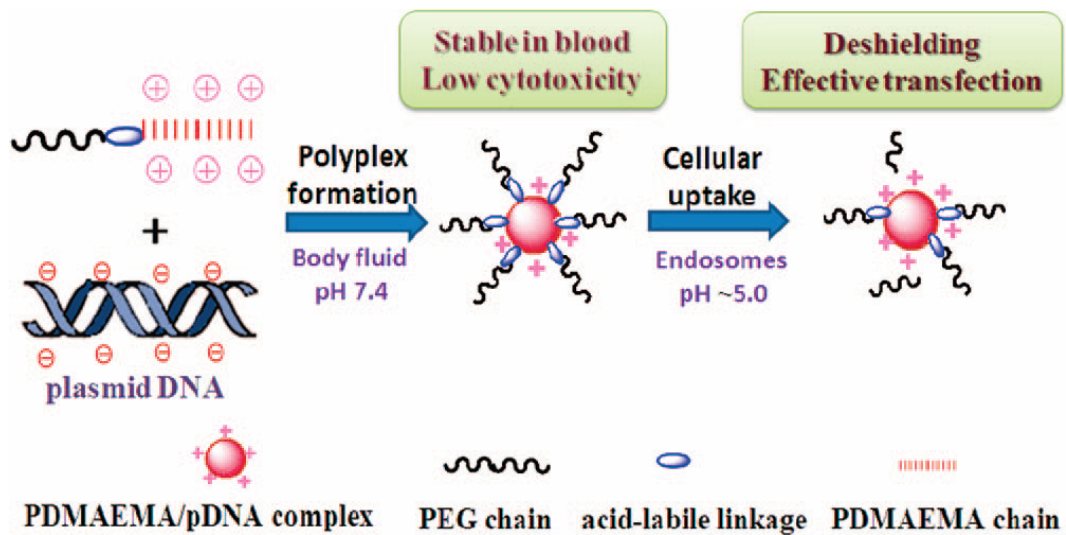


Figura 1.5. Illustrazione di una deschermatura pH-sensibile di poliplessi [Lin S. et al., 2008]

1.5.2. Peptidi per il rilascio endosomiale. Peptidi fusogenici

Alcuni polimeri non sono in grado di destabilizzare la membrana dell'endosoma mediante effetto proton sponge, un esempio

di tali polimeri è la poli(L-lisina) (PLL). In questo caso, è possibile incorporare nei poliplessi dei domini litici naturali o sintetici, atti a conferire ai sistemi la capacità di destabilizzare la membrana endosomiale. In effetti, molti virus adottano questa strategia per superare efficacemente tale barriera. Un esempio è dato dall'emoagglutinina una glicoproteina antigenica presente sulla superficie di alcuni virus, come per esempio nel virus dell'influenza (HA2), la quale subisce, in risposta alla diminuzione del pH all'interno dell'endosoma, un cambiamento conformazionale della struttura terziaria. Inoltre, nel caso specifico, la proteina può subire un addizionale cambiamento conformazionale nella struttura secondaria, risultante in un α -elica di residui amminoacidici anfipatici che genera un poro nella membrana endosomiale della cellula ospite. L'incorporazione di analoghi sintetici di tali peptidi/proteine virali, sia covalentemente che ionicamente, ha notevolmente migliorato l'efficienza di transfezione dei poliplessi (circa 1000 volte più grande) [Wagner E. et al., 1992; Plank C. et al., 1994; Nishikawa M. et al., 2000; Zauner W. et al., 1995; Haensler J. et al., 1993; Wyman T.B. et al., 1997].

Oltre ai peptidi di fusione di derivazione virulenta sono stati incorporati nella formulazione dei poliplessi, proteine di fusione

derivate da batteri [Saito G. et al., 2003], tossine ed altri fonti naturali come ad esempio la mellitina (Mel).

Gli agenti fusogenici possono essere classificati in due categorie:

- Quelli con una specifica attività al pH endosomiale (come peptidi contenenti residui acidi) i quali non sono litici a pH 7.4, ma lo diventano a valori di pH più bassi;
- Quelli mostranti un'attività litica indipendente dal pH, associata ad una considerevole tossicità, come quella della mellitina libera o della Listeriolisina O (LLO) presente nel batterio *Listeria monocytogenes*. Sono stati usati dei precursori della LLO e Mel contenenti dei ponti disolfuro, che rendono tali agenti fusogenici meno attivi al di fuori dell'ambiente intracellulare [Saito G. et al., 2003; Chen C.P. et al., 2006].

Un'ulteriore strategia molto efficace per utilizzare la mellitina come agente fusogenico, riducendone la tossicità, è data dal temporaneo mascheramento delle cariche positive dei residui di lisina della stessa molecola. Ciò è realizzabile mediante l'acilazione dei gruppi amminici con l'anidride dimetil maleica (DMMA) o analoghi dialchil derivati [Rozema D.B. et al., 2003]. Tali modificazioni

chimiche riducono l'attività litica delle molecole di mellitina a pH fisiologico, ma idrolizzandosi a pH endosomiale rendono nuovamente disponibili i gruppi amminici, ripristinando l'azione litica della molecola nei confronti della membrana dell'endosoma.

1.5.3. Vettori polimerici con segmenti fusogenici

Oltre ad utilizzare i peptidi fusogenici per favorire l'uscita dall'endosoma è possibile utilizzare un'alternativa più economica e sicura. Si tratta di progettare vettori che presentano dei segmenti poliacidi pH sensibili, capaci di dar luogo alla lisi della membrana endosomiale e consentire in tal modo la fuoriuscita del poliplesso nel citoplasma. Un esempio è dato da un copolimero amfilico costituito da unità di acido metacrilico ed unità di butilacrilato che mima l'attività litica pH-specifica di peptidi virali per il rilascio di materiale genetico nell'ambiente intracellulare, figura 1.6 [Bulmus V. et al., 2003; Murthy N. et al., 2001; Lackey C. et al., 2002].

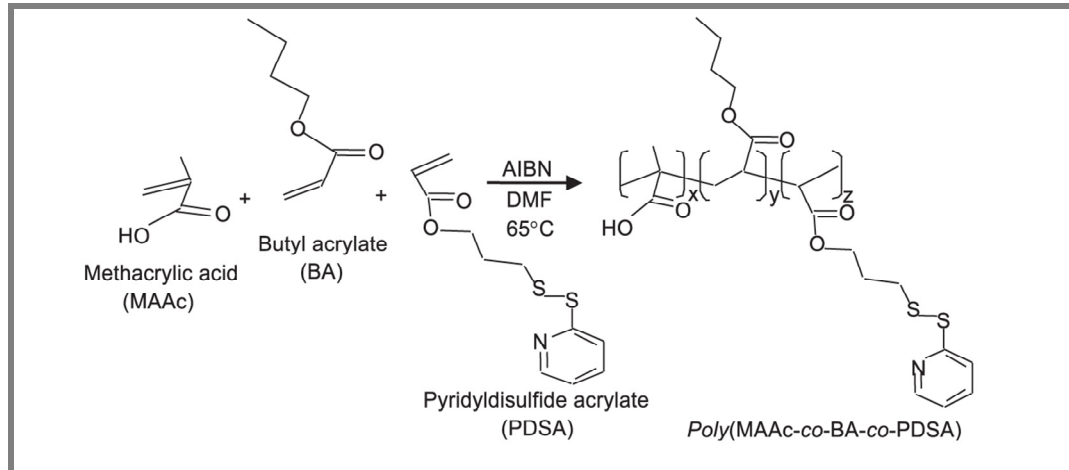


Figura 1.6. Sintesi di un copolimero capace di mimare l'azione litica dei peptidi fusogenici [Bulmus V. et al., 2003].

I gruppi carbossilici presenti nel polimero sono ionizzati a pH superiore al pKa conferendo al copolimero una conformazione random coil. A pH inferiore al pKa si verifica un aumento dei residui idrofobici che portano ad un cambiamento della conformazione del polimero, che attraverso l'interazione dei gruppi metilici con la membrana endosomiale provocano instabilità nella struttura vescicolare, causandone la rottura.

Altri polimeri capaci di causare la rottura della membrana endosomiale sono riportati in figura 1.7.

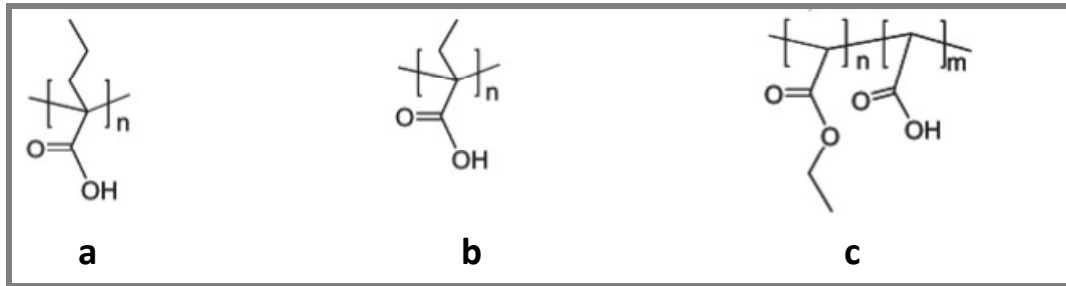


Figura 1.7. Polimeri capaci di dare endosomal escaping. **a)** acido poli(propilacrilico); **b)** Acido poli(etilacrilico); **c)** Acido poli(etilacrilato-co-acrilico).

In questo genere di polimeri, l'equilibrio tra le componenti idrofiliche ed idrofobiche, così come il peso molecolare del polimero, devono essere accuratamente adattati, al fine di mantenere la capacità del sistema di distruggere la membrana nell'intervallo di pH dell'endosoma (5.0-6.5) [Murthy N. et al., 2001].

1.6. PROPRIETÀ STRUTTURALI E FUNZIONALI DEI POLIMERI USATI IN TERAPIA GENICA.

Sistemi polimerici per la terapia genica richiedono dunque uno spettro di proprietà tali da renderli adatti a questa specifica applicazione. In particolare per ottenere un efficiente sistema per il gene delivery polimerico bisogna considerare:

- la necessità di disporre nello stesso sistema polimerico di specie monomeriche differenti ciascuna delle quali apporti al vettore

risultante una caratteristica specifica (es.: porzioni oligomeriche che contengono gruppi carichi positivamente o protonabili);

- l'influenza della struttura dei polimeri (architettura e topologia) sulla loro capacità di condensare il DNA e sulle proprietà chimico fisiche del vettore risultante.

I polimeri cationici adoperati in terapia genica comprendono polipeptidi sintetici, poli-(L-lisina) (PLL), polietilenimina (PEI), poli(β -aminoesteri), dendrimeri cationici (PAMAM), derivati polimerici a base di carboidrati come quelli del chitosano e 2-dimetil(amminoetil) metacrilato (DMAEMA).

La poli-(L-lisina) (PLL) figura 1.8A è uno dei polimeri cationici comunemente usati, la quale forma efficacemente complessi polielettrolitici di dimensioni nanometriche con gli acidi nucleici grazie al gruppo amminico primario dei residui di lisina. Comunque la PLL presenta solo questi gruppi amminici nel backbone i quali risultano insufficienti per facilitare l'endosomal escaping dei poliplessi nel citosol. Per conferire tale proprietà alla PLL è stata proposta la coniugazione di peptidi in grado di alterare l'integrità della membrana dell'endosoma come i peptidi fusogenici o mediante l'uso di peptidi che possano a pH endosomiale dare luogo all'effetto proton

sponge come ad esempio la poli-istidina [Read M.L. et al., 2005; Lee H. et al., 2002].

La poli(etilenimina) (PEI) è un polimero cationico ottenuto dall'aziridina il quale mostra un'efficacia di transfezione di gran lunga superiore rispetto alla PLL. A causa della sua alta densità di carica consente la formazione di poliplessi più compatti con gli acidi nucleici ed ha una buona capacità tampone, che conferisce una maggiore capacità di dare endosomal escaping. In particolare, la branched PEI (bPEI) (figura 1.8B) ha gruppi amminici primari, secondari e terziari che forniscono sufficiente attività tampone al pH endosomiale, facilitando l'endosoma escape degli acidi nucleici per effetto proton sponge [Boussif O. et al., 1995]. PEI di alto peso molecolare mostrano gravi problemi di tossicità rendendo la loro applicazione clinica difficile, nonostante l'elevata efficienza nel gene delivery. La linear PEI (LPEI) (figura 1.8C) ha solo gruppi amminici secondari nel backbone eccetto per i gruppi amminici primari terminali, presenta una maggiore tossicità della bPEI avendo un'efficienza di transfezione paragonabile [Jeong J.H. et al., 2001]. Per ridurre la citotossicità della PEI pur mantenendo alta l'efficienza di transfezione la PEI è stata coniugata al polietilenglicole (PEG), ottenendo un copolimero i cui

poliplessi hanno rivelato una minore tossicità cellulare, ma minore capacità transfettante rispetto ai poliplessi ottenuti con la sola PEI.

Attualmente la ricerca è orientata verso la coniugazione di oligoetileneimine (OEI) dal peso molecolare di 800-1000 Da a polimeri di più alto peso molecolare aventi una marcata biocompatibilità. Infatti, sono stati sintetizzati copolimeri biodegradabili della PEI (0.8 KDa) mediante cross-linking di queste molecole sfruttando legami pH-sensibili ai valori dell'ambiente endosomiale (pH 4-5). Si è potuto osservare che i copolimeri ottenuti con OEI800, la quale da sola presenta un'efficienza di transfezione molto bassa, hanno mostrato un'efficienza di transfezione paragonabile a quella della PEI da 25KDa, ma con valori di vitalità cellulare di gran lunga più alti [Knorr V. et al., 2008 (A)].

I poli(β -aminoesteri) sono polimeri biodegradabili con legami esterei nel backbone, i quali facilitano la decomplessazione dei poliplessi al valore del pH endosomiale (figura 1.8D). I poli(β -aminoesteri) sono stati preparati mediante la coniugazione di monomeri amminici primari o secondari a vari monomeri acrilati attraverso reazioni di addizione di Michael. Questi polimeri hanno mostrato una maggiore efficienza di transfezione ed una minore citotossicità rispetto alla PEI, che potrebbe essere attribuita alla

degradabilità dei legami esterei del backbone nelle condizioni di pH acido dell'endosoma. [Akinc A. et al., 2003 (A); Akinc A. et al., 2003 (B)].

Dendrimeri Poli(AMido Amine) in acronimo (PAMAM) sono costituiti da sistemi tridimensionali altamente ordinati ed iper-ramificati (figura 1.8E) che vengono designati da un numero di generazioni (G_n). Hanno la caratteristica di essere monodispersi con peso molecolare di 500-1000 KDa e possiedono un grande rapporto superficie-volume a numeri di generazioni bassi. I dendrimeri cationici sono i più studiati in gene delivery e sono sintetizzati mediante polimerizzazione graduale da iniziatori come etilendiammina [Kukowska-Latallo J.F. et al., 1996]. Con l'aumento del numero di generazioni si ha un aumento dell'efficienza di transfezione, ma contemporaneamente aumenta la citotossicità [Kukowska-Latallo J.F. et al., 1996; Duncan R. et al., 2005]. Infatti, la tossicità di dendrimeri di generazione 4 (peso molecolare di 14215 Da) è risultata simile a quello della PLL di 56KDa. Una somministrazione intravenosa di complessi ottenuti tra dendrimeri PAMAM di generazione 9 ed un plasmide, al rapporto N/P pari a 5, ha mostrato espressione genica solo nei polmoni, suggerendo che i dendrimeri potrebbero essere applicati come un efficace carrier per il

gene delivery polmonare [Kukowska-Latallo J.F. et al., 2000]. Inoltre, complessi ottenuti con dendrimeri PAMAM di generazione 7 e siRNA, hanno mostrato un effetto di silenziamento genico ad un rapporto N/P di 10 nell'espressione della luciferasi nelle cellule A459 [Zhou J. et al., 2006].

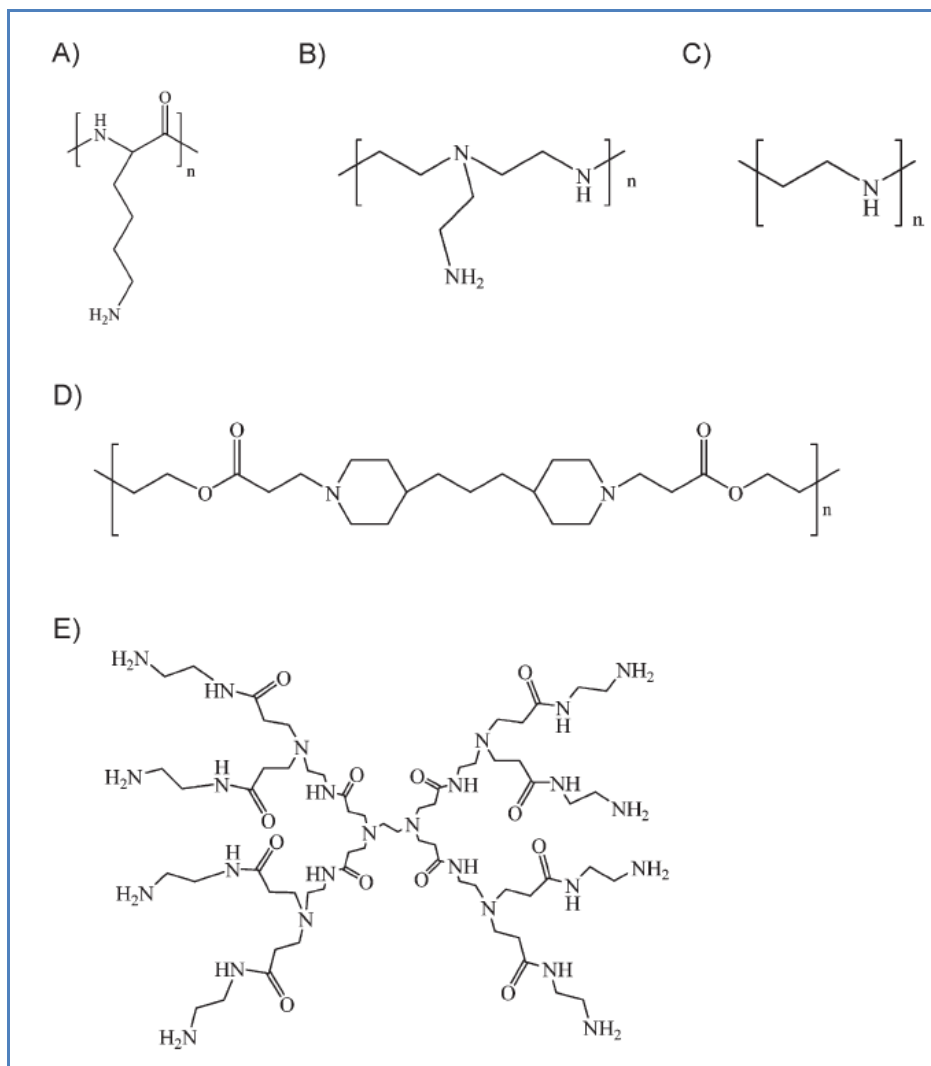


Figura 1.8. (A) poli-(L-lisina) (PLL), (B) branched PEI, (C) linear PEI, (D) poli(β -aminoestere), e (E) poli(amido amine) (PAMAM).

Il chitosano (CTS) è uno dei polimeri cationici naturali utili per il gene delivery. È un polisaccaride lineare composto da legami β -(1,4) D-glucosammina ed N-acetil-D-glucosammina, (figura 1.9); esso è un polimero biodegradabile ed altamente biocompatibile e non tossico perché degradato in N-acetilglucosammina dai lisozimi del corpo. In realtà, non si tratta di un vero e proprio policatione visto che non possiede cariche positive fisse, ma gruppi amminici protonabili (pKa 6.5). Per tale motivo il chitosano presenta una densità di carica minore a pH fisiologico che gli conferisce scarsa tossicità. Comunque, l'applicazione di CTS è stata spesso significativamente limitata a causa della sua scarsa solubilità a pH fisiologico, a causa del suo pKa. Inoltre, CTS non modificato ha mostrato una efficienza di transfezione piuttosto bassa sia in vitro che in vivo. Per queste ragioni, sono stati proposti vari derivati del CTS solubili in acqua per migliorarne la transfezione a pH fisiologico [Kumar M.N. et al., 2004]. Per esempio, Lu et al. hanno sintetizzato un copolimero del CTS graftato con PEI di basso peso molecolare come gene vector, il quale ha mostrato bassa citotossicità ed efficienza di transfezione paragonabile alla PEI (25 kDa) in vitro [Lu B. et al., 2008].

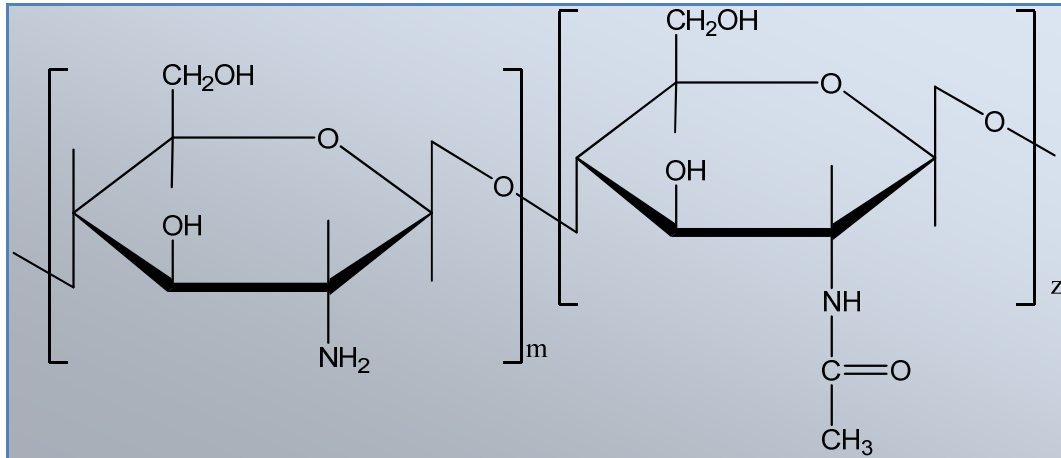


Figura 1.9. Struttura del chitosano

Omopolimeri del poli(2-(N,N-dimetilamino)etil metacrilato) (*pDMAEMA*) sono ottimi polimeri per la veicolazione del materiale genetico, con un'elevata capacità di proteggerlo dalla degradazione da parte delle nucleasi [Wetering P. et al 1999; Zhu C. et al., 2010; Georgiou T.K. et al 2005]. Polimeri ben definiti di *pDMAEMA* sono stati sintetizzati mediante la tecnica dell'Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP), la quale fa parte di una classe di reazioni radicaliche controllate (Controlled Radical Polymerizations CRPs) utilizzando come monomero, il 2-(N,N-dimetilamino)etil metacrilato (*DMAEMA*). Questo monomero presenta un'ammina terziaria con un *pKa* di circa 7.5, tale cioè da essere protonato per metà a pH fisiologico e quindi da avere buone capacità complessanti, la presenza peraltro di metà circa di gruppi amminici terziari non protonati può conferire effetto proton sponge al poliplesso ottenuto con il plasmide.

[Wetering P. et al 1999; Zhu C. et al., 2010]. Il pDMAEMA possiede un effetto proton sponge inferiore alla PEI, implicando un meccanismo alternativo per l'endosomal escape. Infatti, possiede un'intrinseca proprietà di destabilizzare la membrana dell'endosoma [Layman J.M. et al., 2009] che, combinata con una facile dissociazione dei poliplessi, una volta presenti nel citosol e/o nel nucleo, conferiscono al polimero un'elevata efficienza di transfezione [Wetering P. et al 1999]. La classe di polimeri di pDMAEMA è stata intensamente studiata da Hennink e dai suoi collaboratori, i quali hanno dimostrato che omopolimeri con peso molecolare (Mw) di 300 kDa sono efficaci gene vectors [Cherng J.Y. et al., 1996] e che, con l'aumento del peso molecolare, si ha un aumento della capacità complessante, dell'efficienza di transfezione, ma anche un contemporaneo aumento della tossicità [van de Wetering P. et al., 1997; Arigita C. et al., 1999].

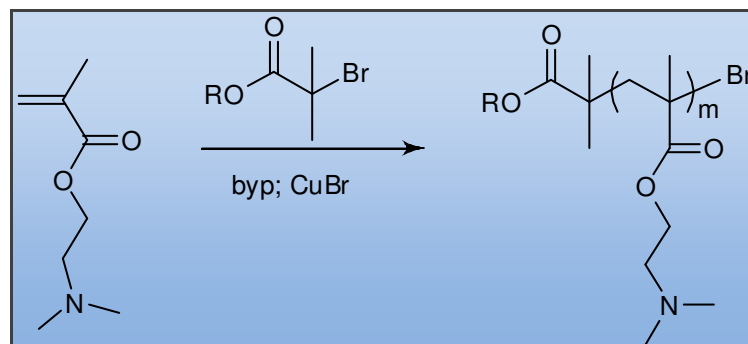


Figura 1.10. Schematizzazione della sintesi dell'omopolimero del pDMAEMA

Da quanto fin qui visto, risulta evidente che in base al tipo di polimerizzazione, i poliplessi ottenuti avranno proprietà chimico fisiche diverse. Ciò in base: al backbone del polimero scelto ed alle molecole ad esso coniugate. In altri termini, il design dei polimeri è il fulcro dello sviluppo di carriers efficienti per il gene delivery. Informazioni utili per tale scopo sono: la conoscenza dei processi di up-take e di rilascio degli acidi nucleici, e particolarmente importante per lo sviluppo dei polimeri, esatta struttura e migliore correlazione struttura-attività.

Ad oggi esistono diverse metodologie per ottenere polimeri, e fra queste, vi sono le tecniche radicaliche convenzionali e controllate. I metodi di polimerizzazione radicalica controllata consentono di ottenere copolimeri con composizione, architettura e funzionalizzazione ben definita. Questi processi di polimerizzazione sono riconducibili ad un gruppo di reazioni di polimerizzazione radicalica, che differiscono da quella convenzionale per il grande controllo ottenibile sugli elementi chiave del processo di polimerizzazione. Questi metodi prendono complessivamente il nome di Controlled Radical Polymerizations (CRPs). L'inconveniente principale della polimerizzazione radicalica convenzionale è infatti quello di fornire polimeri con polidispersità generalmente elevata,

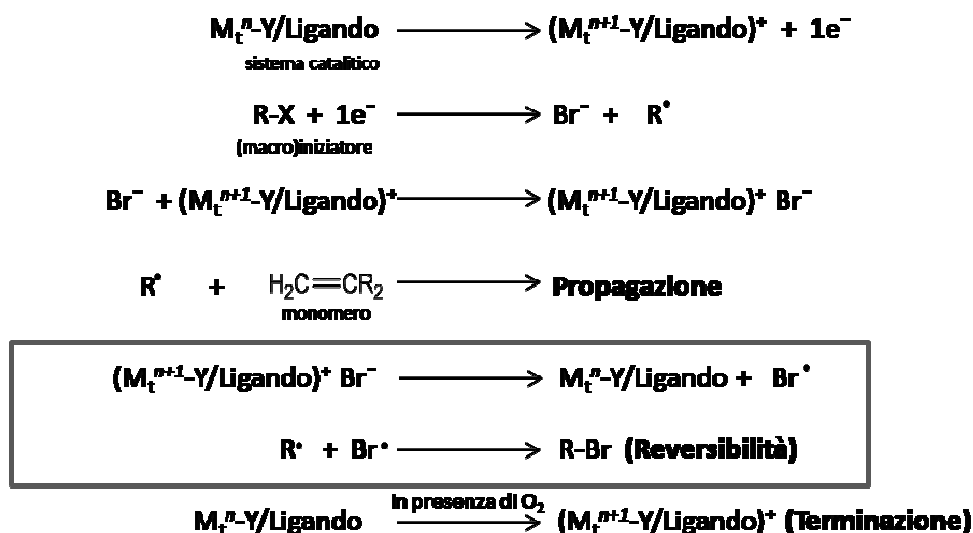
cioè con una elevata distribuzione dei pesi molecolari delle catene polimeriche ottenute. Tra le CRPs, la polimerizzazione radicalica a trasferimento atomico (ATRP, *Atom Transfer Radical Polymerization*) ha avuto e continua ad avere un enorme successo grazie alla sua applicabilità a numerosi tipi di monomeri e grazie al suo valore sintetico e tecnologico, in quanto permette di sintetizzare, in maniera versatile e con condizioni di reazione moderate, polimeri con composizione eterogenea e con diversa topologia, che trovano una sempre maggiore applicazione nel campo della ricerca farmaceutica anche come sistemi per il gene delivery.

1.7. Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP).

La tecnica di ATRP è una polimerizzazione radicalica controllata, effettuata in presenza di specie in grado di reagire in modo reversibile con il radicale della catena crescente.

Il controllo sulla polimerizzazione radicalica è basato su due principi. Il primo riguarda la rapidità del processo di iniziazione, che determina un numero costante di catene polimeriche in accrescimento. In secondo luogo la maggior parte delle catene polimeriche in accrescimento esistono come specie dormienti che conservano però la

capacità di crescere grazie all'equilibrio dinamico che si instaura con il radicale di propagazione [Coessens V. et al., 2001]. Il meccanismo è illustrato nello Schema 1.2.



Schema 1.2 Insieme di reazioni elementari costituenti il meccanismo di ATRP

Il sistema di reazione è multicomponente ed è costituito dal monomero, da un iniziatore R-X (X = alogeno), da un catalizzatore costituito da un complesso di un metallo di transizione M_t^n e da un opportuno legante L. Il metallo di transizione utilizzato nelle reazioni di ATRP può essere il rame [Davis K. et al., 1997; Wang J.S. et al., 1995 (A)], rutenio [Simal F. et al., 1999] e ferro [Teodorescu M. et al., 2000]. Si è potuto notare però che il rame sembra essere migliore rispetto ad altri metalli di transizione, per la produzione di poliacrilati

ben definiti con bassa polidispersità; ciò è probabilmente dovuto alla rapida disattivazione dei radicali acrilici di accrescimento da parte dell'alogenuro di rame. Inizialmente il radicale, la specie attiva, viene generato attraverso un processo reversibile ossido-riduttivo catalizzato dal metallo di transizione complessato. Dopo la prima reazione di inizio, il radicale terminale della catena polimerica (radicale di propagazione R^{\cdot}) può reagire con il monomero dando origine a polimerizzazione oppure con la specie $M_t^n-Y/L+Br^{\cdot}$ e formare la specie dormiente $R-Br$. Quest'ultima può liberare nuovamente il radicale (si tratta infatti di una reazione reversibile) che potrà quindi reagire nuovamente con il monomero e proseguire così la polimerizzazione. In questo modo quello che si ottiene è la protezione della specie attiva e la conseguente drastica diminuzione della probabilità che essa possa dare reazioni di trasferimento o terminazione di catena, come avverrebbe invece in una polimerizzazione radicalica convenzionale. La costante di attivazione (k_{att}) è molto più piccola rispetto a quella di deattivazione (k_{deatt}) e questo permette la diminuzione della velocità delle reazioni di terminazione. Questo meccanismo di "attivazione-deattivazione" produce delle catene polimeriche mediamente di lunghezza uguale che

danno origine ad un polimero con peso molecolare controllato, con bassa polidispersità, con composizione e architettura controllate.

L'ATRP è una tecnica molto versatile, così come si evince dalla grande varietà di monomeri polimerizzati in varie applicazioni. I monomeri più reattivi nei confronti dell'ATRP sono i metacrilati, ma sono note polimerizzazioni che sfruttano anche la reattività di altri sistemi quali stireni sostituiti, glicidil acrilati, acrilonitrili, 4-vinilpiridine e metacrilammidi. Monomeri che non formano radicali stabilizzati per risonanza o per effetti induttivi non sono ancora stati polimerizzati con successo attraverso ATRP, probabilmente a causa del basso valore della costante di equilibrio ($K_{eq}=K_a/K_d$) [Coessens V. et al., 2001]. Infatti a parità di condizioni di polimerizzazione e con lo stesso catalizzatore, ciascun monomero presenta una propria K_{eq} di trasferimento atomico. In particolare il prodotto della K_{eq} e della K_p (costante di polimerizzazione) determina la velocità di polimerizzazione; quindi se la K_{eq} è molto bassa la reazione procede molto lentamente, al contrario, se la K_{eq} è troppo elevata, porta ad un maggior numero di terminazioni a causa della cospicua concentrazione del radicale e dello spostamento dell'equilibrio verso la formazione del metallo di transizione in forma ossidata [Queffelec J. et al., 2000]. Un gran numero di monomeri sono stati polimerizzati

con successo mediante ATRP per produrre polimeri a composizione strutturale ben definita. E' comunque importante che il monomero da utilizzare presenti un gruppo stabilizzante (fenile o carbonile) adiacente al carbonio radicalico, in maniera tale da mostrare una costante di equilibrio sufficientemente elevata, ma che non interferisca con il radicale in accrescimento e con il sistema catalitico. In più è necessario modulare opportunamente le condizioni di reazione (concentrazione, temperatura, catalizzatore) per ottenere un'adeguata concentrazione di radicale per uno specifico monomero.

Utilizzando monomeri con gruppi cationici o protonabili in condizioni fisiologiche, è possibile sfruttare l'ATRP per produrre polimeri utili nel gene delivery. Alcuni esempi di tali monomeri sono riportati in tabella 1.2.

Tabella 1.2 monomeri utilizzati per la sintesi di polimeri come carriers per il gene delivery

	Monomeri	Architettura del polimero	Tipo di delivery
Monomeri cationici	Boc-AEMA	Omopolimeri, Copolimeri random, a blocchi ed a stella	DNA, RNA
	Boc-AEAEMA	Omopolimeri	DNA
	DEAEMA	Omopolimeri, Copolimeri a blocchi, a stella e graft	DNA, RNA
	DMAEMA	Omopolimeri, Copolimeri random, block, a stella e graft	DNA, RNA
	DMAPMAA	Copolimeri a blocchi ed a stella	DNA, RNA
	DPAEMA	Copolimeri a blocchi	DNA
	MeDMA	Copolimeri a stella	DNA
	HAEAPMA	Copolimeri a stella	DNA
Monomeri funzionali	BMA	Copolimeri a blocchi	DNA, RNA
	GMA	Omopolimeri, Copolimeri a blocchi ed a stella	DNA
	HEMA	Copolimeri a blocchi e graft	DNA
	MAS	Omopolimeri	DNA
	MPC	Copolimeri a blocchi	DNA
	OEGMA	Copolimeri random, a blocchi ed a stella	DNA, RNA
	tBA	Copolimeri a blocchi	DNA, RNA

La polimerizzazione, ha consentito la produzione di omopolimeri, copolimeri a blocchi, copolimeri graft, polimeri hyperbranched e polimeri a stella. Nel delivery di p-DNA o RNA, i differenti gene carriers esibiscono differenti caratteristiche per quel che concerne la capacità di condensare il materiale genetico, la morfologia, la citotossicità e l'efficienza di transfezione dei poliplessi ottenuti.

1.7.1. Iniziatori per ATRP

Il numero di catene polimeriche in accrescimento è determinato dall'*iniziatore*. I principali iniziatori utilizzati nell'ATRP sono alogenuri alchilici con un sostituente attivante sul carbonio α , come un

gruppo arilico, carbonilico o allilico, composti polialogenati e composti che presentano un debole legame R-X, come N-X, S-X e O-X; anche alcuni pseudo alogeni, in particolare tiocianati e tiocarbammati sono stati impiegati con successo come iniziatori nella polimerizzazione di stireni ed acrilati [Davis K. et al.,1997; Nishimura M. et al., 1999; Singha N.K. et al., 2000]. L'uso di alchil ioduri richiede particolari precauzioni per via della loro instabilità alla luce, dal momento che essi possono formare complessi metallo-ioduro scarsamente solubili e che il legame R-I può essere rotto eteroliticamente. Per questi motivi, bromuri e cloruri sono gli alogenuri maggiormente impiegati. Questi permettono inoltre una migrazione rapida e selettiva dell'alogeno X tra la catena in accrescimento ed il complesso del metallo di transizione, essenziale per la formazione di polimeri ben definiti con ristretta distribuzione di peso molecolare. In genere viene usato lo stesso alogeno nell'iniziatore e nel sale del metallo (es.:R-Br e CuBr); tuttavia lo scambio dell'alogeno può essere a volte adoperato per ottenere un ulteriore livello di controllo sulla polimerizzazione [Matyjaszewski K. 1998 (A)]. Inoltre, in base a quanto confermato dalle misure delle costanti di attivazione, gli alogenuri alchilici terziari sono iniziatori migliori rispetto a quelli secondari, che sono a loro volta migliori

rispetto agli alogenuri alchilici primari [Matyjaszewski M. et al., 2001 (A)].

Vari α -aloesteri sono stati usati con successo come iniziatori in ATRP ben controllate. In genere, α -aloisobutirradi producono radicali più velocemente rispetto a quanto facciano i corrispondenti α -alopropionati grazie alla migliore stabilizzazione del radicale generato dallo step di estrazione dell'alogeno.

Anche gli α -alochetoni polialogenati (es $\text{CCl}_3\text{COCH}_3$ e CHCl_2COPh) sono utilizzati come iniziatori per l'ATRP e sono risultati essere i migliori iniziatori per la polimerizzazione di MMA catalizzata da complessi di rutenio [Nishikawa T. et al., 1999; Ando T. et al., 1997; Takahashi H. et al., 1999; Ando T. et al., 1996; Nishikawa T. et al., 1997].

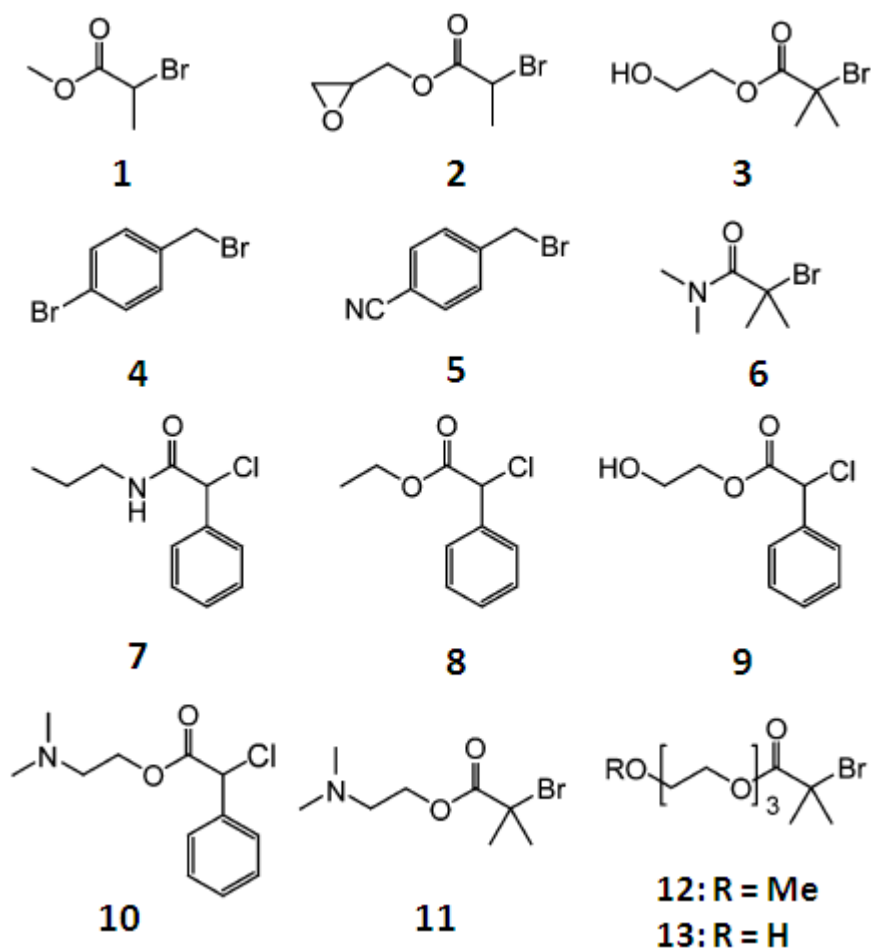


Figura 1.11. Vari iniziatori per ATRP utilizzabili sia per la formazione di omopolimeri che per la funzionalizzazione di polimeri preformati che da luogo a macroiniziatori (MI). Gli iniziatori da 1 a 6 e gli iniziatori 12 e 13 sono utilizzabili in ATRP catalizzate da Cu, mentre quelli da 7 a 11 sono utilizzabili per ATRP catalizzate da Ru.

La più rapida iniziazione osservata con i chetoni rispetto ai corrispondenti esteri è attribuita al maggiore effetto elettron-attrattore del gruppo carbonilico chetonico che induce un'ulteriore polarizzazione del legame carbonio-cloro.

Il processo di ATRP può sfruttare come iniziatore anche una macromolecola a cui sono state coniugate covalentemente una o più

piccole molecole che fungono da iniziatori veri e propri. In questo caso si parla di “*macroiniziatori*” che possono essere mono o multipoint (mono o multifunzionali) in relazione alla presenza sulla catena macromolecolare di uno o più siti (ad esempio atomi di alogeno) su cui iniziare la polimerizzazione e che possono essere usati per sintetizzare copolimeri block e graft [Matyjaszewski K. et al., 1998 (B)].

1.7.2. Sistema catalitico

Scegliere un appropriato *sistema catalitico* assicura il controllo del processo in quanto contribuisce in maggior misura a determinare la posizione dell'equilibrio di trasferimento atomico e la dinamica dello scambio tra la specie dormiente e il radicale di propagazione. Il catalizzatore come già detto è composto da un metallo di transizione con un adatto *ligando*. È in prima istanza necessario che il metallo abbia minimo due stati di ossidazione separati da un elettrone; inoltre deve avere una alogenofilicità adeguata e, a seguito della ossidazione, la sua sfera di coordinazione deve poter espandersi per legare l'atomo di alogeno in maniera selettiva. Il migliore catalizzatore per ATRP in termini di versatilità, nonché il meno dispendioso è il rame. Il Cu(I) “libero”, cioè in assenza di ligandi che lo complessino, è poco stabile

in molti solventi e disproporziona a Cu(II) e a Cu(0) (rame metallico) [Benari M.D. et al., 1990]. La costante di equilibrio della reazione di disproporzione (K_{disp}) dipende dai potenziali redox delle coppie $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}$ e $\text{Cu}^{\text{I}}/\text{Cu}^0$, e dipende fortemente anche dalla natura del solvente e, in particolar modo dalla capacità del solvente di coordinare gli ioni Cu(II) e Cu(I). Ad esempio l' H_2O stabilizza moltissimo il Cu(II) rispetto a Cu(I). Un comportamento analogo è riportato per diversi solventi organici come DMF, MeOH, DMSO che sono caratterizzati da valori di K_{disp} che, anche se inferiori a quello in H_2O , sono nettamente maggiori di 1. Invece alcuni solventi azotati come acetonitrile, benzonitrile, piridina stabilizzano molto meglio il Cu(I) rispetto a Cu(II) per cui K_{disp} risulta essere molto piccola. Ad esempio in acetonitrile $K_{\text{disp}} = 10^{-21}$. La posizione di tale equilibrio di disproporzione può essere alterata significativamente dalla presenza di agenti complessanti, cioè da ligandi il cui ruolo è quello di modulare il potenziale redox e l'alogenofilicità del centro metallico.

Inoltre il ligando promuove la solubilizzazione del sale del metallo di transizione nel mezzo organico e conferisce più in generale al sistema catalitico una appropriata reattività e dinamica per il trasferimento atomico. I ligandi azotati sono molto utilizzati nell'ATRP con catalizzatori a base di ferro e di rame [Matyjaszewski

K. et al., 1997 (A); Xia J. et al., 1999]. In generale leganti multidentati a base di azoto sono i migliori (figura 1.12). L'ordine generale di attività dei complessi di rame è influenzato dalla loro struttura e segue il seguente ordine: tetradentati (ciclici a ponte) > tetradentati (ramificati) > tetradentati (ciclici) > tridentati > tetradentati (lineari) > bidentati [Tang W. et al., 2007; Nanda A.K. et al., 2003]. Inoltre, è importante considerare anche l'effetto elettronico e sterico dei ligandi: è stata osservata infatti una riduzione dell'attività e dell'efficienza del sistema catalitico nel caso in cui si abbia un eccessivo ingombro sterico intorno al centro metallico o il ligando presenti un sostituito con forte effetto elettron-attrattore [Matyjaszewski K. Et al., 2001 (B)]. In figura 1.12 sono riportati i ligandi azotati comunemente usati in ATRP catalizzata da rame.

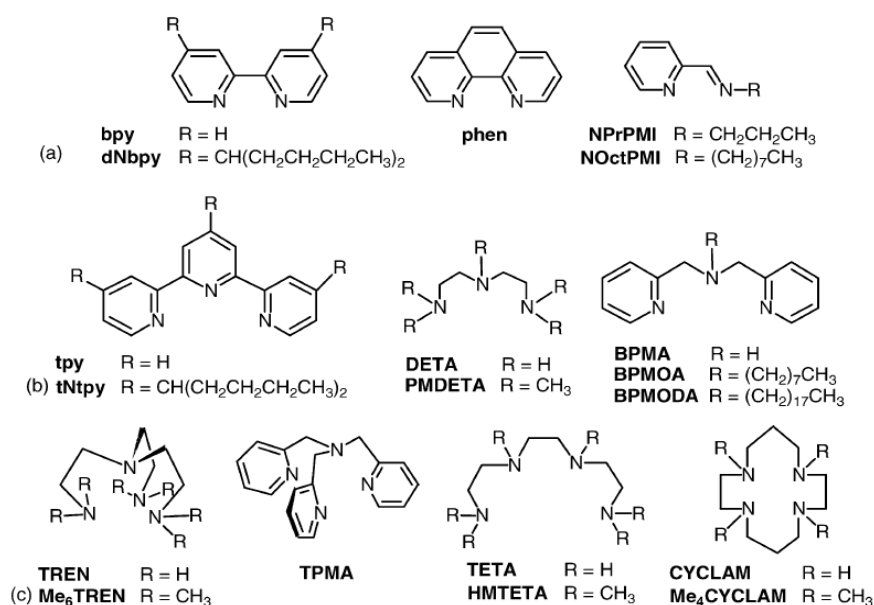


Figura 1.12. Ligandi azotati comunemente usati in ATRP catalizzata da rame (Cu). Strutture di ligandi bidentati: 2,2'-bipiridina (bpy); 4,4'-di(5-nonil)-2,2'-bipiridina (dNbpy); 1,10-fenantrolina (phen); N-propil-(2-piridil)metanimmina (NPrPMI); N-ottil-(2-piridil)metanimmina (NOctPMI) (a). Ligandi tridentati: 2,2':6',2''-terpiridina (tpy); 4,4',4''-tris(5-nonil)-2,2':6',2''-terpiridina (tNtpy); dietilenetriammina (DETA); N,N,N',N'',N'''-pentametildietilenetriammina (PMDETA); N,N-bis(2-piridilmetil)ammina (BPMA); N,N-bis(2-piridilmetil)ottilammina (BPMOA); N,N-bis(2-piridilmetil)ottadecilammina (BPMODA) (b). Ligandi tetradentati: tris[2-amminoetil]ammine (TREN); tris[2-(dimetilammino)etil]ammina (Me₆TREN); tris[(2-piridil)metil]ammina (TPMA); trietilenetetrammina (TETA); 1,1,4,7,10,10-esametiltrietilenetetrammina (HMTETA); 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano (CYCLAM); 1,4,8,11-tetraaza-1,4,8,11-tetrametilciclotetradecano (Me₄CYCLAM) (c).

In generale, sia ligando che solvente possono modificare le proprietà elettroniche, steriche e di solubilità del catalizzatore e perciò modificare il comportamento cinetico del sistema. Lo studio del sistema catalitico è di estrema importanza in quanto permette l'ottimizzazione del processo ATRP e la sua grande efficienza.

1.7.3. Effetto della temperatura e del tempo sull'ATRP

La velocità di polimerizzazione nell'ATRP aumenta con l'aumentare della temperatura, in funzione dell'aumento sia della costante di propagazione del radicale che della costante di equilibrio di trasferimento atomico. Come risultato di una maggiore temperatura, si ha l'aumento dell'energia di attivazione per il radicale di propagazione rispetto a quello di terminazione ed un maggiore controllo. Tuttavia, a temperature elevate il trasferimento di catena ed altre reazioni collaterali possono risultare più probabili [Matyjaszewski K. et al., 1997 (B); Matyjaszewski K., 1998 (C)]. Anche la solubilità del catalizzatore aumenta con la temperatura, ma aumenta di contro anche il rischio di degradazione dello stesso. In generale il valore ottimale di temperatura dipende dal monomero e dal catalizzatore.

Per quel che riguarda la durata ottimale della reazione di polimerizzazione, si è visto che tempi di reazione troppo alti possono portare a perdita dei gruppi terminali a causa di possibili terminazioni delle catene crescenti.

1.7.4. Consecutive ATRPs.

Con il termine di “Consecutive ATRP” si definisce un’applicazione della tecnica fin qui descritta, che prevede l’uso, in qualità di iniziatore, di un prodotto ottenuto da una precedente reazione di ATRP. Si tratta pertanto, nella maggior parte dei casi, di macroiniziatori il cui gruppo alchil alogenuro terminale, che costituisce la specie dormiente, può essere nuovamente “iniziato” per una successiva copolimerizzazione mediante ATRP [Zhang Z.B. et al., 2009].

Questa tecnica consente ad esempio di ottenere copolimeri costituiti da 3 blocchi del tipo $[A]_m-[B]_n-[C]_x$ (triblock copolymers) per applicazione successiva dell’ATRP all’omopolimero $[A]_m$ e al copolimero a due blocchi $[A]_m-[B]_n$, ma consente anche di derivatizzare le catene pendenti di un copolimero graft con più di un tipo di monomero, per ottenere porzioni “etero-oligomeriche” con composizione definita, inserite all’interno di strutture macromolecolari caratterizzate da peculiari architetture (a stella; iper-ramificate; multiblock).

Un esempio di copolimero multiblock, ottenuto usando reazioni di consecutive ATRP, è la sintesi del $p(\text{HEMA})-b-p(\text{DMAEMA})-b-p(\text{PEG})-b-p(\text{DMAEMA})-b-p(\text{HEMA})$, preparato a partire dal

macroiniziatore PEG-di-2-bromoisobutirile (Br-PEG-Br). Si tratta di un copolimero a cinque blocchi proposto come gene delivery system [Xu F.J. et al., 2008]. Tali sistemi hanno mostrato un'elevata capacità di complessare il DNA, dando luogo alla formazione di poliplessi con dimensioni che vanno da 100 a 160nm in funzione del rapporto in peso polimero/DNA. Inoltre, tali sistemi hanno mostrato un'elevata efficienza di transfezione, superando anche il valore della PEI di riferimento.

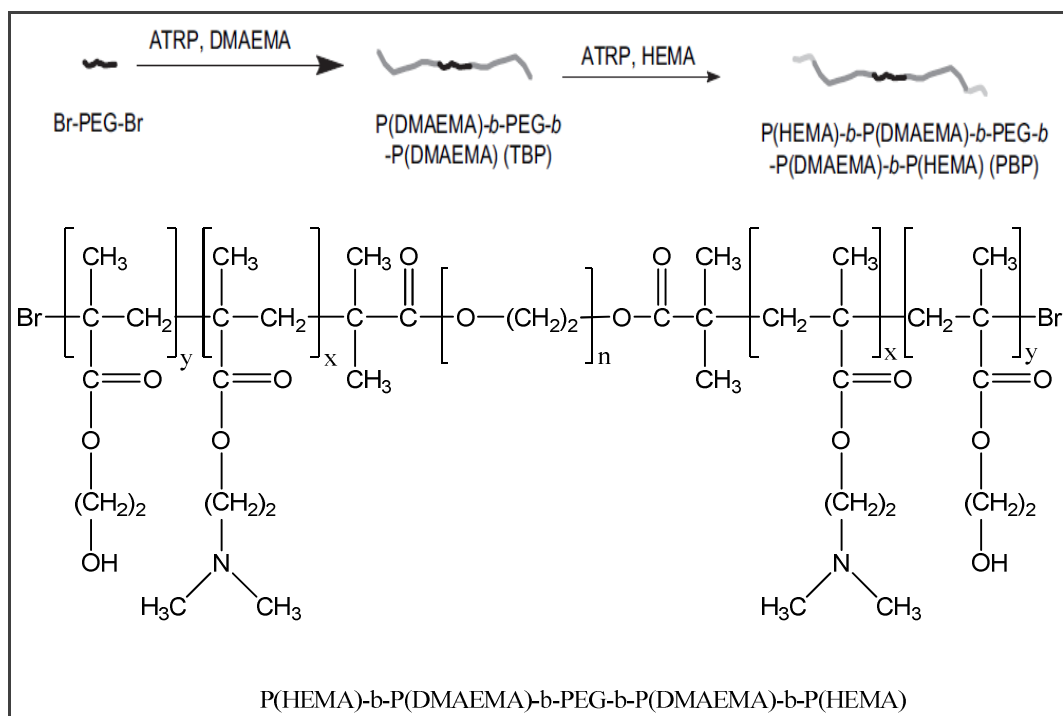


Figura 1.11. Rappresentazione schematica della sintesi del p(HEMA)-b-p(DMAEMA)-b-(PEG)-b-p(DMAEMA)-b-p(HEMA) e strutture del macroiniziatore e delle porzioni polimerizzate in successione.

In generale, la tecnica di consecutive ATRP costituisce un metodo unico e versatile per progettare gene delivery systems con specifica architettura composizione. In linea di principio poi ai sistemi ottenuti può essere conferita stabilità, e specifiche proprietà funzionali. Quest'ultima proprietà può essere conferita al sistema grazie alla possibilità di utilizzare macroiniziatori di PEG, come nel caso sopra riportato, o altre molecole come le oligoetilenglicole metacrilato (OEGMA) di cui è noto l'effetto stabilizzante. Il vantaggio risiede anche nella possibilità di controllare il peso molecolare delle catene polimeriche, che risulta essere rilevante nel conferire al sistema finale l'opportuna stabilità [Üzgün S. et al., 2010].

2. SCOPO DELLA TESI.

L'utilizzo di polimeri cationici per la veicolazione di materiale genetico, sviluppatosi intensamente solo negli ultimi dieci anni, è divenuto un approccio fondamentale in terapia genica. Esso prevede l'utilizzo di copolimeri cationici in grado di dar luogo a sistemi che consentano l'ingresso del materiale genetico nelle cellule e che mostrino un'alta specificità cellulare, alta efficienza di transfezione e rischi per la salute controllabili.

Da diversi anni il gruppo di ricerca dove ho svolto il mio lavoro di dottorato ha rivolto l'interesse verso la progettazione e la realizzazione di nuovi vettori non virali di tipo polimerico. In particolare, sono stati sintetizzati copolimeri cationici idrosolubili capaci di dar luogo alla formazione di complessi col DNA, mediante interazioni di tipo elettrostatico, neutralizzando la sua carica negativa e facilitandone l'ingresso all'interno delle cellule. Tali copolimeri cationici sono stati ottenuti a partire da un derivato della polisuccinimide, l' α,β -poli(N-2-idrossietil)-D,L-aspartammide (PHEA) il quale non presenta una natura cationica e per tale ragione necessita d'essere derivatizzato con gruppi capaci d'interagire con il DNA. Il PHEA è un polimero sintetico altamente idrosolubile,

biocompatibile, non tossico, non antigenico e non immunogenico [Giammona G. et al., 1987]. La presenza di gruppi ossidrilici in catena laterale, uno per ogni unità ripetitiva (figura 2.1), consente di legare covalentemente su tale polimero un elevato numero di molecole, come farmaci dando luogo alla formazione di profarmaci macromolecolari [Cavallaro G. et al., 2001; Cavallaro G. et al., 2004 (A)], catene di PEG [Craparo E.F. et al., 2006], e porzioni idrofobiche ottenendo polimeri anfifilici in grado di auto assemblarsi in micelle polimeriche, capaci di incorporare nel core micellare farmaci poco solubili in acqua e di rilasciarli in maniera controllata nel tempo [Cavallaro G. et al., 2003; Mendichi R. et al., 2003; Cavallaro G. et al., 2004 (B)].

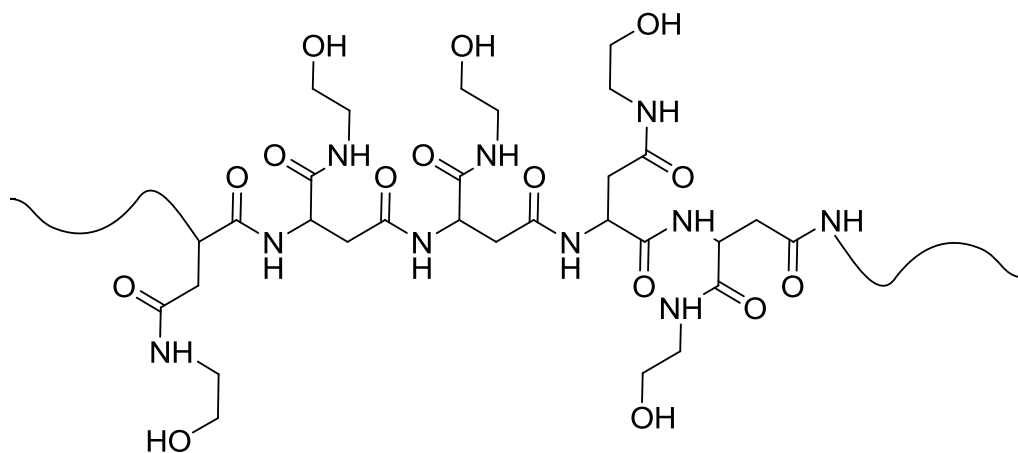


Figura 2.1. Struttura chimica del PHEA.

Il PHEA derivatizzato con la spermina (Spm) [Cavallaro G. et al., 2008]; o con l'etilendiammina, il 3-carbossipropiltrimetilammoniocloruro (CPTA) e il N-succinimidil 3-(2-piridilditio) propionato (SPDP) [Cavallaro G. et al., 2008], rappresentano solo due esempi di policoni che hanno mostrato buone proprietà di transfezione ed eccellente profilo di biocompatibilità. È interessante notare che a differenza del PHEA-Spm, nel secondo esempio (PHEA-EDA-SH-CPTA) il vettore polimerico contiene sia gruppi amminici, sia gruppi ammonici quaternari presentando così cariche positive permanenti, oltre a gruppi tiolici (SH) in grado di formare con il materiale genetico "tiopoliplessi" stabili in circolo ed in grado di rilasciare il materiale genetico all'interno delle cellule.

Lo scopo del mio lavoro in questo triennio di dottorato è stato quello di sintetizzare e caratterizzare dei copolimeri capaci di veicolare materiale genetico, potenzialmente utilizzabili nella terapia genica come gene delivery systems. Sono stati sintetizzati nuovi copolimeri cationici sfruttando, sia l'elevata quantità di gruppi ossidrilici del PHEA [Giammona G. et al., 1989], sia un metodo, quello dell'ATRP che ha consentito di modulare con successo la quantità di cariche positive sui copolimeri ottenuti. Nuovi copolimeri

del PHEA utilizzabili nel gene delivery sono stati ottenuti anche mediante grafting sul PHEA di oligoamine.

La prima tecnica adoperata, l'ATRP, come già discusso presenta molteplici vantaggi, sia dal punto di vista delle blande condizioni di reazione che la rendono facilmente eseguibile, sia per la versatilità che la caratterizza, dal momento che essa permette di polimerizzare una grande varietà di monomeri per ottenere copolimeri con composizioni differenti e dalle più svariate topologie [Coessens V. et al., 2001; Wang J.S. et al., 1995 (B)]. Essa inoltre fornisce un controllo sulla reazione, non attuabile tramite la polimerizzazione radicalica convenzionale, che consente la realizzazione di copolimeri con strutture ben definite cui sono associate proprietà chimico-fisiche e meccaniche particolari.

Al fine di mettere a punto una strategia sintetica che sfruttasse le potenzialità dell'ATRP per la sintesi di copolimeri con struttura graft a partire dall' α,β -poli(N-2-idrossietil)-D,L-aspartamide (PHEA), in grado di funzionare come vettori polimerici per la terapia genica, è stato sviluppato un approccio di *grafting from*, sono stati cioè inseriti nelle catene laterali del PHEA gruppi funzionali in opportuno numero, in grado di fungere da siti di innesto per la successiva polimerizzazione di monomeri mediante ATRP.

La sintesi di questi nuovi policationi è stata effettuata pertanto in due stadi. Nel primo è stato sintetizzato un derivato del PHEA capace di fungere da macroiniziatore per l'ATRP. Tale macroiniziatore è stato ottenuto mediante reazione del PHEA con l' α -bromo isobutirril bromuro, ottenendo il derivato α,β -poli(N-2-idrossietil)-co-[N-2-etilen(2-bromo-isobutirrato)]-D,L-aspartammide), o PHEA-BIB, che è stato successivamente utilizzato come macroiniziatore multifunzionale per l'ATRP dei monomeri, l'N,N-dietilamino-etilmetacrilato (DEAEMA) per l'ottenimento dei policationi e del polietilenglicole metacrilato (PEGMA) sfruttato nelle reazioni di consecutive ATRP, tecnica che come già discusso, consente di modificare la composizione delle catene laterali dei copolimeri ottenuti mediante una prima ATRP, attraverso la successiva polimerizzazione sulle stesse, di monomeri di differente natura.

La prima parte del lavoro sperimentale è consistito nello studiare le condizioni migliori di temperatura, tempo di reazione, solvente (o miscela di solventi) e la quantità di monomero DEAEMA, da utilizzare per l'ottenimento di copolimeri (PHEA-IB-pDEAEMA) che presentassero delle caratteristiche ottimali per conferire al PHEA la capacità di complessare e condensare il DNA. Infatti, la scelta è

ricaduta sull'*N,N*-dietilammino-etilmetacrilato (DEAEMA), mostrato in figura 2.2, in quanto è stato riportato che il pKa dell'omopolimero di tale monomero è 7.3, pertanto presenta circa il 50% di gruppi amminici protonati a pH fisiologico [Liu L. et al., 2008].

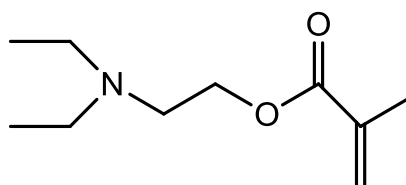


Fig. 2.2 Struttura del *N,N*-dietilamminoetil metacrilato

Nello sviluppo del lavoro è stata eseguita, mediante consecutive ATRP a partire da PHEA-IB-pDEAEMA, la derivatizzazione dei polimeri ottenuti, in modo da produrre copolimeri dotati in catena laterale di oligocatene a due blocchi, utilizzando polietilenglicole metacrilato (PEGMA) come monomero (figura 2.3) (PHEA-IB-pDEAEMA-pPEGMA).

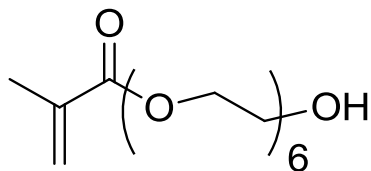


Fig. 2.3 Struttura del polietilenglicole metacrilato

Il PEGMA (di peso molecolare medio 360) è stato scelto vista la ben nota capacità delle catene di PEG di migliorare la stabilità fisica dei poliplessi, risultanti dalla complessazione del policatione PEGilato ed il materiale genetico, riducendone l'interaggregazione, prolungandone l'emivita plasmatica e in generale la biocompatibilità [Merdan T. et al., 2005]. Anche in questo caso si è reso necessario studiare le condizioni migliori di temperatura, tempo di reazione, solvente (o miscela di solventi) e la quantità di monomero PEGMA, tali da consentire di legare un'adeguata quantità di monomero in grado di conferire ai policationi ottenuti ottime caratteristiche di stabilità e biocompatibilità.

Nella seconda parte del lavoro sperimentale di dottorato, sono state sfruttate le conoscenze acquisite sulla sintesi dei copolimeri PHEA-IB-pDEAEMA per progettare e realizzare copolimeri in grado di veicolare oligonucleotidi quali gli small interfering RNA (siRNA).

La scelta di utilizzare quale monomero per la produzione di tali polimeri lo stesso DEAEMA usato precedentemente, è supportata dagli ottimi risultati ottenuti nella veicolazione di oligonucleotidi da copolimeri portanti funzioni strutturalmente simili; in particolare ammine terziarie del tipo dimetilammiometilmetacrilato (DMAEMA) [Lucas B. et al. 2004].

Nella progettazione di tali polimeri si è poi tenuto conto che i siRNA sono molecole di piccole dimensioni, e sono costituiti da un doppio filamento contenente 21-25 coppie di basi. Considerando che i siRNA presentano, prevalentemente, una struttura più rigida rispetto al pDNA, conferita da una conformazione **A** più compatta, caratterizzata da un solco maggiore più largo e più profondo, e da un solco minore più stretto e più superficiale rispetto alla conformazione **B** del pDNA. Tale differente conformazione implica una alterazione della spaziatura dei fosfati presenti nel backbone degli oligoribonucleotidi [Xu L. et al., 2011]. Tale rigidità, causa una riduzione della quantità di polimeri necessaria per legare stechiometricamente gli oligoribonucleotidi rispetto ai deossiribonucleotidi di analoghe dimensioni [Xu L. et al., 2011].

Per tali ragioni, sono stati sintetizzati due nuovi polimeri portanti in catena laterale ramificazioni di pDEAEMA in numero

inferiore rispetto agli omologhi precedentemente ottenuti e aventi in tali catene un numero di polimerizzazione (n) inferiore, cioè catene più corte; tali copolimeri risultano pertanto nel complesso meno carichi degli omologhi precedentemente ottenuti.

Un ulteriore parte del lavoro sperimentale è consistita nella preparazione e caratterizzazione di un copolimero del PHEA recante in catena laterale corte catene di polietileneimina (sLPEI). È noto dalla letteratura che la polietileneimina lineare da 22KDa presenta una elevata efficienza di transfezione, ma una contemporanea elevata tossicità. Di contro, LPEI di basso peso molecolare (800-1000 Da) possiedono una tossicità molto ridotta rispetto ai loro omologhi di alto peso molecolare [Ahn C.H. et al., 2004; Thomas M. et al., 2002], ma tuttavia non forniscono una sufficiente stabilità dei poliplessi. La scelta di coniugare queste corte catene di LPEI al PHEA nasce dalla capacità di gran parte dei derivati policationici studiati di dar luogo alla formazione di poliplessi molto stabili. La sintesi è stata realizzata mediante coniugazione delle oligocatene di PEI ai gruppi ossidrilici del PHEA (grafting) utilizzando come attivante il 4-nitrofenil-bis-carbonato (4-NPBC).

Il PHEA-sLPEI è risultato essere un policatione estremamente interessante, soprattutto grazie alle ottime capacità transfettanti

mostrate in vitro. Al fine pertanto di ottenere sistemi somministrabili in vivo e dotati di opportune capacità stealth, si è proceduto infine con l'inserimento nella sua struttura di unità in grado di migliorarne le caratteristiche di biocompatibilità e la stabilità in ambiente fisiologico. A tale scopo alla struttura del PHEA-sLPEI, sono state coniugate catene di PEG₂₀₀₀. Come detto in precedenza, è noto infatti che polimeri idrofili non recanti carica, possano conferire ai polimeri ai quali sono associati, per coniugazione chimica, ottime caratteristiche di stabilità e di biocompatibilità. I PEG formano shell idrofile attorno al poliplesso, mascherandone la carica, ed essendo quest'ultima responsabile della maggior parte degli effetti tossici, ne migliorano la biocompatibilità. Per ottenere tale risultato è stata messa a punto un'opportuna via sintetica al fine di ottenere un derivato PHEA-PEG-sLPEI che è stato testato e confrontato con il suo omologo non PEGilato.

Tutti i copolimeri ottenuti sono stati caratterizzati dal punto di vista chimico, strutturale e molecolare tramite analisi FT-IR, ¹H-NMR e SEC. Per studiare la capacità dei copolimeri di agire come sistemi di veicolazione di materiale genetico sono stati effettuati test di complessazione con il DNA mediante elettroforesi su gel d'agarosio allo 0.7%. Su tutti i poliplessi sono state inoltre effettuate misure di

potenziale ζ e Dinamic Light Scattering (DLS). Per valutare la biocompatibilità dei poliplessi sono stati realizzati saggi di citotossicità su una linea cellulare di B16F10; al fine di valutare l'efficienza di transfezione, sulla stessa linea cellulare sono stati inoltre effettuati test di transfezione. Inoltre, sono stati effettuati studi di complessazione, citocompatibilità e transfezione dei complessi ottenuti con i copolimeri a più basso grado di derivatizzazione ed uno specifico siRNA siE2F1 su una linea cellulare di carcinoma epatico HuH7.

3. RISULTATI E DISCUSSIONI

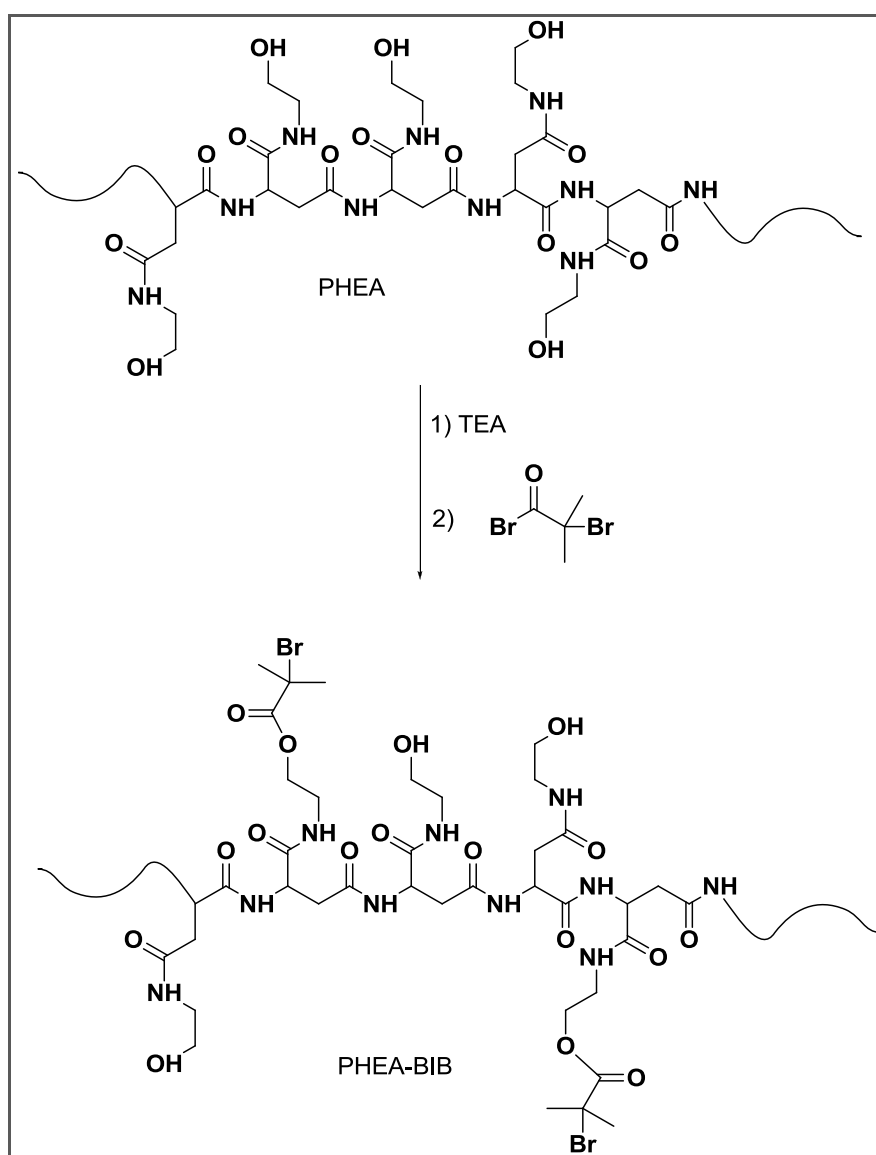
3.1. Sintesi del copolimero α,β -poli(N-2-idrossietilbromoisobutirrato)-DL-aspartammide (PHEA-BIB)

La sintesi del copolimero PHEA-BIB è stata eseguita sfruttando un protocollo già studiato nel laboratorio presso il quale ho svolto il mio lavoro di tesi.

La reazione del PHEA con il bromuro dell'acido α -bromoisobutirrico (BIBB) in DMF, a 0°C per 4h, ha portato alla formazione del copolimero desiderato (PHEA-BIB, Schema 3.1). La purificazione è stata eseguita tramite dialisi esaustiva contro acqua bidistillata. In figura. 3.1 è riportata la struttura chimica del copolimero PHEA-BIB. In figura. 3.2 è mostrato lo spettro $^1\text{H-NMR}$ in D_2O del macroiniziatore.

L'analisi $^1\text{H-NMR}$ ha permesso di quantificare i gruppi α -Bromoisobutirrici introdotti nel polimero, rapportando l'integrale del picco relativo ai protoni del gruppo Bromoisobutirrico a δ 1,9 (a) con l'integrale del picco a δ 2.79 relativi ai protoni $-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-$ delle unità ripetitive nel backbone del polimero (b), [Cavallaro G. et al., 2009].

Il grado di derivatizzazione (D.D. , degree of derivatization % mol/mol), del PHEA-BIB sintetizzato è risultato del 24% e del 30% utilizzando rapporti molari tra BIB e unità ripetitive di PHEA pari a 0.6 e 0.7 rispettivamente.



Schema 3.1: Sintesi del copolimero PHEA-BIB.

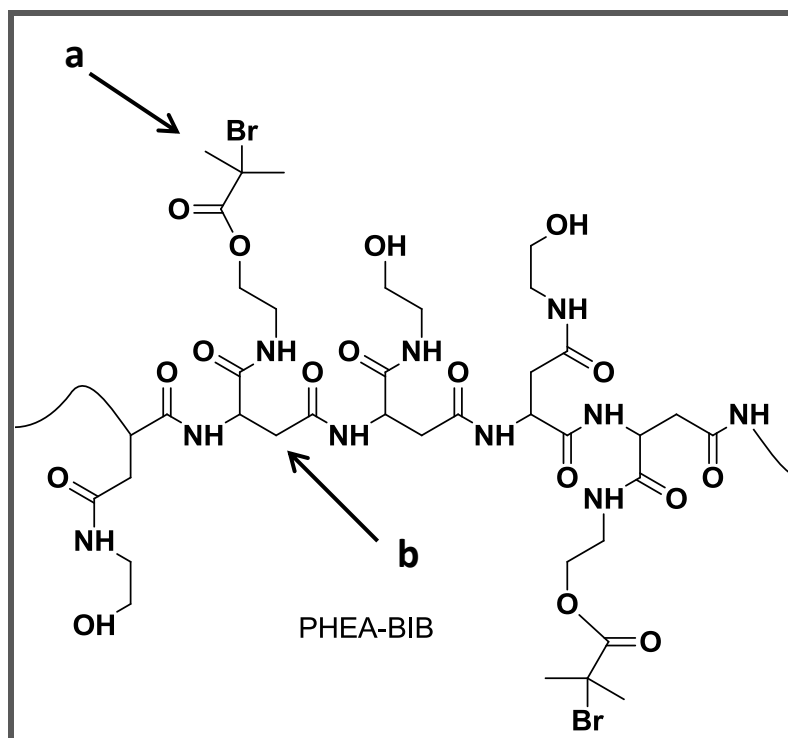


Figura 3.1. Struttura chimica del copolimero PHEA-BIB.

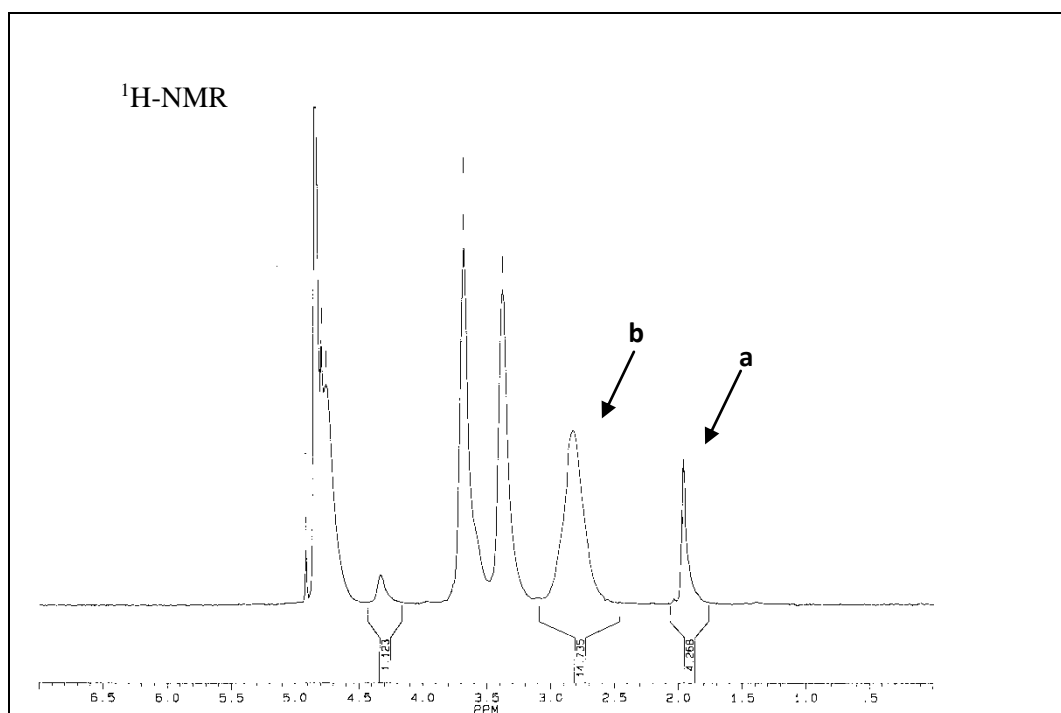


Figura 3.2. Esempio di un tipico spettro ¹H-NMR del PHEA-BIB.

3.2. Sintesi dei copolimeri PHEA-IB-pDEAEMA

Al fine di introdurre in catena laterale del PHEA, catene portanti cariche positive mediante ATRP, sono stati utilizzati come macroiniziatori multifunzionale i PHEA-BIB precedentemente ottenuti e come monomero portante un gruppo protonabile in condizioni fisiologiche l'*N,N*-dietilammino-etilmetacrilato (figura 3.3) che presenta all'estremità un'ammina terziaria protonabile in ambiente fisiologico, e quindi in grado d'interagire con il DNA [Liu L. et al., 2008]. Si è ritenuto quindi, che catene di pDEAEMA legate in catena laterale al PHEA potessero conferire carica positiva al copolimero risultante a pH tra 7.2-7.4; tali catene inoltre conferirebbero al copolimero potere tampone a pH inferiore a 7.3, quale quello delle vescicole lisosomiali [Liu L. et al., 2008].

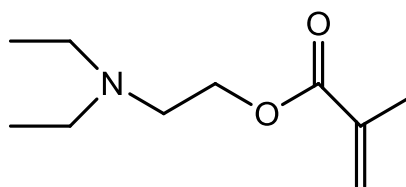


Fig. 3.3. Struttura del *N,N*-dietilamminoetil metacrilato

La reazione di ATRP (schema 3.2) è stata condotta in DMF a 50°C in atmosfera di argon, aggiungendo il monomero (DEAEMA) ed

utilizzando una combinazione di rame (I) e bromuro di 2,2'-bipiridina che danno luogo alla formazione del complesso Cu^+ /bipiridina (bpy), (figura 3.4) che è il sistema catalitico della reazione.

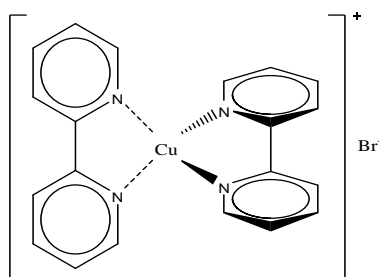
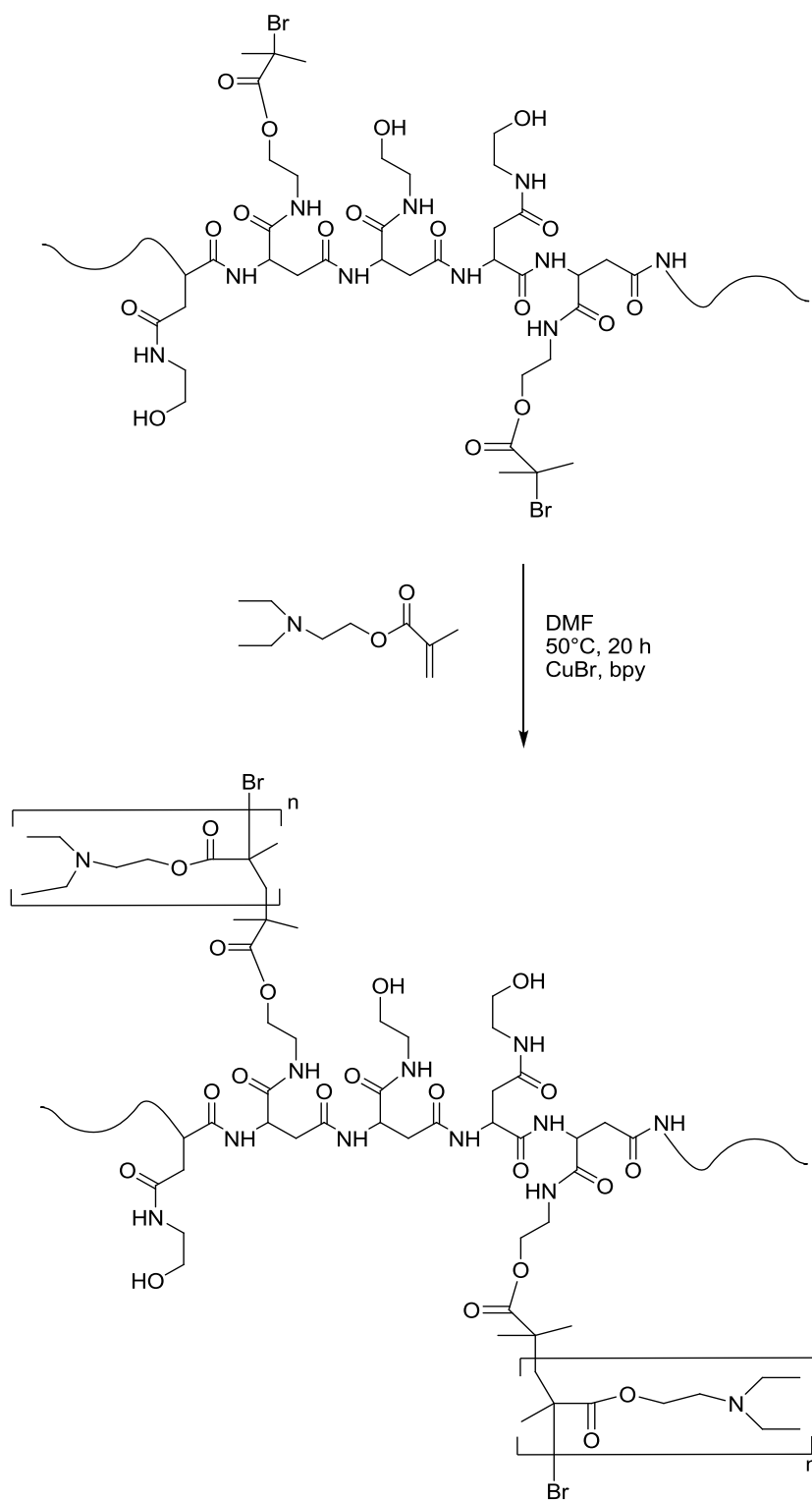


Figura 3.4. Struttura molecolare del complesso Cu^+ /bpy

I copolimeri di PHEA-IB-pDEAEMA purificati tramite dialisi esaustiva sono stati isolati con rese elevate, e caratterizzati tramite spettro $^1\text{H-NMR}$ che ha confermato l'introduzione dei gruppi del monomero nella catena laterale del PHEA.

In figura 3.5 è riportata la struttura chimica del copolimero PHEA-IB-pDEAEMA. La figura 3.6 mostra lo spettro $^1\text{H-NMR}$ in D_2O di un copolimero PHEA-IB-pDEAEMA, e sono evidenziati i picchi utilizzati nella determinazione del grado di derivatizzazione ed i relativi protoni.



Schema 3.2. Sintesi del copolimero PHEA-IB-pDEAEMA

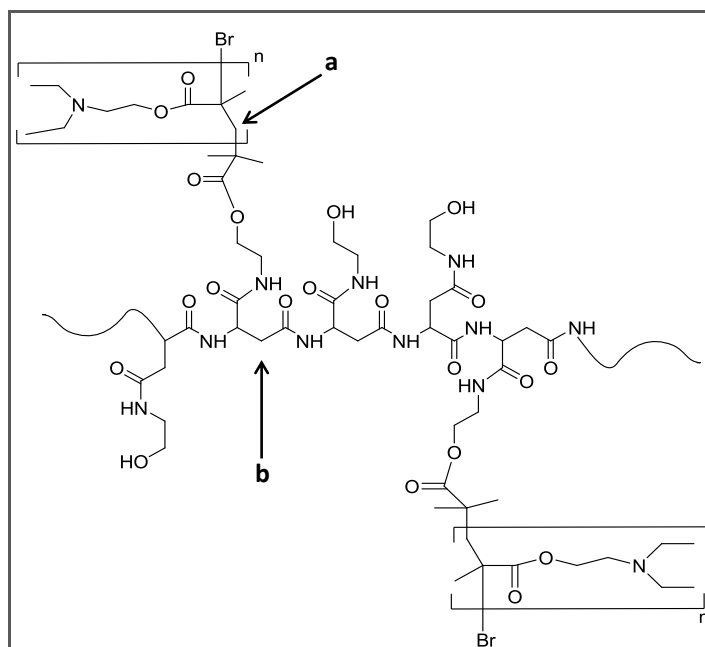


Figura 3.5. Struttura chimica del copolimero PHEA-IB-pDEAEMA

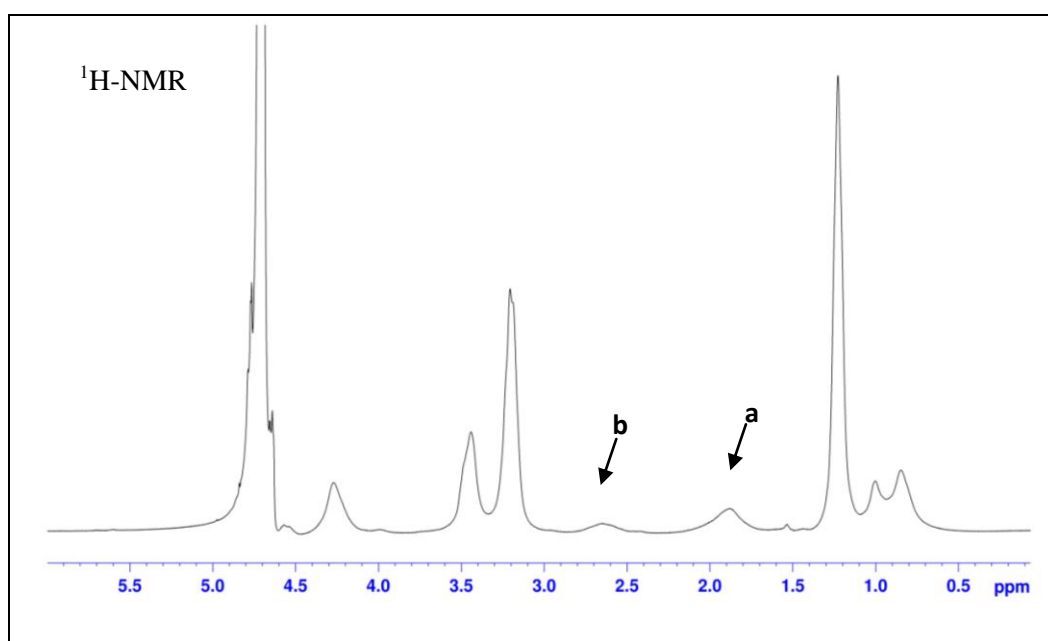


Figura 3.6. Esempio di un tipico spettro $^1\text{H-NMR}$ del PHEA-IB-pDEAEMA

Il grado di derivatizzazione (DD%), determinato mediante spettrometria $^1\text{H-NMR}$ in D_2O , è calcolato confrontando l'integrale del picco a δ 1.88 attribuibile al CH_2 delle catene di pDEAEMA, con

l'integrale del picco a δ 2.65 attribuibile al CH₂ del backbone del PHEA [Cavallaro G. et al., 2009].

Il peso molecolare e la polidispersità dei polimeri sintetizzati sono stati determinati mediante cromatografia ad esclusione dimensionale (SEC) e riportati nella Tabella 3.1 così come le caratteristiche molecolari.

Tabella 3.1. Proprietà dei copolimeri PHEA-IB- pDEAEMA

Parametri di reazione			Proprietà		
Copolimero	D.D. % BIB	$\frac{\text{mmol DEAEMA}}{\text{mmol BIB}}$	n di DEAEMA	Mw (Da)	PDI
PHEA-IB-pDEAEMA _a	24	10	4	45300	1.7
PHEA-IB-pDEAEMA _b	30	20	14	59600	1.6

Come si vede dai dati riportati in tabella, modificando il rapporto molare DEAEMA/BIB o utilizzando PHEA-BIB a differente grado di derivatizzazione in BIB (24 o 30 % mmol/mmol) sono stati sintetizzati due differenti copolimeri PHEA-IB-pDEAEMA; in particolare a partire dal copolimero PHEA-BIB al 24% in BIB, e utilizzando rapporti molar DEAEMA/BIB di 10, si è ottenuto il copolimero PHEA-IB-pDEAEMA (a) avente catene di pDEAEMA con un numero di monomeri medio di 4, inoltre utilizzando il copolimero PHEA-BIB al 30% in BIB e usando un rapporto molare DEAEMA/BIB di 20, è stato ottenuto il copolimero PHEA-IB-

pDEAEMA avente catene di pDEAEMA con numero di monomero medio pari a 14. Come previsto il copolimero (b) ha un peso molecolare maggiore di (a), e ciò è in accordo con l'aumento del numero di monomeri polimerizzati ovvero con l'aumento di lunghezza delle catene laterali. Inoltre tale dato supporta l'ipotesi che nelle condizioni di reazione usate, non si verifica degradazione del polimero.

3.3. Studi di complessazione con il DNA

La capacità dei polimeri PHEA-IB-pDEAEMA (a) e PHEA-IB-pDEAEMA (b) di complessare il DNA è stata valutata mediante elettroforesi su gel d'agarosio allo 0.7% P/V, valutando la mobilità elettroforetica dei poliplessi [Lindberg U. et al., 1964].

Il tempo di formazione dei complessi, in HBG è stato fissato a 30 minuti e i complessi sono stati ottenuti utilizzando rapporti in peso differenti, aggiungendo ad una quantità fissa di DNA, quantità crescenti di copolimeri in modo da ottenere rapporti in peso polimerazione/DNA (C/P) nel range tra; 1:1 a 7:1 per il copolimero (a) e da 0.5:1 a 4:1 per il copolimero (b). Entrambi i copolimeri hanno

mostrato una buona capacità di ritardare la migrazione elettroforetica del DNA.

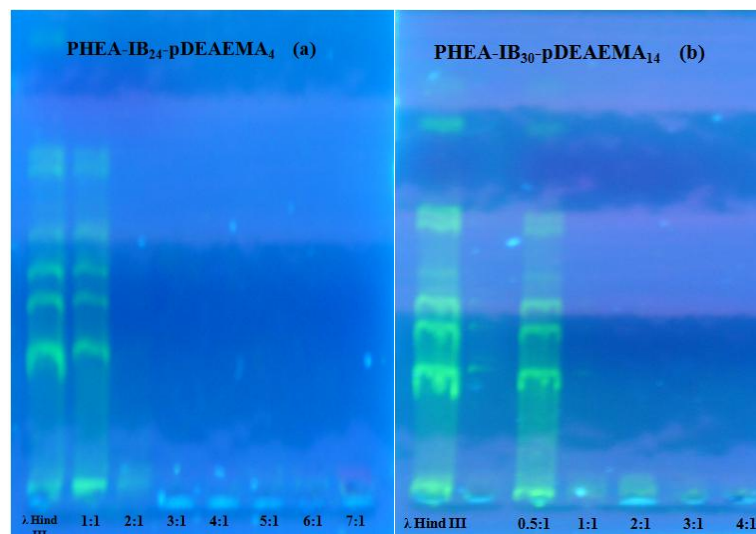


Figura 3.7. Elettroforesi su gel d'argosio dei complessi PHEA-IB₂₄-pDEAEMA₄(a)/DNA e PHEA-IB₃₀-pDEAEMA₁₄(b)/DNA a differenti rapporti in peso C/P. I due polimeri sono confrontati con λ -Hind III.

Come mostrato in figura 3.7, il segnale relativo alle bande di migrazione del DNA libero diminuisce proporzionalmente con il crescere del rapporto in peso copolimero/DNA. In particolare il copolimero PHEA-IB-pDEAEMA (a) ha mostrato capacità complessante nelle condizioni sperimentali utilizzate, bloccando completamente la mobilità del DNA ad un rapporto in peso C/P pari a 2:1, mentre il copolimero PHEA-IB-pDEAEMA (b) ad un rapporto in peso C/P pari a 1:1. Ciò è in accordo con l'aumento della percentuale di cariche positive in catena laterale, infatti il copolimero (b) presenta un maggior numero di braccia, aumentando in tal modo la capacità

complessante dello stesso. Avendo constatato l'effettiva capacità di entrambi i copolimeri (a) e (b), di bloccare la migrazione del DNA sono quindi, stati eseguiti studi biofisici e biologici.

3.4. Proprietà biofisiche dei poliplessi

Alcune proprietà biofisiche dei poliplessi PHEA-IB-pDEAEMA (a) e PHEA-IB-pDEAEMA (b) come diametro medio e potenziale- ζ sono state determinate attraverso DLS (Dynamic Light Scattering), e misure di potenziale- ζ eseguite con uno strumento Malvern Zeta Sizer. L'importanza del diametro dei complessi per un efficiente up-take cellulare è ben nota, infatti, solo se il DNA è condensato in complessi sufficientemente piccoli, è possibile che esso entri all'interno della cellula [Von Gersdorff K., et al, 2006]; inoltre l'ottenimento di poliplessi di dimensione ridotta costituisce un requisito fondamentale per una espressione transgenica in vivo ottimale [Kichler A. et al 2005].

Il plasmide usato per questi esperimenti è stato il pCMV-Luc che codifica per la proteina luciferasi, ed il suo diametro, non condensato, è risultato ≥ 518 nm.

Per valutare l'eventuale effetto sulle dimensioni del poliplesso al variare del tempo di contatto tra policatione e plasmide, sono state

effettuate misure delle dimensioni dei complessi a 30 minuti e 24 ore di complessazione considerando il copolimero PHEA-IB-pDEAEMA (b). In tabella 3.2 sono riportati i valori di diametro medio ed indice di polidispersità del poliplessi ottenuti in HBG, a 30 minuti e 24 ore di complessazione del copolimero PHEA-IB-pDEAEMA(b) con il plasmide, a diversi rapporti in peso C/P. Come si può vedere dopo 24 ore di complessazione, la dimensione dei poliplessi è sempre minore di quella osservata dopo 30 minuti di complessazione, così come i valori di PDI sono sempre più piccoli.

Tabella 3.2. Diametro medio e indice di polidispersità dei poliplessi ottenuti con il copolimero PHEA-IB-pDEAEMA (b) in HBG dopo 30 minuti 24 ore di complessazione.

30 minuti di complessazione			24h di complessazione		
C/P	Z-Average (nm)	PDI	C/P	Z-Average (nm)	PDI
0.25	271	0.46	0.25	161	0.23
0.5	331	0.43	0.5	236	0.27
1.0	306	0.49	1.0	242	0.30
1.5	302	0.38	1.5	205	0.27
2.0	247	0.32	2.0	193	0.24
3.0	184	0.23	3.0	178	0.21
5.0	160	0.22	5.0	146	0.21

Pertanto, i poliplessi ottenuti dopo 24 ore di complessazione sono risultati più compatti ed anche la distribuzione delle specie dimensionali risultano più omogenee. Per tali ragioni 24 ore di complessazione, sono sempre state utilizzate per gli studi successivi.

La tabella 3.3 mostra i valori di diametro medio e l'indice di polidispersità del poliplesso in HBG del copolimero PHEA-IB-pDEAEMA (a) con il plasmide.

Come si può vedere nel caso del copolimero (a) la dimensione dei poliplessi rimane leggermente superiore a quello ottenuto per il copolimero (b), così come i valori di PDI, suggerendo la presenza di specie più grandi e meno omogenee dal punto di vista dimensionale.

Malgrado ciò, le dimensioni dei poliplessi rimangono comunque sempre nel range colloidale utile per la somministrazione endovenosa.

Tabella 3.3. Diametro medio e indice di polidispersità del poliplessi ottenuti in HBG con il copolimero (a).

C/P	Z-Average (nm)	PDI
0.5	273	0.39
1	276	0.43
1.5	237	0.42
2	203	0.44
3	333	0.29
5	258	0.32

I valori di potenziale- ζ dei poliplessi ottenuti con entrambi i copolimeri in HBG (figura 3.8), mostrano che aumentando la quantità in peso dei copolimeri utilizzati nella formazione dei poliplessi, si

ottiene un aumento dei valori di potenziale- ζ , in effetti partendo da un valore di -55mV per il plasmide nudo, il potenziale- ζ diventa positivo ad un rapporto in peso policatione/DNA intorno a 1.5 per entrambi i copolimeri. Questi risultati sembrano essere in buon accordo con quelli delle dimensioni e dell'indice di polidispersità dei poliplessi.

In effetti, se si considera che in quest'intervallo (C/P tra 1 e 1.5) i valori del potenziale- ζ per entrambi i tipi di poliplessi sono abbastanza bassi, la loro tendenza ad aggregare risulterà elevata, con un conseguente aumento delle dimensioni medie e dell'indice di polidispersità.

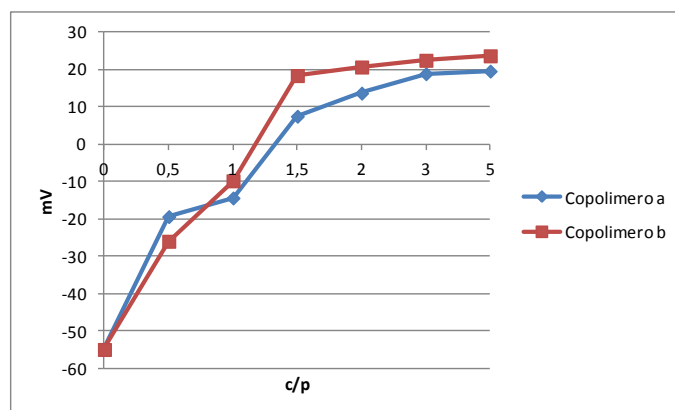


Figura 3.8. Andamento del potenziale- ζ dei copolimeri PHEA-IB-pDEAEMA(a) (●) PHEA-IB-pDEAEMA(b) (■), misurato in HBG, in funzione dei rapporti in peso C/P e mV.

3.5. Saggi di Citotossicità dei poliplessi ottenuti con i copolimeri PHEA-IB-pDEAEMA.

La citocompatibilità è una caratteristica molto importante per i sistemi polimerici proposti come gene delivery system.

I poliplessi ottenuti tra i copolimeri (a) e (b) ed il plasmide pCMV-Luc, sono stati testati in vitro su una linea cellulare di melanoma murinico B16F10, per valutare i loro effetti sulla vitalità cellulare. A tale scopo sono stati testati rispettivamente i rapporti in peso C/P 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 e 3.0. I dati sulla tossicità sono mostrati in figura 3.9. La vitalità cellulare è stata misurata utilizzando b-PEI come controllo positivo, al rapporto in peso C/P di 0.8 e le cellule non trattate come controllo negativo.

Come si può osservare i poliplessi ottenuti rispettivamente con entrambi i copolimeri PHEA-IB-pDEAEMA(a) e PHEA-IB-pDEAEMA(b) mostrano tossicità cellulare molto bassa. In particolare, la vitalità cellulare ottenuta con PHEA-IB-pDEAEMA(a) e PHEA-IB-pDEAEMA(b) ai rapporti in peso C/P 1.0 e 1.5 è maggiore del 90%. La vitalità cellulare diminuisce per entrambe i poliplessi quando si aumenta il rapporto da 2 a 3, ma per i poliplessi ottenuti con (a) non è mai inferiore all'80%. Ciò è probabilmente dovuto al basso numero di

monomeri presenti in catena laterale nel copolimero (a) rispetto al copolimero (b), ($n = 4$ contro $n = 14$). Infatti è noto che, all'aumentare dei siti protonati nel copolimero a pH fisiologico, diminuisce la sua biocompatibilità [Merdan T. et al., 2002].

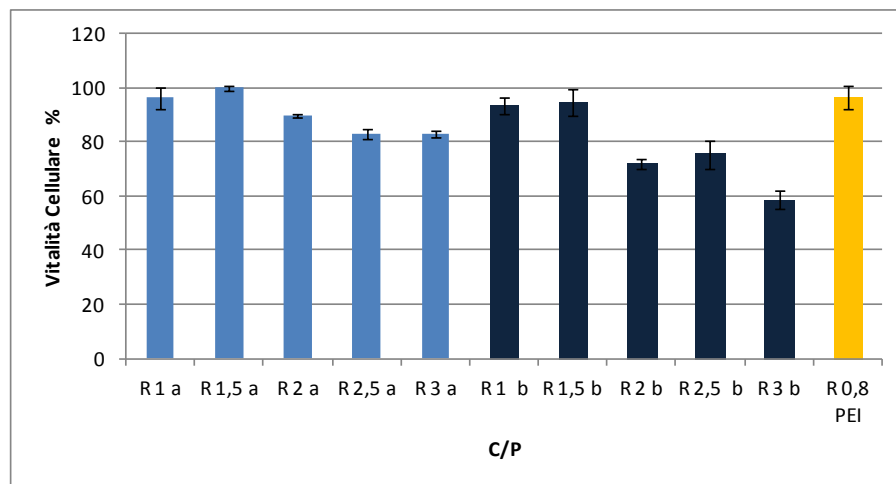


Figura 3.9. Citotossicità in vitro dei poliplessi ottenuti tra PHEA-IB-pDEAEMAB(a) e PHEA-IB-pDEAEMA(b) con pCMV-Luc ai vari rapporti in peso C/P. I dati sono confrontati con bPEI al rapporto C/P 0.8. Le cellule B16-F10 sono state incubate con i poliplessi per 4 h in mezzo DMEM + FBS. Ogni esperimento è stato eseguito in triplicato ed i risultati sono presentati come media \pm deviazione standard.

3.6. Studi di efficienza di transfezione dei vettori PHEA-IB-PDEAEMA

Al fine di valutare la capacità dei copolimeri ottenuti di agire come sistemi efficaci per la veicolazione ed il rilascio del materiale genetico, è stata determinata la capacità transfettante di tali sistemi su cellule di melanoma murinico B16F10, utilizzando come controllo positivo la PEI ramificata (b-PEI).

Gli stessi rapporti in peso C/P utilizzati per il test di citotossicità sono stati applicati per gli studi di transfezione ed i risultati sono riportati in figura 3.10.

In particolare PHEA-IB-pDEAEMA(b) ha evidenziato, a rapporti C/P tra 1.5 e 3 una maggiore efficienza di trasfezione rispetto al copolimero PHEA-IB-pDEAEMA(a). In ogni caso l'efficienza di transfezione è sempre inferiore a quella dei livelli di transfezione della b-PEI. Tali risultati mostrano che nel migliore dei casi l'efficienza di trasfezione è di circa 10 volte inferiore di b-PEI.

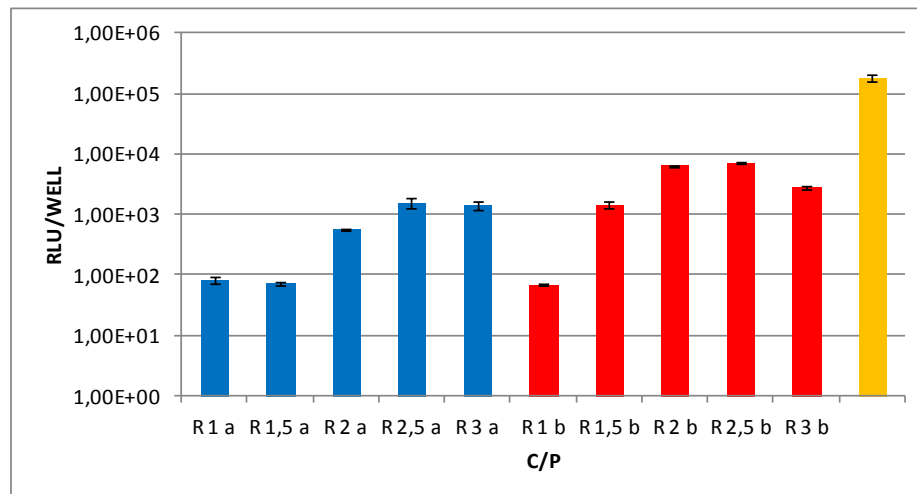


Figura 3.10. Efficienza di transfezione in vitro (espressione della luciferasi) ai rapporti in peso C/P indicati. I dati sono confrontati con la bPEI al rapporto C/P 0.8. Le cellule B16F10 sono state transfettate con i poliplessi PHEA-IB-PDEAEMA(a) e PHEA-IB-PDEAEMA(b) come descritto nella parte sperimentale. I dati sono espressi in RLU per pozzetto. Ogni esperimento è stato eseguito in triplicato ed i risultati sono presentati come media \pm deviazione standard.

La bassa efficienza di transfezione potrebbe essere attribuibile a diversi fattori, ed in particolare potrebbe dipendere sia dalla elevata

ramificazione dei copolimeri che porterebbe a dei poliplessi con una elevata stabilità, con un conseguente basso rilascio del materiale genetico; sia da un basso rilascio del plasmide complessato a livello endocellulare a seguito del fenomeno di endosomal escaping. Ciò è probabilmente dovuto ad uno scarso effetto proton sponge dei polimeri contenenti unità di DEAEMA o monomeri simili [Jones R.A. et al 2004].

3.7. Sintesi dei copolimeri PHEA-IB-pDEAEMA-pPEGMA

Nel tentativo di disporre di sistemi per il gene delivery dotati di elevata vitalità cellulare, anche a rapporti in peso C/P maggiori e per aumentare la loro efficienza di transfezione, sono state introdotte catene di poli(etilenglicole) nelle ramificazioni dei copolimeri PHEA-IB-pDEAEMA mediante consecutive ATRP.

I copolimeri PHEA-IB-pDEAEMA (a) e (b) sono quindi stati usati come macroiniziatori multifunzionali per consecutive ATRP utilizzando poli(etilenglicole) metacrilato (PEGMA) come monomero (figura 3.11) e lo stesso sistema catalitico adoperato per sintetizzare i copolimeri (a) e (b).

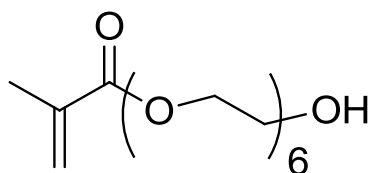
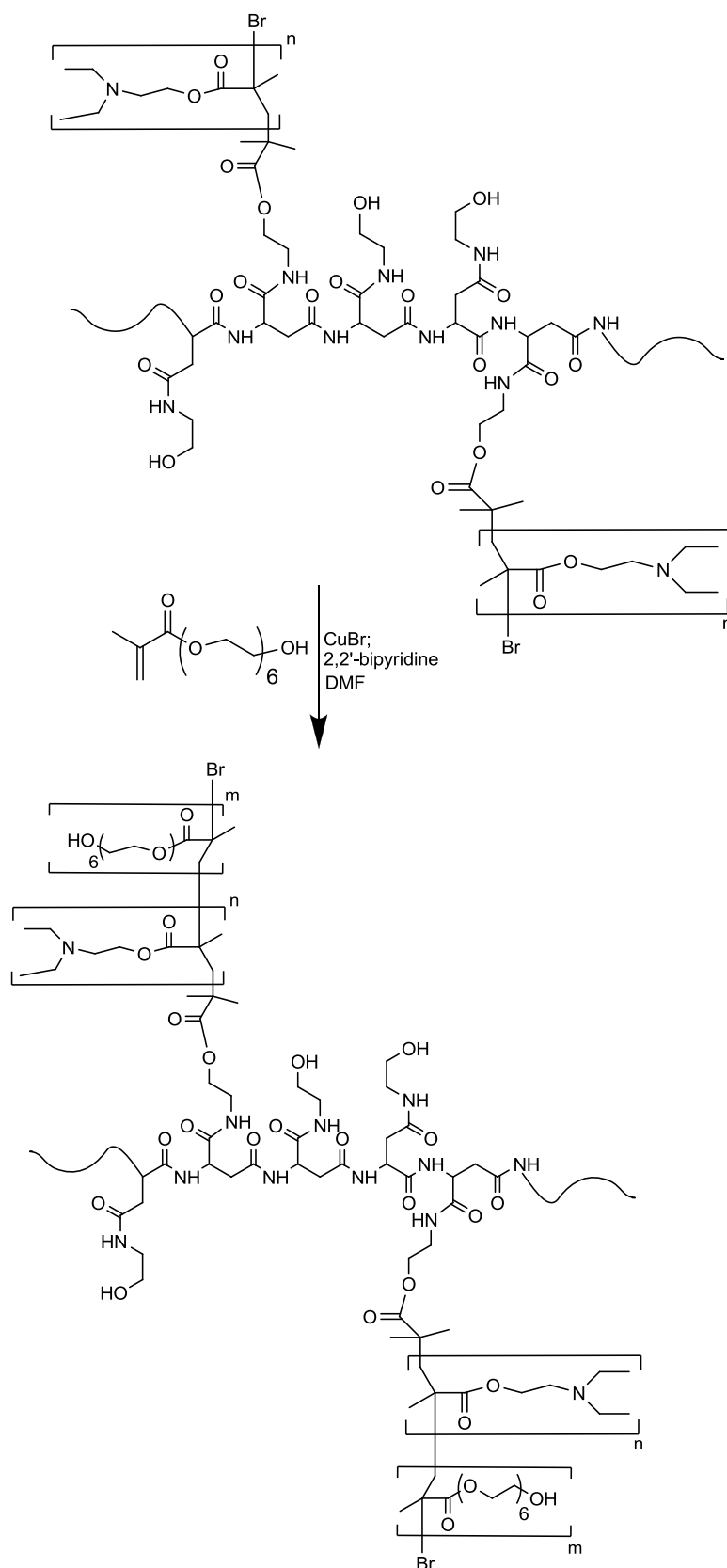


Figura 3.11. Struttura del polietilenglicole metacrilato

Il primo copolimero adoperato come macroiniziatore è stato PHEA-IB₃₀-pDEAEMA₁₄ (b) su cui sono stati eseguiti numerosi tentativi di reazione (schema 3.3), variando il rapporto molare (mmoli PEGMA/numero di unità ripetitive contenenti iniziatore) tra 10 e 200 e mantenendo costanti le altre condizioni di reazione (tempo e temperatura) e cioè operando per 20 ore a 50°C (si veda tabella 3.4). Come si osserva a bassi rapporti molari (mmoli PEGMA/num. di unità ripetitive contenenti iniziatore) non si è verificata alcuna reazione e soltanto utilizzando rapporti molari di 100 e 200 a 50°C si è cominciato a rilevare la presenza di monomero di PEGMA in catena laterale ($m < 1$). Riducendo la temperatura a 25°C ed aumentando il tempo di reazione (48h) si è osservato un lieve aumento del numero di monomeri PEGMA rilevato in catena laterale, ottenendo il copolimero PHEA-IB₃₀-pDEAEMA₁₄-pPEGMA₁ (b'), con una quantità di monomero legato (m) equivalente a circa 1.2.



Schema 3.3. Sintesi del PHEA-IB-pDEAEMA-pPEGMA.

La valutazione del successo della reazione è stata effettuata mediante $^1\text{HNMR}$ in D_2O , rilevando la presenza del segnale a δ pari a 3.6 attribuito alle catene di PEGMA polimerizzate alle estremità delle catene laterali di pDEAEMA dei copolimeri PHEA-IB-pDEAEMA. La quantificazione del grado di derivatizzazione in PEGMA è stata effettuata paragonando l'integrale del segnale a δ pari a 3.6 con il segnale a δ pari a 2.65 attribuito ai CH_2 relativi al backbone del PHEA.

Tabella 3.4. Condizioni di reazione e dati di caratterizzazione

Condizioni di reazione	mmol PEGMA	TIME (h)	T°C	D.D %	m
	num.u.rip.contenenti iniziatore				
a	10	20	50	-	-
b	50	20	50	-	-
c	100	20	50	25	<1
d	100	20	25	31	≈ 1
e	200	20	50	27	<1
f	200	48	25	37	≈ 1.2

m=unità ripetitive di PEGMA per catena laterale

Utilizzando le condizioni di reazione indicate con **d** in tabella 3.4 (20h a 25°C; rapporto molare pari a 100) sul copolimero PHEA-IB₂₄-pDEAEMA₄, è stato ottenuto un copolimero PHEA-IB₂₄-

pDEAEMA₄-pPEGMA avente in catena laterale un numero medio di residui di PEGMA pari a 6.5 (a').

Il peso molecolare per entrambi i copolimeri (a' e b') è stato ottenuto mediante cromatografia ad esclusione dimensionale (SEC), utilizzando come fase mobile un tampone acetato a pH 4, operando a 37°C con un flusso di 0.8 ml/min, e standard di poliossietilene. Il peso molecolare ottenuto per il copolimero PHEA-IB₃₀-pDEAEMA₁₄-pPEGMA₁ (b') è risultato pari a 64600 Da (Mw/Mn 1.6), per il copolimero PHEA-IB₂₄-pDEAEMA₄-pPEGMA_{6.5} (a') pari a 62100 Da (Mw/Mn 1.7).

I valori dei pesi molecolari sopra riportati sono conformi con le composizioni dei copolimeri e con l'aumento del numero di monomeri polimerizzati in laterale, considerando che (a') presenta $n_{\text{DEAEMA}} = 4$ e $m_{\text{PEGMA}} = 6.5$ e (b') presenta $n_{\text{DEAEMA}} = 14$ e $m_{\text{PEGMA}} = 1.2$.

3.8. Studi di complessazione del DNA con i copolimeri ottenuti mediante consecutive ATRP

La capacità di complessare il DNA da parte dei polimeri PHEA-IB-pDEAEMA-pPEGMA è stata valutata mediante elettroforesi su gel d'agarosio allo 0.7%. Come detto in precedenza, i complessi sono stati formati in HBG sterile per un tempo di 30 minuti, aggiungendo una quantità fissa di DNA e incrementando la quantità di copolimero in modo da ottenere rapporti in peso polimerico/DNA nel range tra 1/1 e 7/1, per il copolimero PHEA-IB₂₄-pDEAEMA₄-pPEGMA_{6.5} (a'), e nell'intervallo tra 0.5/1 e 4/1 per il copolimero PHEA-IB₃₀-pDEAEMA₁₄-pPEGMA₁ (b'). Come si evince dalla figura 3.12, entrambi i copolimeri sono in grado di complessare il DNA. Il completo arresto della corsa elettroforetica del DNA è stato ottenuto con rapporti C/P pari a 3/1 per il copolimero (a'), e pari a 2/1 per il copolimero (b'). Paragonando i due copolimeri si può notare che l'efficienza di complessazione diminuisce passando dal copolimero PHEA-IB₃₀-pDEAEMA₁₄-pPEGMA₁ (b') al copolimero PHEA-IB₂₄-pDEAEMA₄-pPEGMA_{6.5} (a'), per cui per quest'ultimo è richiesto un rapporto C/P maggiore per bloccare la stessa quantità in peso di DNA.

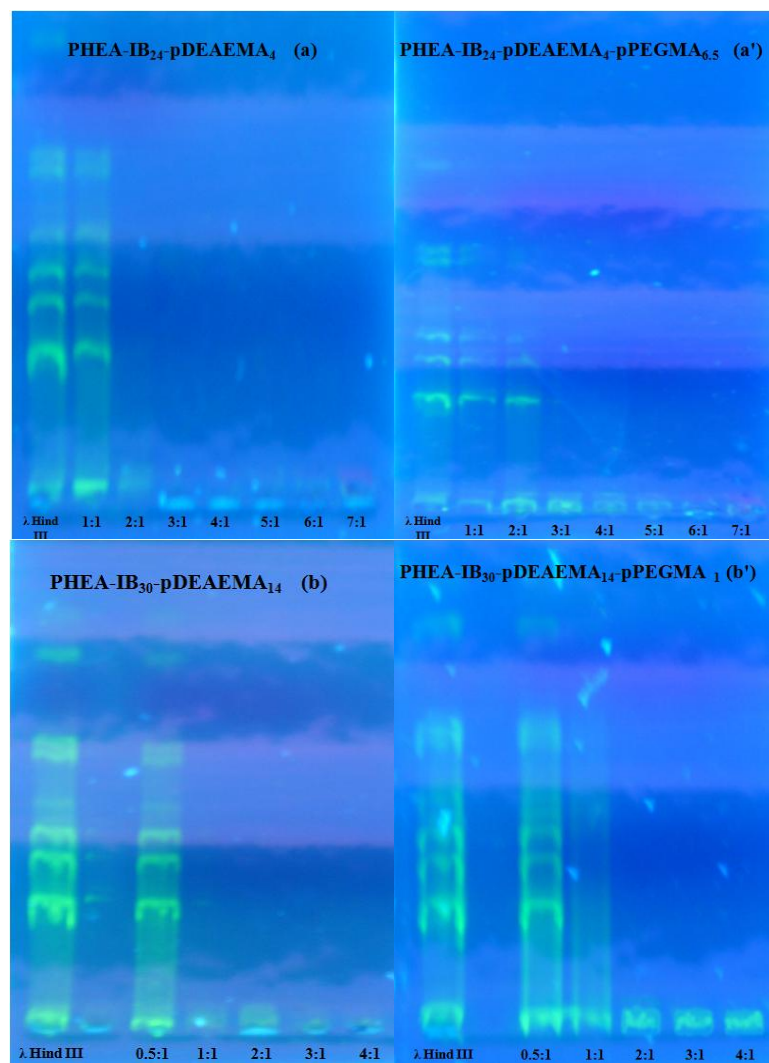


Figura 3.12. Gel elettroforetico a differenti rapporti in peso dei copolimeri PHEA-IB-pDEAEMA (a), PHEA-IB-pDEAEMA (b), PHEA-IB-pDEAEMA-pPEGMA (a') e PHEA-IB-pDEAEMA-pPEGMA (b'). Tutti e quattro i copolimeri sono comparati con λ -Hind III.

3.9. Proprietà biofisiche dei poliplessi ottenuti con i copolimeri PHEA-IB-pDEAEMA-pPEGMA

Le proprietà biofisiche, diametro e potenziale- ζ , dei poliplessi ottenuti utilizzando i copolimeri PHEA-IB-pDEAEMA-pPEGMA, sono state determinate mediante dynamic light scattering (DLS) e misure di potenziale- ζ .

I dati di dimensioni e distribuzione dimensionale dei poliplessi sono riportati nelle tabelle 3.5 e 3.6. I dati ottenuti rivelano che il copolimero PHEA-IB₂₄-pDEAEMA₄-pPEGMA_{6.5} forma, con il pDNA, poliplessi con una distribuzione dimensionale compresa in un range più ristretto rispetto al copolimero non PEGilato da cui è stato ottenuto. Le dimensioni particellari dei poliplessi contenenti tale copolimero aumentano proporzionalmente al rapporto C/P (eccetto che per il C/P 5) rimanendo comunque inferiori rispetto alle dimensioni dei poliplessi ottenuti utilizzando il copolimero non PEGilato avente lo stessa quantità di monomeri di DEAEMA per catena laterale (si veda la tabella 3.5). La dimensione dei poliplessi ottenuti con il copolimero PHEA-IB₃₀-pDEAEMA₁₄-pPEGMA₁ non mostra grandi differenze rispetto a quella dei poliplessi formati utilizzando il copolimero PHEA-IB₃₀-pDEAEMA₁₄ (si veda la tabella

3.6). Questo è probabilmente dovuto alla bassa quantità di unità monomeriche di PEGMA per catena laterale.

Tabella 3.5. Confronto delle dimensioni poliplessi ottenuti con i copolimeri (a) ed (a')

PHEA-IB-pDEAEMA (a)			PHEA-IB-pDEAEMA-pPEGMA (a')		
C/P	Z-Average (nm)	PDI	C/P	Z-Average (nm)	PDI
0.5	273	0.39	0.5	124	0.66
1	276	0.43	1	172	0.29
1.5	237	0.42	1.5	189	0.27
2	203	0.44	2	205	0.25
3	333	0.29	3	228	0.19
5	258	0.32	5	181	0.21

Tabella 3.6. Confronto delle dimensioni poliplessi ottenuti con i copolimeri (b) ed (b')

PHEA-IB-pDEAEMA (b)			PHEA-IB-pDEAEMA-pPEGMA (b')		
C/P	Z-Average (nm)	PDI	C/P	Z-Average (nm)	PDI
0.5	236	0.27	0.5	258	0.26
1	242	0.30	1	257	0.32
1.5	205	0.27	1.5	265	0.27
2	193	0.23	2	238	0.32
3	178	0.21	3	244	0.38
5	146	0.21	5	161	0.24

I valori del potenziale- ζ , ottenuti in HBG, mostrano che incrementando la quantità in peso di copolimero utilizzato per la formazione dei poliplessi il potenziale- ζ aumenta; in particolare, partendo da un valore di -55 mV relativo al plasmide nudo, il potenziale- ζ diventa positivo a un rapporto C/P vicino a 4 per il copolimero PHEA-IB₂₄-pDEAEMA₄-pPEGMA_{6.5}, e ad un rapporto C/P tra 1 e 1,5 per il copolimero PHEA-IB₃₀-pDEAEMA₁₄-pPEGMA₁. La figura 3.13 mostra le curve relative all'andamento del

potenziale- ζ dei poliplessi contenenti i nuovi copolimeri PEGilati paragonate a quelle relative ai poliplessi ottenuti utilizzando i copolimeri non PEGilati.

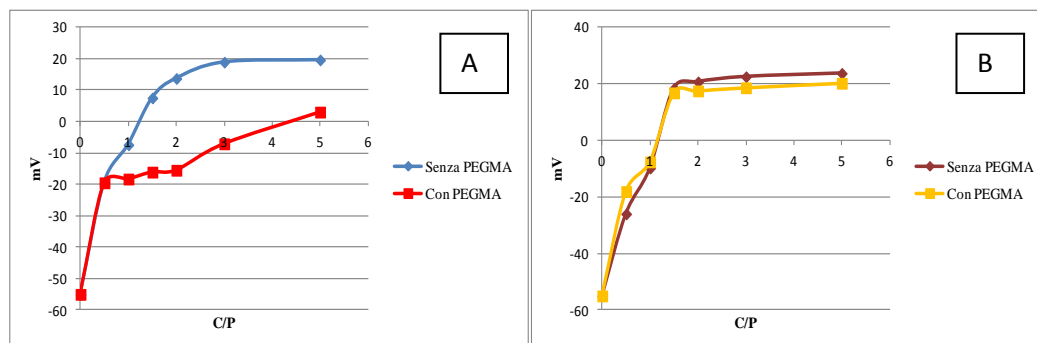


Figura 3.13. Valori di potenziale- ζ dei poliplessi misurati in HBG a vari rapporti C/P. A: PHEA-IB₂₄-pDEAEMA₄ e PHEA-IB₂₄-pDEAEMA₄-pPEGMA_{6.5}; B: PHEA-IB₃₀-pDEAEMA₁₄ e PHEA-IB₃₀-pDEAEMA₁₄-pPEGMA₁.

Si può notare come l'andamento del potenziale- ζ per il copolimero PHEA-IB₂₄-pDEAEMA₄-pPEGMA_{6.5} si discosta da quello relativo al suo precursore non PEGilato, mentre nel secondo caso l'andamento può considerarsi molto simile per i due copolimeri messi a confronto. La ragione di questo è ancora una volta imputabile alla bassa quantità di monomeri di PEGMA legati per catena laterale. In conclusione, i dati sperimentali relativi alla determinazione dell'andamento del potenziale- ζ sono in tutti i casi in accordo con i risultati ottenuti dalle misure di mobilità elettroforetica.

3.10. Saggi di citotossicità dei poliplessi ottenuti con i copolimeri PHEA-IB-pDEAEMA-pPEGMA a' e b'

I poliplessi ottenuti utilizzando i copolimeri e pCMV-Luc sono stati testati in vitro per saggiare i loro effetti sulla vitalità di una linea cellulare di melanoma murinico B16F10, usando i rapporti in peso C/P pari a 2.5 , 3 , 4 , 5 e 6 per il copolimero PHEA-IB₂₄-pDEAEMA₄-pPEGMA_{6.5} , e rapporti pari a 1 , 1.5 , 2 , 2.5 e 3 per il copolimero PHEA-IB₃₀-pDEAEMA₁₄-pPEGMA₁. I dati di tossicità sono mostrati in figura 3.14. La vitalità cellulare è stata misurata utilizzando come controllo positivo b-PEI con un rapporto in peso C/P di 0.8, e come controllo negativo le cellule non trattate. Come si vede dalla figura, la presenza del PEGMA contribuisce alla diminuzione della citotossicità per il copolimero PHEA-IB₂₄-pDEAEMA₄-pPEGMA_{6.5} , rispetto al precursore non PEGilato, essendo i valori di vitalità cellulare intorno al 100% per quasi tutti i rapporti. Anche se il copolimero PHEA-IB₃₀-pDEAEMA₁₄-pPEGMA₁ ha una minore quantità di PEGMA, confrontando i dati con quelli ottenuti dai saggi sul copolimero non PEGilato, si può notare come la presenza di tale monomero incrementi comunque la vitalità cellulare.

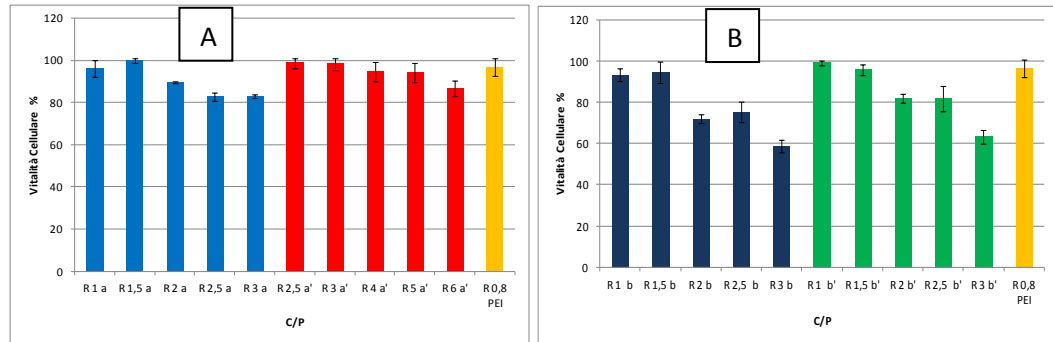


Figura 3.14. Vitalità cellulare dei poliplessi formati con i copolimeri PHEA-IB-pDEAEMA-pPEGMA (a) e PHEA-IB-pDEAEMA-pPEGMA (b) e con pCMV-Luc ai rapporti C/P indicati. I dati sono confrontati con copolimeri (a) e (b) allo stesso agli stessi rapporti C/P. La bPEI è stata utilizzata come controllo positivo al rapporto in peso C/P 0,8. Le cellule B16-F10 sono state incubate con i poliplessi per 4 ore in DMEM+ FBS. I dati sono espressi come percentuale di cellule non trattate. Ogni esperimento è stato eseguito in triplicato ed i risultati sono presentati come media \pm deviazione standard.

3.11. Studi di transfezione

Per valutare l'abilità dei nuovi copolimeri di agire come gene delivery systems è stata saggiata la capacità di transfezione dei poliplessi su una linea cellulare di B16F10, usando b-PEI (branched polyethileneimine) come controllo positivo. I rapporti C/P utilizzati sono gli stessi dei test di citotossicità (figura 3.15).

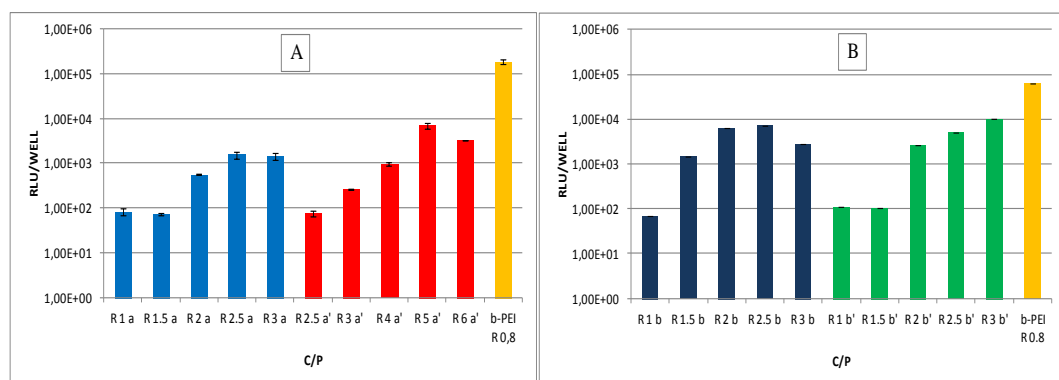


Figura 3.15. Studi di efficienza di transfezione in vitro dei poliplessi ottenuti con PHEA-IB-pDEAEMA-pPEGMAa '(A) e PHEA-IB-pDEAEMA-pPEGMAb' (B) e con pCMV-Luc ai rapporti in peso C/P indicati. I dati sono messi a confronto con quelli ottenuti con i copolimeri (a) e (b) allo stesso rapporto in peso C/P. La bPEI è stata utilizzata come controllo positivo al rapporto C/P 0.8. Ogni esperimento è stato eseguito in triplicato ed i risultati sono presentati come media \pm deviazione standard.

I poliplessi contenenti il copolimero PHEA-IB₃₀-pDEAEMA₁₄-pPEGMA₁ hanno mostrato una efficienza di transfezione lievemente più elevata rispetto a quelli ottenuti utilizzando il copolimero PHEA-IB₂₄-pDEAEMA₄-pPEGMA_{6,5}, ma in entrambi i casi, e a tutti i rapporti, l'efficienza di transfezione si è rivelata sempre al di sotto di quella della b-PEI. Paragonando i risultati con i dati relativi ai copolimeri non PEGilati si può notare come la presenza del PEGMA, seppur abbia migliorato la citocompatibilità in vitro dei sistemi ottenuti, non abbia effettivamente portato ad un miglioramento della transfezione. La bassa efficienza di transfezione ancora una volta potrebbe essere spiegata considerando diversi fattori, e cioè che questa possa dipendere sia dalla elevata ramificazione dei copolimeri che porterebbe a dei poliplessi con una elevata stabilità, con un conseguente basso rilascio del materiale genetico; sia da un basso rilascio del plasmide complessato a livello endocellulare. Ciò è probabilmente dovuto ad uno scarso effetto proton sponge dei polimeri contenenti unità di DEAEMA o monomeri simili [Jones R.A. et al 2004].

3.12. Sintesi e Caratterizzazione dei Copolimeri PHEA-IB-DMAEMA con un basso grado grafting per la veicolazione di small interfering RNA (siRNA).

La terapia genica riguarda non solo le molecole di grandi dimensioni come il pDNA, ma anche oligonucleotidi come gli small interfering RNA (siRNA). Anche i siRNA come il pDNA, possono essere veicolati utilizzando i vettori polimerici. In linea di massima, i requisiti che devono possedere i carriers per la veicolazione del pDNA, valgono anche per gli oligonucleotidi, ma occorre tenere conto della differenza di dimensioni e di conformazione (di tipo **A** per i siRNA e di tipo **B** per il DNA) tra i due tipi di materiale genetico. In particolare, i siRNA sono costituiti da un doppio filamento contenente 21-25 coppie di basi e possiedono una struttura compatta di una tale entità, che conferisce loro un comportamento simile a delle aste rigide. Ciò causa un'alterazione della spaziatura dei fosfati presenti nel backbone degli oligoribonucleotidi, che comporta una riduzione della quantità di cariche positive necessaria per legare stechiometricamente gli oligoribonucleotidi rispetto ai deossiribonucleotidi di analoghe dimensioni [Xu L. et al., 2011]. Per tali ragioni, sono stati sintetizzati due nuovi polimeri del PHEA mediante l'*Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP)*, utilizzando anche in questo caso l'*N,N*-

dietilamino-etilmetacrilato (DEAEMA) come monomero ed aventi delle ramificazioni di pDEAEMA in numero inferiore rispetto agli omologhi precedentemente ottenuti ed aventi in tali catene un numero di polimerizzazione (n) inferiore, cioè catene più corte; tali copolimeri risultano pertanto, nel complesso, meno carichi degli omologhi precedentemente ottenuti.

La scelta di utilizzare lo stesso monomero del precedente lavoro è supportata dagli ottimi risultati ottenuti nella veicolazione di oligonucleotidi da copolimeri portanti funzioni strutturalmente simili; in particolare ammine terziarie del tipo dimetilammietilmetacrilato (DMAEMA) [Lucas B. et al., 2004].

Come è stato detto in precedenza, la presenza di un alta quantità di ossidrilici nel backbone polimerico del PHEA consente di legare in catena laterale una certa quantità di gruppi 2-bromoisobutirrilici mediante la reazione con il 2-bromoisobutirril bromuro. Variando il rapporto in moli tra il BIBB e quelle delle unità ripetitive di PHEA, è stato possibile modulare la quantità di siti d'iniziazione della reazione radicalica, consentendo di ottenere nuovi macroiniziatori per l'ATRP (PHEA-BIB). In particolare, utilizzando rapporto in moli pari a 0.350 e 0.175 è stato possibile sintetizzare, due nuovi PHEA-BIB aventi un minore grado di derivatizzazione rispetto a quelli in precedenza visti. I

parametri di reazione come temperatura, tempo e solvente di reazione, sono stati mantenuti costanti, fatta eccezione per la quantità in moli della trietilammina (TEA) che è stata proporzionalmente ridotta (schema 3.1). Il grado di derivatizzazione (D.D. degree of derivatization % mol/mol), dei due PHEA-BIB sintetizzati è stato determinato mediante analisi $^1\text{H-NMR}$, la quale ha permesso di quantificare i gruppi α -Bromoisobutirrici introdotti nel polimero, rapportando l'integrale del picco relativo ai protoni del gruppo Bromoisobutirrico a δ 1.9 (a) con l'integrale del picco a δ 2.79 relativi ai protoni $-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-$ delle unità ripetitive nel backbone del polimero (b), (figura 3.1) [Cavallaro G. et al., 2009] ottenendo valori di D.D. del 13% e del 4%.

I nuovi copolimeri PHEA-IB-pDEAEMA contenenti unità ripetitive di DEAEMA sono stati preparati sfruttando la polimerizzazione radicalica a trasferimento di atomo, utilizzando un rapporto molare tra monomero ed i gruppi BIB pari a 10. L'omopolimerizzazione è stata eseguita in atmosfera di argon utilizzando una combinazione di rame (I) e bromuro di 2,2'-bipiridina come catalizzatore (figura 3.4), la DMF come solvente ed operando a 50°C (vedi schema 3.2). In entrambi i casi, i copolimeri PHEA-IB-pDEAEMA purificati tramite dialisi esaustiva contro acqua sono stati

isolati con alta rese e caratterizzati tramite analisi $^1\text{H-NMR}$, la quale ha confermato l'introduzione dei monomeri in catena laterale del PHEA. Tali copolimeri, presentano due diversi numeri di braccia con differente lunghezza delle catene laterali, permettendo in tal modo, di ottenere ramificazione con un diverso numero di ammine terziarie. Vedi tabella 3.7. L'obiettivo è stato quello di individuare l'influenza della struttura del copolimero sul comportamento biologico dei nuovi gene carriers.

Tabella 3.7. Proprietà dei nuovi copolimeri PHEA-IB-pDEAEMA

Copolimero	D.D. % BIB	mmol DEAEMA mmol BIB	n di DEAEM A	Mw (KDa)	PDI
PHEA-IB-PDEAEMA _a	13	10	10	120000	2.0
PHEA-IB-PDEAEMA _b	4	10	4	77000	2.1

Come è possibile vedere in tabella, i valori dei pesi molecolari dei copolimeri sono di 120000 e 77000 rispettivamente per a e b. Tali valori, sono più grandi di quelli prevedibili teoricamente. Ciò è probabilmente dovuto ad un fenomeno di aggregazione tra le molecole di PHEA-IB-pDEAEMA, ipotesi supportata da un valore di PDI non ottimale.

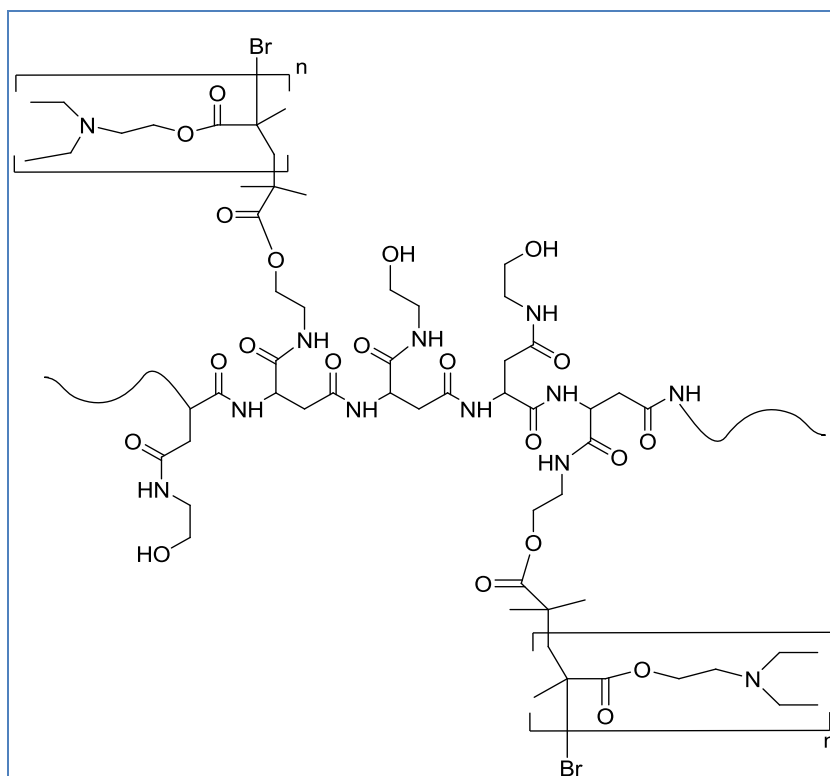


Figura 3.16. Struttura chimica dei copolimeri PHEA-IB-pDEAEMA a basso grado di grafting.

3.13. Studi preliminari di complessazione con il DNA

Per studiare la capacità dei nuovi copolimeri di agire come sistemi di veicolazione di materiale genetico sono stati effettuati test di complessazione con il DNA λ -Hind III mediante elettroforesi su gel d'agarosio. La valutazione della mobilità elettroforetica dei poliplessi a differenti rapporti in peso polimero-DNA è stata eseguita dopo aver mantenuto in contatto i copolimeri ed il DNA per un tempo di formazione in tampone HBG a pH 7.4 fissato a 24h, utilizzando rapporti in peso C/P da 0.5/1 a 6/1.

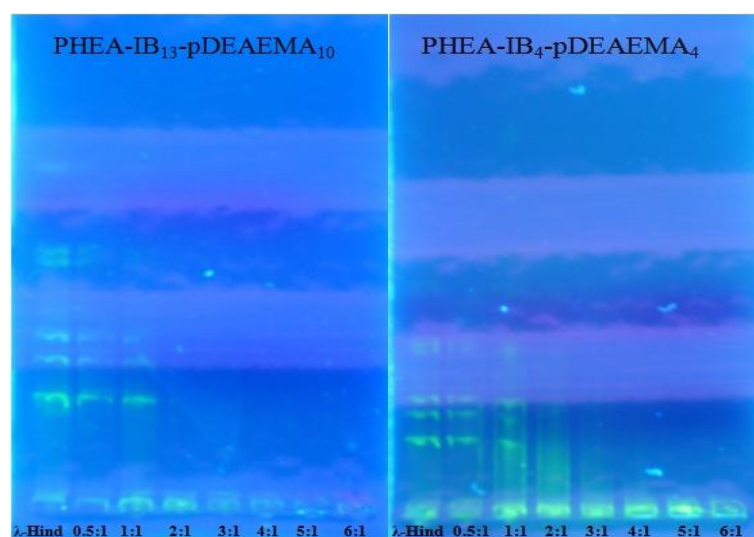


Figura 3.17. Studio della mobilità elettroforetica dei poliplessi ottenuti con i copolimeri PHEA-IB₁₃-pDEAEMA₁₀ e PHEA-IB₄-pDEAEMA₄ a differenti rapporti in peso polimero-DNA(λ -Hind III)

Come mostrato in Figura 3.17, i copolimeri hanno evidenziato una buona capacità di ritardare la corsa elettroforetica del DNA. L'intensità delle bande di migrazione del DNA libero diminuiscono gradatamente con l'aumentare del rapporto in peso copolimero/DNA. Un completo blocco della migrazione è osservato per i copolimeri PHEA-IB₁₃-pDEAEMA₁₀ e PHEA-IB₄-pDEAEMA₄ con rapporti in peso rispettivamente di 2 e 3, indicando che il copolimero PHEA-IB₁₃-pDEAEMA₁₀ avendo un numero più grande di cariche positive esibisce un maggiore capacità di condensare il pDNA.

3.14. Studi preliminari di dimensioni e potenziale- ζ con un plasmide modello

Le proprietà biofisiche dei poliplessi ottenuti con i nuovi copolimeri, intese come diametro medio e potenziale- ζ , sono state determinate mediante misure di Dynamic Light Scattering (DLS) e potenziale- ζ .

L'importanza delle dimensioni dei complessi per un efficiente uptake è ben noto, infatti solo se il DNA è condensato in piccoli complessi è possibile avere un veloce ingresso di tali sistemi all'interno della cellula, inoltre un poliplesso di piccole dimensioni è anche un prerequisito per un ottimale espressione transgenica in vivo. Nelle tabelle 3.7 e 3.8 di seguito riportate sono elencate le dimensioni dei poliplessi ottenuti con i due copolimeri dopo 24h di complessazione.

Tabella 3.8. Dimensioni dei poliplessi ottenuti con PHEA-IB₁₃-pDEAEMA₁₀/pCMV-Luc

R (w/w)	Dimensioni (nm)	PDI
0.5	333	0.38
1	264	0.33
2	246	0.31
4	233	0.26
6	215	0.35
10	174	0.30

Tabella 3.9. Dimensioni dei poliiplessi ottenuti con PHEA-IB₄-pDEAEMA₄/pCMV-Luc

R (w/w)	Dimensioni (nm)	PDI
1	431	0.59
2	423	0.45
6	350	0.49
10	316	0.42
12	267	0.40
15	203	0.38
18	200	0.38

I complessi del pCMV-Luc con i copolimeri PHEA-IB₁₃-pDEAEMA₁₀ e PHEA-IB₄-pDEAEMA₄; hanno mostrato una diminuzione del diametro medio da 518 del DNA nudo a valori al di sotto dei 200 nm per il rapporto in peso C/P 10 relativo al copolimero PHEA-IB₁₃-pDEAEMA₁₀ e di 200 nm per il rapporto in peso C/P 18 relativo al copolimero PHEA-IB₄-pDEAEMA₄, evidenziando una buona capacità condensante per entrambi.

Le curve di potenziale- ζ dei due copolimeri del PHEA sono mostrate in figura 3.18. I valori di potenziale- ζ ottenuti in HBG a pH 7.4 mostrano che all'aumentare del rapporto in peso polimero/DNA utilizzato, il potenziale aumenta, partendo da un valore di -55mV per il plasmide nudo, diventa positivo a rapporti superiori a 1.2 e 12 rispettivamente per il PHEA-IB₁₃-pDEAEMA₁₀ e il PHEA-IB₄-pDEAEMA₄. Tali dati sono in accordo con la minore quantità di gruppi amminici terziari presenti nel PHEA-IB₄-pDEAEMA₄ rispetto

al copolimero PHEA-IB₁₃-pDEAEMA₁₀ a parità di rapporto in peso polimero/DNA utilizzato.

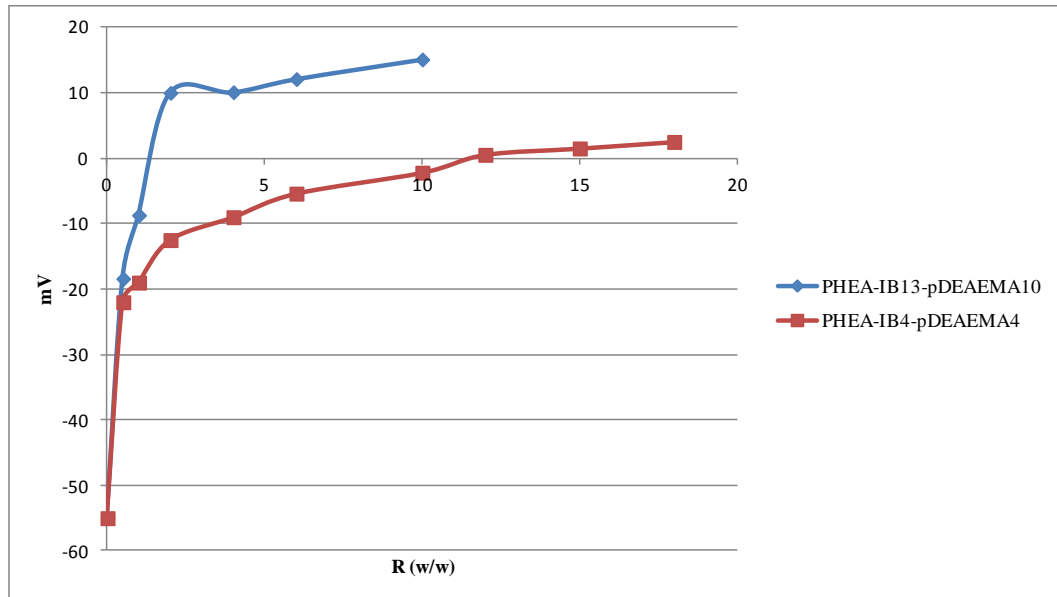


Figure 3.18. valori del potenziale- ζ dei copolimeri PHEA-IB-pDEAEMA_a; PHEA-IB-pDEAEMA_b misurati in HBG, in funzione del rapporto in peso C/P e dei mV.

3.15. Studi di stabilità dei poliplessi attraverso scambio polianionico

È noto, da dati riportati in letteratura, che i complessi con il DNA mostrano bassa stabilità a livello ematico, in quanto possono subire rapida dissociazione a causa delle proteine plasmatiche, caratterizzate da una distribuzione di carica negativa. In particolare, si è supposto che tali proteine possano interagire con i policationi spiazzando il DNA complessato, comportando in tal modo il prematuro rilascio del materiale genetico [Hashida M. et al., 1996].

La valutazione della stabilità dei poliplessi in presenza di proteine plasmatiche, anche in vitro, è importante ai fini dell'efficacia di far arrivare il materiale genetico all'interno delle cellule bersaglio.

La stabilità allo scambio anionico dei poliplessi è stata pertanto valutata mediante incubazione in vitro degli stessi con l'albumina, scelta perché proteina più abbondante nel plasma e dotata a pH fisiologico di cariche negative (P.I. 4.9). Anche in questo caso i complessi sono stati preparati solubilizzando i copolimeri (PHEA-IB₁₃-pDEAEMA₁₀ e PHEA-IB₄-pDEAEMA₄) in tampone HBG a pH 7.4 e mantenuti in contatto con il DNA (Calf Thymus) per 24h. Inoltre, l'albumina è stata utilizzata alla concentrazione pari a quella fisiologica (4g/dl). La valutazione della stabilità dei complessi, a rapporti in peso C/P che vanno da 2 a 15 per entrambi i copolimeri, è stata effettuata mediante elettroforesi su gel d'agarosio allo 0.7%, monitorando la migrazione del DNA per effetto del campo elettrico, in seguito all'interazione con l'albumina, dopo incubazione di quest'ultima per 12h con i poliplessi [Maniatis T. et al., 1986]. Come è possibile vedere in figura 3.19 i poliplessi ottenuti con entrambi i copolimeri mostrano alta stabilità a tutti i rapporti in peso C/P usati dimostrando che l'albumina non è stata in grado di spostare il DNA complessato.

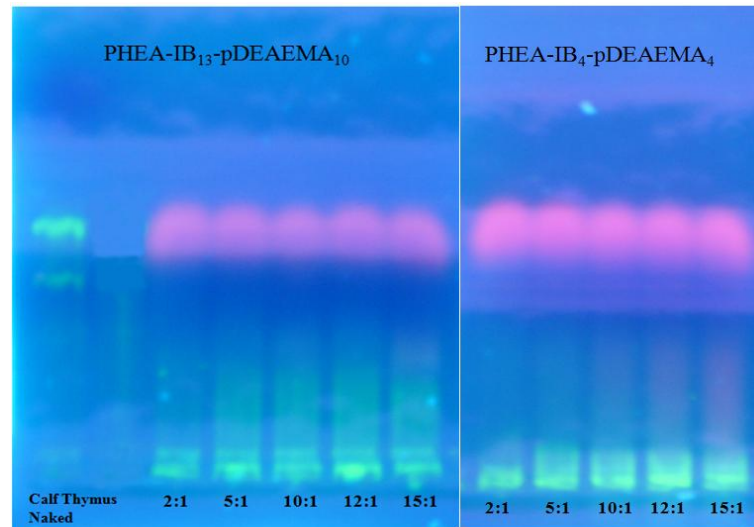


Figura 3.19. Elettroforesi su gel d'agarosio dei poliplessi trattati con albumina a concentrazione fisiologica a differenti rapporti in peso C/P compreso tra 2 e 15. Tutti i poliplessi sono messi a confronto con il DNA Calf Thymus nudo.

3.16. Test preliminari di citotossicità dei complessi (MTS)

La bassa citotossicità è una proprietà indispensabile per i complessi che si propongono come vettori per materiale genetico. Per tale ragione i poliplessi ottenuti con il plasmide pCMV-Luc sono stati sottoposti a test di citotossicità in vitro utilizzando come modello una linea cellulare di melanoma murinico, le B16F10. I complessi sono stati formati mantenendo in contatto il polimero ed il DNA per 24h e testati con rapporti in peso C/P da 1 a 2 per il copolimero PHEA-IB₁₃-pDEAEMA₁₀ (indicato con C10), e da 12 a 18 per PHEA-IB₄-pDEAEMA₄ (indicato con C4) utilizzando 24 e 48h come tempi d'incubazione. La vitalità cellulare è stata misurata utilizzando la PEI

ramificata (b-PEI) ad un rapporto in peso 0.8 come controllo positivo e cellule non trattate come controllo negativo (100% di vitalità). I dati di citotossicità sono mostrati in figura 3.20, dalla quale è possibile vedere che la vitalità cellulare è circa del novanta per cento per qualsiasi rapporto in peso per entrambe le tipologie dei poliplessi sia a 24h che 48h d'incubazione. I sistemi testati sono pertanto dotati di elevata citocompatibilità.

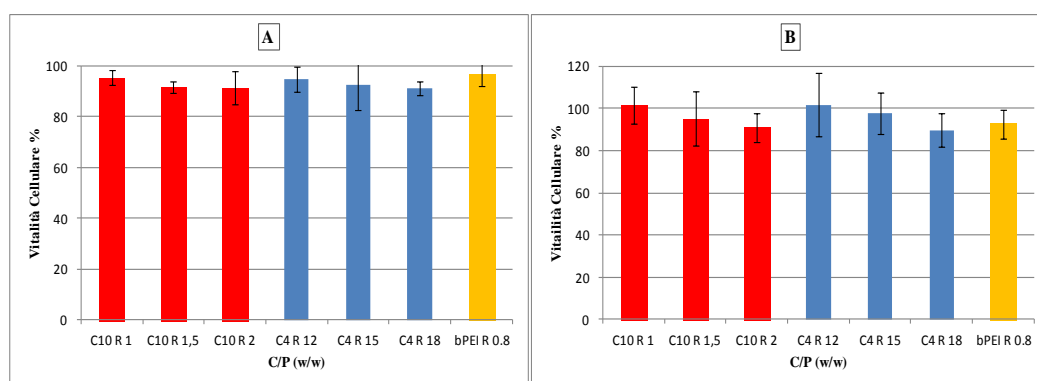


Figura 3.20. Vitalità cellulare dei poliplessi formati con i copolimeri PHEA-IB₁₃-pDEAEMA₁₀ (C10) e PHEA-IB₄-pDEAEMA₄ (C4) e con pCMV-Luc ai rapporti C/P indicati. La bPEI è stata utilizzata come controllo positivo al rapporto in peso C/P 0.8. Le cellule B16-F10 sono state incubate con i poliplessi per 24 (A) e 48 ore (B) in DMEM+ FBS. I dati sono espressi come percentuale di cellule non trattate. Ogni esperimento è stato eseguito in triplicato ed i risultati sono presentati come media \pm deviazione standard.

3.17. Test di transfezione con complessi ottenuti tra copolimeri e siRNA

Le cicline E sono delle proteine che interessano la progressione del ciclo cellulare. Una ciclina forma complessi con l'enzima *CDK* (*Chinasi ciclina-dipendente*) la quale attiva la funzione chinastica

dell'enzima e fosforila, nel nucleo, il *retinoblastoma* (*Rb*), che prima inibiva il fattore di trascrizione E2F1, rendendolo libero di dare inizio ad una serie di trascrizioni (figura 3.21).

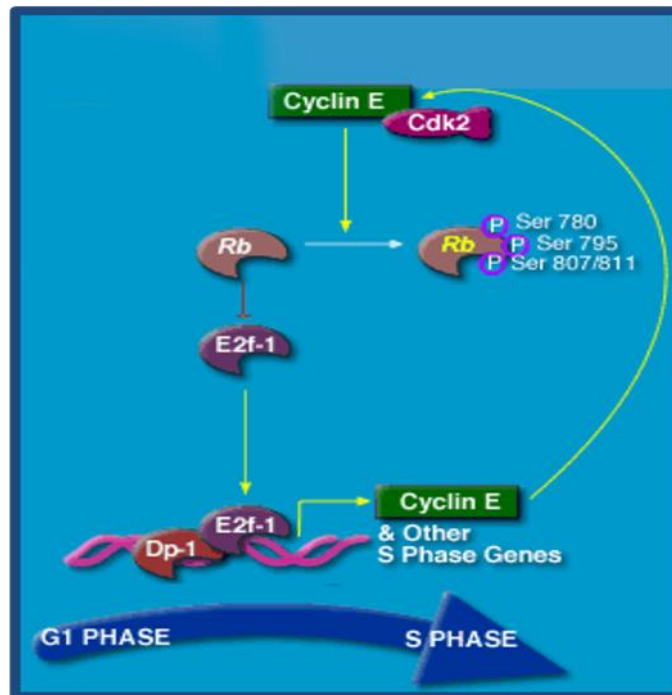


Figura 3.21. Meccanismo di regolazione del ciclo cellulare delle cicline.

In particolare, quando Rb è legato a E2F1, e questo è defosforilato, ne blocca l'attività dei fattori di trascrizione. Al contrario, quando Rb è fosforilato dal complesso cdk2/Ciclina E, si ha la dissociazione del dimero, permettendo a E2F1 di attivare la trascrizione dei geni necessari per la fase S del ciclo cellulare. Uno dei geni attivati da E2F1 è quello relativo alla ciclina E stessa, portando ad un feedback positivo di ciclina E accumulata.

Per tali ragioni è importante bloccare il processo che porta alla biosintesi delle cicline, così da impedire alle cellule tumorali di proliferare [Fung T.K. et al., 2005]. Ciò può essere effettuato utilizzando siRNA capaci di inibire in ultima analisi la sintesi delle cicline.

Al fine di valutare la capacità dei copolimeri del PHEA di veicolare tali siRNA, è stato realizzato uno studio su una linea cellulare di carcinoma epatico HuH7 andando ad impedire l'espressione del mRNA per il fattore di trascrizione E2F1. In questo studio è stato somministrato uno specifico siRNA siE2F1 attraverso la formazione di un complesso PHEA-IB₁₃pDEAEMA₁₀/siE2F1, il quale è stato incubato per 3h con un rapporto polimero/siRNA pari a 2 p/p, corrispondente ad una concentrazione in siRNA di 217nM. L'efficienza del silenziamento è stata valutata dopo 3 giorni. [Farra R. et al., 2011]. È stato utilizzato inoltre un siRNA di controllo (siGL2) nelle medesime condizioni del siRNA siE2F1. Come è possibile vedere in figura 3.22, circa il 50% delle cellule HuH7 trattate con i poliplessi ha mostrato una soppressione dell'espressione del mRNA target (E2F1).

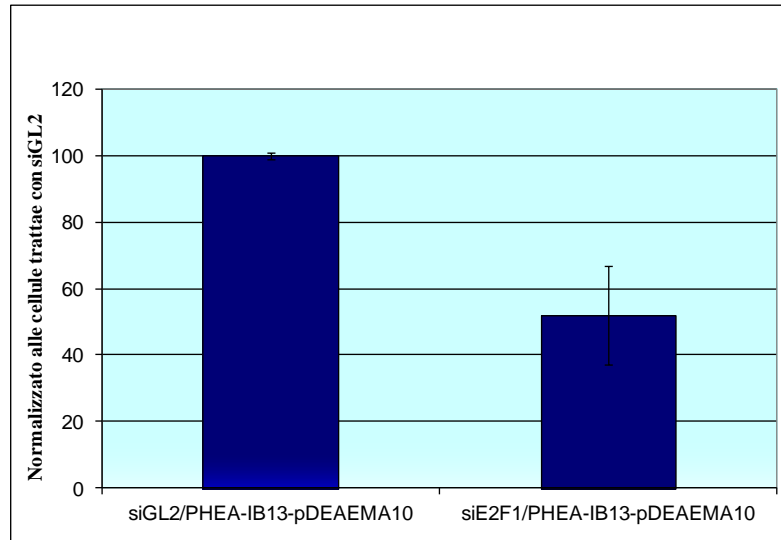


Figura 3.22. Istogramma dei livelli di mRNA di E2F1 in cellule di epatocarcinoma HuH7

Il risultato ottenuto con il sistema PHEA-IB₁₃pDEAEMA₁₀/siE2F1 evidenzia che il copolimero PHEA-IB₁₃pDEAEMA₁₀ è capace di formare poliplessi con il siRNA scelto, poliplessi che sono in grado di ridurre l'espressione del fattore di trascrizione E2F1 riducendo quindi la proliferazione cellulare.

3.18. Studi di vitalità cellulare dopo trattamento con il siRNA

Allo scopo di valutare l'effetto che il complesso PHEA-IB₁₃pDEAEMA₁₀/siE2F1 ha sulla vitalità cellulare dopo la somministrazione, è stata eseguita la conta cellulare dopo 3 giorni dal delivery [Farra R. et al., 2011]. Come è possibile vedere in figura 3.23, le cellule trattate con il complesso PHEA-IB₁₃pDEAEMA₁₀/siE2F1 presentano un valore inferiore rispetto al siRNA controllo siGL2. Ciò

è spiegabile considerando che la riduzione dei livelli di mRNA per il fattore di trascrizione E2F1, il quale è responsabile dei processi coinvolti nella stimolazione della proliferazione cellulare, comporta anche una certa riduzione del numero di cellule nel campione trattato con il siRNA specifico; questo dato quindi è in accordo e conferma gli studi di transfezione in figura 3.22.

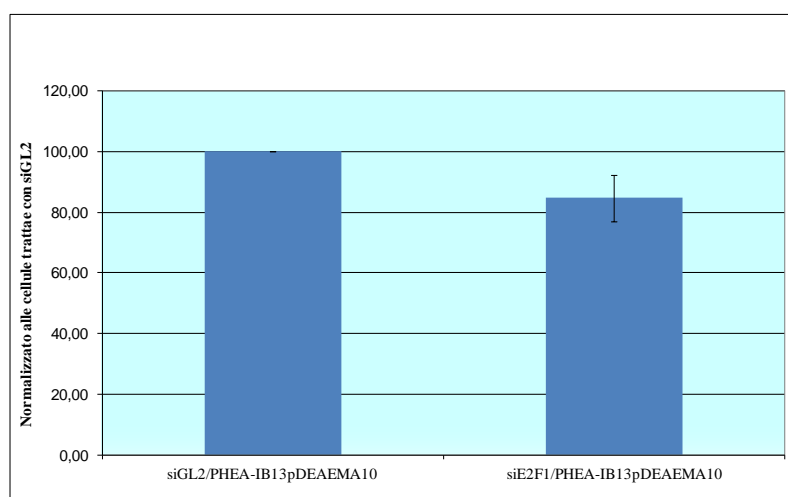


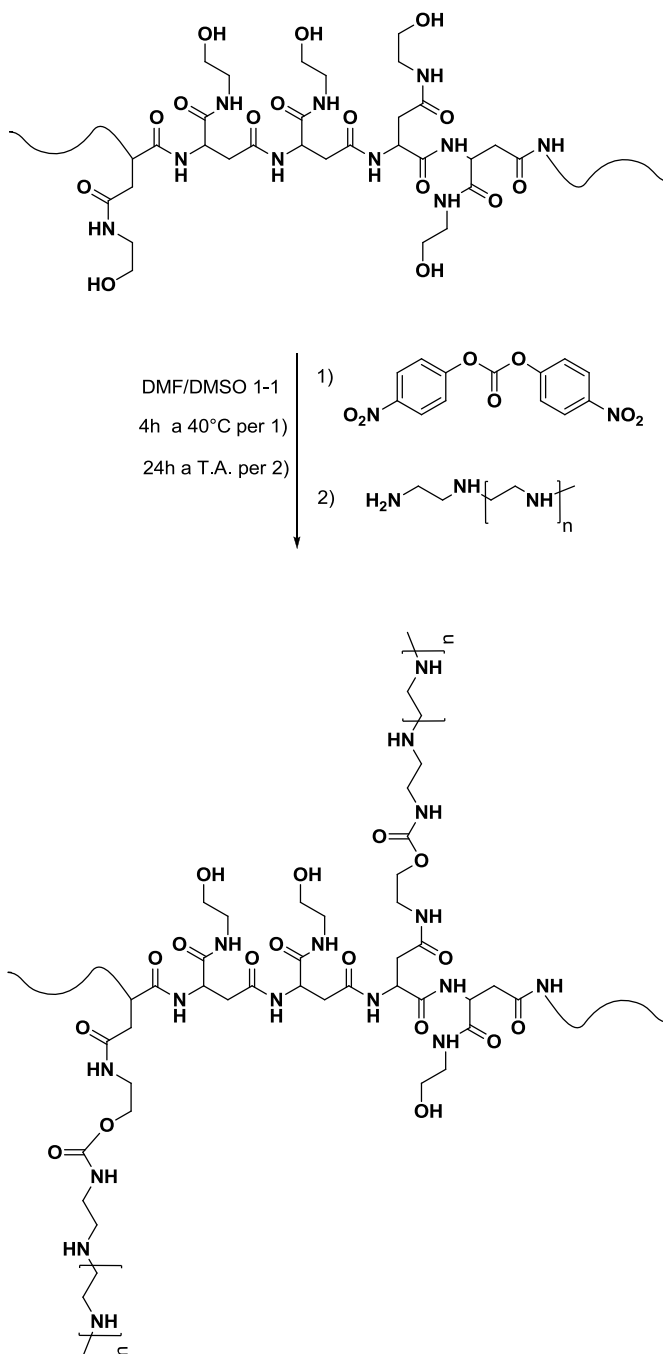
Figura 3.23. Studi di vitalità cellulare su cellule di HuH7 dopo 3h d'incubazione col complesso PHEA-IB₁₃pDEAEMA₁₀/siE2F1.

3.19. Sintesi e caratterizzazione del copolimero PHEA-sLPEI e PHEA-PEG-sLPEI

Considerata l'importanza della presenza di catene di oligoammine legate al PHEA nella progettazione di polimeri dotati di elevata capacità condensante, bassa citotossicità ed alta efficienza

di transfezione, nell'ultima fase del mio lavoro di dottorato mi sono occupato della coniugazione di oligocatene di polietilenimina lineare (sLPEI) nella struttura del PHEA, ottenendo in tal modo prodotti in grado di interagire con il DNA attraverso interazioni ioniche ed in grado di funzionare quali vettori genici.

La sLPEI è stata legata al backbone del PHEA attraverso attivazione dei gruppi idrossilici con 4-NPBC seguita da reazione dell'addotto con sLPEI, reazione che porta alla formazione di un legame carbammico (schema 3.4). Il tempo d'attivazione utilizzato è stato di 4 ore. Il copolimero PHEA-sLPEI è stato purificato mediante dialisi e caratterizzato tramite analisi $^1\text{H-NMR}$, la quale conferma la struttura ipotizzata, inoltre lo spettro $^1\text{H-NMR}$ permette di determinare il grado di derivatizzazione percentuale molare (DD%) comparando la media degli integrali relativi agli idrogeni della sLPEI determinato in D_2O più l'aggiunta di DCl (δ 3.36), con l'integrale relativo al picco a δ 3.62 assegnabile ai protoni del gruppo etanolamminico $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$ del backbone polimerico. La figura 3.25 illustra un tipico $^1\text{H-NMR}$ del PHEA-sLPEI. Il grado di derivatizzazione in sLPEI così determinato è stato del 18%.



Schema 3.4. Sintesi del copolimero PHEA-sLPEI

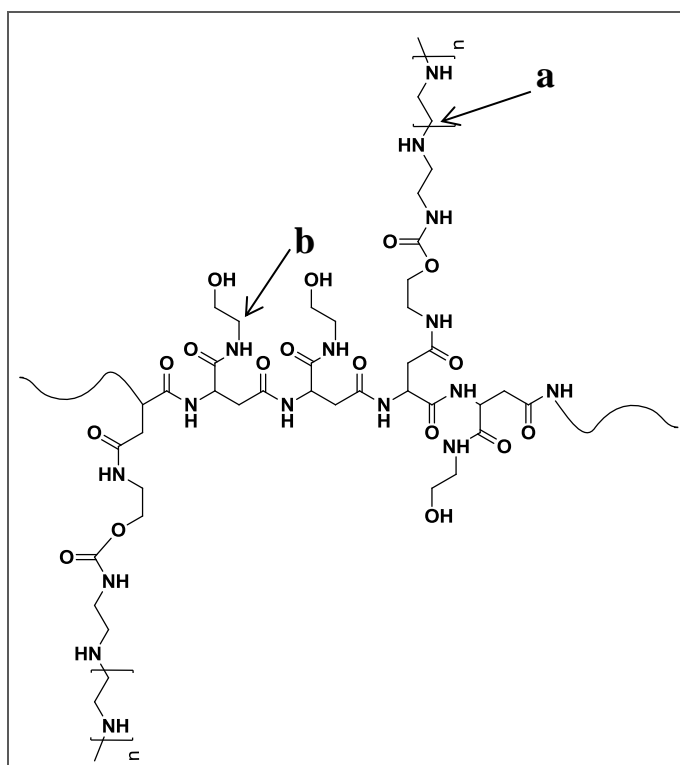


Figura 3.24. Struttura chimica del copolimero PHEA-sLPEI

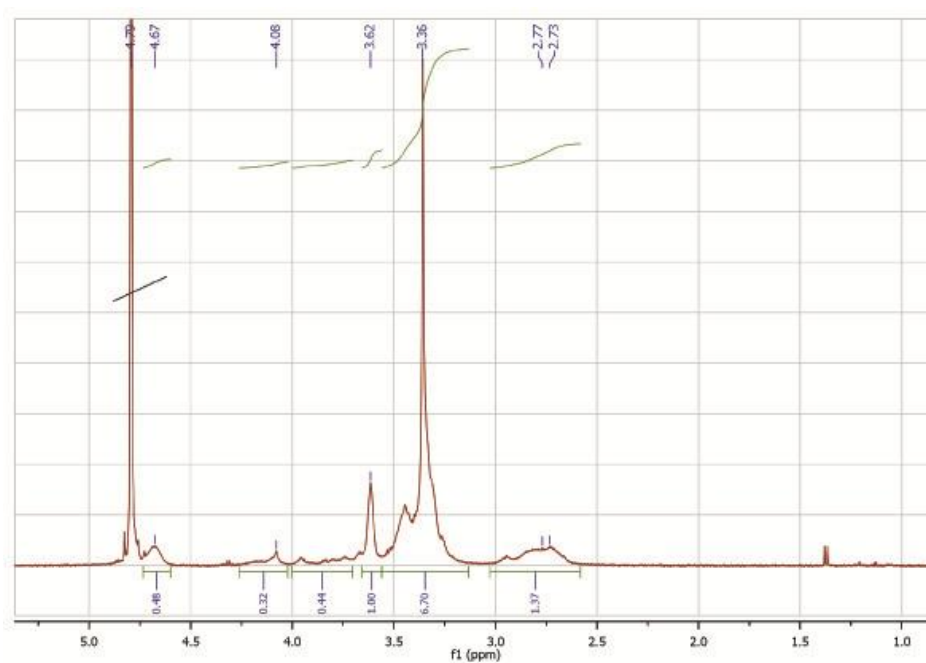


Figura 3.25. Spettro $^1\text{H-NMR}$ del PHE-sLPEI in $\text{D}_2\text{O}+\text{DCI}$

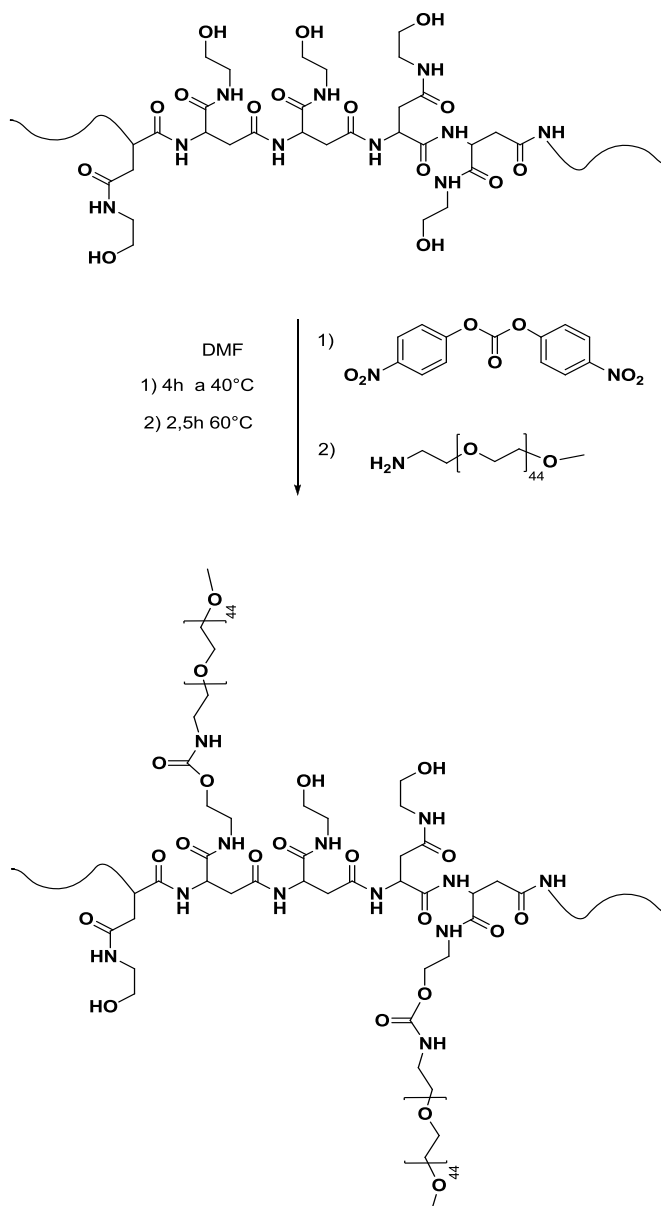
Al fine di valutare la differenza di comportamento biologico tra il copolimero PHEA-sLPEI ed il suo analogo PEGilato, è stato

sintetizzato un nuovo copolimero del PHEA recante oltre alle unità sLPEI, catene di PEG legate direttamente al backbone polimerico del PHEA. La via sintetica prescelta fa uso, anche in questo caso, del bis-(4-nitrofenil)-carbonato (4-NPBC) e di un ammino metossi PEG. Come già sottolineato in precedenza, il 4-NPBC è un agente di coniugazione utilissimo per legare molecole recanti gruppi amminici agli ossidrili liberi del PHEA attraverso la formazione di un legame carbammico. La reazione di coniugazione tra PHEA e PEG avviene solo dopo attivazione degli ossidrili del PHEA con il 4-NPBC, alla temperatura di 40°C. In seguito il gruppo amminico terminale del PEG viene fatto reagire con il PHEA attivato alla temperatura di 60°C (schema 3.5). Tale reazione porta alla formazione di un legame carbammico formato dal carbonile donato dall'agente attivante e dal gruppo amminico dell'ammino-metossi-PEG.

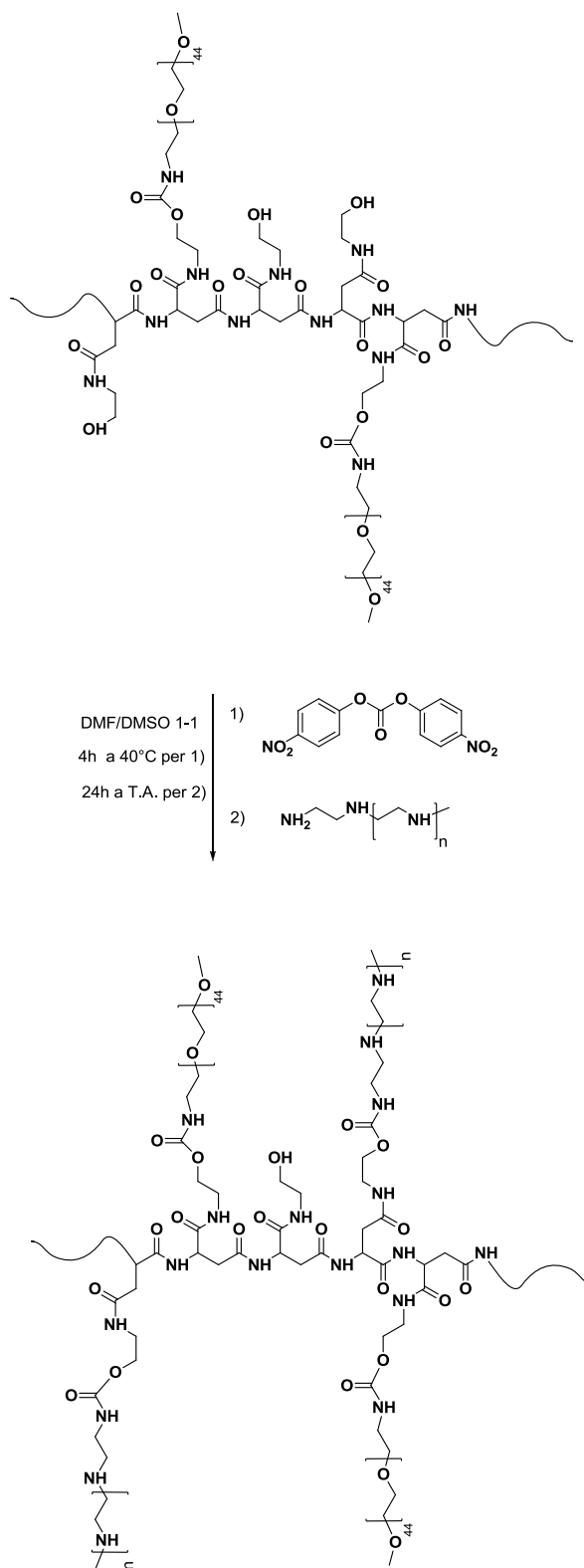
Il PHEA-PEG ottenuto è stato caratterizzato utilizzando la spettrometria $^1\text{H-NMR}$. L'analisi NMR ha confermato la struttura ipotizzata. Inoltre il grado di derivatizzazione del PHEA con PEG (DD_{PEG}) è stato determinato con l'ausilio dell'NMR (in D_2O) e calcolato paragonando l'integrale dei picchi relativi ai protoni a δ 3.65 $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-$ (appartenenti al PEG) con gli integrali relativi ai

protoni a δ 3.12 del PHEA. Il DD in PEG è stato del 2% in moli corrispondente ad una percentuale in peso del 20%.

La sLPEI è stata legata al PHEA-PEG attraverso la reazione di attivazione di questo con 4-NPBC come precedentemente descritto. Il grado di derivatizzazione in sLPEI determinato come precedentemente spiegato è stato del 15% (schema 3.6).



Schema 3.5. Sintesi del copolimero PHEA-PEG



Schema 3.6. Sintesi del copolimero PHEA-PEG-sLPEI

Per valutare la capacità dei copolimeri di complessare il DNA sono stati eseguiti studi di complessazione mediante analisi elettroforetica.

3.20. Studi di complessazione con il DNA

L'interazione tra DNA (λ -Hind III) ed i derivati PHEA-sLPEI e PHEA-PEG-sLPEI è stata valutata attraverso analisi elettroforetica, su gel d'agarosio allo 0.7% p/v. I complessi sono stati preparati in tampone HBG a pH 7.4 ed il tempo di formazione dei complessi è stato fissato a 30 minuti utilizzando rapporti in peso C/P da 1/1 a 5/1. In figura 3.26 sono mostrate le elettroforesi dei poliplessi ottenuti con entrambi i copolimeri, le quali mostrano una grande capacità di ritardare la corsa elettroforetica del DNA. Infatti, come è possibile vedere in figura, entrambi i copolimeri bloccano la corsa elettroforetica del DNA ad un rapporto in peso C/P pari ad 1 evidenziando che, almeno per quel che riguarda l'elettroforesi, la presenza del PEG non altera la capacità complessante del copolimero.

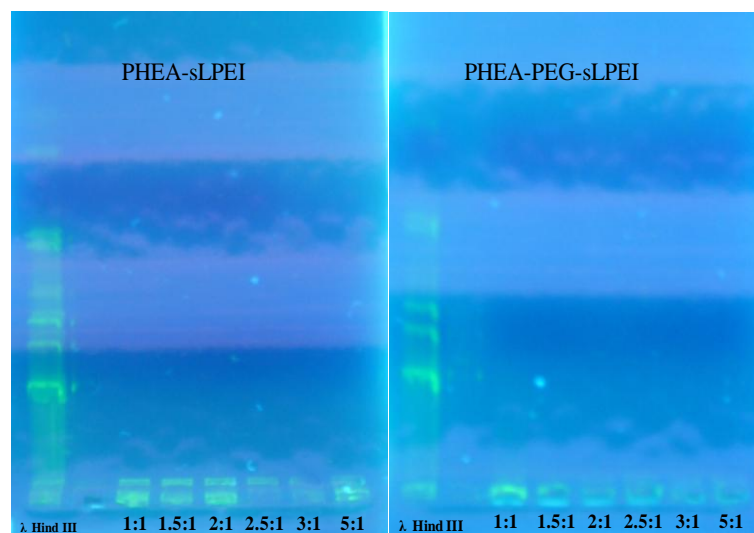


Figura 3.26. Elettroforesi su gel d'argarosio dei complessi PHEA-sLPEI/DNA e PHEA-PEG-sLPEI/DNA a differenti rapporti in peso C/P. I due polimeri sono confrontati con λ -Hind III.

3.21. Dimensioni e potenziale ζ

Le proprietà biofisiche dei poliplessi ottenuti con i copolimeri PHEA-sLPEI e PHEA-PEG-sLPEI in termini di diametro medio e potenziale- ζ sono state determinate mediante misure di Dynamic Light Scattering (DLS) e potenziale- ζ .

L'importanza delle dimensioni dei complessi per un efficiente uptake è ben noto, infatti come è già stato sottolineato in precedenza, solo se il DNA è condensato in piccoli complessi è possibile avere l'ingresso di tali sistemi all'interno della cellula, inoltre un poliplesso di piccole dimensioni è anche un prerequisito per un ottimale

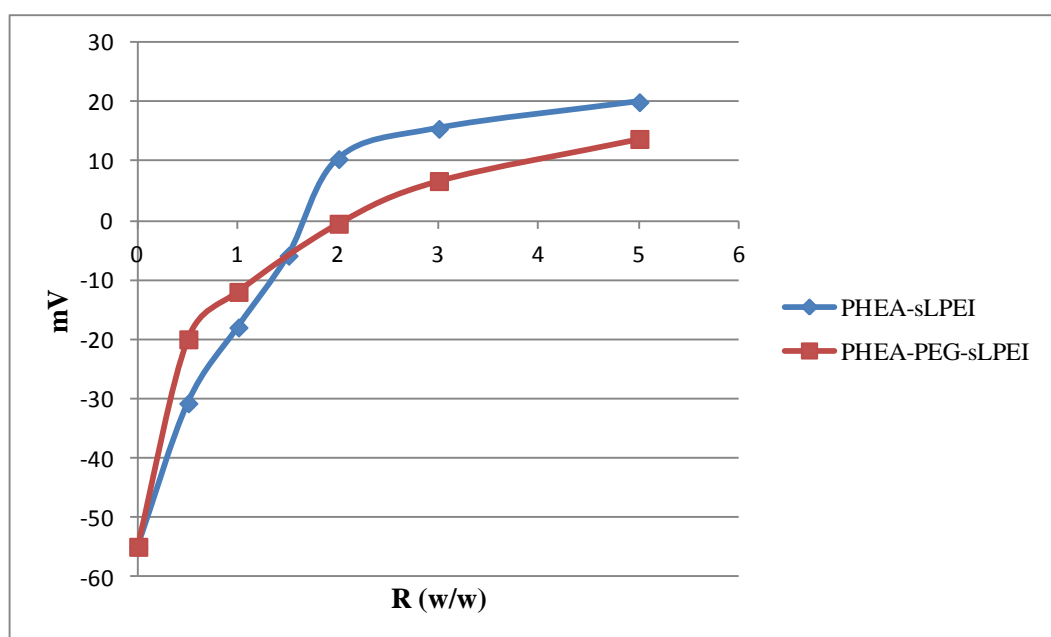
espressione transgenica in vivo. Anche le proprietà di superficie dei poliplessi sono estremamente importanti ai fini sia della stabilità degli stessi, che della loro capacità di interagire con la membrana delle cellule bersaglio e degli eritrociti. È noto infatti che, se da un lato una bassa carica superficiale aumenta l'emocompatibilità dei sistemi, ed in genere la biocompatibilità, dall'altro, implica anche una elevata tendenza all'autoaggregazione con un conseguente aumento delle dimensioni dei poliplessi, che si hanno generalmente con valori di potenziale- ζ prossimo alla neutralità. Nelle tabelle 3.9 e 3.10 di seguito riportate sono elencate le dimensioni dei poliplessi ottenuti con i copolimeri dopo 1h di complessazione, mentre in figura 3.27 sono riportati i valori di potenziale- ζ all'aumentare del rapporto C/P.

Tabella 3.10. Dimensioni dei poliplessi ottenuti con PHEA-sLPEI

PHEA-sLPEI/pCMV-Luc		
R (w/w)	Dimensioni (nm)	PDI
0.5	560	0.46
1	378	0.37
1.5	790	0.67
2	429	0.44
3	330	0.42
5	234	0.34

Tabella 3.11. Dimensioni dei poliplessi ottenuti con PHEA-PEG-sLPEI

PHEA-PEG-sLPEI/pCMV-Luc		
R (w/w)	Dimensioni (nm)	PDI
0.5	593	0.71
1	409	0.45
2	264	0.48
3	282	0.68
5	330	0.47

**Figure 3.27.** Valori del potenziale- ζ dei copolimeri PHEA-sLPEI e PHEA-PEG-sLPEI misurati in tampone HBG a pH 7.4, in funzione del rapporto in peso C/P e dei mV.

Come si può osservare, diversamente da quello che si rileva per i poliplessi visti precedentemente, l'andamento del diametro dei sistemi ottenuti con il copolimero PHEA-sLPEI, risulta essere irregolare con un massimo intorno a C/P pari a 1.5 (PDI 0.67) e

presenta una effettiva diminuzione delle dimensioni dei nanosistemi a rapporti C/P superiori. Gli stessi poliplessi presentano, come si osserva in figura 3.27, un potenziale- ζ prossimo alla neutralità per C/P pari a 1.5. Da quanto esposto sembra pertanto ipotizzabile che a C/P prossimi a 1.5 le dimensioni di tali poliplessi sono elevate per effetto dei fenomeni di aggregazione degli stessi, favorito dal loro basso potenziale nelle condizioni sperimentali impiegate. Tale considerazione pertanto è supportata dall'elevato valore di PDI. Le dimensioni dei poliplessi diminuiscono successivamente all'aumentare del rapporto C/P, suggerendo che i poliplessi formati sono più compatti, la diminuzione contestuale del PDI indica inoltre che le specie presenti sono anche più omogenee in termini dimensionali.

Per i poliplessi ottenuti con il copolimero PHEA-PEG-sLPEI si osserva, una diminuzione progressiva della dimensione all'aumentare del rapporto C/P fino a C/P 2; non si osserva comunque per tali poliplessi un incremento significativo delle dimensioni a C/P pari a 2, in cui il potenziale- ζ è prossimo a zero, suggerendo che la presenza del PEG sulla superficie dei poliplessi costituisce una efficace barriera idrofilica all'autoaggregazione. L'effetto schermante di tali catene, è suggerito anche dai valori di potenziale- ζ dei poliplessi stessi a C/P

maggiore di 2, dal momento che tali poliplessi, mostrano un potenziale- ζ sempre più basso rispetto a quelli ottenuti con i polimeri non PEGilati.

3.22. Test di citotossicità dei complessi (MTS)

Per valutare la citocompatibilità dei complessi ottenuti con i copolimeri PHEA-sLPEI e PHEA-PEG-sLPEI ed il plasmide pCMV-Luc, tali sistemi sono stati sottoposti a test di citotossicità in vitro utilizzando quale linea cellulare modello, le B16F10. I complessi sono stati formati mantenendo in contatto i copolimeri ed il pDNA per 1h e testati con rapporti in peso C/P da 2 a 4 per il PHEA-sLPEI e da 3 a 10 per il PHEA-PEG-sLPEI. I dati di citotossicità sono mostrati in figura 3.28. La vitalità cellulare è stata misurata utilizzando la PEI ramificata ad un rapporto in peso 0.8 come controllo positivo e cellule non trattate come controllo negativo (100% di vitalità). Come è possibile vedere in figura 3.28, la vitalità cellulare è circa del novanta per cento per qualsiasi rapporto in peso a 4h d'incubazione per il PHEA-sLPEI, mentre, per il copolimero PHEA-PEG-sLPEI il valore della vitalità raggiunge il 100% per tutti i rapporti. A 24h d'incubazione si nota una riduzione della vitalità cellulare in funzione del rapporto in peso C/P per il PHEA-sLPEI, mostrando un valore

intorno al 60% per il rapporto più alto. Nel caso del copolimero PHEA-PEG-sLPEI si ha un valore della vitalità prossimo al 100% anche dopo le 24h d'incubazione, mostrando come la presenza del PEG renda più citocompatibile i poliplessi ottenuti.

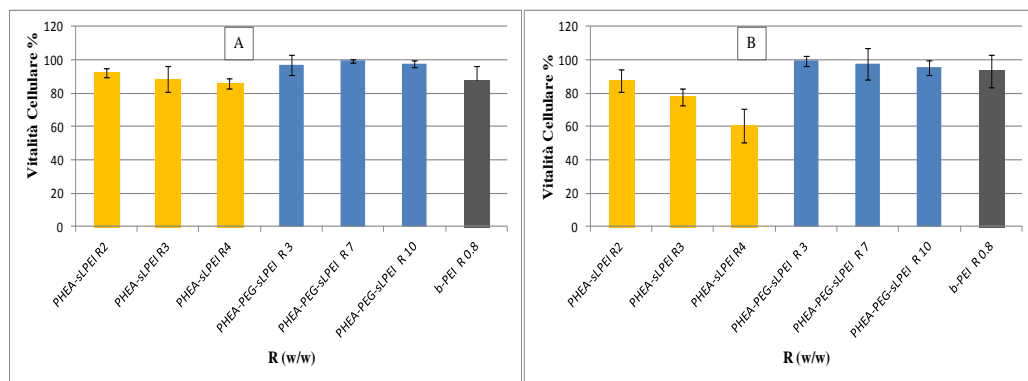


Figura 3.28. Vitalità cellulare dei poliplessi formati con i copolimeri PHEA-sLPEI e PHEA-PEG-sLPEI e con pCMV-Luc ai rapporti C/P indicati a 4h (A) e 24h (B) d'incubazione. La b-PEI è stata utilizzata come controllo positivo al rapporto in peso C/P 0.8. Le cellule B16-F10 sono state incubate con i poliplessi per 4 e 24 ore in DMEM+ FBS. I dati sono espressi come percentuale di cellule non trattate. Ogni esperimento è stato eseguito in triplicato ed i risultati sono presentati come media \pm deviazione standard.

3.23. Saggio d'espressione genica

Il saggio d'espressione genica dei poliplessi ottenuti con i copolimeri PHEA-sLPEI e PHEA-PEG-sLPEI è stato eseguito su cellule di melanoma murinico B16-F10, i rapporti utilizzati ed i tempi di complessazione sono gli stessi di quelli adoperati per il test della vitalità cellulare. In figura 3.29 sono mostrati i risultati relativi

all'efficienza di transfezione dei poliplessi ottenuti miscelando i copolimeri sopracitati ed il plasmide pCMV-Luc.

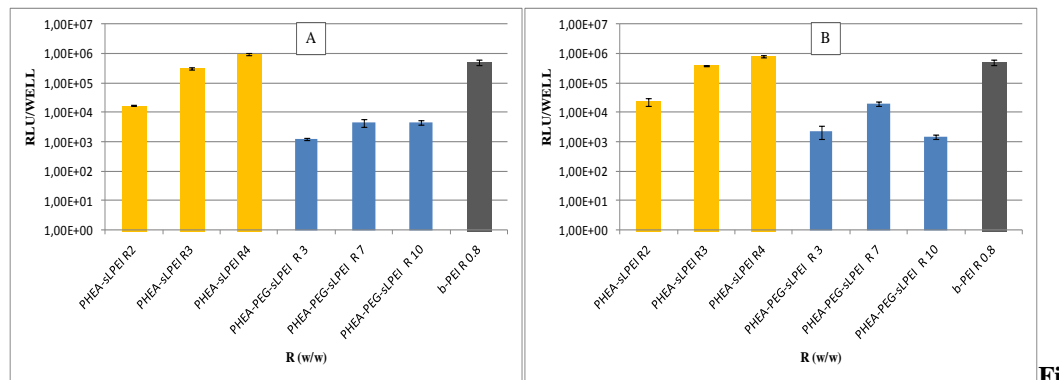


Figura 3.29. Efficienza di transfezione in vitro (espressione della luciferasi) ai rapporti in peso C/P indicati. I dati sono confrontati con la bPEI al rapporto C/P 0.8. Le cellule B16F10 sono state transfettate con i poliplessi ottenuti con i copolimeri PHEA-sLPEI e PHEA-PEG-sLPEI a 4h (A) e 24h (B) d'incubazione come descritto nella parte sperimentale. I dati sono espressi in RLU per pozzetto. Ogni esperimento è stato eseguito in triplice copia ed i risultati sono presentati come media \pm deviazione standard.

Il copolimero PHEA-sLPEI ha dato risultati molto soddisfacenti in termini di transfezione sia a 4h che a 24h d'incubazione. Infatti, già al rapporto in peso 3 si ottiene una buona efficienza di transfezione, risultato che diventa eccellente aumentando il rapporto in peso fino ad un valore di R pari a C/P pari a 4, l'efficienza di transfezione dei complessi è superiore a quella ottenuta con la bPEI di riferimento. Inoltre, Considerando che si ha una diminuzione della vitalità cellulare dopo 24h d'incubazione è presumibile che l'efficienza di transfezione possa essere maggiore a parità di numero di cellule.

Nel caso del copolimero PHEA-PEG-sLPEI, come è mostrato in figura l'efficienza di transfezione dei poliplessi si mantiene inferiore a quella ottenuta con i copolimeri non PEGilati sia a 4 che 24h d'incubazione, raggiungendo un valore di poco superiore a 10^4 RLU, per il rapporto in peso C/P 7, dopo 24h d'incubazione.

Tale risultato è con buona probabilità da attribuire alla possibilità che il PEG presente sulla superficie dei poliplessi, riduca l'interazione degli stessi con le cellule, e conseguentemente la loro internalizzazione [Edinger D. et al., 2011].

Ulteriori sviluppi del lavoro prevedranno la coniugazione ai copolimeri PHEA-sPLEI, di catene di PEG aventi ad una estremità un ligando utile a favorire l'uptake mediante endocitosi recettore dipendente. Inoltre, le catene di PEG saranno coniugate al backbone di tali copolimeri attraverso la formazione di legami idrolizzabili nell'ambiente acido dell'endosoma.

Queste strategie consentiranno di mantenere le proprietà stealth dei poliplessi, ma anche di favorire sia l'uptake di tali nanosistemi, sia la capacità di dare effetto proton sponge, che è notoriamente ridotto a causa della presenza di porzioni idrofiliche sulla superficie dei poliplessi.

4. CONCLUSIONI

Durante il mio lavoro dottorato è stata messa a punto la sintesi e caratterizzazione di nuovi polimeri a struttura poliamminoacidica recanti in catena laterale dei gruppi capaci di complessare e condensare il materiale genetico.

I polimeri oggetto del mio studio sono stati sintetizzati a partire dal PHEA attraverso reazioni semplici, che garantiscono buona riproducibilità come la tecnica dell'*ATRP* o mediante una tecnica di coniugazione di molecole già sintetizzate che fa uso del bis(4-nitrofenil)carbonato come agente attivante dei gruppi ossidrilici del PHEA.

I polimeri sintetizzati mediante *ATRP* sono stati ottenuti mediante la polimerizzazione sulle catene laterali del PHEA dei monomeri N,N-dietilamminoetil metacrilato (DEAEMA). A questo scopo è stato utilizzato il copolimero PHEA-BIB come macroiniziatore “multi-point”, il quale permette la polimerizzazione contemporanea di monomeri a partire dai residui di iniziatore bromo isobutirile (BIB) dislocati lungo il backbone del PHEA. Questo approccio sintetico costituisce un metodo versatile ed efficace per preparare copolimeri a pettine con un differente grado di grafting, ottenendo in tal modo i copolimeri PHEA-IB₂₄-PDEAEMA₄ (a) e

PHEA-IB₃₀-PDEAEMA₁₄ (b). Le procedure di sintesi sono risultate modulabili modificando opportunamente i parametri di reazione, è infatti possibile produrre policationi con differente numero di catene laterali, e differente lunghezza, ovvero n di monomeri polimerizzati.

Inoltre, a partire dai policationi PHEA-IB₂₄-PDEAEMA₄ (a) e PHEA-IB₃₀-PDEAEMA₁₄ (b) sono stati sintetizzati altri due policationi che presentano unità di polietilenglicole metacrilato (PEGMA) mediante *consecutive ATRP* consentendo così di ottenere PHEA-IB₂₄-PDEAEMA₄-pPEGMA_{6,5} (a') e PHEA-IB₃₀-PDEAEMA₁₄-pPEGMA₁ (b'). Sono state pertanto messe a punto le condizioni di reazione per la realizzazione di copolimeri con “braccia” bicomponente costituite cioè da n monomeri di DEAEEMA e m di PEGMA.

I dati sperimentali relativi a tutti i copolimeri ottenuti, hanno dimostrato che i gruppi amminici terziari delle unità di DEAEEMA conferiscono al PHEA la natura policationica e di conseguenza la capacità di complessare e condensare il DNA. Inoltre, i copolimeri PHEA-IB₂₄-PDEAEMA₄ (a) e PHEA-IB₃₀-PDEAEMA₁₄ (b) hanno mostrato una bassa capacità di transfettare le cellule di melanoma murinico B16F10, mantenendo però, alti valori della vitalità cellulare.

Infine, l'introduzione delle unità di poli-etilenglicole metacrilato (PEGMA), mediante consecutive ATRP, ha comportato un aumento della vitalità cellulare, non riuscendo però a migliorare l'efficienza di transfezione, essendo questa paragonabile a quella dei copolimeri non PEGilati.

Nella seconda parte del mio lavoro di dottorato è stata realizzata la sintesi di nuovi copolimeri del PHEA, recante in catena laterale unità di N,N-dietilamminoetil metacrilato (DEAEMA) con un minor grado di grafting rispetto ai copolimeri fin qui visti. La reazione con la quale è stato raggiunto questo obiettivo è semplice, riproducibile e porta a prodotti con alte rese, l'ATRP. Ciò allo scopo di realizzare copolimeri PHEA-IB-pDEAEMA, in grado di veicolare oligonucleotidi quali gli small interfering RNA (siRNA). Studi preliminari di complessazione con il DNA di tali copolimeri hanno mostrato un'alta capacità complessante dando luogo alla formazione di poliplessi aventi dimensioni di poco superiori rispetto a quelli ottenuti con un maggior grado di grafting. Inoltre, studi di stabilità di tali poliplessi con l'albumina, mostrano come entrambi i copolimeri esibiscano alta stabilità a tutti i rapporti in peso C/P (da 2 a 15) usati.

I poliplessi ottenuti con entrambi i copolimeri presentano, nelle condizioni sperimentali utilizzate, alti valori di vitalità cellulare,

raggiungendo il 90% di vitalità a tutti rapporti impiegati, anche dopo 24h d'incubazione.

Infine, gli studi di transfezione dei complessi ottenuti con i siRNA, eseguiti su cellule di carcinoma epatico (HuH7), hanno evidenziato la capacità di tali sistemi di ridurre l'espressione del fattore di trascrizione E2F1 riducendo quindi la proliferazione cellulare. Tali dati sono completati da buoni valori di vitalità cellulare rispetto ai valori ottenuti con il siRNA controllo siGL2.

Nella terza ed ultima parte del mio dottorato mi sono occupato di sintetizzare un nuovo policatione avente sempre come backbone il PHEA ed in catena laterale corte catene di polietilenimina (sLPEI). Il copolimero PHEA-sLPEI è stato sintetizzato mediante la coniugazione delle di molecole sLPEI, utilizzando il bis(4-nitrofenil)carbonato come agente attivante dei gruppi ossidrilici del PHEA. Tale metodo si è dimostrato molto efficace nell'inserimento in catena laterale di un oligoammina capace di conferire la natura policationica ai vettori oggetto dello studio. Contemporaneamente è stato sintetizzato un omologo PEGilato del PHEA-sLPEI, al fine di valutare la differenza di comportamento biologico tra i due copolimeri.

I dati sperimentali riguardanti tali copolimeri hanno dimostrato che entrambi hanno la capacità di complessare e condensare il DNA, sia in termini di corsa elettroforetica che in valori di dimensioni, ottenute mediante misure di Dynamic Light Scattering (DLS). Tali valori mostrano un andamento irregolare del diametro dei sistemi ottenuti con il copolimero PHEA-sLPEI, presentando un massimo intorno a C/P pari a 1.5. Ciò è attribuibile ad un fenomeno di aggregazione dei poliplessi, favorito dal basso potenziale- ζ nelle condizioni sperimentali impiegate, considerazione supportata dall'elevato valore di PDI.

Un comportamento differente è stato mostrato dai poliplessi ottenuti con il copolimero PHEA-PEG-sPLEI, per i quali si è osservato, una diminuzione progressiva della dimensione all'aumentare del rapporto C/P fino a C/P 2; non riscontrando, per tali poliplessi un incremento significativo delle dimensioni a rapporti (C/P) in cui il potenziale- ζ è prossimo a zero, suggerendo che la presenza del PEG sulla superficie dei poliplessi costituisce una efficace barriera idrofilica all'autoaggregazione.

Infine, i poliplessi ottenuti con PHEA-sLPEI hanno mostrato una eccellente capacità di transfettare le cellule di B16F10 sia a 4 che 24h d'incubazione oltre ad una buona citocompatibilità. Il copolimero

PHEA-PEG-sPLEI, ha mostrato un'elevata vitalità cellulare anche dopo 24h d'incubazione, esprimendo un'efficienza di transfezione che si mantiene inferiore a quella ottenuta con i copolimeri non PEGilati sia a 4 che 24h d'incubazione. Ciò è attribuibile alla presenza di catene di PEG sulla superficie dei poliplessi, riducendo in tal modo, l'interazione degli stessi con le cellule, e conseguentemente la loro internalizzazione.

5. PARTE SPERIMENTALE

5.1. Materiali e metodi

L' α,β -poli(N-2-idrossietil)-D,L-aspartammide (PHEA) è stato sintetizzato e purificato secondo una procedura già riportata [Giammona G. et al., 1987]. Il PHEA è stato preparato dalla reazione della polisuccinimide (PSI) con etanolamina in soluzione di DMF e purificato attraverso un processo di dialisi esaustiva. Dati spettroscopici (FT-IR e $^1\text{H-NMR}$) hanno confermato la struttura attribuita [Giammona G. et al., 1987]. $^1\text{H-NMR}$ [D_2O]: δ 2.82 [m, 2H; $-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-$] $_{\text{PHEA}}$, δ 3.36 [m, 2H, $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$] $_{\text{PHEA}}$, δ 3.66 [m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$] $_{\text{PHEA}}$, δ 4.72 [m, 1H- $\text{NH}-\text{CH}-\text{CO}-$] $_{\text{PHEA}}$. Gli spettri $^1\text{H-NMR}$ sono stati acquisiti in D_2O utilizzando uno spettrometro Bruker Advance II 300 operante a 300Mhz. Gli spettri FT-IR sono stati realizzati utilizzando uno spettrometro Perkin-Elmer 1720.

Gli spettri UV-Vis sono stati acquisiti utilizzando uno strumento Shimadzu UV160U.

Il peso molecolare medio pesato del PHEA e dei suoi copolimeri è stato misurato utilizzando la cromatografia ad esclusione molecolare (SEC).

Le analisi SEC sono state realizzate utilizzando due colonne Ultrahydrogel della Water (500 e 200Å) (Milord, MA, USA) connesse ad un rilevato ad indice di rifrazione Water 2410. Come eluente è stato usato tampone acetato a pH 4 a 37°C, settando il flusso a 0.6 ml/min e usando come standard per la curva di taratura poli(etileneossido) (145-1.5 kDa). Le misure di scattering dinamico sono state realizzate usando uno strumento Malvern Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments, Worcester, UK) equipaggiato con laser a 532 nm posto a 90° dalla linea di scatteraggio.

L'N,N-dietilamminoetil metacrilato (DEAEMA), Poli(etilenglicol) metacrilato (PEGMA) Mn360, α -Bromoisobutirril bromuro, DNA lambda HindIII digest, calf thymus DNA sodium salt, SYBR Green I, Branched PEI (BPEI) con un peso molecolare medio di 25 kDa sono stati acquistati da Sigma-Aldrich. Il plasmide pCMV-Luc che decodifica per la luciferasi da *Photinus pyralis* è stato gentilmente fornito dal Prof. M. Ogris (Pharmaceutical Biology-Biotechnology, Department of Pharmacy, Ludwig-Maximilians-Universität, Butenandtstr. 5-13, D-81377 Munich, Germany).

La linear PEI a corta catena (circa 900 Da) è stata gentilmente fornito dal Prof. Antoine Kichler (Unité de Pharmacologie Chimique et Génétique; CNRS, UMR 8151, Paris, F-75270 cedex, France).

Il reagente MTS è stato acquistato da Promega (Milan, Italy). Il mezzo di coltura cellulare ed il siero bovino fetale (FBS) è stato acquistato da Sigma-Aldrich. La linea cellulare è stato mantenuta in coltura a 37 °C in 5% CO₂ ed atmosfera umidificata. Le cellule B16F10 di melanoma murinico (acquistate dall'Istituto Zooprofilattico sperimentale dell'Emilia Romagna) sono state mantenute in coltura in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) addizionato con 10% FBS, 100 U/ml penicillina, 100 U/ml streptomina e 4 mM glutammina. I prodotti per le colture cellulari sono state acquistate da Sigma-Aldrich (Milan).

5.2. Sintesi dell' α,β -poli(N-2-idrossietil)(α -Bromoisobutirato)-D,L-aspartammide (PHEA-BIB)

Il PHEA (500 mg; 3.1 mmol di unità ripetitive di idrossietil-aspartammide) è stato solubilizzato in 10 ml di DMA anidra a temperatura ambiente in atmosfera di argon. A completa solubilizzazione il pallone di reazione è stato posto in un bagno d'acqua termostato a 0°C e sono stati aggiunti TEA (500 μ L; 3.6 mmol) e BIBB in quantità tale da avere rapporti tra BIBB e unità ripetitive di PHEA pari a 0.6 o 0.7. La miscela di reazione è stata portata a temperatura ambiente nell'arco di 4 ore e successivamente è

stata precipitata goccia a goccia in un eccesso di etere dietilico (150 ml), la dispersione contenente un precipitato di colore bianco, è stato lasciata una notte in freezer a -20°C ed è stata centrifugata il giorno seguente a $11800 \times g$ per 10 minuti a 4°C . Il residuo solido così ottenuto è stato solubilizzato in acqua bidistillata e purificato tramite dialisi esaustiva contro acqua bidistillata. Successivamente la soluzione purificata è stata congelata e liofilizzata.

Il prodotto puro è stato caratterizzato mediante $^1\text{H-NMR}$ e $^{13}\text{C-NMR}$. Il peso molecolare e l'indice di polidispersità sono stati determinati mediante analisi SEC. Il peso molecolare medio ponderale del PHEA-BIB è risultata pari a 40.0 kDa con $M_w/M_n = 1.76$. Lo spettro $^1\text{H-NMR}$ del PHEA-BIB (300 MHz, D_2O , 25°C) mostra picchi a : δ 1.90 [m, 6H, CH_3]_{IB}, δ 2.84 [m, 2H; $-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-$]_{PHEA}, δ 3.38 [m, 2H, $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$]_{PHEA}, δ 3.68 [m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$]_{PHEA}, δ 4.33 [m, 2H, $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-$]_{PHEA}, δ 4.76 [m, 1H- $\text{NH}-\text{CH}-\text{CO}-$]_{PHEA}. ^{13}C NMR (300 MHz, DMSO-d_6 , 25°C): δ 170.8-169.7 ($\text{C}=\text{O}$)_{PHEA}, δ 59.7 ($-\text{CH}_2-\text{O}-$)_{PHEA}, δ 57.3 (C-Br)_{BIB}, δ 50.1 ($-\text{CH}-\text{CO}$)_{PHEA}, δ 44.3 ($-\text{HN}-\text{CH}_2-$), δ 37.5 ($-\text{CH}_2-\text{CO}$)_{PHEA}, δ 30.3 (CH_3)_{BIB}. Vedi schema 1.

Il grado di derivatizzazione (D.D.%) ottenuto mediante $^1\text{H-NMR}$, paragonando l'integrale del picco a δ 1.90, attribuibile al

gruppo metilico del BIB, con quello assegnato al CH₂ del backbone del PHEA a δ 2.8 [Cavallaro G. et al., 2009] è risultato rispettivamente del 24% e del 30% mol/mol.

5.3. Procedura generale per la sintesi e la caratterizzazione dell' α,β -poli(N-2-idrossietil)-D,L-aspartammide-g-poli-N,N-dietilammino-etiltmetacrilato (PHEA-IB-pDEAEMA).

In un tipico esperimento di polimerizzazione i copolimeri PHEA-BIB contenenti rispettivamente una quantità di BIB del 24% o 30% (PHEA-BIB_a, D.D. 24% and PHEA-BIB_b, D.D. 30%) sono stati usati come macroinizzatori. 100 mg di PHEA-BIB (0.10 mmol di residui di BIB in catena laterale per PHEA-BIB_a and 0.15 mmol di residui di BIB in catena laterale per PHEA-BIB_b) e DEAEMA (una quantità di DEAEMA tale da avere un rapporto molare tra DEAEMA e BIB pari a 10 e 20 rispettivamente) sono stati solubilizzati in 8 ml di DMF anidra. Il pallone di reazione è stato sigillato ed in seguito è stato fatto gorgogliare argon nella miscela per 20 minuti al termine dei quali sono stati introdotti nel pallone di reazione 2,2' biperidina (in quantità tale che il rapporto molare tra 2,2' biperidina e i residui di BIB legati fosse uguale a 4) e bromuro di rame(I) (con un rapporto molare

tra CuBr(I) e i residui di BIB pari a 1). Nella miscela di reazione è stato fatto gorgogliare argon per altri 10 minuti e il pallone di reazione è stato trasferito in un bagno ad olio termostato a 50°C per 20h. La polimerizzazione è stata interrotta ponendo la miscela di reazione a contatto con l'aria fino alla completa ossidazione del rame; quest'ultima è stata quindi precipitata goccia a goccia in acqua bidistillata e il residuo solido è stato lavato due volte nello stesso solvente. Il solido ottenuto è stato solubilizzato in acqua bidistillata per aggiunta di qualche goccia di HCl 1N e la soluzione purificata mediante dialisi esaustiva contro acqua utilizzando, una membrana da dialisi SpectraPor con un cut-off di peso molecolare 12000–14000 Da. Dopo la dialisi la soluzione è stata liofilizzata.

Il polimero ottenuto, analizzato tramite analisi $^1\text{H-NMR}$ in D_2O (aggiungendo DCl fino a completa solubilizzazione), mostra segnali a: $\delta 0.9-1.1$ [m, 3H; $\text{CH}_3\text{-C-COO-}]_{\text{pDEAEMA}}$, $\delta 1.2-1.3$ [(m, 3Hx2; $((\text{CH}_3\text{-CH}_2)_2\text{N-})_{\text{pDEAEMA}}$ + (m, 6H, CH_3)_{IB}], $\delta 1.88$ [m, 2H; $\text{-CH}_2\text{-C(CH}_3\text{)-COO-}]_{\text{pDEAEMA}}$, $\delta 2.65$ [m, 2H; $\text{-CH-CH}_2\text{-CO-NH-}]_{\text{PHEA}}$, $\delta 3.21$ [m, 2Hx2; $((\text{CH}_3\text{-CH}_2)_2\text{N-})_{\text{pDEAEMA}}$, $\delta 3.37-3.60$ [(m, 2H, $\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH})_{\text{PHEA}}$ + (m, 2H ; $\text{-N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_{\text{pDEAEMA}}$ + (m, 2H, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH})_{\text{PHEA}}$], $\delta 4.2-4.4$ [(m, 2H; $\text{-N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_{\text{pDEAEMA}}$ + (m, 2H, $\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CO-})_{\text{PHEA}}$], $\delta 4.75$ [m, 1H- $\text{NH-CH-CO-}]_{\text{PHEA}}$.

Il grado di derivatizzazione (D.D.%) è stato ottenuto dai dati $^1\text{H-NMR}$ comparando l'integrale del picco a δ 1.88 attribuibile ai CH_2 del pDEAEMA, con quello relativo ai CH_2 del backbone del PHEA a δ 2.65.

FT-IR(KBr): 3343cm^{-1} (νOH , PHEA), 1734cm^{-1} (νCO ester), 1654cm^{-1} (νCO amide I, PHEA), 1542cm^{-1} (νCO amide II, PHEA), $1125\text{-}1065\text{cm}^{-1}$ (νCN , DEAEMA).

5.4. Procedura generale per la sintesi e la caratterizzazione dell' α,β -poli(N-2-idrossietil)-D,L-aspartammide-g-poli-N,N-dietilammino-etiltmetacrilato-b-poli-PEG-metacrilato (PHEA-IB-pDEAEMA-pPEGMA) via Consecutive Atom Transfer Radical Polymerization.

Gli iniziatori di partenza utilizzati per la consecutive ATRP sono stati i copolimeri PHEA-IB₂₄-pDEAEMA₄ e PHEA-IB₃₀-pDEAEMA₁₄ ottenuti come precedentemente descritto. 100mg di macroiniziatore (contenente una quantità di Br di 0.065 mmol per il copolimero PHEA-IB₂₄-pDEAEMA₄ e 0.03 mmol per il copolimero PHEA-IB₃₀-pDEAEMA₁₄) e una quantità di monomero poli(etileneglicole)-metacrilato (PEGMA) tale da avere un rapporto molare tra PEGMA e unità portanti Bromo pari a 100 e 200

rispettivamente, sono stati solubilizzati in 8 ml di DMF e la miscela risultante introdotta in un pallone a doppio collo. Il pallone è stato sigillato e all'interno della miscela è stato fatto gorgogliare argon per 20 minuti, al termine dei quali sono stati introdotti 2,2' biperidina (con un rapporto molare tra 2,2' biperidina e le mmol di unità ripetitive portanti residui di Br pari a 4) e bromuro di rame(I) (con un rapporto molare tra CuBr(I) e le mmol di Br pari a 1). Nella miscela di reazione è stato fatto gorgogliare argon per altri 10 min e la stessa è stata posta a 25 °C, per 20h nel caso del copolimero PHEA-IB₂₄-pDEAEMA₄ e 48h per il copolimero PHEA-IB₃₀-pDEAEMA₁₄. In entrambi i casi la polimerizzazione è stata interrotta ponendo la miscela di reazione a contatto con l'aria fino alla completa ossidazione del rame. La miscela è stata quindi aggiunta goccia a goccia in acqua bidistillata e la soluzione risultante purificata mediante dialisi esaustiva contro acqua utilizzando una membrana da dialisi SpectraPor con un cut-off di peso molecolare 12000-14000 Da. Dopo la dialisi la soluzione è stata liofilizzata.

Il polimero ottenuto è stato caratterizzato tramite analisi ¹H-NMR in D₂O (aggiungendo DCl fino a completa solubilizzazione): δ0.7-1.0[m, 3H; **CH**₃-C-COO-]_{pDEAEMA}, δ1.1-1.3[(m, 3Hx2; ((**CH**₃-CH₂)₂N-)_{pDEAEMA} + (m, 6H, **CH**₃)_{IB}], δ1.85[m, 2H; -**CH**₂-C(CH₃)-

$\text{COO-}]_{\text{pDEAEMA}}$, $\delta 2.65$ [m, 2H; $-\text{CH}-\underline{\text{CH}_2}-\text{CO}-\text{NH}-]_{\text{PHEA}}$, $\delta 3.21$ [m, 2HX2; $((\text{CH}_3-\text{CH}_2)_2\text{N-})]_{\text{pDEAEMA}}$, $\delta 3.35-3.80$ [(m, 2H, $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH})_{\text{PHEA}}$ + (m, 2H ; $-\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{\text{pDEAEMA}}$ + (m, 22H, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_{\text{pPEGMA}}$ + (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH})_{\text{PHEA}}$], $\delta 4.2-4.4$ [(m, 2H; $-\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO-})_{\text{pDEAEMA}}$ + (m, 2H; $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO-})_{\text{pPEGMA}}$ + (m, 2H, $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO-})_{\text{PHEA}}$], $\delta 4.75$ [m, 1H- $\text{NH}-\text{CH}-\text{CO-}]_{\text{PHEA}}$.

Il grado di derivatizzazione (D.D.%) è stato ottenuto dai dati $^1\text{H-NMR}$ in D_2O (più DCl fino a completa solubilizzazione) paragonando l'integrale del picco a $\delta 3.6$, attribuibile ai CH_2 del PEGMA, con quello assegnato ai CH_2 del backbone del PHEA a $\delta 2.65$.

FT-IR(KBr): 3343cm^{-1} (vOH, PHEA), 1734cm^{-1} (v CO ester), 1654cm^{-1} (v CO amide I, PHEA), 1542cm^{-1} (v CO amide II, PHEA), $1125-1065\text{cm}^{-1}$ (v CN, DEAEMA).

5.5. Procedura generale per la sintesi e la caratterizzazione dell' α,β -poli(N-2-idrossietil)-D,L-aspartammide-g-poli-N,N-dietilammino-etiltmetacrilato (PHEA-IB-pDEAEMA).

I copolimeri PHEA-BIB-pDEAEMA con un basso grado di grafting sono stato preparati secondo la procedura già riportata nel paragrafo 5.3, utilizzando dei macroiniziatori PHEA-BIB contenenti rispettivamente una quantità di BIB del 13% e del 4%. Sono stati fatti reagire 100 mg di PHEA-BIB a differente D.D.% con una quantità di DEAEMA tale da avere un rapporto molare tra DEAEMA e BIB pari a 10 per entrambi i macroiniziatori.

5.6. Sintesi del copolimer polietilenimmina-g- α,β -poli(N-2-idrossietil)-D,L-aspartammide (PHEA-sLPEI)

Ad una soluzione di 50mg di PHEA (0.32 mmol) in 2 ml di una miscela di DMF/DMSO anidri sono stati aggiunti 48mg di bis(4-nitrofenil) carbonato (4-NPBC) solido (0.16 mmol, R= 0.5 mol 4-NPBC/mol PHEA Unità Ripetitive). La miscela di reazione è stata mantenuta per 4 ore a $40\pm 0.1^\circ\text{C}$. Trascorso tale tempo la soluzione di reazione è stata aggiunta goccia a goccia ad una soluzione di oligo linear PEI (sLPEI) (0.16mmol, R=0.5 mol sLPEI/mol PHEA RU) preparata solubilizzando 147 mg di poliammina in 8 ml di

DMF/DMSO anidro e la miscela è stata lasciata a reagire a temperatura ambiente per 24h. Dopo tale tempo la soluzione di reazione è stata precipitata in etere dietilico. La sospensione è stata centrifugata ed il residuo lavato con lo stesso solvente. Il solido ottenuto dopo leggero essiccamento è stato solubilizzato in acqua deionizzata e purificato per dialisi esaustiva in tubo da dialisi SpectraPor Dialysis Tubing avente cut-off molecolare 12000–14000 Dalton. Il prodotto purificato è stato liofilizzato, la resa ponderale basata sul PHEA di partenza è stata superiore al 100%. Sul prodotto puro è stata condotta analisi ^1H NMR in $\text{D}_2\text{O}+\text{DCI}$. Lo spettro ^1H NMR del PHEA-sLPEI (D_2O) mostrano i seguenti picchi: $\delta 2.80$ [m, 2H, $\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CO}-$] $_{\text{PHEA}}$, $\delta 3.36$ [s, 70H, $-\text{CO}-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH})_n\text{CH}_3$] $_{\text{sLPEI}}$, $\delta 3.40$ [m, 2H, $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$] $_{\text{PHEA}}$, $\delta 3.63$ [$-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$ PHEA), $\delta 4.10$ [m, 2H, $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-$] $_{\text{sLPEI-PHEA}}$, $\delta 4.75$ [m, 1H, $-\text{NH}-\text{CH}-\text{CO}-$] $_{\text{PHEA}}$.

FT-IR(KBr): $3300-3500\text{ cm}^{-1}$ (νOH , νNH PHEA; νNH , νNH_2 sLPEI; νNH uretanico), 1655 cm^{-1} (νCO amide I, PHEA), 1542 cm^{-1} (νCO amide II, PHEA), $1130-1060\text{ cm}^{-1}$ ($\nu\text{C-N}$ sLPEI).

5.7. Sintesi del PHEA-PEG

La sintesi del PHEA-PEG è stata realizzata preparando una soluzione di PHEA (40 mg/ml) in DMF anidra alla quale è stata aggiunta un'adeguata quantità di 4-NPBC, in modo da avere un $R_1=0.1$ ($R=$ moli di 4-NPBC/ moli di unità ripetitive di PHEA). La miscela di reazione è stata lasciata a 40°C per 2.5 ore, trascorso tale tempo, una soluzione di O-(2-amminoetil)-O'-metil poli(etilenglicole)₂₀₀₀ (PEG₂₀₀₀) in DMF anidra (60.8 mg/ml) è stata aggiunta alla miscela di reazione in modo da avere un $R_2= 1.2$ (moli di PEG₂₀₀₀/ moli di 4-NPBC). Quindi la miscela di reazione è stata lasciata a 60°C per 2.5 ore e posta in atmosfera di argon sotto continua agitazione. Il copolimero isolato, purificato, ottenuto con una resa superiore al 100% in peso (basata sul polimero di partenza) è stato caratterizzato attraverso analisi FT-IR e ¹H-NMR. Lo spettro ¹H-NMR (D₂O) del PHEA-PEG₂₀₀₀ mostra i seguenti picchi: $\delta 2.70$ [m, 2H, CH-**CH**₂-CO-]_{PHEA}, $\delta 3.3$ [m, 2H, -NH- **CH**₂- CH₂-OH]_{PHEA}, $\delta 3.5$ [m, 2H -NH-CH₂-**CH**₂-OH]_{PHEA}, $\delta 3.6$ [m, 176H -CH₂-**CH**₂-O-]_{PEG}, $\delta 4.6$ [m, 1H -NH-**CH**-CO-]_{PHEA}. Lo spettro FT-IR spectrum (KBr) del PHEA-PEG₂₀₀₀ mostra una banda slargata centrata a 3400 cm⁻¹ (stretching asimmetrico dell'O-H e del N-H); a 2917cm⁻¹ (stretching C-H);

1656 cm^{-1} (ammide I); 1543 cm^{-1} (ammide II) e 1110 cm^{-1} (stretching C-O).

5.8. Procedura generale per la sintesi del PHEA-PEG-sLPEI

Ad una soluzione di PHEA-PEG (30 mg/ml), in 2 ml di miscela DMF/DMSO 1-1 anidra, sono stati aggiunti 48 mg di 4-NPBC solido (R=0.5 moli di 4-NPBC/moli di unità ripetitive di PHEA). La miscela è stata mantenuta per 4 ore a 40°C \pm 0.1°C. Trascorso tale tempo la miscela di reazione è stata aggiunta goccia a goccia ad una soluzione di sLPEI (147 mg in 8ml di miscela DMF/DMSO 1/1 anidri).

La reazione è mantenuta sotto agitazione per 24 ore a temperatura ambiente. Dopo tale tempo la miscela di reazione è stata diluita in acqua bidistillata e posta in dialisi esaustiva utilizzando una membrana SpectraPor Dialysis Tubing avente cut-off molecolare 12000-14000. Dopo dialisi la soluzione è stata liofilizzata ed il prodotto puro (ottenuto con una resa del 100% in peso a partire dal PHEA di partenza) è stato caratterizzato attraverso analisi $^1\text{H-NMR}$ (D_2O). Lo spettro $^1\text{H-NMR}$ del derivato PHEA-PEG-sLPEI mostra i seguenti picchi: δ 2.6 [s,70H,-CO-NHCH₂CH₂NH(CH₂CH₂NH)_nCH₃]_{sLPEI}, δ 2.80 [m, 2H, CH-CH₂-CO-

$]$ _{PHEA}, δ 3.33 [m, 2H, -NH-**CH**₂-CH₂-O-]_{PHEA}, δ 3.53 [m, 2H -NHCH₂-**CH**₂-OH]_{PHEA}, δ 3.6 [m, 176H, -CH₂-CH₂-O-]_{PEG}, δ 4.10 [m, 2H, -NH-CH₂-**CH**₂-O-CO-]_{PHEA-sLPEI}, δ 4.75 [m, 1H, -NH-**CH**-CO-]_{PHEA}.

FT-IR(KBr): 3300-3500 cm⁻¹ (ν OH, ν NH PHEA; ν NH, ν NH₂ sLPEI; ν NH uretanico), 1655 cm⁻¹ (ν CO amide I, PHEA), 1540cm⁻¹ (ν CO amide II, PHEA), 1130-1110 cm⁻¹ (ν C-N sLPEI).

5.9. Analisi della mobilità elettroforetica dei complessi copolimero/DNA

La formazione dei complessi tra i polimeri del PHEA e il DNA (poliplessi) è stata valutata in tampone HEPES a pH 7.4 contenente il 5% di glucosio (HBG). I polimeri sono stati solubilizzati in HBG a temperatura ambiente. Nello stesso mezzo sono state preparate le soluzioni di λ DNA Hind III digest o pCMV-Luc a una concentrazione 0.2 mg/ml. La complessazione è stata realizzata miscelando aliquote note di soluzione di DNA e soluzioni di polimeri, a 37°C, a vari rapporti in peso compresi tra 1 e 7 per il copolimero PHEA-IB₂₄-pDEAEMA₄ e tra 0,5 e 4 copolimero PHEA-IB₃₀-pDEAEMA₁₄ ; gli stessi rapporti sono stati utilizzati per i

copolimeri PHEA-IB₂₄-pDEAEMA₄-pPEGMA_{6,5} e PHEA-IB₃₀-pDEAEMA₁₄-pPEGMA₁; tra 0.5 e 6 per i copolimeri PHEA-IB₁₃-pDEAEMA₁₀ e PHEA-IB₄-pDEAEMA₄; tra 1 e 5 per i copolimeri PHEA-sLPEI e PHEA-PEG-sLPEI. I tempi di complessazione sono stati di 24h per tutti i polimeri eccetto i PHEA-sLPEI e PHEA-PEG-sLPEI, per i quali è stata sufficiente 1h soltanto. Per l'analisi elettroforetica è stato usato gel di agarosio (0.7%, p/v) in tampone tris-acetato/EDTA (TAE). L'elettroforesi è stata eseguita a 90 V per 50 minuti e la migrazione dei campioni visualizzata tramite un transilluminator UV e fotografata utilizzando una comune fotocamera digitale.

5.10. Dynamic light scattering e potenziale-Z dei poliplessi

Le misure di Dynamic light scattering sono state eseguite a 25 °C usando uno strumento Malvern Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK), con un laser regolato a 532 nm e un angolo fisso di scattering di 90°. I poliplessi sono stati preparati usando rapporti in peso C/P crescenti, tra i copolimeri ed il DNA plasmidico tal quale (pCMV-Luc). Le misure delle dimensioni sono state effettuate in HBG. Le soluzioni sono state filtrate attraverso filtri in cellulose rigenerata (RC) da 5 µm ed il valore di diametro

idrodinamico medio (dimensione in nm) e l'indice di polidispersità (PDI) sono stati ottenuti mediante analisi cumulativa della funzione di correlazione. Le misure di potenziale Zeta (mV) sono state registrate a 25°C utilizzando la stessa strumentazione. I complessi contenenti pCMV-Luc sono stati preparati in HBG usando rapporti in peso crescenti nell'intervallo compreso tra 0.25 e 5 per i copolimeri PHEA-IB₂₄-pDEAEMA₄ e PHEA-IB₃₀-pDEAEMA₁₄; tra 0.5 e 5 per i copolimeri PHEA-IB₂₄-pDEAEMA₄-pPEGMA_{6,5} e PHEA-IB₃₀-pDEAEMA₁₄-pPEGMA₁; tra 0.5 e 10 per il copolimero PHEA-IB₁₃-pDEAEMA₁₀ e tra 1 e 18 per il PHEA-IB₄-pDEAEMA₄; tra 0.5 e 5 per i copolimeri PHEA-sLPEI e PHEA-PEG-sLPEI. I tempi di formazione dei complessi sono stati di 1h per i polimeri PHEA-sLPEI e PHEA-PEG-sLPEI, e di 24h per tutti gli altri.

5.11. Studi di stabilità dei poliplessi ottenuti con i copolimeri PHEA-IB₁₃-pDEAEMA₁₀ e PHEA-IB₄-pDEAEMA₄ in presenza di albumina.

La stabilità dei poliplessi è stata valutata in presenza dell'albumina come polianione. I poliplessi sono stati formati solubilizzando i copolimeri in tampone HBG a pH 7.4 e mantenuti in contatto con il DNA (Calf Thymus) per 24h a temperatura ambiente

utilizzando rapporti in peso tra 2 e 15. Dopo questo intervallo di tempo è stata aggiunta una quantità d'albumina tale d'avere una concentrazione di 4g/dl (concentrazione fisiologica) e mantenuta in contatto con i poliplessi per 12h a temperatura ambiente. Infine, è stata effettuata un'analisi elettroforetica su gel d'agarosio allo 0.7%, al fine di valutare l'eventuale rilascio di DNA per spostamento di questo da parte dall'albumina.

5.12. Citotossicità dei complessi copolimero/plasmide (MTS)

Cellule B16F10 di melanoma murino sono state seminate in piastre a 96 pozzetti alla densità di 5×10^3 cellule/pozzetto. Le cellule sono state coltivate in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) addizionato del 10% di siero fetale bovino (FBS) e l'1 % di penicillina/streptomicina (100 U/ml penicillina e 100 ug/ml streptomicina), alla temperatura di 37 °C in atmosfera satura di umidità al 5 % in CO₂. Dopo 24 ore le cellule sono state trattate con i poliplessi formati a rapporti in peso tra 1 e 3 per i copolimeri PHEA-IB₂₄-pDEAEMA₄ e PHEA-IB₃₀-pDEAEMA₁₄ ; tra 2.5 e 6 per il copolimero PHEA-IB₂₄-pDEAEMA₄-pPEGMA_{6,5} e tra 1 e 3 per il PHEA-IB₃₀-pDEAEMA₁₄-pPEGMA₁; tra 1 e 2 per il copolimero

PHEA-IB₁₃-pDEAEMA₁₀ e tra 12 e 18 per il PHEA-IB₄-pDEAEMA₄; tra 2 e 4 per il copolimero PHEA-sLPEI e tra 3 e 10 per il PHEA-PEG-sLPEI. I complessi sono stati aggiunti alle cellule in 100 µl di mezzo fresco e incubate per 4-24 ore. Quindi il mezzo contenente i poliplessi è stato rimosso e sostituito con mezzo fresco e le cellule poste ad incubare. Dopo 24 ore è stato sostituito il mezzo e sono stati aggiunti 20 µl di MTS (*[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carbossimetossifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolo, sale interno*) in ogni pozzetto e le piastre incubate a 37°C per 2 ore, quindi, dopo sottrazione del segnale dovuto al mezzo, è stata misurata l'assorbanza a 490 nm con un lettore UV di piastre (Thermo Multiskan EX). Come confronto positivo le cellule sono state trattate con bPEI e come controllo negativo sono state usate cellule non trattate.

5.13. Test di espressione genica

In un esperimento tipico, 24h prima della transfezione le cellule B16F10 sono state inoculate in piastre da 96-pozzetti ad una concentrazione di 5×10^3 cellule/pozzetto. I complessi Policatione/pCMVLuc sono stati formati in HBG a rapporti in peso crescenti C/P tra 1 e 3 per i copolimeri PHEA-IB₂₄-pDEAEMA₄ e

PHEA-IB₃₀-pDEAEMA₁₄ ; tra 2.5 e 6 per il copolimero PHEA-IB₂₄-pDEAEMA₄-pPEGMA_{6,5} e tra 1 e 3 per il PHEA-IB₃₀-pDEAEMA₁₄-pPEGMA₁; tra 2 e 4 per il copolimero PHEA-sLPEI e tra 3 e 10 per il PHEA-PEG-sLPEI. I poliplessi ottenuti sono stati aggiunti nei pozzetti contenenti le cellule e 100 µl di medium di cultura DMEM fresco contenente l'1% di soluzione di penicillina/streptomicina (100 U/ml di penicillina e 100 µg/ml di streptomicina) e il 10% di siero fetale bovino. I Complessi, prima di essere aggiunti nei pozzetti sono stati lasciati a temperatura ambiente per tempi di complessazione di 24 ore, per i copolimeri PHEA-IB₂₄-pDEAEMA₄ ; PHEA-IB₃₀-pDEAEMA₁₄; PHEA-IB₂₄-pDEAEMA₄-pPEGMA_{6,5} ;PHEA-IB₃₀-pDEAEMA₁₄-pPEGMA₁; e di 1h per PHEA-sLPEI e PHEA-PEG-sLPEI. Quindi, incubati con le cellule per 4-24 ore e dopo tale tempo il mezzo di coltura è stato sostituito con medium fresco. Dopo ulteriori 24 ore, il mezzo è stato rimosso e le cellule sono state lavate con 200 µl di PBS, quindi lisate con un detergente opportuno. L'attività della luciferasi è stata determinata usando un protocollo standard per studi di luminescenza [Kabanov A.V. et al, 1995]. L'efficienza di transfezione è stata espressa come unità di luce relativa (RLU) per cellule seminate. I poliplessi di b-PEI (PM=25 kDa)/DNA (C/P 0.8) sono stati usati come controllo positivo, le cellule non transfettate

come controllo negativo. Due ng di luciferasi ricombinante (Promega, Mannheim, Germania) corrispondono approssimativamente a 10^7 RLU.

5.14. Coltura cellulare (HuH7)

Le cellule sono state mantenute in William's medium E (Sigma-aldrich, St Louis, MO) e Dulbecco's modified Eagle's high glucose medium DMEM (Euroclone, Celbio, Devon, UK). Tutti i mezzi contengono il 10% di siero bovino fetale (FBS), 2 mM L-glutamina, 100 U/ml penicillina and 100 mg/ml streptomicina (Euroclone, Celbio, Devon, UK).

5.15. Preparazione complessi PHEA-IB₁₃-pDEAEMA₁₀/siRNA

I siRNA sono stati idratati per 15 minuti a T.A. in 125 μ l di terreno Optimem (Invitrogen), stesso tempo di idratazione è stato dato al polimero a T.A. in 125 μ l di terreno Optimem (Invitrogen). Due aliquote di siRNA e polimero (volume finale 300 μ l) sono state miscelate per 20 min a T.A per consentire la formazione del complesso. Successivamente sono stati aggiunti 550 μ l di Optimem (volume finale 800 μ l, 217nM finale siRNA, rapporto in peso

siRNA:Polimero=1:2) ed è stata quindi effettuata la somministrazione alle cellule (linea di epatocarcinoma HuH7, $3,6 \times 10^4$ cellule) mantenendo in incubazione per 3h. Dopo tale tempo il terreno è stato sostituito ed aggiunti 3 ml di terreno fresco.

L'effetto sull'mRNA è stato valutato dopo 3 giorni dopo il delivery.

5.16. Saggio di transfezione con il complesso PHEA-IB₁₃-pDEAEMA₁₀/siRNA

La sequenza del siRNA (Eurogentec SA, Belgio) diretto contro le posizioni 1324/1117 del mRNA E2F1, è stato precedentemente riportato [Farra R. et al., 2011]. Il giorno prima della transfezione, le cellule di carcinoma epatico (HuH7) sono state seminate ad una densità di $3,8 \times 10^3$ cellule/cm² in 6 micropiastre in presenza di 3 ml di mezzo contenente il 10% di siero bovino fetale. La trasfezione è stata effettuata sia utilizzando il siRNA per E2F1 che il siRNA controllo (siGL2) marcato al 5' fine del senso del filamento da FITC (studi di assorbimento), o il siGL2 non marcato, con un rapporto peso siRNA-transfectant di 1:2. I complessi (siRNA 217 nM) sono stati somministrato alle cellule per 3 ore a 37 ° C in presenza del mezzo privo di siero. Successivamente, il mezzo transfezione è stato rimosso,

le cellule sono state lavate con 3 ml di PBS e poi 4 ml di PBS o terreno completo. Successivamente, le cellule sono state trypsinized e risospese in 500 μ l di PBS/BSA 0,5% e il numero di fluoresceina positivo delle cellule è stata valutata mediante citometria di flusso (FACScanto, Becton Dickinson, DIVA software).

6. BIBLIOGRAFIA

- Ahn C.H., Chae S.Y., Bae Y.H., Kim S.W. Synthesis of biodegradable multi-block copolymers of poly(l-lysine) and poly(ethylene glycol) as a non-viral gene carrier. *J. Control. Release* 97 (2004) 567-574.
- Akinc A., Anderson D.G., Lynn D.M., Langer R. Synthesis of Poly(β -amino ester)s Optimized for Highly Effective Gene Delivery. *Bioconjug. Chem.* 14 (2003) 979-988 (B).
- Akinc A., Lynn D.M., Anderson D.G., Langer R. Parallel Synthesis and Biophysical Characterization of a Degradable Polymer Library for Gene Delivery. *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 5316-5323 (A).
- Ando T., Kamigaito M., Sawamoto M. Design of initiators for living radical polymerization of methyl methacrylate mediated by ruthenium(II) complex. *Tetrahedron* 53 (1997) 15445-15457.
- Ando T., Kato M., Kamigaito M., Sawamoto M. Living radical polymerization of methyl methacrylate with ruthenium complex: Formation of polymers with controlled molecular weights and very narrow distributions. *Macromolecules* 29 (1996) 1070-1072.
- Arigita C., Zuidam N.J., Crommelin D.J., Hennink W.E. Association and Dissociation Characteristics of Polymer/DNA Complexes Used for Gene Delivery. *Pharm. Res.* 16 (1999) 1534-1541.

- Bareford L.M., Swaan P.W. Endocytic mechanisms for targeted drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (2007) 748-758.
- Benari M.D., Hefter G.T. Electrochemical Characteristics of the Copper(II)-Copper(I) Redox Couple in Dimethyl Sulfoxide Solutions. *Aust. J. Chem.* 43 (1990) 1791-1801.
- Boussif O., Lezoualc'h F., Zanta M.A., Mergny M.D., Scherman D., Demeneix B., et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92 (16) (1995) 7297-7301.
- Bulmus V., Woodward M., Lin L., Murthy N., Stayton P., Hoffman A. A new pH-responsive and glutathionereactive, endosomal membrane-disruptive polymeric carrier for intracellular delivery of biomolecular drugs. *J Control Release* 93 (2003) 105-120.
- Campeau P., Chapdelaine P., Seigneurin-Venin S., Massie B., Tremblay J.P. Transfection of large plasmids in primary human myoblasts. *Gene Ther.* 8 (2001) 1387-1394.
- Carlisle R.C., Etrych T., Briggs S.S., Preece J.A., Ulbrich K., Seymour L.W. Polymer-coated polyethylenimine/DNA complexes designed for triggered activation by intracellular reduction. *J Gene Med.* 6 (2004) 337-344.
- Cavallaro G., Campisi M., Licciardi M., Ogris M., Giammona G. Reversibly stable thiopolyplexes for intracellular delivery of genes. *J Contr. Rel.* 115 (2006) 322-334.

- Cavallaro G., Licciardi M., Caliceti P., Salmaso S., Giammona G. Synthesis, physico-chemical and biological characterization of a paclitaxel macromolecular prodrug. *Eur. J. Pharm. Bio-pharm.* 58 (2004) 151-159 (A).
- Cavallaro G., Licciardi M., Di Stefano M., Pitarresi G., and Giammona G. New Self-Assembling Polyaspartamide-Based Brush Copolymers Obtained by Atom Transfer Radical Polymerization. *Macromolecules* 42 (2009) 3247-3257.
- Cavallaro G., Licciardi M., Giammona G., Caliceti P., Semenzato A., Salmaso S. Poly(hydroxyethylaspartamide) derivatives as colloidal drug carrier systems. *J. of Controlled Release* 89 (2003) 285-295.
- Cavallaro G., Maniscalco L., Licciardi M., Giammona G. Tamoxifen-loaded polymeric micelles: Preparation, physico-chemical characterization and in vitro evaluation studies. *Macromolecular Bioscience* 4 (2004) 1028-1038 (B).
- Cavallaro G., Pitarresi G., Licciardi M., Giammona G. Polymeric prodrug for release of an antitumoral agent by specific enzymes. *Bioconjugate Chem.* 12 (2001) 143-151.
- Cavallaro G., Scirè S., Licciardi M., Ogris M., Wagner E., Giammona G. Polyhydroxyethylaspartamide-spermine copolymers: Efficient vectors for gene delivery. *J Contr. Rel.* 131 (2008) 54-63.

- Chen C.P., Kim J.S., Steenblock E., Liu D., Rice K.G. Gene transfer with poly-melittin peptides. *Bioconjug. Chem.* 17 (2006) 1057-1062.
- Cherng J.Y., van de Wetering P., Talsma H., Crommelin D.J., Hennink W.E. Effect of Size and Serum Proteins on Transfection Efficiency of Poly ((2-dimethylamino)ethyl methacrylate)-Plasmid Nanoparticles. *Pharm. Res.* 13 (1996) 1038-1042.
- Chu T.C., Twu K.Y., Ellington A.D., Levy M. Aptamer mediated siRNA delivery. *Nucleic Acids Res.* 34 (2006) e73.
- Coessens V., Pintauer T., Matyjaszewski K. Functional polymers by atom transfer radical polymerization. *Prog. Polym. Sci.* 26 (2001) 337-377.
- Cossu G. “Farmacologia generale e molecolare” cap.X 2006 Ed. 3° UTET
- Craparo E.F., Cavallaro G., Bondi M.L., Mandracchia D., and Giammona G. PEGylated Nanoparticles Based on a Polyaspartamide. Preparation, Physico-Chemical Characterization, and Intracellular Uptake. *Biomacromolecules* 7 (2006) 3083-3092.
- Davis K., O'Malley J., Paik H.-J. Matyjaszewski K. Effect of the counteranion in atom transfer radical polymerization using alkyl (pseudo)halide initiators. *Polym. Prep. (Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem.)*. 38 (1997) 687-688.

- Derfus A.M., Chen A.A., Min D.H., Ruoslahti E., Bhatia S.N. Targeted Quantum Dot Conjugates for siRNA Delivery. *Bioconjug. Chem.* 18 (2007) 1391-1396.
- Donahue R.E., Kessler S.W., Bodine D., McDonagh K., Dunbar C., Goodman S., Agricola B., Byrne E., Raffeld M., Moen R. Helper virus induced T cell lymphoma in nonhuman primates after retroviral mediated gene transfer. *J. Exp. Med.* 176 (1992) 1125-1135.
- Duncan R., Izzo L. Dendrimer biocompatibility and toxicity. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57 (2005) 2215-2237.
- Edinger D., Wagner E. Bioresponsive polymers for the delivery of therapeutic nucleic acids. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology.* 3 (2011) 33-46.
- El-Aneed A. An overview of current delivery systems in cancer gene therapy. *J. Of Controlled Release.* 94; 22 (2004) 1-14.
- Erbacher P., Roche A.C., Monsigny M., Midoux P. The reduction of the positive charges of polylysine by partial gluconoylation increases the transfection efficiency of polylysine/DNA complexes. *Biochim. Biophys. Acta* 1324 (1997) 27-36.
- Farra R., Dapas B., Pozzato G., Scaggiante B., Agostinia F., Zennaro C., Grassi M., Rosso N, Giansante C, Fiotti N., Grassi G. Effects of E2F1–cyclin E1–E2 circuit down regulation in hepatocellular carcinoma cells. *Digestive and Liver Disease* 43 (2011) 1006-1014.

- Fella C., Walker G.F., Ogris M., Wagner E. Aminereactive pyridylhydrazone-based PEG reagents for pH-reversible PEI polyplex shielding. *Eur. J. Pharm. Sci.* 34 (2008) 309-320.
- Fisher K.D., Ulbrich K., Subr V., Ward C.M., Mautner V., Blakey D., Seymour L.W. A versatile system for receptor-mediated gene delivery permits increased entry of DNA into target cells, enhanced delivery to the nucleus and elevated rates of transgene expression. *Gene Ther.* 7 (2000) 1337-1343.
- Forrest M.L., J.T. Koerber, Pack D.W. A degradable polyethylenimine derivative with low toxicity for highly efficient gene delivery. *Bioconjug Chem.* 14 (2003) 934-940.
- Fung T.K. and Poon R.Y.C. A roller coaster ride with the mitotic cyclins. *Seminars in Cell & Developmental Biology.* 16 (2005) 335-342.
- Gabrielson N.P., Pack D.W. Acetylation of polyethylenimine enhances gene delivery via weakened polymer/DNA interactions. *Biomacromolecules* 7 (2006) 2427-2435.
- Georgiou T.K., Vamvakaki M., Phylactou L.A., Patrickios C.S. Synthesis, characterization, and evaluation as transfection reagents of double-hydrophilic star copolymers: effect of star architecture. *Biomacromolecules* 6 (2005) 2990-2997.
- Giammona G., Carlisi B., Palazzo S. Reaction of α,β -poly(*N*-hydroxyethyl)-DL-aspartamide with derivatives of carboxylic acids. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, 25 (1987) 2813-2818.

- Giammona G., Puglisi G., Carlisi B., Pignatello R., Spadaro A., Caruso A. Polymeric prodrugs: α,β -poly(N-hydroxyethyl)-DL-aspartamide as a macromolecular carrier for some non-steroidal anti-inflammatory agents. *Int. J. Pharm.* 57 (1989) 55-62.
- Gore M.E. Adverse effects of gene therapy: gene therapy can cause leukaemia: no shock, mild horror but a probe. *Gene Ther.* 10 (2003) 4.
- Gorecki D.C. Prospects and problems of gene therapy: an update, *Expert Opin. Emerging Drugs.* 6 (2001) 187-198.
- Haensler J., Szoka F.C. Jr. Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture. *Bioconjug. Chem.* 4 (1993) 372-379.
- Hashida M., Mahado R.J., Kawabata K., Myao M., Nishikawa Y., Tokamura Y. pharmacokinetics and targeted delivery of proteins and genes. *J. Controlled Release.* 41 (1996) 91-97.
- Hoon J.J., Christensen L.V., Yockman J.W., Zhong Z., Engbersen J.F., Jong K.W., Feijen J., Wan K.S. Reducible poly(amido ethylenimine) directed to enhance RNA interference. *Biomaterials.* 28 (2007) 1912-1917.
- Hornof M., de la Fuente M., Hallikainen M., Tammi R.H., Urtti A. Lowmolecular weight hyaluronan shielding of DNA/PEI polyplexes facilitates CD44 receptor mediated uptake in human corneal epithelial cells. *J Gene Med.* 10 (2008) 70-80.

- Jeong J.H., Song S.H., Lim D.W., Lee H., Park T.G. DNA transfection using linear poly(ethylenimine) prepared by controlled acid hydrolysis of poly(2-ethyl-2-oxazoline) *J. Controlled Release* 73 (2001) 391-399.
- Jin H., Kim T.H., Hwang S.K., Chang S.H., Kim H.W., Anderson H.K. et al. Aerosol delivery of urocanic acid–modified chitosan/programmed cell death 4 complex regulated apoptosis, cell cycle, and angiogenesis in lungs of K-ras null mice. *Mol. Cancer Ther.* 5 (2006) 1041-1049.
- Jin H., Xu C.X., Kim H.W., Chung Y.S., Shin J.Y., Chang S.H. et al. Urocanic acid-modified chitosan-mediated PTEN delivery via aerosol suppressed lung tumorigenesis in K-rasLA1 mice. Aerosol delivery of PTEN for lung cancer treatment. *Cancer Gene Ther.* 15 (2008) 275-283.
- Jones R.A., Poniris M.H., Wilson M.R. pDMAEMA is internalised by endocytosis but does not physically disrupt endosomes. *J. Control. Release* 96 (2004) 379-391.
- Kabanov A.V., Kabanov V.A. DNA complexes with polycation for the delivery of genetic material into cell. *Bioconjug. Chem.* 13 (1995) 952–957.
- Kichler A., Leborgne C., Savage P.B. and Danos O., Cationic steroid antibiotics demonstrate DNA delivery properties. *J. Contr. Release.*; 107 (2005) 174-182.

- Kim T.H., Ihm J.E., Choi Y.J., Nah J.W., Cho C.S. Efficient gene delivery by urocanic acid-modified chitosan. *J. Control Release* 93 (2003) 389-402.
- Kircheis R., Wightman L., Schreiber A., Robitza B., Rossler V., Kursa M., Wagner E. Polyethylenimine/DNA complexes shielded by transferrin target gene expression to tumors after systemic application. *Gene Ther.* 8 (2001) 28-40.
- Kloeckner J., Bruzzano S., Ogris M., Wagner E. Gene carriers based on hexanediol diacrylate linked oligoethylenimine: effect of chemical structure of polymer on biological properties. *Bioconjug Chem.* 17 (2006) 1339-1345.
- Knorr V., Allmendinger L., Walker G.F., Paintner F.F., Wagner E. An acetal-based PEGylation reagent for pH-sensitive shielding of DNA polyplexes. *Bioconjug. Chem.* 18 (2007) 1218-1225.
- Knorr V., Ogris M., Wagner E. An acid sensitive ketal-based polyethylene glycol-oligoethylenimine copolymer mediates improved transfection efficiency at reduced toxicity. *Pharm Res.* 25 (2008) 2937-2945 (B).
- Knorr V., Russ V., Allmendinger L., Ogris M., Wagner E. Acetal linked oligoethylenimines for use as pH-sensitive gene carriers. *Bioconjug Chem.* 2008, 19:1625–1634 (A).
- Kukowska-Latallo J.F., Bielinska A.U., Johnson J., Spindler R., Tomalia D.A., Baker J.R. Efficient transfer of genetic material into mammalian cells using Starburst polyamidoamine dendrimers. *Jr. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 4897-4902.

- Kukowska-Latallo J.F., Raczka E., Quintana A., Chen C., Rymaszewski M., Baker J.R. Intravascular and Endobronchial DNA Delivery to Murine Lung Tissue Using a Novel, Nonviral Vector. *Hum. Gene Ther.* 11 (2000) 1385-1395.
- Kumar M.N., Muzzarelli R.A., Muzzarelli C., Sashiwa H, Domb A.J. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chem. Rev.* 104 (2004) 6017-6084.
- Kunath K., van Harpe A., Petersen H., Fischer D., Voigt K., Kissel T., Bichel U. The Structure of PEG-Modified Poly(Ethylene Imine)s Influences Biodistribution and Pharmacokinetics of Their Complexes with NF- κ B Decoy in Mice. *Pharm. Res.* 19 (2002) 810-817.
- Lackey C., Press O., Hoffman A., Stayton P. A biomimetic pH-responsive polymer directs endosomal release and intra-cellular delivery of an endocytosed antibody complex. *Bioconjug. Chem.* 13 (2002) 996-1001.
- Layman J.M., Ramirez S.M., Green M.D., Long T.E. Influence of Polycation Molecular Weight on Poly(2-dimethylaminoethyl methacrylate)-Mediated DNA Delivery in vitro. *Biomacromolecules* 10 (2009) 1244-1252.
- Lee H., Jeong J.H., Park T.G. PEG grafted polylysine with fusogenic peptide for gene delivery: high transfection efficiency with low cytotoxicity. *J. Controlled Release* 79 (2002) 283-291.
- Lee M., Kim S.W., Polyethylene Glycol-Conjugated Copolymers for Plasmid DNA Delivery. *Pharm. Res.* 22 (2005) 1-10.

- Lehrman S. Virus treatment questioned after gene therapy death. *Nature*. 401 (1999) 517-518.
- Lendley T.S. and Lendley F.D. Multicompartment, numerical mode of cellular events in the pharmacokinetics of gene therapy. *Human Gene Therapy*. 5 (1994) 679-691.
- Lin C., Blaauboer C.J., Timoneda M.M., Lok M.C., van Steenbergen M., Hennink W.E., Zhong Z., Feijen J., Engbersen J.F. Bioreducible poly(amido amine)s with oligoamine side chains: synthesis, characterization, and structural effects on gene delivery. *J Control Release*. 126 (2008) 166-174.
- Lin S., Du F., Wang Y., Ji S., Liang D., Yu L., and Li Z. An Acid-Labile Block Copolymer of PDMAEMA and PEG as Potential Carrier for Intelligent Gene Delivery Systems. *Biomacromolecules* 9 (2008) 109-115.
- Lindberg U. *Biochim. Et Bioph. Acta*. 82 (1964) 237-248.
- Liu L., Wu C., Zhang J., Zhang M., Liu Y, Wang X., FU G. Controlled Polymerization of 2-(Diethylamino)ethyl Methacrylate and its Block Copolymer with N-Isopropylacrylamide by RAFT Polymerization. *J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem*. 46 (2008) 3294-3305.
- Liu Q., Muruve D.A. Molecular basis of the inflammatory response to adenovirus vectors. *Gene Ther*. 10 (2003) 935-940.
- Lu B., Xu X.D., Zhang X.Z., Cheng S.X., Zhuo R.X. Low molecular weight polyethylenimine grafted N-maleated chitosan

for gene delivery: properties and in vitro transfection studies. *Biomacromolecules* 9 (2008) 2594-2600.

- Lucas B., Van Rompaey E., Remaut K., Sanders N., De Smedt S.C., Demeester J. On the biological activity of anti-ICAM-1 oligonucleotides complexed to non-viral carriers. *J. Controlled Release*. 96 (2004) 207-219.
- Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. In: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2nd Ed. Cold Spring Harbour Press. New York 18 (1986) 24.
- Matsumoto Y., Itaka K., Yamasoba T., Kataoka K. Intranuclear fluorescence resonance energy transfer analysis of plasmid DNA decondensation from nonviral gene carriers. *J Gene Med.* 11 (2009) 615-623.
- Matyjaszewski K. Mechanistic Aspects of Atom Transfer Radical Polymerization. *ACS Symposium Series* 685 (1998) 258-283 (A).
- Matyjaszewski K. Inner sphere and outer sphere electron transfer reactions in atom transfer radical polymerization. *Macromol. Symp.* 134 (1998) 105-118 (C).
- Matyjaszewski K., Coca S., Gaynor S.G., Nakagawa Y., Jo S.M. WO 9801480; U.S. Patent 5, 1998, 789, 487 (B).
- Matyjaszewski K., Davis K., Patten T., Wei M. Observation and analysis of a slow termination process in the atom transfer radical

- polymerization of styrene. *Tetrahedron* 53 (1997) 15321-15329 (B).
- Matyjaszewski K., Go1belt B., Paik H.J., and Horwitz C.P. Tridentate Nitrogen-Based Ligands in Cu-Based ATRP: A Structure–Activity Study. *Macromolecules* 34 (2001) 430-440 (B).
 - Matyjaszewski K., Paik H.J., Zhou P., Diamanti S.J. Determination of Activation and Deactivation Rate Constants of Model Compounds in Atom Transfer Radical Polymerization. *Macromolecules* 34 (2001) 5125-5131 (A).
 - Matyjaszewski K., Wei M., Xia J., McDermott N.E. Controlled/"living" radical polymerization of styrene and methyl methacrylate catalyzed by iron complexes. *Macromolecules* 30 (1997) 8161-8164 (A).
 - McTaggart S., Al-Rubeai M. Retroviral vectors for human gene delivery. *Biotechnol. Adv.* 20 (2002) 1-31.
 - Mendichi R., Giacometti Schieron A., Cavallaro G., Licciardi M., Giammona G. Molecular characterization of α,β -poly(N-2-hydroxyethyl)-DL-aspartamide derivatives as potential self-assembling copolymers forming polymeric micelles. *Polymer* 44 (2003) 4871-4879.
 - Merdan T., Kopeček J., Kissel T. Prospects for cationic polymers in gene and oligonucleotide therapy against cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 54 (2002) 715-758.

- Merdan T., Kunath K., Petersen H., Bakowsky U., Voigt K.H., Kopecek J. et al. PEGylation of Poly(ethylene imine) Affects Stability of Complexes with Plasmid DNA under in Vivo Conditions in a Dose-Dependent Manner after Intravenous Injection into Mice. *Bioconjug. Chem.* 16 (2005) 785-792.
- Midoux P., Breuzard G., Gomez J.P., Pichon C. Polymer-Based Gene Delivery: A Current Review on the Uptake and Intracellular Trafficking of Polyplexes. *Curr. Gene Ther.* 8 (2008) 335-352.
- Midoux P., Pichon C., Yaouanc J.J. and Jaffrès P.A. Chemical vectors for gene delivery: a current review on polymers, peptides and lipids containing histidine or imidazole as nucleic acids carriers. *British Journal of Pharmacology.* 157 (2009) 166-178.
- Mok H., Park T.G. Functional Polymers for Targeted Delivery of Nucleic Acid Drugs. *Macromol. Biosci.* 9 (2009) 731-743.
- Murthy N., Chang I., Stayton P., Hoffman A. pH-sensitive hemolysis by random copolymer of alkyl acrylates and acrylic acid. *Macromol. Symp.* 172 (2001) 49-55.
- Nanda A.K., Matyjaszewski K. Effect of [PMDETA]/[Cu(I)] Ratio, Monomer, Solvent, Counterion, Ligand, and Alkyl Bromide on the Activation Rate Constants in Atom Transfer Radical Polymerization. *Macromolecules* 36 (2003) 1487-1493.
- Nishikawa M., Yamauchi M., Morimoto K., Ishida E., Takakura Y., Hashida M. Hepatocyte-targeted in vivo gene expression by intravenous injection of plasmid DNA complexed with synthetic

- multi-functional gene delivery system. *Gene Ther.* 7 (2000) 548-555.
- Nishikawa T., Ando T., Kamigaito M., Sawamoto M. Evidence for Living Radical Polymerization of Methyl Methacrylate with Ruthenium Complex: Effects of Protic and Radical Compounds and Reinitiation from the Recovered Polymers. *Macromolecules* 30 (1997) 2244-2248.
 - Nishikawa T., Kamigaito M., Sawamoto M. Living Radical Polymerization in Water and Alcohols: Suspension Polymerization of Methyl Methacrylate with RuCl₂(PPh₃)₃ Complex. *Macromolecules* 32 (1999) 2204-2209.
 - Nishimura M., Kamigaito M., Sawamoto M. Living radical polymerization of styrene with transition metal dithiocarbamate/AIBN systems: Halogen-free living processes. *Polym. Prep. (Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem.)* 40 (1999) 470-471.
 - Ogris M., Brunner S., Schuller S., Kircheis R., Wagner E. PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. *Gene Ther.* 6 (4) (1999) 595-605.
 - Oishi M., Nagasaki Y., Itaka K., Nishiyama N., Kataoka K. Lactosylated poly(ethylene glycol)-siRNA conjugate through acid-labile beta-thiopropionate linkage to construct pH-sensitive

polyion complex micelles achieving enhanced gene silencing in hepatoma cells. *J Am Chem Soc.* 127 (2005) 1624-1625.

- Oupicky D., Konak C., Dash P.R., Seymour L.W., Ulbrich K. Effect of albumin and polyanion on the structure of DNA complexes with polycation containing hydrophilic non-ionic block. *Bioconjug Chem.* 10 (5) (1999) 764-772.
- Philipp A., Zhao X., Tarcha P., Wagner E., Zintchenko A. Hydrophobically modified oligoethylenimines as highly efficient transfection agents for siRNA delivery. *Bioconjug Chem.* 20 (2009) 2055-2061.
- Pichon C., Roufaï M.B., Monsigny M., Midoux P. Histidylated oligolysines increase the transmembrane passage and the biological activity of antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Reserch.* 28 (2000) 504-512.
- Plank C., Oberhauser B., Mechtler K., Koch C., Wagner E. The influence of endosome-disruptive peptides on gene transfer using synthetic virus-like gene transfer systems. *J Biol. Chem.* 269 (1994) 12918-12924.
- Pouton C.W., Setmour L.W. Key issue in non-viral gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 46 (2001) 187-203.
- Prevette L.E., Kodger T.E., Reineke T.M., Lynch M.L. Deciphering the role of hydrogen bonding in enhancing pDNA-polycation interactions. *Langmuir.* 23 (2007) 9773-9784.

- Queffelec J., Gaynor S.G., Matyjaszewski K. Optimization of Atom Transfer Radical Polymerization Using Cu(I)/Tris(2-(dimethylamino)ethyl)amine as a Catalyst. *Macromolecules* 33 (2000) 8629-8639.
- Read M.L., Bremner K.H., Oupicky D., Green N.K., Searle P.F., Seymour L.W. Vectors based on reducible polycations facilitate intracellular release of nucleic acids. *J Gene Med.* 5 (2003) 232-245.
- Read M.L., Singh S., Ahmed Z., Stevenson M., Briggs S.S., D. Oupicky, Barrett L.B., Spice R., Kendall M., Berry M., J.A. Preece, Logan A., Seymour L.W. A versatile reducible polycation-based system for efficient delivery of a broad range of nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* 33 (2005) e86.
- Remy-Kristensen A., Clamme J.P., Vuilleumier C., Kuhry J.G., Mely Y. Role of endocytosis in the transfection of L929 fibroblasts by polyethylenimine/DNA complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes.* 1514 (2001) 21-32.
- Rogers C.S., Sullenger B.A. *The Gene Therapy.* Goodman and Gillman, cap 5, XED (2001).
- Rozema D.B., Ekena K., Lewis D.L., Loomis A.G., Wolff J.A. Endosomolysis by Masking of a Membrane-Active Agent (EMMA) for cytoplasmic release of macromolecules. *Bioconjug. Chem.* 14 (2003) 51-57.
- Saito G., Amidon G.L., Lee K.D. Enhanced cytosolic delivery of plasmid DNA by a sulfhydryl-activatable listeriolysin

- O/protamine conjugate utilizing cellular reducing potential. *Gene Ther.* 10 (2003) 72-83.
- Schatzlein A.G. Targeting of synthetic gene delivery systems. *J Biomed Biotechnol.* 2 (2003) 149-158.
 - Simal F., Demonceau A., Noels A.F. Highly efficient ruthenium-based catalytic systems for the controlled free-radical polymerization of vinyl monomers. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 38 (1999) 538-540
 - Singha N.K. and Klumperman B. Atom-transfer radical polymerization of methyl methacrylate (MMA) using CuSCN as the catalyst *Macromol. Rapid Commun.* 21 (2000) 1116-1120.
 - Sun J.Y., Anand-Jawa V., Chatterjee S., Wong K.K. Immune responses to adeno-associated virus and its recombinant vectors. *Gene Ther.* 10 (2003) 964-976.
 - Takahashi H., Ando T., Kamigaito M., Sawamoto M. Half-Metallocene-Type Ruthenium Complexes as Active Catalysts for Living Radical Polymerization of Methyl Methacrylate and Styrene. *Macromolecules* 32 (1999) 3820-3823.
 - Tang W., Matyjaszewski K. Effects of Initiator Structure on Activation Rate Constants in ATRP. *Macromolecules* 40 (2007) 1858-1863.
 - Teodorescu M., Gaynor S.G., Matyjaszewski K. Halide Anions as Ligands in Iron-Mediated Atom Transfer Radical Polymerization. *Macromolecules* 33 (2000) 2335-2339.

- Thomas M., Klibanov A.M. Enhancing polyethylenimine's delivery of plasmid DNA into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 99 (2002) 14640-14645.
- Üzgün S., Akdemir O., Hasenpusch G., Golas M.M., Sander B., Stark H., Imker R., Lutz J.F., Rudolph C. Characterization of Tailor-Made Copolymers of Oligo(ethylene glycol) Methyl Ether Methacrylate and N,N-Dimethylaminoethyl Methacrylate as Nonviral Gene Transfer Agents: Influence of Macromolecular Structure on Gene Vector Particle Properties and Transfection Efficiency. *Biomacromolecules* 11 (2010) 39-50.
- van de Wetering P., Cherng J.Y., Talsma H., Hennink, W.E. Relation between Transfection Efficiency and Cytotoxicity of Poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate)/Plasmid Complexes. *J. Control. Release* 49 (1997) 59-69.
- Verbaan F.J., Oussoren C., van Dam I.M., Takakura Y., Hashida M., Crommelin D.J., Hennink W.E., Storm G. The fate of poly(2-dimethyl amino ethyl)methacrylate-based polyplexes after intravenous administration. *Int. J.Pharm.* 214 (2001) 99-101.
- von Gersdorff K, Sanders N, Vandenbroucke R, De Smedt S, Wagner E, Ogris M. The internalization route resulting in successful gene expression depends on polyethylenimine both cell line and polyplex type. *Mol Ther.* 14 (2006) 745-753.
- Wagner E., Plank C., Zatloukal K., Cotten M., Birnstiel M.L. Influenza virus hemagglutinin HA-2 N-terminal fusogenic peptides augment gene transfer by transferrin-polylysine-DNA

complexes: toward a synthetic virus-like gene-transfer vehicle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 7934-7938.

- Walker G.F., Fella C., Pelisek J., Fahrmeir J., Boeckle S., Ogris M., Wagner E. Toward synthetic viruses: endosomal pH-triggered deshielding of targeted polyplexes greatly enhances gene transfer in vitro and in vivo. *Mol Ther.* 11 (2005) 418-425.
- Wang J.S. and Matyjaszewski K. Controlled/"Living" Radical Polymerization. Halogen Atom Transfer Radical Polymerization Promoted by a Cu(I)/Cu(II) Redox Process. *Macromolecules* 28 (1995) 7901-7910 (A).
- Wang J.S. and Matyjaszewski K. Controlled/"living" radical polymerization. Atom transfer radical polymerization in the presence of transition-metal complexes. *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 5614-5615 (B).
- Wetering P., Moret E.E., Schuurmans-Nieuwenbroek N.M.E., van Steenberg M.J., Hennink W.E. Structure-activity relationships of water-soluble cationic methacrylate/methacrylamide polymers for non-viral gene delivery. *Bioconjug. Chem.* 10 (1999) 589-597.
- Wyman T.B., Nicol F., Zelphati O., Scaria P.V., Plank C., Szoka F.C. Jr. Design, synthesis, and characterization of a cationic peptide that binds to nucleic acids and permeabilizes bilayers. *Biochemistry* 36 (1997) 3008-3017.

- Xia J. and Matyjaszewski K. Multidentate nitrogen ligands in atom transfer radical polymerization. *Polym. Prep. (Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem.)* 40(2) (1999) 442-443.
- Xu F.J., Li H., Li J., Zhang Z., Kang E.T., Neoh K.G. Pentablock copolymers of poly(ethylene glycol), poly((2-dimethyl amino)ethyl methacrylate) and poly(2-hydroxyethyl methacrylate) from consecutive atom transfer radical polymerizations for non-viral gene delivery. *Biomaterials* 29 (2008) 3023-3033.
- Xu L., Anchordoquy T. Drug Delivery Trends in Clinical Trials and Translational Medicine: Challenges and Opportunities in the Delivery of Nucleic Acid-Based Therapeutics. *J. Pharmaceutical Sciences*. 100 (2011) 38-52.
- Yang Y., Xu Z., Chen S., Gu W., Chen L. et al. Histidylated cationic polyorganophosphazene/DNA self-assembled nanoparticles for gene delivery. *Int. J. Pharm.* 353 (2008) 277-282.
- Zauner W., Blaas D., Kuechler E., Wagner E. Rhinovirus-mediated endosomal release of transfection complexes. *J Virol.* 69 (1995) 1085-1092.
- Zhang X., Godbey W.T. Viral vectors for gene delivery in tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58 (2006) 515-534.
- Zhang Z.B., Zhu X.L., Xu F.J., Neoh K.G., Kang E.T. Temperature- and pH-sensitive nylon membranes prepared via

consecutive surface-initiated atom transfer radical graft polymerizations. *J. Membrane Science* 342 (2009) 300-306.

- Zhou J., Wu J., Hafdi N., Behr J.P., Erbacher P., Peng L. PAMAM dendrimers for efficient siRNA delivery and potent gene silencing. *Chem. Commun.* 22 (2006) 2362-2364.
- Zhu C., Jung S., Si G., Cheng R., Meng F., Zhu X., Park T.G., ZHONG Z. Cationic methacrylate copolymers containing primary and tertiary amino side groups: controlled synthesis via RAFT polymerization, DNA condensation, and invitro gene transfection. *J Polym. Sci.Part. A Polym. Chem.* 48 (2010) 2869-2877.
- Zugates G.T., Peng W., Zumbuehl A., Jhunjhunwala S., Huang Y.H., Langer R., Sawicki J.A., Anderson D.G. Rapid optimization of gene delivery by parallel endmodification of poly(beta-amino ester)s. *Mol Ther.* 15 (2007) 1306-1312.