Giulio Natta, polimeri biomedici e poli(ammido-ammine)

di Paolo Ferruti

Giulio Natta fu essenzialmente un grande chimico industriale. Nell'ambito dei polimeri, gli interessi di Natta non si limitavano alla polimerizzazione stereospecifica, ma fu invece costantemente animato dall'attesa di nuove iniziative di ricerca ragionevoli e brillanti, e sapeva riconoscerle anche quando erano, per quei tempi, eccentriche. Personalmente da Natta fui indirizzato a studiare l'uso di macromolecole di sintesi in medicina. In seguito a ciò, furono preparati in quegli anni i primi esempi di una nuova classe di polimeri, le poli(ammido-ammine), di cui questo articolo riassume, in omaggio a Natta, i più recenti sviluppi.

Giulio Natta in uno dei laboratori del Politecnico di Milano assieme ad alcuni suoi collaboratori (foto scattata alla vigilia della consegna del Nobel)

Giulio Natta scoprì la polimerizzazione stereospecifica dei monomeri vinilici poco dopo la metà del secolo scorso e per questo nel 1963 ricevette, insieme con Ziegler, il premio Nobel per la Chimica. A circa mezzo secolo di distanza, nessuno fra quanti al mondo si occupano di polimeri ignora il suo nome, e si può a buon diritto affermare che Giulio Natta è ormai entrato per sempre fra i grandi chimici della storia.

Natta, però, non fu soltanto il geniale e fortunato scopritore di un nuovo metodo di polimerizzazione, sia pure di capitale importanza. Fu anche un eccellente organizzatore e manager della ricerca e, soprattutto, un caposcuola. Egli fu grande perché fu anche questo. Approfondire l'argomento delle capacità organizzative di Natta andrebbe oltre lo scopo di quest'articolo. Mi basta ricordare che nel corso della mia vita non ho mai trovato né in Italia né all'estero una struttura di ricerca più funzionale dell'Istituto di Chimica Industriale del Politecnico di Milano, com'era negli anni Sessanta sotto la sua direzione.

Giulio Natta diede negli anni Cinquanta e Sessanta un impulso che si può definire grandioso allo sviluppo della chimica macromolecolare in Italia. Egli in ciò non fu il solo: non si possono ignorare, ad esempio, le importanti scuole di chimica dei polimeri fondate nello stesso periodo da Nasini e Saini a Torino, Scoffone a Padova, Rossi a Genova, Baccaredda a Pisa e Liquori a Napoli. Fu però per la chimica dei polimeri il caposcuola più illustre ed anche il più fortunato, se si considerano le scuole di seconda e terza generazione fondate da suoi allievi o allievi d'allievi in altre università italiane, per non parlare degli istituti di ricerca non universitari sia pubblici (Cnr) sia privati nella cui creazione o impostazione scientifica Natta svolse una parte preponderante. Da tutto questo, chi non ha conosciuto personalmente Natta potrebbe farsene un'immagine inesatta perché limitativa. Natta non fu soltanto uno studioso della polimerizzazione stereospecifica, con tutte le sue ampie implicazioni. Non fu nemmeno soltanto un chimico macromolecolare in senso lato. Natta fu essenzialmente un grande chimico industriale che prima di occuparsi di polimeri aveva dato importanti contributi alla chimica industriale "classica", di cui non cessò mai di occuparsi fino al ritiro dalla vita accademica. Egli fondò, direttamente o indirettamente, importanti scuole di chimica industriale che operano tutt'ora ad alto livello in campi diversi dai polimeri, considerò sempre la chimica macromolecolare una branca della chimica industriale, e avrebbe certamente visto con assoluto sfavore ogni iniziativa di farne una disciplina separata.

Restando nell'ambito dei polimeri, gli interessi di Natta non si limitavano alla polimerizzazione stereospecifica. Egli era invece, per quanto ricordo, animato dalla curiosità o meglio dall'attesa di cose nuove. Era perciò aperto verso iniziative di ricerca che fossero insieme ragionevoli e brillanti, e sapeva riconoscerle anche quando uscivano da schemi per quei tempi tradizionali. Entrai nello staff di Natta al Politecnico di Milano alla fine del 1961, e dopo un breve periodo iniziale abbandonai completamente la polimerizzazione stereospecifica, occupandomi invece prevalentemente per tutta la vita e in tutte le sedi in cui prestai servizio di polimeri multifunzionali per uso biomedico. Può sembrare strano ascoltare fra i polimeristi allievi di Natta una voce discordante dal grande coro della polimerizzazione stereospecifica. Stupirà ancora di più apprendere che proprio da Natta, nel suo ufficio, fui indirizzato a questo genere di ricerche e da allora non lo abbandonai più. Le cose andarono così. Verso la fine degli anni Cinquanta due chimici tedeschi, Schlipköter e Brockhaus, avevano scoperto che la poli (2-vinilpiridina) N-ossido era in grado di bloccare lo sviluppo della silicosi in animali da esperimento. Enrico Vigliani, allora direttore della Clinica del Lavoro dell'Università di Milano, si rivolse a Natta per ottenere, se possibile, un campione di questo polimero. Natta capì immediatamente le potenzialità dei polimeri in campo biomedico. Ci

P. Ferruti, Dipartimento di Chimica Organica e Industriale, Università di Milano. paolo.ferruti@unimi.it

fu una riunione nel suo ufficio fra lui, Ferdinando Danusso (nel cui laboratorio prestavo servizio come Aspirante Ricercatore del Cnr) e me da un lato, e Vigliani, Benvenuto Pernis e Maria Antonietta Marchisio, giovane ricercatrice presso la Clinica del Lavoro, dall'altro. Fui incaricato di studiare la sintesi della poli (2-vinilpiridina) N-ossido, che fu quindi il primo polimero di interesse biomedico che preparai, e incoraggiato da Natta e Danusso a proseguire sulla linea di ricerca, allora eccentrica, che attualmente è nota nella comunità scientifica come "Polymer Therapeutics". Dovevo lavorare di concerto con Maria Antonietta Marchisio, e il primo risultato fu il nostro matrimonio. Poi vennero i lavori scientifici in comune su numerosi altri polimeri N-ossido, lo studio di una nuova classe di polimeri, le poli(ammido-ammine), le prime esplorazioni delle potenzialità di quest'ultime come agenti complessanti l'eparina, e poi via via tutti gli altri studi a cui mi sono dedicato con mia moglie in passato e tuttora mi dedico. E proprio gli ultimi sviluppi delle ricerche sulle poli(ammido-ammine) saranno riassunti in questo articolo.

Sintesi e struttura delle poli(ammidoammine)

Le poli(ammido-ammine) (PAA) sono polimeri contenenti in catena principale gruppi ter-amminici e ammidici, che si ottengono per poliaddizione con trasferimento di idrogeno, in ambiente acquoso e senza catalizzatori aggiunti di ammine primarie o secondarie a bis-acrilammidi, come evidenziato nello Schema.

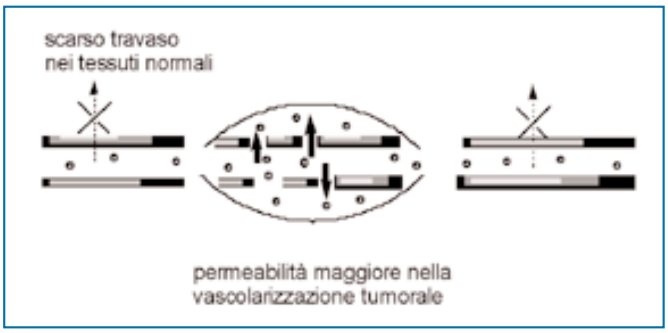


Figura - Schema esplicativo dell'effetto EPR

La reazione avviene preferibilmente in solventi protici come acqua o alcoli, a temperatura ambiente e senza catalizzatori aggiunti. Si ottengono pesi molecolari più elevati conducendo la poliaddizione in soluzione concentrata.
In condizioni non selettive, le diammine primarie si comportano da monomeri tetrafunzionali e con bis-acrilammidi danno polimeri reticolati. In particolari condizioni però anche da diammine primarie si possono ottenere PAA solubili, che contengono gruppi amminici primari come costituenti laterali.

Proprietà delle poli(ammidoammine)

Le PAA sono generalmente solubili o almeno rigonfiabili in acqua; quelle insolubili in acqua sono generalmente solubili in acidi. Molte PAA sono inoltre solubili in cloroformio, alcoli e altri solventi organici. I loro pesi molecolari variano di solito fra $5x10^3$ e $5x10^4$, ed i loro valori di viscosità intrinseca [η] fra 0,15 e 1,0 dL/g. Di regola, le PAA mostrano in soluzione acquosa volumi idrodinamici relativamente grandi, significativi di una loro tendenza ad assumere una conformazione a catena aperta. I valori delle costanti di Mark-Houwink-Sakurada sono generalmente alti, e possono arrivare per PAA con strutture cicliche in catena a valori dell'ordine, rispettivamente, di $1,76x10^{-5}$ e 1,14. Le PAA idrosolubili sono lentamente degradabili in ambienti acquosi. Si tratta di una proprietà favorevole per le loro applicazioni come veicolanti di farmaci, perché ne consente dopo un certo tempo la bioeliminazione. Il meccanismo di degradazione sembra puramente idrolitico, poiché non è stata rilevata, per analisi Nmr, la presenza di gruppi vinilici derivanti da reazioni di β-eliminazione. Inoltre, la velocità di degradazione è fortemente influenzata dal pH.

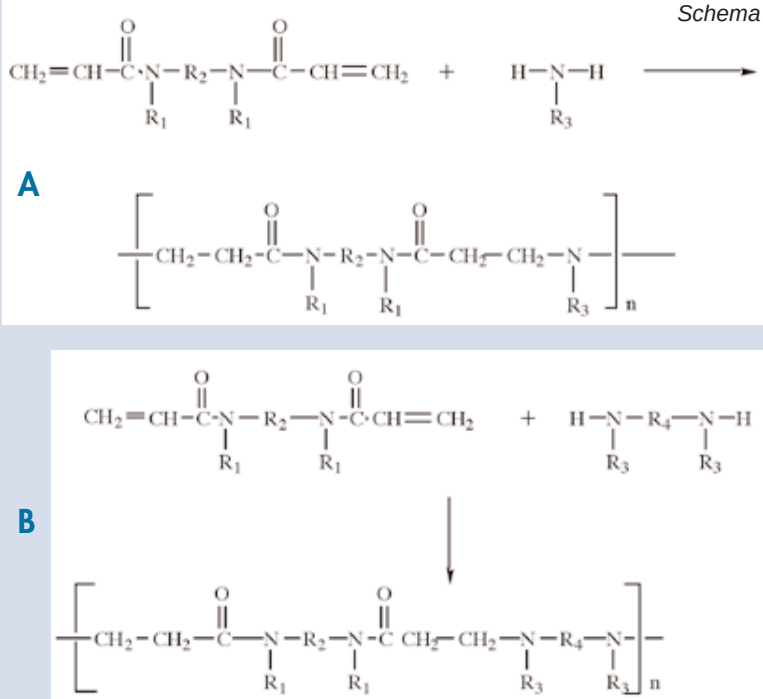
Le poli(ammidoammine) come polielettroliti

Tutte le PAA contengono gruppi amminici ionizzabili nella catena principale e possono perciò essere classificate come polielettroliti. Di norma, i valori delle costanti di protonazione (log K) dei polielettroliti dipendono dal grado di protonazione dell'intera macromolecola. Questo implica che queste molecole seguono l'equazione di Henderson-Hasselbach modificata:

$$\log K_i = \log K°_i + (n-1)\log[(1-\alpha/\alpha]$$

Il valore di $\log K°_i$ corrisponde alla costante di protonazione di un gruppo contenuto in una catena che si trova in forma completamente non ionizzata. Nella maggior parte delle PAA i valori di n sono molto vicini all'unità e di conseguenza è possibile determinare costanti di basicità "reali". Nel caso di PAA derivanti da diammine disecondarie si ottengono valori di pKa_1 compresi tra 7 e 9 e valori di pKa_2 compresi tra 4 e 8: si tratta quindi di basi polimeriche di forza medio-debole.

Schema



Le PAA come agenti eparino-complessanti

L'eparina è un noto agente anticoagulante molto usato nella pratica clinica. Si tratta di un mucopolisaccaride contenente gruppi carbossilici e solfonici, che in soluzione acquosa si comporta come un polianione con alta densità di carica. L'inibizione dell'attività anticoagulante dell'eparina si ottiene di solito somministrando come antagonista il solfato di protammina, che purtroppo dà origine a severi effetti collaterali. È merito di mia moglie la scoperta che alcune PAA sono in grado, in ambienti fisiologici, di neutralizzare l'attività anticoagulante dell'eparina in modo analogo al solfato di protammina, ma senza gli inconvenienti di quest'ultima. Le stesse PAA in forma reticolata assorbono l'eparina in modo altamente selettivo anche da soluzioni molto diluite in acqua, plasma, o anche sangue intero senza esercitare azioni negative sui componenti corpuscolati (globuli rossi, globuli bianchi o piastrine). Possono costituire quindi il componente bioattivo di filtri capaci di de-eparinizzare il sangue di pazienti cui è stata somministrata eparina.

Citotossicità delle PAA e confronto con altri policationi

Molti policationi di varia struttura, come ad esempio la poli-L-lisina e la polietilenimmina sono stati studiati come veicolanti solubili ("carriers") di farmaci antitumorali e sono stati proposti come veicolanti di geni e oligonucleotidi, nella terapia genica diretta verso il fegato e nel rilascio di nucleotidi antisenso. I policationi sono però in generale molto tossici, tanto da precluderne un eventuale utilizzo terapeutico. La tossicità delle PAA è invece si solito molto più bassa di quella dei policationi sopra citati, specialmente nel caso delle PAA anfotere (vedi oltre), la cui biocompatibilità è paragonabile a quella del destrano.

Distribuzione dell'ISA 23 in animali portatori di tumori*

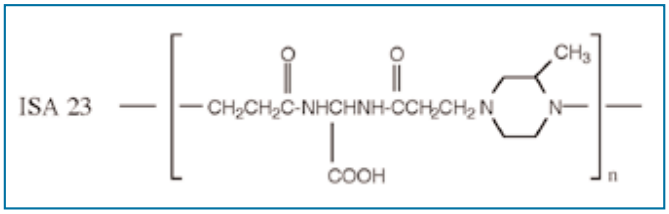
Tessuto	*Dopo 1 ora*	*Dopo 5 ore*
Sangue	11,5	4,8
Fegato	2,0	1,8
Reni	2,7	1,2
Tumore	1,2	2,5

* % in peso di ISA 23 rispetto alla dose

Le PAA anfotere

Le PAA sono già di per sé polimeri altamente funzionalizzati. Tuttavia, molte funzioni addizionali possono essere introdotte nella loro struttura come sostituenti laterali semplicemente usando come monomeri ammine o bis-acrilammidi che rechino queste funzioni. In particolare, si possono ottenere PAA anfotere usando amminoacidi o peptidi come monomeri amminici, oppure l'acido N,N-bisacrilammidoacetico come monomero bisacrilammidico. Le PAA derivanti da quest'ultimo hanno dal punto di vista biologico alcune caratteristiche importanti in vista di un loro uso come modificanti o veicolanti di sostanze biologicamente attive quali farmaci tradizionali, peptidi o proteine.
Le principali fra queste sono:
- idrosolubilità elevata;
- tossicità molto bassa, paragonabile a quella del destrano;
- degradabilità in ambiente fisiologico;
- "invisibilità", una volta iniettate, da parte del sistema reticolo-endoteliale (RES) durante la circolazione nel sangue.

La prima e la seconda caratteristica rendono queste PAA adoperabili senza particolari problemi. La terza caratteristica evita ogni rischio d'accumulo nell'organismo di macromolecole o particelle che hanno esaurito la loro "carica" di principio attivo. La quarta caratteristica evita che le macromolecole di PAA siano rapidamente catturate dalle cellule del RES, la cui funzione è appunto di agire come "spazzini" per particolati e macromolecole. La cattura di macromolecole o particelle generalmente conduce a una loro localizzazione in sedi che possono essere non convenienti, come fegato e milza. Questo aspetto è da tenere in considerazione soprattutto in vista di un utilizzo di macromolecole o nanoparticelle come veicolanti di farmaci antitumorali con localizzazione diversa dai due organi citati. Infatti, si è recentemente riconosciuto che macromolecole o nanoparticelle "invisibili" (o "stealth", come vengono correntemente chiamate nella letteratura scientifica con un termine di origine militare) finiscono con l'accumularsi passivamente a livello dei tessuti tumorali grazie al cosiddetto "effetto EPR".
Questo fenomeno è stato così chiamato (EPR: "Enhanced Permeability and Retention") perché attribuibile a due fattori. Da un lato, la vascolarizzazione tumorale mostra un endotelio discontinuo, vale a dire con permeabilità alterata, che ne permette l'attraversamento da parte di macromolecole di grosse dimensioni, che invece attraversano con difficoltà o non attraversano per nulla le pareti di vasi normali (vedi Figura). Dall'altro lato, si osserva nel tumore una mancanza di drenaggio efficace da parte del sistema linfatico, che conduce ad un accumulo locale delle macromolecole una volta penetrate. L'effetto EPR si esplica pienamente solo nel caso di particelle o polimeri che sfuggono ai sistemi di difesa dell'organismo e permangono a lungo nel circolo sanguigno. È cioè necessario che le particelle o i polimeri siano "stealth". Secondo studi recenti le poli(ammido-ammine) (PAA) anfotere presentano tali caratteristiche in modo particolarmente elevato. Fra le PAA anfotere, la ISA 23, che deriva dalla poliaddizione di 2-metilpiperazina ad acido 2,2-bisacrilammidoacetico, è stata particolarmente studiata e presenta le caratteristiche di cui sopra in modo ottimale. ISA 23 è tipicamente idrosolubile, biodegradabile e atossica. Essa presenta in modo notevole la capacità di concentrarsi selettivamente a livello dei tumori, come si può rilevare dalla Tabella, ricavata dai ottenuti presso la Welsh School of Pharmacy" dell'Università di Cardiff. Il dato relativo al tumore appare particolarmente significativo se si considera la sua ridotta massa rispetto all'intero animale. L'ISA 23 si presenta quindi come il candidato ideale per la preparazione di derivati biodegradabili, atossici e "stealth" di sostanze ad attività antitumorale, essendo probabilmente in grado di veicolarle e concentrarle selettivamente a livello dei tumori.



Bibliografia

[1] P. Ferruti *et al., Macromol. Rapid Comm.,* 2002, **23,** 332.
[2] P. Ferruti *et al., Macromolecules,* 2000, **33,** 7793.
[3] S. Richardson *et al., J. Drug Targeting,* 1999, **6,** 391.
[4] S.C.W. Richardson *et al., Biomacromolecules,* 2001, **2,** 1023.