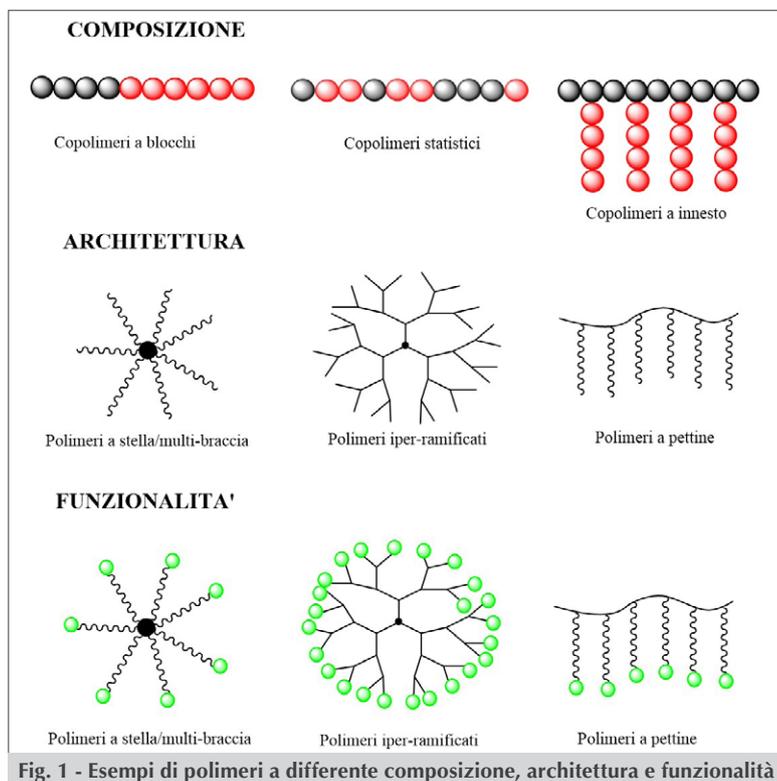




STEFANIA ORDANINI<sup>A,B,C</sup>, WANDA CELENTANO<sup>A</sup>, FRANCESCO CELLESI<sup>A,B</sup>  
<sup>A</sup>DIPARTIMENTO DI CHIMICA, MATERIALI ED INGEGNERIA CHIMICA "G. NATTA"  
 POLITECNICO DI MILANO  
<sup>B</sup>FONDAZIONE CEN - EUROPEAN CENTRE FOR NANOMEDICINE  
 MILANO  
<sup>C</sup>FONDAZIONE IRCCS CA' GRANDA OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO  
 MILANO  
 FRANCESCO.CELLESI@POLIMI.IT

## PROGETTAZIONE DI MACROMOLECOLE AD ARCHITETTURA COMPLESSA PER LA NANOMEDICINA

*Polimeri ad architettura complessa vengono sempre più utilizzati in nanomedicina, grazie alla loro capacità di attraversare barriere biologiche e di trasportare farmaci. Polimerizzazioni controllate e tecniche di "click chemistry" permettono una sintesi di macromolecole biocompatibili con peso molecolare, topologia e funzionalità regolabili.*



### Polimeri ad architettura complessa

La sintesi e lo studio di polimeri ad elevata complessità molecolare sono stati oggetto di una intensa ricerca negli ultimi anni, di pari passo con gli sviluppi nel campo dei nanomateriali e delle nanotecnologie. L'interesse per macromolecole a topologia complessa, quali i polimeri ramificati e iper-ramificati, a pettine, multi-braccia, nonché i copolimeri a blocchi (Fig. 1), è dovuto alle loro singolari proprietà chimico-fisiche, che si discostano notevolmente da quelle delle macromolecole lineari, e consentono quindi di esplorare nuove applicazioni nel campo della scienza dei materiali e delle nanotecnologie [1].

Opportune tecniche di polimerizzazione "controllate" e "viventi", quali ad esempio l'Atom Transfer Radical Polymerisation (ATRP) e la Ring Opening Polymerisation (ROP), permettono una sintesi su misura di macromolecole con composizione, peso molecolare e grado di ramificazione ben

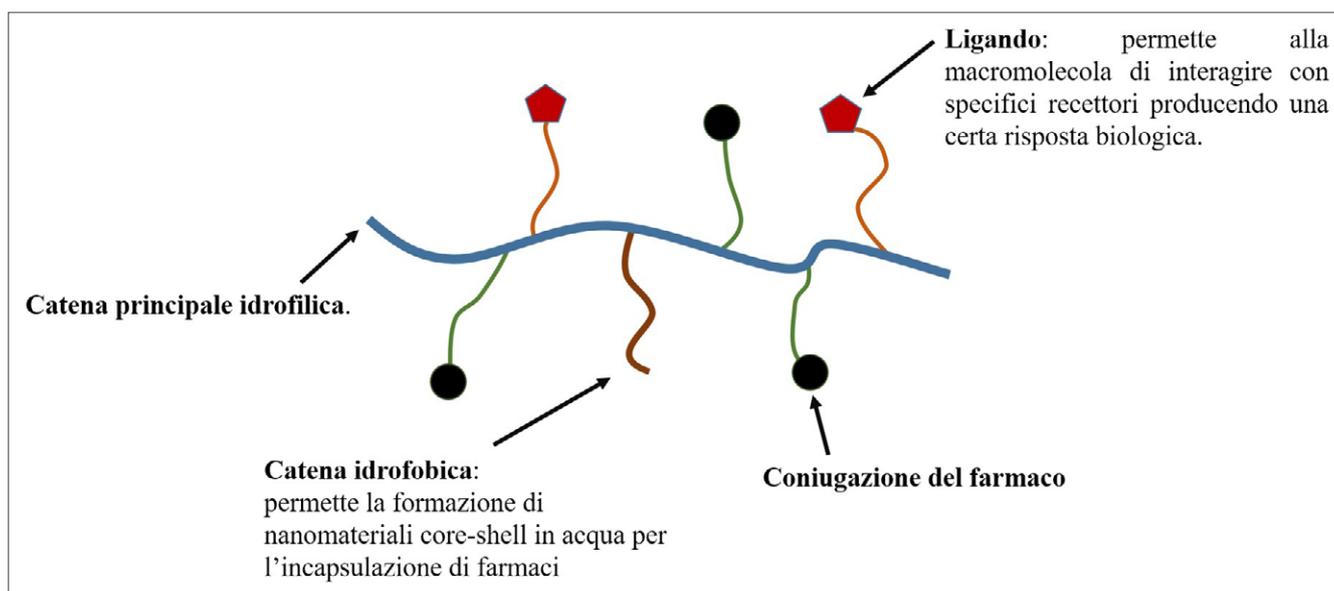


Fig. 2 - Il concetto di polimero farmacologicamente attivo

definiti, topologia controllata e specifica funzionalità. Progettando opportunamente polimeri biocompatibili e/o biodegradabili ad architettura complessa, sono stati sviluppati biomateriali per un numero sempre crescente di applicazioni nell'ambito della nanomedicina e del drug delivery. Si possono infatti produrre nanovettori per il trasporto e il rilascio di farmaci con un elevato controllo della loro dimensione e della loro capacità di attraversare le varie barriere biologiche e raggiungere selettivamente cellule, tessuti, organi.

Le loro proprietà chimico-fisiche possono essere variate per ottenere formulazioni iniettabili su misura per il trattamento di tumori ed altre patologie (come quelle renali) e per la vaccinazione (nanovaccini, adiuvanti). In questi casi è necessario un controllo raffinato della taglia e della morfologia del nanomateriale polimerico finale quando esso è disperso in un ambiente acquoso, come ad esempio un buffer fisiologico, un mezzo di coltura cellulare, od un fluido biologico.

Tenendo basso il peso molecolare medio e la polidispersità e selezionando un elevato grado di ramificazione è possibile ottenere sospensioni colloidali polimeriche di dimensioni ultra-piccole (con un diametro idrodinamico <10 nm). Questi nanovettori "ultrasmall" possiedono un'elevata capacità di attraversare le varie barriere biologiche per raggiungere il loro specifico obiettivo biologico. Copolimerizzando monomeri a differente composizione chimica si possono ottenere strutture che presentano domini idrofobici, capaci quindi di intrappolare farmaci liposolubili, stabilizzati da una corona macromole-

colare idrofilica. Il vantaggio di queste nanostrutture spesso risiede nella loro capacità di formare micelle unimolecolari, che non presentano una concentrazione critica di micellizzazione, e che quindi trattenono il farmaco incapsulato anche dopo diluizione nel flusso sanguigno o nel sistema linfatico.

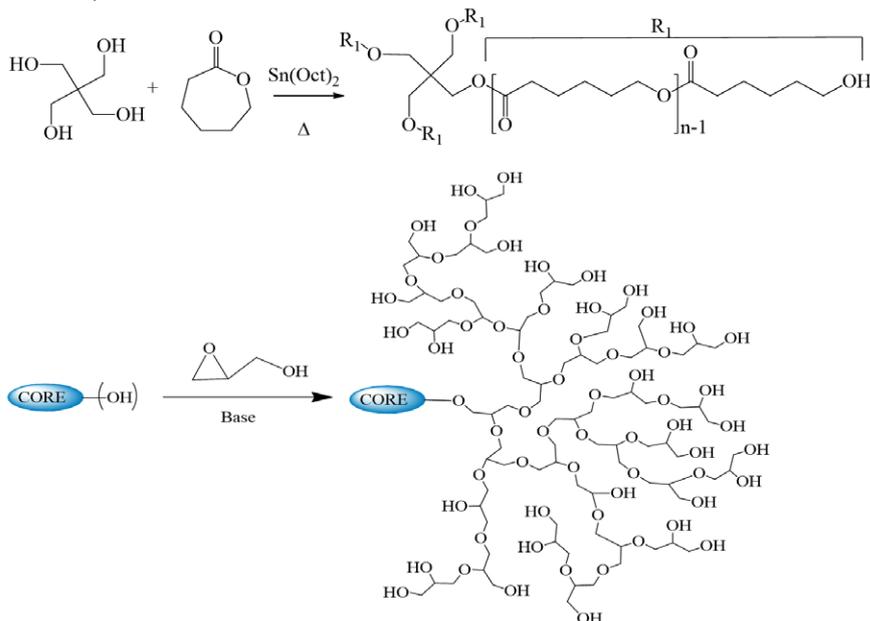
Infine, la combinazione di polimerizzazioni "controlled-living" con tecniche di "click chemistry", come la cicloadizione di Huisgen azide-alchino o l'addizione di Michael, consente di ottenere macromolecole ad elevato grado di funzionalizzazione. Una volta legate chimicamente alla catena polimerica, biomolecole, quali peptidi, proteine e gruppi saccaridici, forniscono al nanomateriale le caratteristiche necessarie per dialogare con le cellule e interagire con i sistemi biologici.

### Progettazione e sintesi

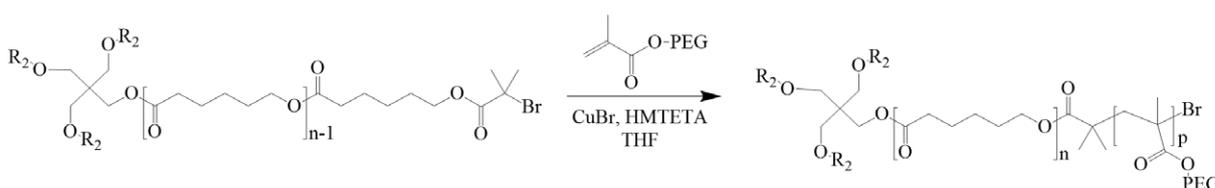
Nel campo del drug delivery, il concetto di polimero farmacologicamente attivo fa riferimento ad una catena polimerica principale idrosolubile e biocompatibile, alla quale vengono coniugati sia un farmaco da trasportare, sia leganti capaci di interagire selettivamente con opportuni recettori cellulari per ottenere la veicolazione selettiva [2] (Fig. 2). Il concetto può essere esteso a catene polimeriche che presentano gruppi laterali o blocchi lipofili, capaci cioè di auto-assemblarsi formando domini idrofobici per l'incapsulazione di farmaci a basso peso molecolare poco solubili in acqua.

Tenendo conto di questi aspetti, il controllo dei seguenti parametri è di fondamentale importanza nella fase di progettazione dei materiali polimerici:

## A) ROP, ROMBP:



## B) ATRP:



## C) Reazioni click:

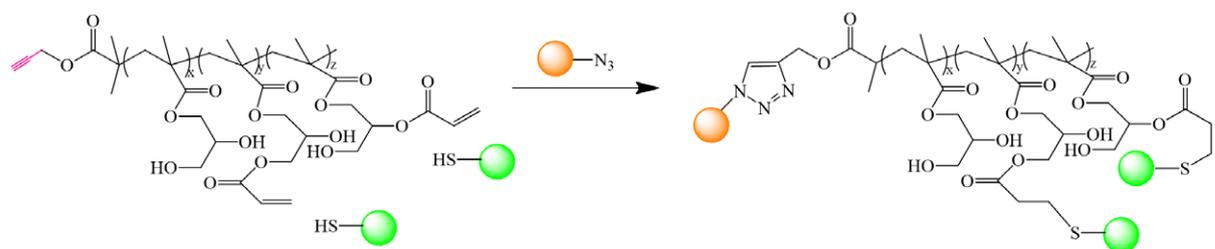


Fig. 3 - Sintesi di polimeri a topologia complessa e funzionalizzati

- peso molecolare e indice di polidispersità;
  - sceita dei monomeri opportuna per ottenere macromolecole biocompatibili, possibilmente biodegradabili;
  - topologia della macromolecola;
  - grado di funzionalizzazione;
  - dimensione media finale ed indice di polidispersità del nanomateriale disperso in fase acquosa;
  - capacità di caricare e rilasciare il farmaco opportuno;
  - bioattività e veicolazione selettiva (targeting).
- Qui di seguito una descrizione di alcune tecniche di polimerizzazione utilizzate per il controllo fine di questi parametri.

### Ring opening polymerisation (ROP)

Poli-addizioni di tipo ring-opening permettono la polimerizzazione di monomeri ciclici, ottenendo macromolecole con un elevato controllo del peso molecolare e della dispersità. La reazione, infatti, procede attraverso un processo vivente/controllato. Polimerizzando lattidi e lattoni, si possono ottenere poliesteri biocompatibili e biodegradabili; variando gli iniziatori e la funzionalizzazione dei monomeri [3] è possibile regolare le proprietà dei polimeri finali.

Attraverso l'utilizzo di un catalizzatore organometallico, quale ad esempio lo stagno ottanoato, il carbo-



nile del monomero viene complessato e attivato per la polimerizzazione. Questa può essere iniziata da un nucleofilo (per esempio un alcool) presente nel mezzo di reazione.

Iniziando la polimerizzazione dell' $\epsilon$ -caprolattone con un alcool polifunzionale come il pentaeritritolo (Fig. 3A), è possibile ottenere un poli  $\epsilon$ -caprolattone a quattro braccia con una distribuzione dei pesi molecolari molto stretta e con un peso molecolare predeterminato [4]. Alternativamente, utilizzando iniziatori che presentano doppi legami (come il 2-idrossietil metacrilato, HEMA), è possibile sintetizzare macromonomeri a base di poliestere, che potranno essere utilizzati in una polimerizzazione radicalica successiva per ottenere architetture ancora più complesse [5].

Un particolare tipo di polimerizzazione per la sintesi controllata di polimeri iper-ramificati è la polimerizzazione multi-braccia per apertura di anello (*Ring Opening MultiBranching Polymerisation-ROMBP*) di monomeri ciclici che presentano anche un gruppo iniziatore (inimeri) [6] (Fig. 3A). Questa strategia sintetica, effettuata con una lenta addizione del monomero (*slow monomer addition-SMA*) e parziale deprotonazione dell'iniziatore, risulta essere un buon metodo per ottenere polimeri iper-ramificati con un basso indice di polidispersità [7].

#### **Atom Transfer Radical Polymerisation (ATRP)**

La polimerizzazione radicalica per trasferimento atomico (*Atom Transfer Radical Polymerisation*, ATRP) è uno dei processi di polimerizzazione radicalica vivente controllata più utilizzato per la produzione di polimeri con stretta distribuzione del peso molecolare [8].

Il processo ATRP è basato sulla reazione di addizione radicalica al monomero ed è catalizzato da un complesso di un metallo di transizione (tipicamente il rame nonostante la sua tossicità, oppure il ferro quando viene richiesta la massima biocompatibilità [9]). Tale polimerizzazione presenta un equilibrio tra specie attive e dormienti che porta ad una crescita simultanea di tutte le catene, mantenendo la concentrazione dei radicali sufficientemente bassa da ridurre le reazioni di terminazione.

La cinetica della reazione dipende principalmente dal tipo di catalizzatore, legante e iniziatore utilizzati; spesso sono da considerare anche altri fattori, quali solvente, temperatura, concentrazione e solubilità di tutti i componenti. La ATRP può essere applicabile a numerosi tipi di monomeri, quali i metacrilati [10]

(Fig. 3B), che consentono di produrre, con condizioni di reazione moderate, vari tipi di polimeri di notevole interesse applicativo (copolimeri a blocchi, copolimeri a innesto, polimeri iper-ramificati e polimeri a stella).

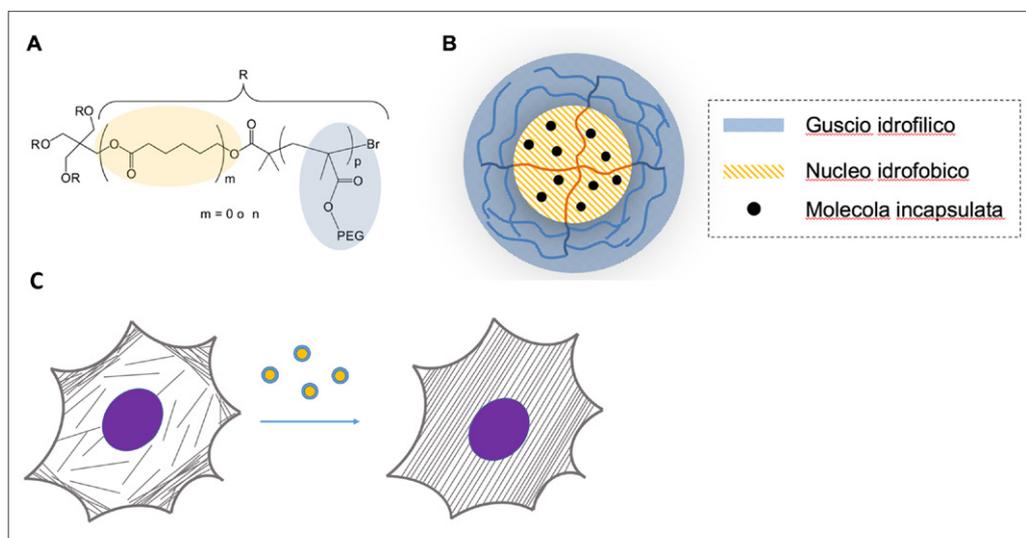
#### **Tecniche di funzionalizzazione**

Per ottenere macromolecole capaci di dialogare con cellule e interagire con i sistemi biologici, è necessario funzionalizzare le catene polimeriche con molecole bioattive, come peptidi, proteine ed opportuni gruppi saccaridici. Queste coniugazioni vengono spesso ottenute attraverso tecniche di click-chemistry, ovvero un insieme di reazioni modulari veloci, versatili, selettive, ad elevata resa, che non generano prodotti secondari indesiderati, dalle quali si ottengono prodotti facilmente isolabili con metodi non cromatografici [11]. Tra le reazioni che soddisfano questi requisiti, la cicloaddizione azide/alchino e le reazioni tiolo doppio legame (thiol-ene ed addizione di tipo Michael) trovano vasto uso in campo biomedico [12] (Fig. 3C).

#### **Caratterizzazione morfologica**

Come detto in precedenza, una volta sintetizzati i materiali polimerici, è fondamentale poterne investigare le proprietà morfologiche, come la forma, la dimensione e la polidispersità, quando sono dispersi in fase acquosa. È infatti in questo stato che essi interagiscono con i sistemi biologici. Polimeri anfifilici, caratterizzati cioè da un dominio idrofobico e uno idrofilico, possono assemblarsi formando strutture unimolecolari sferiche o di varia forma (per esempio a farfalla o a fiore [13]), oppure possono aggregare formando micelle convenzionali o aggregati di micelle unimolecolari. Nell'ottica di produrre sistemi di drug delivery stabili anche in condizioni fisiologiche, materiali polimerici in grado di formare micelle unimolecolari sono da preferirsi; essi, infatti, hanno una maggiore possibilità di veicolare il farmaco fino al sito bersaglio. Micelle convenzionali, invece, possono disassemblarsi precocemente nei fluidi corporei, quando sottoposte ad alte diluizioni o variazioni di parametri come pH e temperatura [14].

Il dynamic light scattering (DLS) è una delle tecniche più utilizzate per caratterizzare i polimeri dispersi in un mezzo acquoso. Questa analisi restituisce il diametro idrodinamico delle specie nel mezzo e, di conseguenza, permette anche di determinare il numero di specie presenti in soluzione e il loro grado di polidispersità. Nell'ambito del drug delivery, è au-



**Fig. 4 - (A) Struttura del polimero multi-braccia e (B) schematizzazione della nanoparticella che forma in soluzione acquosa. (C) I podociti danneggiati mostrano un citoscheletro con bassa densità di filamenti di actina intorno al nucleo; dopo trattamento con le nanoparticelle, le cellule recuperano la loro morfologia originaria**

spicabile ottenere distribuzioni monomodali con un basso grado di polidispersità, in quanto polimeri eterogenei possono anche avere bioattività eterogenee [15]. Anche il microscopio a trasmissione elettronica (TEM) consente di visualizzare come le molecole di polimero si dispongono nello spazio. Poiché le immagini TEM sono acquisite dopo la rimozione del solvente da campioni inizialmente in soluzione, le dimensioni che si ottengono possono risultare diverse (spesso minori) di quelle ricavate dalle analisi DLS, che invece rilevano il diametro idrodinamico del colloide. Quando possibile, misure di microscopia elettronica in trasmissione su sottili film a base acquosa, vetrificati e mantenuti alla temperatura dell'azoto liquido (cryo-TEM), hanno il vantaggio di fornire immagini di queste strutture polimeriche anfifiliche senza dover evaporare il solvente. Una volta che la morfologia dei materiali polimerici viene determinata tramite TEM, confrontando la loro taglia con quella ottenuta mediante DLS è possibile stabilire se essi formino specie uni- o multimolecolari in soluzione.

La transizione da micelle unimolecolari ad aggregati multimolecolari può avvenire al di sopra di una determinata concentrazione di polimero, che prende il nome di concentrazione di aggregazione critica (CAC) e che può essere misurata. Varie tecniche di analisi possono essere impiegate per questo scopo. Per esempio, la fluorescenza del pirene cambia a

seconda che questo si trovi in un ambiente polare, come l'acqua, o in uno apolare, come il nucleo di un aggregato polimerico [16]. In corrispondenza della CAC, è possibile osservare un brusco cambiamento delle caratteristiche del suo spettro di emissione. Anche un rapido aumento del diametro idrodinamico della specie in funzione della sua concentrazione può indicare la transizione da singola molecola ad aggregato multimolecolare. Allo stesso modo, è possibile misurare la tensione superficiale della soluzione al variare della concentrazione di polimero anfifilico, come avviene per classiche soluzioni di surfattanti.

### Applicazione - Nanoparticelle polimeriche per il trasporto di farmaci ai podociti renali

Nel campo delle patologie renali croniche, si è alla ricerca di nuovi approcci terapeutici per veicolare farmaci ai glomeruli renali danneggiati, e in particolare per raggiungere i podociti, cellule che costituiscono la barriera di filtrazione renale e che sono direttamente coinvolte nella progressione di queste malattie [17]. Nell'ottica di produrre un materiale polimerico in grado di attraversare la barriera di filtrazione renale per trasportare farmaci ai podociti, nei nostri laboratori è stato sintetizzato un polimero multi-braccia [4], la cui struttura è riportata in Fig. 4A. Esso è costituito da un nucleo idrofobico a base di poli  $\epsilon$ -caprolattone da cui si diramano diverse unità di glicole polietilenico, idrofilico, disposte come i denti di un pettine; è stato sintetizzato tramite una combinazione di ROP e ATRP. Quando questo polimero viene disperso in acqua o in un solvente acquoso, esso si dispone formando delle particelle sferiche di dimensione nanometrica, dove la parte idrofilica forma un guscio che protegge il nucleo idrofobico e



lo separa dall'ambiente acquoso (Fig. 4B). Inducendo la formazione delle nanoparticelle in presenza di una molecola idrofobica, questa viene incapsulata all'interno del loro nucleo.

Tramite analisi DLS, abbiamo osservato che la taglia delle nanoparticelle in acqua è di 20 nm circa, e che esse hanno un basso indice di polidispersità ( $<0,25$ ). La dimensione di queste nanoparticelle è sufficientemente piccola per essere compatibile con la barriera di filtrazione renale, che fa passare molecole di taglia 6-10 nm in condizioni fisiologiche, e molecole leggermente più grandi in condizioni patologiche [18]. Abbiamo appurato questa compatibilità iniettando le nanoparticelle in topi con patologie renali indotte e rilevandone poi la presenza all'interno delle loro urine. Dopo aver incapsulato all'interno delle nanoparticelle il farmaco idrofobico desametasone, noto per avere un effetto benefico sui podociti [19], e aver verificato che questo viene rilasciato gradualmente dalle nanoparticelle, abbiamo testato l'efficacia delle nanoparticelle contenenti il farmaco sui podociti stessi. Inizialmente, i podociti sono stati danneggiati in laboratorio tramite incubazione con una sostanza tossica (adriamicina), capace di alterare la morfologia dei filamenti di actina del loro citoscheletro (Fig. 4C). Trattando i podociti con le nanoparticelle caricate con desametasone, è stata ripristinata la struttura del citoscheletro, che è infatti apparso nuovamente organizzato come nelle cellule sane. È importante inoltre sottolineare che le nanoparticelle testate non hanno mostrato tossicità.

Concludendo, tecniche di polimerizzazione controllate permettono di ottenere nanomateriali con una struttura predefinita e una bassa polidispersità. A seconda della loro composizione e della loro topologia, è possibile controllare che tipo di nanoparticelle formeranno in soluzione acquosa e, di conseguenza, per quale applicazione biologica potranno essere utilizzati.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] K. Matyjaszewski, J. Spanswick, *Materials Today*, 2005, **8**, 26.
- [2] L. Nuhn, M. Barz, R. Zentel, *Macromolecular Bioscience*, 2014, **14**, 607.
- [3] C. Jérôme, P. Lecomte, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008, **60**, 1056.
- [4] R. Bruni, P. Possenti *et al.*, *Journal of Controlled Release*, 2017, **255**, 94.
- [5] C. Colombo, M. Li *et al.*, *Acs Omega*, 2017, **2**, 599.
- [6] A. Sunder, R. Hanselmann *et al.*, *Macromolecules*, 1999, **32**, 4240.
- [7] R.K. Kainthan, E.B. Muliawan *et al.*, *Macromolecules*, 2006, **39**, 7708.
- [8] K. Matyjaszewski, *Macromolecules*, 2012, **45**, 4015.
- [9] I.P. Silvestri, F. Cellesi, *Macromolecular Chemistry and Physics*, 2015, **216**, 2032.
- [10] J.K. Oh, K. Min, K. Matyjaszewski, *Macromolecules*, 2006, **39**, 3161.
- [11] R.K. Iha, K.L. Wooley *et al.*, *Chemical Reviews*, 2009, **109**, 5620.
- [12] L. Ragupathy, D.G. Millar *et al.*, *Macromolecular Bioscience*, 2014, **14**, 1528.
- [13] C. Yang, S. Huang *et al.*, *Polymer Chemistry*, 2016, **7**, 7455.
- [14] X. Fan, Z. Li, X.J. Loh, *Polymer Chemistry*, 2016, **7**, 5898.
- [15] G.G. Kochendoerfer, S.-Y. Chen *et al.*, *Science*, 2003, **299**, 884.
- [16] G. Kwon, M. Naito *et al.*, *Langmuir*, 1993, **9**, 945.
- [17] F. Cellesi, M. Li, M.P. Rastaldi, *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 2015, **24**, 239.
- [18] C. Brede, V. Labhasetwar, *Advances in Chronic Kidney Disease*, 2013, **20**, 454; A. Ruggiero, C.H. Villa, *et al.*, *Proc. of the National Academy of Sciences*, 2010, **107**, 12369.
- [19] C.Y. Xing, M.A. Saleem *et al.*, *Kidney International*, 2006, **70**, 1038.

### Design of Complex Macromolecular Architectures For Nanomedicine

Polymers with complex macromolecular architecture are widely used in nanomedicine, due to their capacity of crossing biological barriers and transport drugs. Controlled polymerisations and 'click chemistry' techniques allow the synthesis of biocompatible macromolecules with tuneable molecular weight, topology and functionality.