

***UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI  
"FEDERICO II"***

***FACOLTA' DI SCIENZE MM. FF. NN.***



***DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE CHIMICHE***

***XXI CICLO (2005-2008)***

***Sistemi polimerici multicomponenti biorassorbibili  
per applicazioni biomediche e farmaceutiche***

Tutor:

Prof. Giovanni Maglio

Coordinatore:

Prof. Aldo Vitagliano

Candidato:

Dr.ssa Mariarosaria Canciello

## ***Summary***

Hydrophobic aliphatic polyesters, such as poly( $\epsilon$ -caprolactone), PCL, poly(lactide), PLA and their copolymers, have been intensively investigated for applications in construction of temporary medical devices for regeneration of damaged tissues and in pharmaceutical controlled release systems. For both applications, biocompatibility and biodegradability are fundamental requirements. The rather high crystallinity of the above polyesters, however, decreases their compatibility with soft tissues and lowers the biodegradability. To overcome this drawback and induce biodegradability in a controlled way, highly hydrophilic poly(oxy-ethylene), PEO, segments have been widely used to obtain block poly(ether-ester)s, PEE, that well combine the typical properties of the two different blocks. In particular, amphiphilic di-, tri- and multiblock copolymers, based on PCL and PEO, have been recently investigated because they are a logical choice to build up appropriate systems, either in controlled drug release because of their ability to form micro- or nanoparticles, or in tissue engineering because of PCL ability to support the growth of cell into tissue-like structures and to degrade to natural metabolites.

The research activities, mainly, regarded in the design and application of hydrophilic PEO (A) and hydrophobic poly( $\epsilon$ -caprolactone), PCL, (B) based block copolymers (ABCs) prepared using synthetic pathways that ensure highly regular structures. Particularity were prepared:

*a) ABCs with different architectures and compositions*

*-linear di,tri-block copolymers: AB and ABA*

*Linear di-block* copolymers, PEO-PCL, were prepared by Sn(oct)<sub>2</sub> catalyzed ring-opening polymerisation (ROP) of caprolactone initiated by multifunctional  $\alpha$ -methyl, $\omega$ -hydroxy-PEO<sub>2k</sub>. An appropriate  $\epsilon$ -CL/Lys-PEO molar ratio was used to obtain AB with different size of PCL segments, PEO<sub>2k</sub>-PCL<sub>4k</sub> and PEO<sub>2k</sub>-PCL<sub>8k</sub>.

*Linear tri-block* copolymer, PEO<sub>2k</sub>-PCL<sub>8k</sub>-PEO<sub>2k</sub> was synthesized condensing the -NH<sub>2</sub> end group of  $\alpha$ -methyl, $\omega$ -amino-PEO<sub>2k</sub> with the carboxyl end group of PCL segments of di-block PEO<sub>2k</sub>-PCL<sub>8k</sub>-COOH, obtained reacting PEO<sub>2k</sub>-PCL<sub>8k</sub>-OH with succinic anhydride;

*-branched '3 arm-star shaped' and 'graft' copolymers: AB<sub>2</sub>, A(BA)<sub>2</sub>, A-g-B.*

*3-arm star-shaped copolymers* consisting of PEO and PCL segments or PEO and diblock segments PCL-PEO radiating from a centre for, respectively, AB<sub>2</sub> or A(AB)<sub>2</sub> architecture types. Particularly, AB<sub>2</sub> and A(BA)<sub>2</sub> copolymers with different size of PCL blocks and with constant length of PEO segments were prepared by a straightforward "core-first" synthetic procedure.

*The AB<sub>2</sub> star-block* copolymers with different size of PCL blocks, PEO<sub>2k</sub>(PCL<sub>2k</sub>)<sub>2</sub> and PEO<sub>2k</sub>(PCL<sub>6k</sub>)<sub>2</sub>, were prepared by ring opening polymerization (ROP) of  $\epsilon$ -caprolactone,  $\epsilon$ -CL, using difunctional polyether macroinitiators bearing two amino groups at the same chain end, N <sub>$\epsilon$</sub> ,N <sub>$\alpha$</sub> -Lys-PEO; macroinitiator was prepared by condensation of  $\alpha$ -methoxy- $\omega$ -amino-PEO<sub>2k</sub> (M<sub>n</sub> = 2.0 kDa) terminated amino groups (mPEO<sub>2k</sub>-NH<sub>2</sub>) and N <sub>$\alpha$</sub> ,N <sub>$\epsilon$</sub> -di-Z-L-Lys.

*The A(BA)<sub>2</sub> star-block* copolymer, PEO<sub>2k</sub>(PCL<sub>6k</sub>PEO<sub>2k</sub>)<sub>2</sub>, was synthesized condensing the -NH<sub>2</sub> end group of mPEO<sub>2k</sub>-NH<sub>2</sub> with the

carboxyl end groups of PCL segments of  $\text{PEO}_{2k}(\text{PCL}_{6k}\text{-COOH})_2$ , obtained reacting  $\text{PEO}_{2k}(\text{PCL}_{6k}\text{-OH})_2$  with succinic anhydride.

The inherent viscosity values, together with SEC analysis results, indicated moderate polymerisation degrees in the ROP for AB e AB<sub>2</sub> copolymers (0.20-0.30 dL·g<sup>-1</sup>), and high coupling efficiency for ABA and A(AB)<sub>2</sub> copolymers (0.38-0.36 dLg<sup>-1</sup>). The thermal behaviour of branched and linear copolymers was investigated by DSC analysis: the crystallization of each component is not hampered by the presence of the second component, provided that PCL/PEO wt ratio is  $\leq 2$ , and that  $T_m$ ,  $T_c$  and  $\Delta H_m$  are affected by composition, segment length and, to a minor extent, by copolymer architecture.

The formation of microspheres and nanoparticles from such polymers and the release of bioactive molecules was investigated in cooperation with the Dpt. of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, Federico II University of Naples (Prof.ssa F. Quaglia). Preliminary studies have shown that in aqueous media they self-assembled in core-shell nanoscopic structures with hydrodynamic diameter <100 nm. Low values of critical association concentrations, in the range 0.35-14  $\mu\text{g/ml}$ , indicated a good thermodynamic stability of the polymeric nanoparticles. The self-assembling properties of such ABCs are controlled by the relative sizes of polyester segments and depend also on copolymer architectures.

A 'graft' copolymer ( $\text{PCL}_{10k}\text{-g-PEO}_{5k}$ )<sub>n</sub> was prepared by chain extension of a  $\text{PEO}_{5k}(\text{PCL}_{5k})_2$  macromer, prepared as above reported for AB<sub>2</sub>, reacting the -OH end groups of PCL segments, with sebacoyl dichloride. The chain extension was confirmed by SEC and inherent viscosity analysis (0.53 dL·g<sup>-1</sup>). In cooperation with the I.C.T.P (CNR) of

Naples (Dott. M.Malinconico, Dott.ssa P.Laurienzo), such copolymer was employed in the preparation of porous membranes, based on PDLLA-PCL (70/30) blends with PCL/PEO copolymers as an interfacial agent, for applications as scaffolds for soft tissue cell proliferation. A “core-skin” structure with a strong surface enrichment of PCL was evidenced and better emulsifying properties were found for the graft copolymer in comparison with those of the linear block copolymer.

*b) ABCs with linear and ‘3arm-star shaped’ architectures bearing proper functional groups as PEO end group*

Folate or folic acid has been employed as a targeting moiety of various carriers of anticancer agents to increase their cellular uptake within target cells, since folate receptors are highly overexpressed in several human tumors. In order to develop actively targeted nanocarriers provided on the surface with ligands specific for cell recognition, folate (FA) conjugated linear di-block and branched 3-arm-star shaped PCL-PEO copolymers were prepared. The tethering of the ligand to the outer shell of nanoparticles was achieved through folate functionalization of PEO block. FOL-PEO-NH<sub>2</sub> was prepared by conjugation of activated  $\gamma$ -carboxyl groups of folic acid (FOL) and amino chain-ends of difunctional PEO segments. Linear di-block and branched copolymers, Fol-AB and Fol-AB<sub>2</sub>, were synthesized condensing the -NH<sub>2</sub> end group of FOL-PEO-NH<sub>2</sub> with the carboxyl end group of PCL segments prepared ‘ad hoc’ with the desired architecture. The folate conjugation degree and the molecular structures were determined by NMR and UV analysis.

c) *Multiblock ABCs containing -NH<sub>2</sub> pendant groups, regularly spaced along the chain, available for covalent bonding of amino-acid sequences.*

Biodegradable and biocompatible synthetic polymers, mainly polyester such as PLA, PLGA and PCL, have been widely employed as matrix for three-dimensional scaffolds because of their non-toxicity, suitable biodegradability and good compatibility both prior and during biodegradation. A major drawback associated with synthetic polymers is their low bioactivity which may limit cell adhesion and further tissue integration at the implant-host tissue interface. Amine end-capped side chains incorporated into a polymer backbone have been prepared and used to immobilize bioactive peptide ligands such as RGD (Arg-Gly-Asp), the signaling domain derived from fibronectin, thus inducing selective cell adhesion.

Poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) macromers ( $M_n = 1.7\text{-}3.8$  KDa) which contain one Z-protected  $-\text{NH}_2$  group per chain were synthesized by ring-opening polymerization of  $\epsilon$ -caprolactone in the presence of  $\text{Sn}(\text{oct})_2$  using as initiator a diamine prepared by condensation of N-Boc-1,6-hexanediamine and  $\text{N}_\alpha\text{-Boc-N}_\epsilon\text{-Z-L-Lysine}$ . The coupling of these macromers with  $-\text{COCl}$  end-capped poly(oxyethylene) (ClCO-PEO-COCl),  $M_n = 1.0$  kDa, afforded amphiphilic multiblock copolymers which have along the chain regularly spaced pendant protected amino groups. The frequency of reactive pendant groups and the hydrophilic/hydrophobic ratio can be modulated according to the molecular weight of both segments. Removal of the protecting groups, accomplished without chain degradation, yielded  $-\text{NH}_2$  groups available for further reactions. The molecular structure of macromers and copolymers was investigated by  $^1\text{H}$  NMR and SEC. DSC and WAXS analyses showed that macromers and copolymers were semicrystalline and their  $T_m$  increased with increasing

the molecular weight of PCL segments. The inherent viscosity values (0.25-0.30 dL·g<sup>-1</sup>), together with SEC analysis results, indicated moderate polymerization degrees. The amino functionalized PCL macromers and PCL-PEO block copolymers have a good potential in the preparation of scaffolds for applications in tissue engineering and in the construction of biosensors, analytical devices based on surface bonded biological probes. Studies in cooperation with I.M.M. of Naples (CNR Dott. L. De Stefano) have shown the feasibility of surface modification of mesoporous silicon microdevices by spin-coating deposition of PCL macromers containing functional groups for the attachment of biological probes.

## ***Introduzione***

### ***1.1 Biomateriali polimerici***

Con il termine “biomateriali” si fa riferimento ad una classe di materiali ad uso prettamente biomedico impiegati nella riparazione, ripristino o sostituzione di tessuti ed organi danneggiati o malati, o più in generale di materiali che possono costituire interfaccia con un sistema biologico. Essi possono essere sia di origine naturale, come collagene purificato, fibre proteiche o polisaccaridi, che di altro tipo quali metalli, ceramiche e polimeri sintetici.

I materiali polimerici di sintesi, attualmente, rappresentano la categoria di biomateriali più ampia e rivestono un forte interesse applicativo. Le loro applicazioni in campo biomedico sono altamente diversificate. Basta considerare il loro impiego come materiali strutturali per la costruzione o ricoprimento di parti di apparecchiature biomedicali (dializzatori, ossigenatori, sensori, ecc.), per la costruzione di protesi e di organi artificiali e per la formulazione di sistemi a rilascio controllato di farmaci <sup>[1]</sup>.

Sotto l’impulso derivato dallo sviluppo delle conoscenze nel settore medico e dal miglioramento delle tecniche chirurgiche e di ingegneria medica, la scienza e la tecnologia dei polimeri ha reso disponibili materiali con un ampio spettro di caratteristiche chimiche, fisico-meccaniche e morfologiche, oggi comunemente utilizzati in applicazioni intracorporee ed extracorporee sia a breve che a lunga permanenza.

I requisiti generali richiesti ai biomateriali polimerici (e non) sono:



**-Biocompatibilità:** il termine indica una sostanziale inerzia nei confronti dell'ambiente fisiologico circostante, nel senso che il biomateriale deve essere accettato dal corpo e non deve disturbare il sistema biologico in cui è inserito. La biocompatibilità è stata definita (II International Consensus Conference on Biomaterials, Chester, Gran Bretagna, 1991) come "l'abilità di un materiale di esplicare la propria funzione con un'appropriata risposta del sistema vivente che lo ospita". Ciò significa che il biomateriale deve sostituire il materiale "vivente", in tutte le sue funzioni o in parte, senza che l'organismo in cui è inserito si "accorga" di questa sostituzione ed espellerlo attraverso processi infiammatori o assorbirlo con produzione di sostanze tossiche o cancerogene<sup>[2]</sup>. Le interazioni biomateriale-organismo possono dar luogo, infatti, a processi degradativi dei materiali ed a reazioni di intolleranza nell'organismo, specialmente per i componenti destinati ad operare per tempi lunghi in ambienti corrosivi e sotto l'azione di carichi ciclici <sup>[3]</sup>. La biocompatibilità è funzione sia delle proprietà dei materiali (proprietà meccaniche e chimico-fisiche) che delle caratteristiche dei dispositivi impiantati (dimensioni, forma, rigidità), nonché delle condizioni dell'organismo ospite (tipo di tessuto, luogo di impianto, età, sesso, condizioni generali di salute, regime farmaceutico)<sup>[4]</sup>. In particolare, di grande importanza sono le caratteristiche chimico-fisiche della superficie del biomateriale: la struttura chimica della superficie, l'idrofilicità, l'idrofobicità, la presenza di gruppi ionici, la morfologia, il grado di rugosità superficiale, sono fattori che esercitano una grande influenza sulle caratteristiche di biocompatibilità del materiale<sup>[5]</sup>.

**-Stabilità durante le fasi di lavorazione, sterilizzazione e immagazzinamento:** i biomateriali devono poter sottostare a tutte quelle

procedure che precedono l'utilizzo, senza che queste compromettano le caratteristiche chimico-fisiche e meccaniche del biomateriale;

-Elevato grado di purezza: caratteristica questa riferibile soprattutto ai materiali di sintesi;

-Biofunzionalità: il biomateriale deve svolgere per un periodo di tempo adeguato la funzione dell'organo o del tessuto sostituito;

-Emocompatibilità: quando un materiale estraneo entra in contatto con tessuti o fluidi corporei, esso provoca una determinata risposta di questi ultimi. Tipo e livello di tale risposta dipenderanno dalla parte del corpo con cui viene il contatto e saranno costituiti da un complesso e integrato sistema di difesa. In particolare, si potrà manifestare una reazione di tipo infiammatorio con l'intervento, in tempi diversi, di leucociti e macrofagi e la successiva secrezione di mucopolisaccaridi che vanno a formare un tessuto fibroso che ricopre il corpo estraneo. Il fenomeno più complesso e potenzialmente pericoloso, che si verifica al contatto con un corpo estraneo, è l'attivazione del sistema di coagulazione del sangue, culminante nella formazione di trombi.

Affinchè l'innescò di tutti questi meccanismi sia minimizzato, il biomateriale deve possedere alcuni specifici requisiti. Esso deve in particolare:

- Essere privo di tossicità, dovuta sia al materiale che a possibili additivi o a prodotti di degradazione;
- Non deve indurre formazione di tumori
- Non deve influenzare il sistema immunitario dell'ospite
- Deve mostrare elevata stabilità meccanica e funzionale per periodi di tempo anche molto lunghi;
- Non deve indurre la formazione di coaguli sanguigni

I polimeri utilizzati come biomateriali trovarono per la prima volta impiego nel 1950 quando un impianto di polietilene fu usato per la ricostruzione di un timpano di gatto. I risultati, in un primo momento incoraggianti, furono però deludenti; a quel primo tentativo molti altri ne seguirono, fino ad arrivare ad oggi, dove i biomateriali polimerici vengono ormai usati con successo in campo biomedico e farmaceutico. I polimeri possono suddividersi in due classi: *polimeri naturali* e *polimeri sintetici*.

*Polimeri naturali*: appartengono a questa categoria i polisaccaridi e i loro derivati (carbossilimetil-cellulosa, solfato di cellulosa ecc.). Questi materiali sono caratterizzati da biocompatibilità e da assenza di tossicità. Sono largamente usati nei dispositivi per il rilascio controllato di farmaci, sottoforma di films, gels, membrane, microsfele [6]. Anche le proteine (collagene, albumina, ecc.) sono un esempio di polimero naturale caratterizzato da biocompatibilità, atossicità, assorbibilità e sono utilizzate soprattutto nel campo dell'ingegneria tissutale[7, 8].

*Polimeri sintetici*: presentano struttura generalmente molto simile a quella dei polimeri biologici, sono caratterizzati da una grande versatilità e, potendo agire nella loro progettazione su molti parametri (struttura chimica, peso molecolare, architettura, ecc.), si è in grado di ottenere materiali con caratteristiche specifiche per l'applicazione a cui essi sono destinati (tabella 1.1)

**Tabella 1.1:** Principali polimeri sintetici con il rispettivo campo d'applicazione.

<b>Polimeri</b>	<b>Area di applicazione</b>
Polietilene a bassa densità	Chirurgia ricostruttiva
Polietilene	Ortopedia
Gomma al silicone	Chirurgia plastica
Poliacetali	Ortopedia
Resine epossidiche	Ortopedia
Poliammidi	Suture
Poliesteri	Cardiovascolare, Ortopedia
Fluoropolimeri	Chirurgia generale, cardiovascolare
Idrogeli	Oftalmica, rilascio di farmaci
Polivinilcloruro	Costruzione di tubi
Polilattide	Suture, Ortopedica
Poliglicolide	Suture
Polimeri naturali	Agenti emostatici, impianti bioassorbibili, suture

### **1.2 Polimeri biorassorbibili**

I materiali polimerici organici subiscono facilmente processi di degradazione per effetto di agenti fisici (calore, luce, radiazione ad elevata energia, deformazioni meccaniche ecc.) e di agenti chimici quali (ossigeno, acqua, ecc)<sup>[9,10]</sup>.

Un polimero biodegradabile per essere utilizzato come biomateriale deve essere, oltre che biocompatibile e biofunzionale anche biorassorbibile. La biorassorbibilità richiede la degradabilità del materiale nell'ambiente biologico, il controllo della velocità di degradazione e il riassorbimento dei prodotti di degradazione da parte dell'organismo ospite.

I processi di degradazione determinano in genere un deterioramento progressivo ed irreversibile delle proprietà del materiale polimerico quali, ad esempio, le proprietà meccaniche, ottiche, elettriche, ecc. fino a rendere il materiale inservibile all'uso per il quale è stato progettato, determinandone così il "tempo di vita" <sup>[11]</sup>. In particolare sono

estremamente ricercati materiali che posseggano una “vita controllata” e che si degradino a composti a basso peso molecolare non tossici nel corpo umano, durante o al termine dell’espletamento della funzione a loro affidata.

La cinetica di degradazione del materiale biorisorbibile deve essere controllabile in funzione delle particolari applicazioni. Nel caso specifico di protesi ortopediche temporanee, ad esempio, sono richieste velocità di degradazione non troppo elevate in modo da permettere la rigenerazione del tessuto osseo da risanare. Per applicazioni come quelle delle suture e di adesivi usati in chirurgia o del rilascio controllato di farmaci, si richiede, invece, che il polimero abbia una vita relativamente breve ma di durata controllata e che i metaboliti formati nel processo di degradazione siano eliminabili dall’organismo senza conseguenze indesiderabili.

La conoscenza dei meccanismi e della cinetica dei processi di degradazione dei materiali polimerici<sup>[12,13]</sup> in ambito biomedico e farmaceutico è di conseguenza di estrema importanza. Nel corpo umano i principali agenti degradativi che possono modificare i materiali polimerici sono l’acqua, gli enzimi, l’ossigeno e i suoi prodotti di reazione all’interno dell’organismo (radicale superossido, radicale ossidrile, acqua ossigenata, ecc.). Il meccanismo più importante di degradazione nel corpo umano è sicuramente la reazione di *idrolisi*, la cui velocità dipende sia dalla natura del polimero (quindi dal tipo di legami presenti nella catena polimerica), che dall’eventuale presenza di eteroatomi nella catena polimerica e dalla concentrazione di acqua disponibile per il processo d’idrolisi. Assumono importanza di conseguenza il coefficiente di diffusione dell’acqua nei polimeri (compreso tra  $10^{-6}$  e  $10^{-9}$  cm<sup>2</sup>/sec a secondo del polimero) e

l'assorbimento d'acqua. In base a quest'ultimo parametro si definiscono idrofobi i polimeri che assorbono meno dell'uno per cento in peso d'acqua, moderatamente idrofili quelli che assorbono una percentuale compresa fra l'uno e il dieci per cento, idrofili i polimeri che ne assorbono una percentuale maggiore. Il processo di diffusione dell'acqua nei polimeri, sia in termini cinetici che termodinamici, dipende contemporaneamente da diversi fattori e, quindi, può essere molto complesso. E' noto ad esempio che la *presenza di anioni e cationi* presenti nell'acqua che diffonde nel materiale polimerico modifica sostanzialmente la velocità d'idrolisi: gli ioni  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{HSO}_4^-$ , ecc, possono aumentare la velocità d'idrolisi di 3-5 volte. Altri fattori importanti che influenzano la cinetica d'idrolisi sono: la *cristallinità* del polimero, in quanto le zone amorfe sono più rapidamente coinvolte nel processo essendo più accessibili alle molecole d'acqua; la *temperatura*, in quanto un suo aumento fino a valori superiori alla temperatura di transizione vetrosa del materiale determina una maggiore mobilità di catena favorendo così la penetrazione dell'acqua; la *struttura chimica*, in particolare la presenza di gruppi idrofobici o idrofilici che possono rendere il processo più o meno agevole; la *morfologia superficiale*, in quanto la presenza di disomogeneità, rugosità, cavità accelera in genere il processo di degradazione.

Altro meccanismo di degradazione che può avvenire nell'organismo è la *degradazione enzimatica*; il coinvolgimento di enzimi in tale processo è stato accertato per polimeri di origine naturale mentre è ancora oggetto d'indagine per quelli sintetici. In genere gli enzimi non riescono a penetrare nel materiale nelle prime fasi del processo di degradazione, di conseguenza le interazioni sarebbero limitate allo strato superficiale per

diventare più importanti solo dopo che si è avuto erosione, frammentazione fisica o solubilizzazione del polimero. Questa via può essere stimolata inserendo in catena sequenze specifiche di amminoacidi riconoscibili da particolari enzimi.

Infine, anche i radicali presenti nel corpo umano possono iniziare processi di degradazione dei polimeri in esso introdotti. I radicali liberi sono formati in numerosi processi biologici, ma la fonte più abbondante è l'ossigeno che, introdotto nella respirazione, provvede a fornire la maggior parte dell'energia usata dagli organismi aerobici, mediante l'ossidazione di molecole organiche. Le specie che si formano sono il radicale anione superossido, il perossido d'idrogeno ed il radicale ossidrilico che direttamente o indirettamente possono provocare la degradazione dei polimeri. L'iniziatore più probabile dei processi radicalici di degradazione dei polimeri sembra essere il radicale ossidrilico che si forma dalle reazioni di Haber-Weiss e di Fenton.

Nella tabella 1.2 si riportano le principali classi di polimeri utilizzati per la realizzazione di dispositivi medici e i tipici valori della loro vita media:

**Tabella 1.2:** Alcune classi di polimeri con i loro gruppi funzionali e la vita media dovuta a degradazione esclusivamente di tipo idrolitico

<b>Classe di polimero</b>	<b>Gruppo funzionale</b>	<b>Vita media</b>
Polianidridi		0.1 h
Poliesteri		3.3 anni
Poliammidi		83000 anni

Di seguito sono riportati più in dettaglio i meccanismi di biodegradazione a cui vanno incontro.

*Polianidridi:* i legami anidridici sono idroliticamente instabili, questa proprietà ne limita la processabilità e rende difficile la preparazione di oggetti senza che avvenga degradazione. Per questo motivo e per le basse proprietà meccaniche, le polianidridi vengono usate quasi esclusivamente per il rilascio controllato di farmaci [14]

*Poliammidi* : in questa classe di composti il legame ammidico, in particolari condizioni di pH e di temperatura, può essere soggetto all'attacco delle amidasi non specifiche [15]. La degradazione in vivo delle poliammidi è del resto dimostrata dalla rottura di protesi in Nylon. In generale in tali polimeri la biodegradazione è relativamente lenta ed è caratterizzata da rotture superficiali immediatamente dopo l'impianto [16].

*Poli(ortoesteri):* a questa categoria appartengono dei polimeri sintetici da cui sono stati ottenuti materiali che degradano solo superficialmente e tendono a diventare sempre più sottili senza sgretolarsi. Questa proprietà rende i poli(ortoesteri) adatti alla costruzione di matrici per il rilascio controllato di farmaci, essendo il materiale capace di rilasciare i principi attivi trattenuti a velocità costante. La loro velocità di idrolisi troppo elevata, però, non ne consente l'uso in altre applicazioni. Esistono due tipi di poli(ortoesteri). Uno rilascia durante l'idrolisi sottoprodotti acidi che autocatalizzano il processo di degradazione, l'altro non rilasciando sottoprodotti acidi non mostra aumenti autocatalitici della velocità di degradazione [17].

*Poliesteri:* la suscettibilità dei poliesteri alla degradazione idrolitica è attualmente sfruttata per lo sviluppo di protesi biodegradabili e sistemi a rilascio controllato di farmaci. Poiché sono noti i fattori che



determinano la velocità di degradazione dei poliesteri, è possibile creare, con opportuni accorgimenti, materiali con specifiche proprietà meccaniche, di permeabilità, e con tempi di degradazione che possono variare dai giorni agli anni [18].

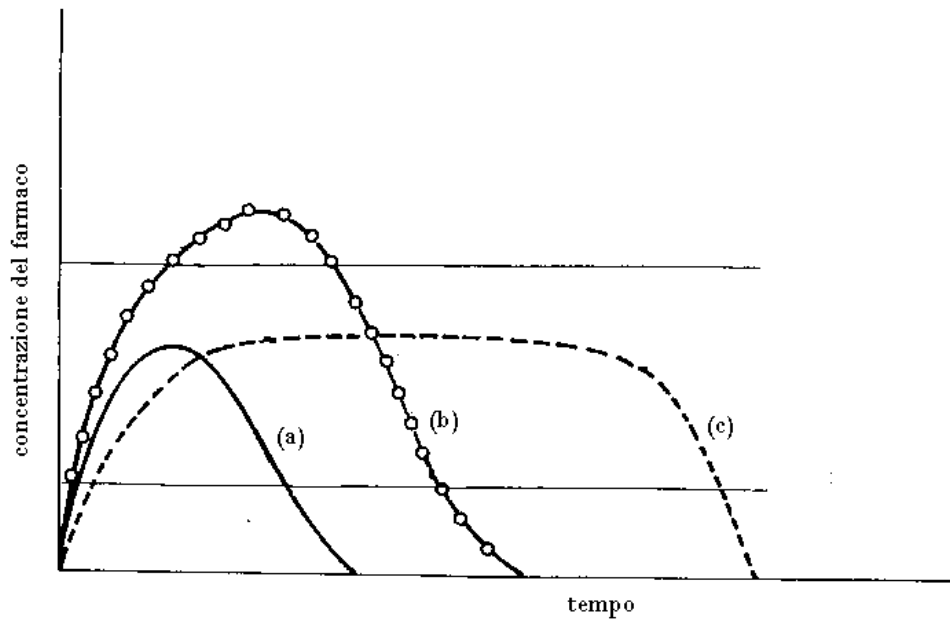
### ***1.3 Applicazioni in campo farmaceutico***

La tecnologia farmaceutica è quella parte del settore del farmaco che si occupa della veicolazione di un principio attivo, di origine naturale e/o sintetica in una “forma farmaceutica” che possa essere somministrata sia all’uomo sia all’animale.

In commercio esistono numerose forme farmaceutiche nelle quali il rilascio può essere ritardato, mentre la velocità e la durata della liberazione del principio attivo possono essere programmate. Tali formulazioni, definite dispositivi o sistemi per il rilascio temporalmente controllato o “sostenuto”<sup>[19]</sup>, consistono in un dispositivo idoneo ad incapsulare un farmaco o un principio attivo e rilasciarlo in maniera controllata al fine di mantenere le sue concentrazioni plasmatiche all'interno della finestra terapeutica per un periodo prolungato di tempo. L'impiego di tali formulazioni consente di:

- controllare il livello ematico del farmaco
- diminuire il numero di somministrazioni giornaliere
- evitare fenomeni di sotto- o sovra-dosaggio
- minimizzare gli effetti collaterali indesiderati

In figura 1.1 sono mostrati i profili di rilascio del farmaco in funzione del tempo e del modo in cui il farmaco è stato somministrato



**Figura 1.1:** profilo delle concentrazioni del farmaco vs il tempo; (a) dose orale standard, (b) overdose orale, (c) dose rilasciata a velocità controllata ideale

Nel caso ideale in cui il farmaco è rilasciato in maniera controllata nel tempo la concentrazione del principio attivo raggiunge livelli efficaci ma non tossici ed è mantenuta costante per il tempo desiderato<sup>[20]</sup>.

I requisiti fondamentali di un biomateriale di natura polimerica da impiegare per la preparazione di dispositivi a rilascio controllato sono:

- compatibilità tra il polimero, ovvero le sue caratteristiche fisico chimiche che determinano il rilascio, e la farmacocinetica del principio attivo;
- resistenza meccanica tale da consentire la somministrazione ed il mantenimento dell'integrità del sistema di rilascio;
- biocompatibilità, ovvero scarsa tossicità cellulare e tissutale.

La velocità e la cinetica di cessione del farmaco da un sistema polimerico dipenderanno da una combinazione di numerosi processi che si

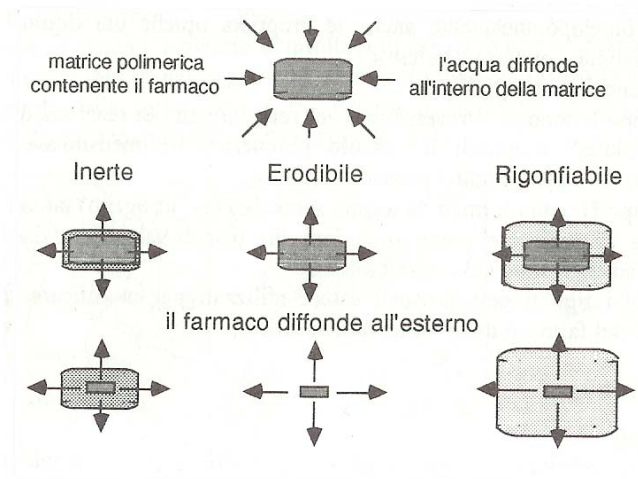
verificano contemporaneamente e che sono strettamente interdipendenti e cioè:

- velocità di penetrazione del solvente
- velocità di solubilizzazione del farmaco
- velocità di rigonfiamento (swelling)
- velocità di erosione e biodegradazione
- velocità di diffusione del farmaco

Questi processi dipendono strettamente dal tipo di polimero e dal suo peso molecolare: più grande è la molecola, maggiori sono le forze intermolecolari che tengono legate le catene fra loro e maggiore è l'energia necessaria a far penetrare il liquido fra le macromolecole. Il processo di dissoluzione del polimero passa comunque attraverso numerosi stadi: intorno al polimero allo stato solido si formano, infatti, progressivamente ed in successione alcuni strati di diversa natura. In un primo strato in cui è penetrato il solvente, le macromolecole si espandono o rigonfiano (swelling layer); nel secondo il polimero si trova in un stato di gel estremamente viscoso (gel layer); nel terzo strato definito stazionario e saturo le macromolecole cominciano a distaccarsi dalla superficie polimerica.

Se nella matrice polimerica è disperso un farmaco, questo dovrà prima essere raggiunto dal solvente per sciogliersi e successivamente diffondere, in un primo momento, attraverso lo strato gelificato, in un secondo, attraverso lo strato stazionario prima di raggiungere l'ambiente esterno. Nei sistemi a controllo chimico intervengono anche processi di erosione e/o biodegradazione della matrice polimerica che causa la progressiva dissoluzione del polimero dello strato più esterno del gel; in quest'ultimo caso la composizione chimica del polimero è determinante

per permettere la realizzazione della cinetica di cessione del farmaco desiderata, ottimizzandone il profilo di attività (figura 1.2).



**Figura 1.2:** rappresentazione schematica del processo di rilascio del farmaco da matrice polimerica

Per le ragioni sopra descritte, affinché un polimero biodegradabile risulti efficace nel controllo del rilascio di farmaci deve essere:

- permeabile all'acqua;
- semicristallino in quanto solo la fase amorfa è accessibile all'acqua
- allo stato gommoso in quanto il mezzo di rilascio non penetra nel polimero se non quando le catene macromolecolari raggiungono una certa mobilità (la temperatura alla quale avviene la transizione vetrosa-gommosa è indicata come  $T_g$ )

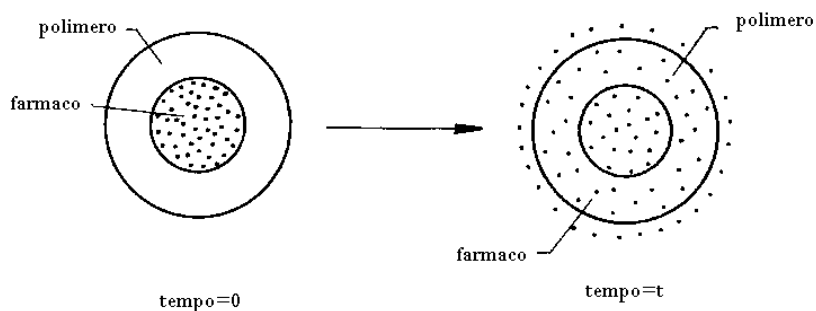
### 1.3.1 Dispositivi per il rilascio controllato di farmaci

L'incorporazione del farmaco nel polimero può essere realizzata attraverso i seguenti dispositivi:

#### Sistemi a membrana

I sistemi a membrana, rappresentati in figura 1.3, sono dispositivi in cui il farmaco, concentrato nel "core", è circondato da un film polimerico. Il meccanismo di rilascio in questo caso dipende dalla

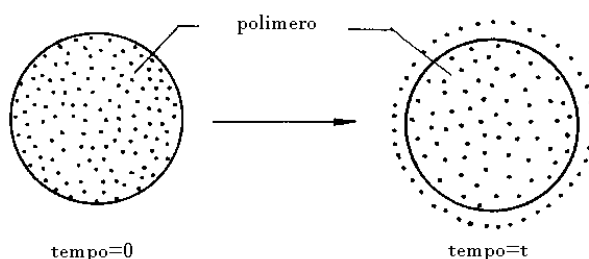
diffusione del principio attivo attraverso la membrana polimerica. I sistemi a membrana sono usati nella terapia oculare, contraccettiva e in applicazioni transdermiche<sup>[21]</sup>.



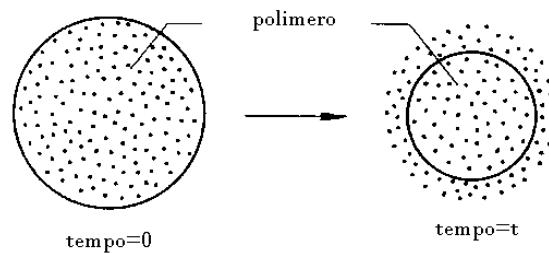
**Figura 1.3 :** meccanismo di rilascio di un sistema a membrana

### Sistemi a matrice

Nei sistemi a matrice, illustrati nelle figure 1.4 e 1.5, il farmaco è distribuito uniformemente nel polimero. Il materiale polimerico può essere biodegradabile o non degradabile (ad esempio polimeri di idrossi-alchilmetacrilato). Il meccanismo di rilascio è controllato dalla diffusione del farmaco nel caso di matrici non degradabili, mentre nel caso di matrici degradabili esso è controllato sia dalla diffusione che dalla degradazione del materiale. Il vantaggio di usare sistemi biorisorbibili risiede nel fatto che non è necessario rimuovere il dispositivo dopo il rilascio del farmaco



**Figura 1.4:** meccanismo di rilascio di un sistema a matrice non degradabile



**Figura 1.5:** meccanismo di rilascio di un sistema a matrice biodegradabile

Di seguito sono elencati alcuni tipologie di matrici per rilascio controllato di sostanze bioattive:

**FILM:** caricati con farmaci, per impianti sottocutanei o periodontali.

**MICROSFERE** ( $d = 1-100 \mu\text{m}$ ): caricate con farmaci o proteine, per uso orale o iniettabili per via sottocutanea o intramuscolare.

**NANOPARTICELLE (MICELLE)** ( $d = 10-100 \text{ nm}$ ) : caricate con farmaci o proteine per soluzioni acquose iniettabili per via intramuscolare o endovenosa (anche in vasi sanguigni di ridotta dimensione).

La forma a rilascio controllato per via orale più semplice e più "antica" è costituita dalle compresse gastroresistenti o enterosolubili. Si tratta di compresse tradizionali, rivestite in superficie da uno strato di materiale polimerico insolubile nello stomaco ma solubile nell'intestino. Tali sistemi consentono il rilascio dei farmaci contenuti solo nell'intestino e non nello stomaco, dove potrebbero essere inattivati o provocare effetti negativi. Purtroppo molte di queste forme farmaceutiche a rilascio controllato hanno dimostrato negli studi in vivo una bassa biodisponibilità; spesso ciò è dovuto al non completo rilascio del principio

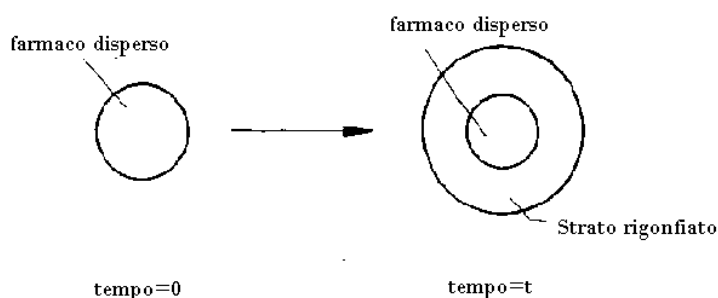
attivo da parte della forma farmaceutica, oppure ad un troppo breve tempo di permanenza della forma stessa nel tratto assorbente dell'apparato gastrointestinale. Infatti, per quanto fine possa essere il controllo della velocità di liberazione del principio attivo dalla forma farmaceutica, i sistemi orali a rilascio controllato rimangono in ogni caso dipendenti anche dal tempo di transito gastrointestinale. Un'altra via di somministrazione spesso utilizzata per forme a rilascio controllato è la via iniettiva. In questo caso, vengono generalmente utilizzate formulazioni come micro e nanoparticelle che liberano lentamente il farmaco per periodi di tempo di settimane o mesi (esempio: Decapeptyl® liberazione prolungata di triptorelina per 1 o 3 mesi). I sistemi terapeutici transdermici (o cerotti), che si basano, invece, sulla formazione di films sono sistemi multilaminati che sono applicati sulla pelle per semplice pressione, come i normali cerotti [22]. Pur appartenendo a tipologie diverse, essi presentano alcuni elementi comuni: uno strato impermeabile che svolge la funzione di sostegno e di protezione e che non permette la dispersione del principio attivo all'esterno; uno strato adesivo, che consente il posizionamento del cerotto in una porzione dell'organismo e lo mantiene in posizione durante l'applicazione, ed il deposito di farmaco. Offrono il grande vantaggio di non essere "invasivi" per il paziente, poiché vengono applicati sulla pelle come un semplice cerotto. I farmaci in commercio sotto forma di cerotti transdermici non sono molto numerosi (scopolamina, nitroglicerina, estradiolo, clonidina, fentanile, nicotina, testosterone).

Tra i vari dispositivi disponibili quelli selettivi verso un organo bersaglio stanno assumendo un ruolo sempre più importante grazie alla particolare caratteristica di interagire attivamente con l'organo o con la

specifica popolazione cellulare verso cui il farmaco è diretto. In questo modo farmaci dotati di una potente attività, come gli antitumorali, possono raggiungere nelle zone dell'organismo colpite da tumore una concentrazione molto più elevata rispetto a quella ottenibile con una somministrazione convenzionale. In quest'ultimo caso, la distribuzione del farmaco omogenea in tutto l'organismo, costringerebbe ad impiegare dosaggi molto elevati per raggiungere livelli terapeutici negli organi bersaglio con conseguente manifestazione di effetti tossici a livello sistemico. Le più importanti classi di sistemi orientabili verso un organo bersaglio sono quelle basate sull'impiego di: micro e nano-particelle, films, liposomi, eritrociti modificati, anticorpi monoclonali [23]. Le prime due classi sono quelle che sicuramente si sono sposate meglio con i materiali polimerici sintetizzati e caratterizzati durante il lavoro di tesi.

### Idrogeli

Gli idrogeli sono materiali caratterizzati da elevata idrofilicità, alta densità di reticolazioni, discreta porosità. Il farmaco viene intrappolato nella matrice polimerica o viene legato chimicamente ad un componente dell'idrogelo. Quando il sistema è a contatto con i fluidi biologici acquosi l'idrogelo si rigonfia e il principio attivo diffonde fuori dalla matrice polimerica vetrosa (figura 1.6).



**Figura 1.6:** meccanismo di rilascio di matrici che si rigonfiano



#### ***1.4 Applicazioni in campo biomedico***

In ambito biomedico le applicazioni dei biomateriali polimerici sono numerose nei settori più vari.

In cardiologia vengono realizzati con materiali polimerici numerosi dispositivi medici impiantabili, quali cateteri, protesi vascolari, valvole cardiache, sistemi di assistenza cardiaca come le apparecchiature di assistenza esterna (ossigenatori). In nefrologia tali materiali hanno trovato impiego nella realizzazione delle apparecchiature per l'emodialisi e l'emofiltrazione, in particolare per la realizzazione di membrane piane e fibre cave per la purificazione extracorporea del sangue. Altri usi si trovano in oftalmologia sia nella realizzazione di lenti a contatto rigide e morbide che nella realizzazione di lenti intraoculari. In questo caso il polimero più usato è il polimetilmetacrilato e suoi copolimeri con monomeri aventi caratteristiche più idrofiliche come l'idrossietilmetacrilato [24]. In ortopedia le applicazioni più importanti dei polimeri si ritrovano in alcune componenti delle protesi articolari, in particolare delle protesi d'anca e di ginocchio, nelle placche e nei chiodi intramidollari per la fissazione delle fratture e nel cemento per ossa. In questo settore, gli inconvenienti legati all'uso di protesi temporanee metalliche, primo tra tutti quello relativo alla loro rimozione e, quindi, alla necessità di dover sottoporre il paziente ad un secondo intervento, hanno fatto sì che l'utilizzo di polimeri biodegradabili nella costruzione di protesi temporanee si stia progressivamente estendendo.

L'attività di ricerca nel settore dei biomateriali si muove oggi sempre più nella direzione di identificare i meccanismi chimici e biologici che si trovano alla base delle interazioni fra i biomateriali ed i tessuti biologici, campo dell' "ingegneria tissutale" [25].

L'espressione "ingegneria tissutale" è la traduzione italiana dell'espressione "tissue engineering" coniata ufficialmente nel 1988 dalla National Science Foundation per definire un campo multidisciplinare che si avvale dei principi della scienza della vita e dell'ingegneria per realizzare sostituti biologici contenenti cellule viventi e funzionali per la rigenerazione, il mantenimento o il miglioramento delle prestazioni dei tessuti [26].

L'ingegneria tissutale si occupa della progettazione e della realizzazione di organi e protesi dal punto di vista dell'interazione materiale sintetico/sito biologico con lo scopo di realizzare impianti porosi che agiscano da impalcatura di supporto per la proliferazione e la rorganizzazione cellulare; il tessuto danneggiato crescendo invade l'impianto, penetra nei suoi pori e la protesi comincia lentamente a degradare venendo gradualmente sostituito con il tessuto che va man mano rigenerandosi.

Le strutture realizzate per l'ingegneria tissutale sono costituite da due elementi fondamentali:

- Componente cellulare, necessaria per la generazione della matrice extracellulare e del mantenimento a lungo termine della stessa;
- Componente artificiale, costituita dal supporto polimerico (scaffold) per la componente cellulare.

Questi nuovi materiali sono chiamati biomateriali ibridi e la presenza delle cellule dovrebbe portare ad un'interazione attiva, bioattività, con i tessuti biologici.

Le tecniche utilizzate nell'ingegneria tissutale seguono due vie differenti:

- **in vitro:** la progettazione e la crescita dei tessuti avviene al di fuori del corpo e solo in un secondo momento si passa all'impianto dei tessuti artificiali sui tessuti danneggiati; tipico esempio è l'uso di pelle "coltivata" per il trattamento di pazienti affetti da gravi ustioni o da ulcere diabetiche;
- **in vivo:** tecnica che consiste nell'isolamento delle cellule dall'ambiente biologico naturale, nella semina di queste su scaffold e infine nell'impianto di questo sistema nel corpo del paziente. Durante la produzione della matrice extracellulare da parte delle cellule, lo scaffold tende a biodegradarsi ed a farsi sostituire dal tessuto biologico rigenerato, cade così la necessità di reintervenire chirurgicamente per la rimozione dell'elemento protesico.

**Bibliografia**

- [1] B.D Ratner, in *The synthesis characterization, reaction and application of polymers*, Pergamon Press, Chap 7, 201 (1989).
- [2] Y. Ikada, W. Shalaby, *ACS Symp. Series n. 540* (1994).
- [3] G. Wegner in *Polymer Werkstoffe*, Thieme Verlag, Stuttgart, 697, (1985).
- [4] A.Baszkin, in *Blood compatible materials and their testing*, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, 39, (1986)
- [5] Y. Ikada, H. Tsuij, *Macromol. Rapid Commun.* 21, 117-132, (2000).
- [6] R.M. Gardener, C.M. Buchman, R. Komark, D. Dorschel, C. Boggs and A.W. White, *J. Appl. Polymer Sci.*, 52, 1477, (1994).
- [7] Y. Tabata, Y. Ikada, *J. Controlled Release*, 27, 79, (1993).
- [8] B.G. Scinde, S. Eهران, *Bio-medical Mater Eng.*, 2, 127, (1992).
- [9] K. Fukuda, *An overview of the activities of the Biodegradable Plastic Society, in Biodegradable Polymers and Plastics*, ed M.Vert Royal Society of Chemistry, 169, (1992).
- [10] N. Grassie, G. Scott, *Polymer degradation and stabilization*, Cambridge University Press, Cambridge, (1985).
- [11] W. Schnabel, *Polymer degradation Hanser International*, Munchen, (1981).
- [12] G. Scott Ed, *Mechanisms of polymer degradation and stabilization*, Elsevier, Applied Science, London, (1990).
- [13] S.H. Hamid, M.B. Amin, A.G. Maadhah, *Handbook of polymer degradation*, Drekker, New York, (1992).
- [14] Gopferich *Biodegradable polymers: polyanhydrides in Encyclopaedia of Controlled Drug Delivery* Ed. E Mathowitz, New York: John Wiley and Sons, 1, 60, (1999).
- [15] S. Negoro, T. Taniguchi, M. Kanaoka, H. Rimura, H. Okada, *J. Bacteriol.*, 155, 22, (1983).
- [16] T.H. Barrows, J.D. Johnson, S.J. Gibson, D.M. Girassing, *ACS Polym. Sci. Technol. Ser. Adv. Biomed. Polym.*, 34, 85, (1986).
- [17] J. Heller, R. Gurny *Poly(orthoesters) in Enciclopaedia of Controlled Drug Delivery* Ed. E Mathowitz, New York: John Wiley and Sons, , 2, 852, (1999).

- [18] M. Vert, J. Feijen, A. Albertsson, C. Scott, E. Chiellini, *The Royal Society of Chemistry Publications* (1992).
- [19] R. Langer, *Nature*, 392, 5, (1998).
- [20] Y. Kaneda, *Biorelated polymers and gels, controlled release and applications in biomedical engineering*, Academic Press, San Diego, 1998
- [21] R.E. Stratford, L.W. Carson, S. Dodda-Kashi, V.H.Lee, *J.Pharm.Sci.*, 77, 883, 1998
- [22] Y. Ogawa, M. Yamamoto, H. Ogawa, T. Yashiki, T. Shimamoto, *Chem. Pharm. Bull.*, 36, 1095, (1988).
- [23] E. Tomlinson in *Modern Pharmaceutics*, G.S. Banker, C.T. Rhodes, A. Dekker, New York, 1990.
- [24] J. Kohn, *MRS Bulletin*, 21, 18, (1996).
- [25] R.M. Nerem, *Medical and Biological Engineering Computing*, 30, CE-8-CE12 (1992).
- [26] R.Langer, J.P. Vacanti, *Tissue engineering*, Science, 260- 920-926, 1993.

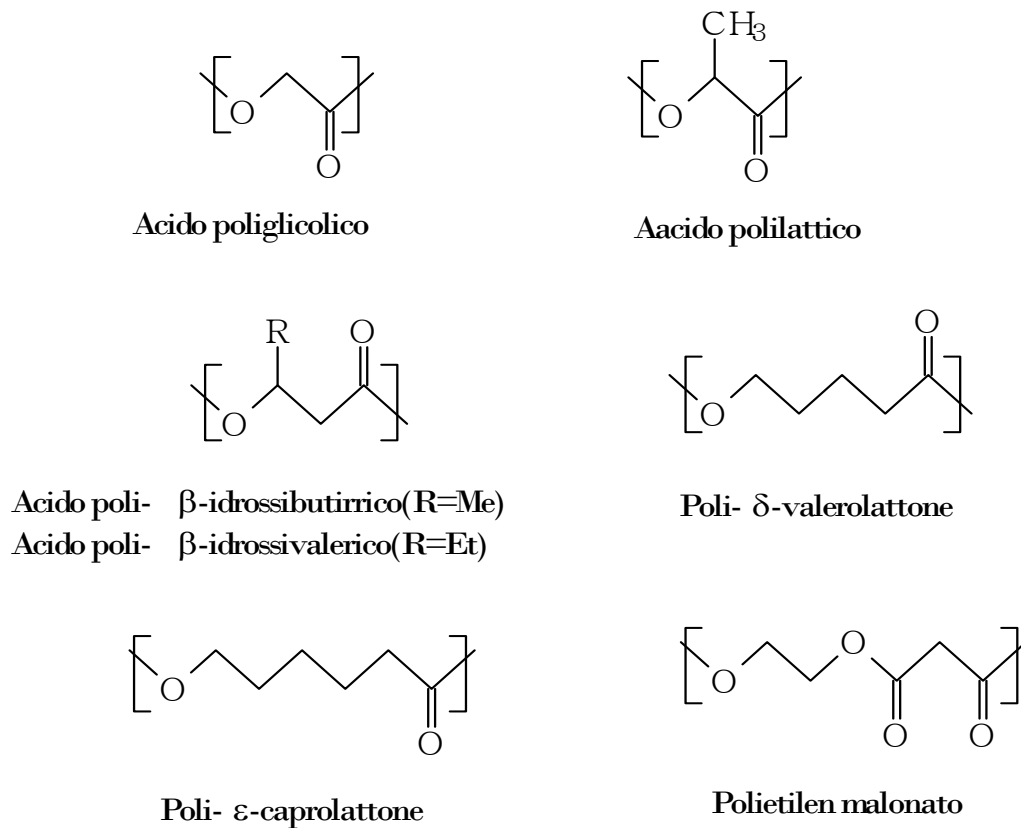
## **Capitolo 1**

### ***Potenzialità applicative dei poliesteri alifatici in campo biomedico***

#### ***1.1 Stato dell'arte***

I poliesteri alifatici sono una classe di polimeri particolarmente interessante per l'utilizzo in campo farmaceutico e biomedico allorchè si richiedano biocompatibilità e bioriassorbibilità in maniera controllata<sup>[1,2]</sup>. Essi, recentemente, hanno attratto molta attenzione anche per applicazioni nel campo dell'ingegneria tissutale, in ragione della loro biocompatibilità e della possibilità di modulare una serie di proprietà in funzione della struttura richiesta.

I poliesteri più comunemente usati in campo biomedico e farmaceutico sono i polimeri e copolimeri dell'acido glicolico, dell'acido L- e DL lattico, dell'acido  $\beta$ -idrossibutirrico, nonché degli acidi ossalici, succinico, maleico, fumarico, e quelli derivanti da lattoni come il  $\beta$ -butirrolattone, il  $\delta$ -valerolattone e da altri lattoni superiori a cui appartiene l' $\epsilon$ -caprolattone. In figura 1.1 sono riportate le unità ripetitive di poliesteri di cui è nota la suscettibilità alla degradazione idrolitica in vivo e in vitro.



*Figura 1.1: esempi di unità ripetitive di poliesteri*

Opportune modifiche strutturali consentono di ottenere a partire da tali poliesteri materiali con specifiche proprietà meccaniche, di permeabilità, e con velocità di degradazione controllabili<sup>[3]</sup>.

In quest'ottica si possono utilizzare diverse strategie per ottenere materiali con proprietà specifiche :

a) *Modifica dell'unità ripetitiva del polimero:* ad esempio, passando dall'acido poliglicolico all'acido polilattico si osserva una degradazione più lenta e una migliore lavorabilità, passando dall'acido poliglicolico all'acido polimalico si ottiene, invece, un maggiore carattere idrofilico e la presenza di gruppi funzionali in catena.

*b) Copolimerizzazione:* in questo modo si possono variare le proprietà fisiche e chimiche di un determinato poliestere in funzione della natura del comonomero, della composizione, della microstruttura e dell'architettura della macromolecola. Un esempio sono i copolimeri policaprolattone-poli(etilenglicole).

*c) Miscelazione:* la formazione di leghe tra due polimeri immiscibili consente di combinare, eventualmente in modo sinergico, le proprietà desiderate di entrambi i componenti. Tipici esempi sono costituiti da leghe poli-L-lattide/poli(etilenglicole) e poli-DL-lattide/policaprolattone.

*d) Reticolazione:* consente di utilizzare polimeri molto flessibili e amorfi oppure estremamente idrofili o idrosolubili garantendone la stabilità dimensionale.

*e) Modifica delle proprietà di superficie:* un aumento dell'idrofilicità superficiale mediante innesto di gruppi -COOH, -OH, -NH<sub>2</sub>, oppure mediante coating con polimeri idrofili come poli(etilenglicole), riduce l'adesione cellulare, in particolare delle piastrine. Ricoprendo o innestando sulla superficie degli anticoagulanti, glicoproteine come la fibronectina o un loro frammento, come ad esempio la sequenza arginina-glicina-acido aspartico (RGD), si favorisce l'adesione di cellule endoteliali.

## **1.2 L'acido polilattico (PLA)**

L'acido lattico presenta due forme stereoisomeriche che danno luogo a tre polimeri distinti: PDLA, PLLA e PDLLA; i primi due sono le forme stereoregolari (isotattiche) semicristalline, mentre l'ultimo, amorfo, è un polimero atattico costituito da unità di acidi D-lattico e L-lattico.

I polimeri dell'acido polilattico, grazie alle loro buone proprietà meccaniche, all'elevata biocompatibilità ed alla loro biodegradibilità, sono



utilizzati in medicina per varie applicazioni quali protesi per la fissazione di fratture in chirurgia maxillo-facciale (BiofixR, PhusilineR)<sup>[4]</sup>, rilascio controllato di farmaci e per suture biodegradabili <sup>[5,6]</sup>.

Il PLLA è impiegato più frequentemente del PDLA, poiché, per idrolisi, genera acido L-lattico, che è lo stereoisomero naturale dell'acido lattico ed interviene come intermedio metabolico nella degradazione anaerobica del glucosio (glicolisi). L'acido L-lattico viene prodotto dai muscoli, durante sforzi notevoli, l'eccesso che si accumula nel sangue viene convertito attraverso un'opportuna via metabolica in glicogeno nel fegato. I prodotti della biodegradazione della PLLA "impiantata in vivo" si inseriscono, pertanto, agevolmente in tale via.

Il PLLA è utilizzato, preferibilmente, per la costruzione di protesi ortopediche grazie alle buone caratteristiche meccaniche e di tenacità, dovuta all'elevata cristallinità, mentre il PDLLA, essendo amorfo, è caratterizzato da una cinetica di degradazione più veloce rispetto a quella dei polimeri semicristallini (PLLA e PDLA), ma le sue proprietà meccaniche sono più scadenti; per queste sue caratteristiche, esso appare più idoneo per applicazioni di rilascio controllato dei farmaci in cui è richiesto che il principio attivo venga rilasciato in tempi brevi o, più in generale, per la realizzazione di impianti per cui si richiede una cinetica di biodegradazione piuttosto veloce.

### ***1.3 Poli( $\epsilon$ -caprolattone) (PCL)***

Il poli( $\epsilon$ -caprolattone), PCL, è stato ampiamente studiato come biomateriale in quanto si degrada per idrolisi dei legami esterei ed è riassorbito nei tessuti senza rilascio di prodotti tossici<sup>[7]</sup>.

#### ***Biodegradabilità***

Inizialmente il PCL era conosciuto come materiale biodegradabile in vivo ad opera di funghi filamentosi o *Cryptococcus laurentii*, un batterio del lievito utilizzabile nel settore dell'imballaggio<sup>[8]</sup>. Successivamente è stato scoperto che il PCL può degradarsi anche con meccanismo idrolitico in condizioni fisiologiche e, in certe circostanze, può essere degradato enzimaticamente <sup>[9]</sup>. La degradazione del PCL rilascia acido  $\epsilon$ -idrossicaproico quale unico metabolita e avviene in due fasi:

- Idrolisi non enzimatica in massa del legame estereo
- Frammentazione e rilascio delle specie oligomeriche

I frammenti di PCL sono degradati da macrofagi e da cellule giganti in un processo che coinvolge anche enzimi prodotti dai lisozomi. Esperimenti in vitro hanno evidenziato, inoltre, come la degradazione del PCL sia accelerata dall'attività enzimatica e microbica<sup>[10]</sup>.

#### *Proprietà chimico-fisiche*

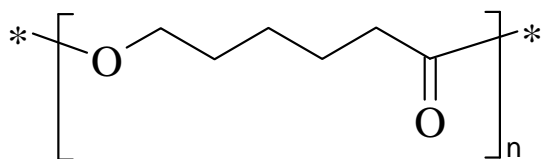
Il PCL è un polimero semicristallino con bassa temperatura di transizione vetrosa,  $T_g = -60^\circ\text{C}$ ; la componente amorfa a temperatura ambiente si trova sempre nello stato gommoso. Questa proprietà è insolita fra i più comuni poliesteri alifatici e contribuisce alla notevole permeabilità del PCL a molti principi attivi. Per queste sue caratteristiche il PCL è molto usato nella progettazione di dispositivi per il rilascio controllato di farmaci; un esempio è il Capronor<sup>TM</sup>, sistema per il rilascio di un contraccettivo della durata di un anno. Altre importanti proprietà sono la sua propensione a formare miscele compatibili con molti altri polimeri e la possibilità di ottenere copolimeri con proprietà anche notevolmente diverse dall'omopolimero.

#### *Sintesi*

La sintesi del PCL può avvenire attraverso differenti meccanismi di polimerizzazione: anionica, cationica, radicalica e di coordinazione. Il peso molecolare, l'indice di polidispersione e la natura dei gruppi terminali dipendono dal tipo di reazione di polimerizzazione.

Il PCL generalmente viene preparato per apertura del ciclo dell' $\epsilon$ -caprolattone, "ring opening polymerization" (ROP), usando un alcool mono-, di-, multi-funzionale come iniziatore in presenza di un centro di coordinazione metallico (Sn, Zn, Al), tipicamente originato da composti come Sn(etilesanoato)<sub>2</sub> (gli alcossidi metallici sono eccellenti iniziatori della polimerizzazione anionica di monomeri eterociclici). La polimerizzazione anionica di tipo 'vivente' è il metodo più versatile per preparare il PCL e i suoi copolimeri con alte conversioni e con bassi indici di polidispersione ( $M_w/M_n=1.2$ ). L'altro aspetto particolarmente positivo delle polimerizzazioni viventi risiede nella possibilità di sintetizzare delle strutture macromolecolari controllate e per le quali la lunghezza del segmento di PCL può essere predeterminata semplicemente dalla quantità di monomero introdotto rispetto all' iniziatore.

L'unità ripetitiva è riportata in Figura 1.2



**Figura 1.2 :** unità ripetitiva del PCL

#### **1.4 Copolimeri a blocchi**

Poliesteri utilizzabili in campo biomedico o farmaceutico necessitano, talvolta, di modifiche quando si richiedono proprietà specifiche come ad esempio una biodegradabilità controllata. Opportune

modifiche possono essere un incremento di idrofilicità o una diminuzione di cristallinità e queste possono essere realizzate mediante copolimerizzazione. I copolimeri sono definiti come polimeri ottenuti per polimerizzazione di due o più monomeri di natura diversa.

L'acido polilattico ed i suoi copolimeri, soprattutto con l'acido poliglicolico e/o con polietilenglicole (PEG), vengono impiegati già da diverso tempo in medicina. Il PCL ha una biocompatibilità perfino superiore a quella del PLLA, ma essendo un materiale semicristallino a bassa Tg ha proprietà meccaniche scadenti e tempi di biodegradazione troppo lunghi, causati da un forte carattere idrofobico e da un'elevata cristallinità. È necessario, quindi, ovviare a questi inconvenienti senza sacrificare le proprietà di maggiore interesse quali biodegradabilità, biocompatibilità, elevata permeabilità a sostanze bioattive e atossicità. Modifiche del PCL rispondenti ai criteri prima indicati si possono realizzare formando opportuni copolimeri a blocchi con altri poliesteri più degradabili o con polieteri, in particolare con polietilenglicoli che sono idrofilici e biocompatibili.

Il poli-etilenglicole (PEG), un polietero biocompatibile, si è affermato molto nel campo dei biomateriali perché rappresenta un ottimo componente in grado di regolare il rapporto idrofobicità/idrofilicità delle macromolecole con cui è copolimerizzato. Il PEG viene escreto tal quale dall'organismo umano.

In questo lavoro di tesi è ampiamente studiata la possibilità di modulare l'idrofilicità del PCL, e quindi la sua velocità di biodegradazione, mediante tecniche di copolimerizzazione con poliossietilene (PEO) <sup>[11]</sup>. Variando opportunamente il metodo di sintesi è possibile variare la lunghezza e l'arrangiamento sequenziale dei segmenti

idrofobici e idrofilici che li compongono ottenendo così copolimeri a diverso grado di idrofilicità, composizione e architettura:



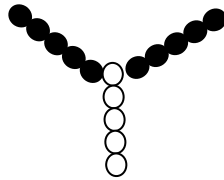
*Copolimeri diblocchi del tipo AB*



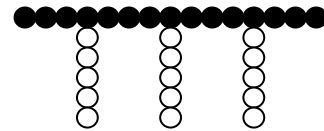
*Copolimeri triblocchi del tipo ABA*



*Copolimeri multiblocchi del tipo (AB)<sub>n</sub>*



*Copolimeri a blocchi star-shaped*



*Copolimeri graft*

L'aspetto più interessante della classe di copolimeri a blocchi di duplice natura idrofobica/idrofilica a base di PCL e PEO è la loro naturale tendenza all'autoaggregazione in sistemi adatti alla incapsulamento, trasporto e rilascio di un principio attivo.

### ***1.5 Miscele polimeriche***

L'utilizzo di polimeri biodegradabili e biocompatibili in campo biomedico nella costruzione di protesi temporanee è uno degli aspetti maggiormente affrontati nel campo della tecnologia dei polimeri degli ultimi anni. L'ostacolo maggiore alla realizzazione di questi dispositivi polimerici è costituito dalle inadeguate proprietà meccaniche dei polimeri biodegradabili oggi disponibili. Le proprietà di un polimero possono, però,

essere significativamente migliorate attraverso la tecnica della miscelazione che consente di combinare, eventualmente in modo sinergico, le proprietà desiderate di due componenti. Le leghe polimeriche possono essere classificate come miscibili, parzialmente miscibili, immiscibili. La morfologia di leghe miscibili è caratterizzata dalla presenza di una sola fase, mentre le restanti due dalla presenza di più fasi. Due polimeri, A e B, tendono generalmente a formare sistemi bifasici, considerato che l'aumento di entropia associato al mescolamento non bilancia le sfavorevoli interazioni tra catene diverse. La formazione di miscele omogenee dipende dall'instaurarsi di specifiche interazioni intermolecolari tra catene diverse, da idonei parametri molecolari (viscosità, peso molecolare) e dalle condizioni sperimentali di mescolamento [12,13].

Molte delle miscele polimeriche di importanza commerciale sono costituite da componenti immiscibili; esse possono essere rese più miscibili ("compatibili") attraverso diverse procedure sperimentali quali l'aggiunta di un agente compatibilizzante, in grado di migliorare la compatibilità tra i componenti abbassando l'energia interfacciale e riducendo il fenomeno di coalescenza tra le fasi. Ciò ha l'effetto di aumentare le prestazioni meccaniche della lega e di diminuire la dimensione media dei domini della fase dispersa. In generale, i compatibilizzanti più utilizzati sono copolimeri a blocchi dei due omopolimeri componenti la lega, di struttura variabile, in grado di porsi all'interfaccia tra le fasi svolgendo un'azione emulsionante.

Metodi di simulazione al computer hanno dimostrato che l'aggiunta di un copolimero del tipo A-B-A in una lega di due polimeri immiscibili in cui A è la matrice e B la fase dispersa rende i domini di B molto più piccoli di quelli che si ottengono quando viene aggiunto un

copolimeri A-B [14,15]. E' stato inoltre dimostrato che un copolimero del tipo A-B-A è un agente emulsionante migliore di un copolimeri di tipo B-A-B di ugual peso molecolare.

Miscele polimeriche a base di PCL e PDLLA rappresentano materiali favorevoli alla ricostruzione di tessuti grazie alla biodegradabilità e biocompatibilità dell'acido poli-DL-lattico e all'elevata tendenza del PCL a promuovere l'adesione e proliferazione cellulare<sup>[16,17]</sup>. Il PDLLA ed il PCL sono immiscibili, anche se non altamente incompatibili <sup>[18]</sup> e, pertanto, sono stati compiuti notevoli sforzi al fine di ottenere una fine dispersione delle fasi degli omopolimeri miscelati, di realizzare strutture dalle buone caratteristiche meccaniche, e di ottenere domini di PCL di ridotte dimensioni aumentando, in tal modo, la superficie di contatto tra l'ambiente fisiologico ed il PCL. Studi precedenti, condotti durante precedenti dottorati di ricerca<sup>[19]</sup>, ha messo in evidenza come copolimeri a blocchi del PLLA-PCL siano in grado di svolgere un'azione emulsionante nei confronti del PCL in leghe PLLA/PCL.

A partire da questi risultati, nel lavoro di tesi si è pensato di sperimentare l'impiego di copolimeri PCL-co-PEO quali agenti compatibilizzanti in leghe a matrice PDLLA. Rispetto ai copolimeri PDLLA-co-PCL precedentemente utilizzati, i nuovi copolimeri saranno caratterizzati da una ben definita architettura e, grazie alla presenza di blocchi altamente idrofilici di PEO, potranno aumentare la velocità di degradazione dei materiali ed influenzare positivamente l'adesione cellulare.

### **1.6 Descrizione del lavoro di tesi**

Il lavoro di tesi è incentrato essenzialmente sulla sintesi e caratterizzazione chimico-fisica di copolimeri di condensazione a base di poli ( $\epsilon$ -caprolattone) (PCL)<sup>[20]</sup>, di diversa struttura chimica e composizione, aventi caratteristiche strutturali e proprietà chimico-fisiche e meccaniche mirate principalmente alla formulazione di sistemi a rilascio controllato di farmaci<sup>[21]</sup> e alla preparazione e funzionalizzazione di dispositivi utilizzati in campo biomedico<sup>[22]</sup> (scaffolds per la riparazione guidata di tessuti danneggiati, biosensori per la diagnostica clinica<sup>[23]</sup>)

L'attività di ricerca, quindi, è stata svolta seguendo due direttrici principali:

a) Sintesi di copolimeri anfifilici a blocchi (ABCs) per la realizzazione di sistemi nano-particellari per il rilascio controllato di farmaci e per la preparazione di membrane polimeriche (scaffolds) basate su miscele PDLLA/PCL<sup>[24,25]</sup>.

Nella progettazione dei copolimeri si è tenuto conto della modulazione del bilancio idrofilo/idrofobico e della cristallinità mediante una scelta appropriata dei blocchi di partenza <sup>[26,27]</sup>. Sono state messe a punto strategie di sintesi per l'ottenimento di copolimeri a blocchi a base di PCL e poliossietilene (PEO) con differenti architetture e composizioni allo scopo di investigare l'influenza che questi parametri esercitano sulle proprietà di autoassemblamento dei copolimeri anfifilici in soluzioni acquose. È stata, inoltre, definita una procedura di sintesi per l'inserimento di porzioni direzionanti sulla superficie delle micro- e nanoparticelle in modo da indirizzare il farmaco in uno specifico compartimento cellulare.



b) Sintesi di polimeri e copolimeri funzionalizzati al fine di introdurre sulla superficie di dispositivi medici, gruppi funzionali in grado di legare in maniera covalente proteine o molecole specifiche che rendono selettivo il dispositivo<sup>[28,29]</sup> (es. sequenze peptidiche bioattive del tipo Arg-Gly-Asp che hanno la funzione di indurre un'adesione cellulare selettiva promuovendo così l'adesione cellulare).

**Bibliografia**

- [1] R. Langer, *Nature*, 392, 5, (1998).
- [2] R.E. Stratford, L.W. Carson, S.Dodda-Kashi, V.H. Lee, *J. Pharm. Sci.*, 77, 883, (1988).
- [3] M. Vert, J. Feijen, A. Albertsson, C. Scott, E. Chiellini, *The Royal Society of Chemistry Publications* (1992).
- [4] T.Nakamura, S.Gitomi, TShimamoto, *Biomaterials and Clinical Application*, 759-765, vol 7, 1987.
- [5] T.H. Barrows, *Clinical Materials*, 1, 233-257, 1986.
- [6] F.Chabot, M. Vert, S.Chapelle, *Polymer*, 24, 53-59, 1983.
- [7] Y. Ogawa, M. Yamamoto, H. Ogawa, T. Yashiki, T. Shimamoto, *Chem. Pharm. Bull.*, 36, 1095, (1988).
- [8] Y. Tokiwa, T. Ando, T. Suzuki, *J. Ferment. Technol.*, 54, 603, (1976).
- [9] Y. Tokiwa, T. Suzuki, *Nature*, 270, 76, (1977).
- [10] R. Fields, F. Rodriquez, R.K. Finn, *J. Appl. Polym. Sci.*, 18, 3571, (1974).
- [11] Neeraj Kumar, Majeti N.V. Ravikumar, A.J. Domb, *Drug Delivery*, 53, 23-44 (2001).
- [12] B.Barton, P.Grahm, *Macromolecules*, 31, 1672, 1998.
- [13] G.Beaucage, R.Stein, R. Koningsveld, *Macromolecules*, 26, 1603, 1993.
- [14] P.j. Flory, *Principles of polymer chemistry*, Cornell University Press, New York, 1953.
- [15] R.Fayt, R. Jerome, Ph.Teyssie, *J.Polymer Sci.*, Ed 24, 25, 1986.
- [16] J.P.M. Fennis, P.J.W. Stoelinga, M.A.W. Markx, J.A.Jansen, *Tissue Eng.*,11, 1045, (2005).
- [17] K.W. Ng, D.W. Hutmacher, J.T. Scantz, *Tissue Eng.*,7,441, (2001).
- [18] Dell'Erba R., Groeninckx G., Maglio G., Malinconico M., Migliozi A., *Polymer*, 2001, v. 42, 7831
- [19] Anna Migliozi, *Tesi di Dottorato in Scienze Chimiche XIV*, Università FedericoII di Napoli, a.a. 1998-2001
- [20] Lenz R., *Adv. Polym. Sci.*, 1994, V.112, 1.
- [21] Kumar N. et al., *Adv. Drug Delivery Reviews*, 2001, V. 53, 21.

- [22] Hutmacher D.W., *Biomaterials*, 2001, V. 21, 2529.
- [23] H.B. Yin, T.Brow et al., *Microelectronic Engineering*, 73-74, 2004, 830-836
- [24] Dell'Erba R., Groeninckx G., Maglio G., Malinconico M., Migliozi A., *Polymer*, 2001, v. 42, 7831.
- [25] Maglio G., Malinconico M., Migliozi A., Groeninckx G., *Macromol. Chem. Phys.*, 2004, v. 205, 946.
- [26] Greish K., Fang J., Inutsuka T., Nagamitsu A., Maeda H., *Clin Pharmacokinet.*, 2003, v. 42,1089.
- [27] Crisci L., Della Volpe C., Maglio G., Nese G., Palumbo R., Rachiero G.P., Vignola M.C., *Macromol. Biosci.*, 2003, v.3, 749.
- [28] Han D.K., Hubbell J.A., *Macromolecules*, 1997, v. 30, 6077.
- [29] Jo S., Engel P.S., Mikos A.G., *Polymer*, 2000, v.41, 7595.

## **Capitolo 2**

### ***Copolimeri anfifilici per la realizzazione di dispositivi per il rilascio controllato di farmaci***

#### ***2.1. Stato dell'arte***

##### ***2.1.1 Veicolanti polimerici di farmaci***

I farmaci tradizionali sono composti a basso peso molecolare che rapidamente trovano accesso alle cellule mediante passaggio attraverso le membrane cellulari. Ad esempio, nel caso della somministrazione per via endovenosa, una elevata percentuale del farmaco iniettato viene escreta dopo pochi minuti, mentre il restante viene distribuito uniformemente nell'organismo, con scarsa concentrazione nel sito in cui è richiesta l'azione terapeutica. Nell'introduzione (paragrafo 1.3) è stata ampiamente descritta l'efficacia dei polimeri sintetici nella formulazione di sistemi per l'incapsulazione e rilascio di principi attivi.

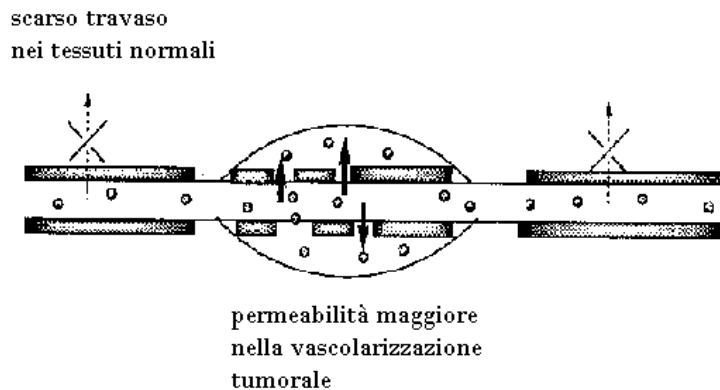
Il vantaggio di utilizzare polimeri come sistemi veicolanti per il rilascio di farmaci risiede nel fatto che un veicolante polimerico può contenere numerosi gruppi funzionali, di conseguenza esso può essere progettato 'ad hoc' in modo tale da possedere contemporaneamente unità solubilizzanti, unità attive, e anche gruppi orientanti verso cellule o organi bersagli. Ne consegue che un veicolante polimerico mostra elevata potenzialità per il superamento di alcune barriere farmacocinetiche e farmacodinamiche quali solubilità, miscibilità, sfavorevole velocità di azione, sfavorevole localizzazione nell'organismo.

### **2.1.2 Micro e nanoparticelle**

Attualmente molti farmaci, analgesici, agenti cardiovascolari, antibiotici, tranquillanti e vitamine, vengono somministrati sotto forma di sistemi a matrice di micro e nano dimensioni. L'incapsulazione del farmaco all'interno della microsfera, oltre a mascherare odori e sapori sgradevoli del farmaco, permette anche di garantire il mantenimento dell'attività farmacologica di principi attivi facilmente degradabili. I vantaggi mostrati dalle micro particelle sono la capacità di garantire un rilascio controllato del farmaco nel duplice aspetto di rilascio graduale e ritardato nel tempo, oltre ad avere eventualmente la capacità di orientarsi verso un organo bersaglio. Riguardo quest'ultimo aspetto, si possono distinguere due diversi tipi di orientamento selettivo:

- **Orientamento di tipo passivo:** dipende dalle interazioni fisiche o biofisiche che avvengono tra sistema particellare e l'organismo [1]. Le particelle con dimensioni comprese nell'intervallo 0,3-2  $\mu\text{m}$ , una volta introdotte nell'organismo, sono identificate come corpi estranei dal sistema immunitario e vengono rapidamente captate dalle cellule del reticolo endoteliale (RES). Tale fenomeno avviene soprattutto a livello del fegato e può rappresentare un vantaggio qualora il sito di azione del farmaco sia rappresentato proprio da tali cellule. La localizzazione delle particelle a livello dei diversi organi bersaglio può dipendere sia dalle dimensioni che dalla via di somministrazione impiegata. Nanosfere con diametro compreso tra 100 e 300 nm, tendono a localizzarsi principalmente nel fegato, più precisamente a livello degli epatociti, nella milza e nel midollo osseo. La somministrazione per via endovenosa o intra-arteriosa di microsfele con dimensioni opportune generalmente favorisce orientamenti di tipo passivo, data la particolare

struttura del sistema vascolare in condizioni patologiche. Ad esempio la somministrazione intra-arteriosa di microsfele di diametro  $12\mu\text{m}$  può portare alla localizzazione selettiva della particella verso cellule tumorali. Questo fenomeno è stato definito ‘effetto di incremento di permeabilità e trattenimento (EPR: enhanced permeability and retention effect) [2,3] ed è attribuibile a due principali fattori: da un lato, la vascolarizzazione tumorale spesso mostra un endotelio discontinuo, cioè con permeabilità alterata, che permette il passaggio di macromolecole di grosse dimensioni, le quali invece attraversano con difficoltà o non attraversano affatto le pareti di vasi normali. D’ altro lato, si osserva nel tumore una mancanza di drenaggio efficace da parte del sistema linfatico, che conduce a un accumulo locale delle macromolecole penetrate



*Figura 2.1: schema esplicativo dell'effetto EPR*

- Orientamento di tipo attivo: l'orientamento di tipo attivo è basato sulla possibilità di modificare la superficie delle particelle, al fine di essere riconosciute dall' organismo come corpi estranei, evitando così la captazione da parte del sistema reticolo endoteliale. La presenza di una

ricopertura idrofila sulla particella la rende irriconoscibile al RES e le consente di circolare per periodi di tempo lunghi abbastanza da permetterle di arrivare al sito bersaglio (direzionamento passivo). Un tempo di circolazione più lungo aumenta anche la probabilità che il vettore possa raggiungere tessuti o organi caratterizzati dalla presenza di un letto vascolare più permeabile come avviene nei tumori solidi. Inoltre, sulla superficie della particella possono essere inserite funzionalità che consentono interazioni specifiche con determinati distretti tissutali nell'organismo.

### ***2.1.3 Impiego di copolimeri anfifilici per la preparazione di sistemi nano particellari***

In tale scenario, stanno riscuotendo un grosso interesse copolimeri anfifilici a blocchi (ABCs) [4,5].

Questi sistemi sono costituiti da blocchi idrofilici ed idrofobici che tendono spontaneamente ad autoaggregarsi in fasi separate, sia in massa che in soluzione, dando luogo a diverse morfologie. In particolare, la diversa affinità dei due tipi di segmenti, idrofobico e idrofilico, nei confronti di determinati solventi, e soprattutto dell'acqua<sup>[6]</sup>, è responsabile della naturale tendenza di questi sistemi ad autoaggregarsi in ambiente acquoso dando vita a strutture ordinate di tipo "core-shell" di dimensioni nanoscopiche e, prevalentemente, di forma sferica. Il core è formato unicamente dal segmento di tipo idrofobico e può essere caricato con farmaci lipofili; il guscio, a sua volta, è di natura idrofilica ed ha il doppio compito di proteggere il core e assicurare alla nanoparticella solubilità in ambiente acquoso e, dunque, il trasporto del farmaco.

L'indicatore fondamentale della stabilità delle micelle polimeriche è la concentrazione micellare critica (CMC), valore minimo di

concentrazione alla quale si osserva l'aggregazione delle singole macromolecole (unimeri) in strutture micellari. Tipici valori di CMC idonei per applicazioni farmaceutiche sono dell'ordine di  $10^{-6}$ - $10^{-7}$  M. L'elevata stabilità termodinamica delle micelle polimeriche, rispetto a quelle originate da tensioattivi convenzionali, indica che le prime hanno una scarsa tendenza a disassemblarsi anche a concentrazioni molto basse e, quindi, la dissociazione delle micelle in unimeri è generalmente lenta anche quando il sistema viene diluito nel circolo ematico. Uno dei maggiori vantaggi nella formazione e dunque nell'utilizzo di nanoparticelle e micelle è la possibilità di somministrarle anche in vasi sanguigni di ridotte dimensioni potendo in tal modo formulare dei farmaci direttamente iniettabili. Inoltre il tempo di residenza di un copolimero in forma micellare è dell'ordine delle ore essendo tali micelle particolarmente stabili<sup>[7]</sup>.

La maggior parte degli ABCs contiene come blocco idrofobico poliesteri biocompatibili e biodegradabili ampiamente usati per applicazioni biomediche, in particolare acido polilattico (PLLA o PDLLA), acido poli(lattico-co-glicolico) (PLGA) e poli( $\epsilon$ -caprolattone) (PCL). Come componente idrofilo viene usato di preferenza il polietilenglicole (PEG), un polietere biocompatibile (viene escreto tal quale dall'organismo umano) in grado di regolare il rapporto idrofobicità/idrofilicità degli ABCs. Nelle micelle a base di PEG la corona idrofila impartisce una buona stabilità sterica al sistema grazie al fatto che le interazioni tra le zone idrofobiche di particelle adiacenti risultano fortemente limitate. I sistemi con un'alta densità di catene di PEO in superficie, minimizzando l'adsorbimento di proteine quindi la lunghezza



dei blocchi di PEO influenza il tempo di circolazione e l'uptake da parte del RES

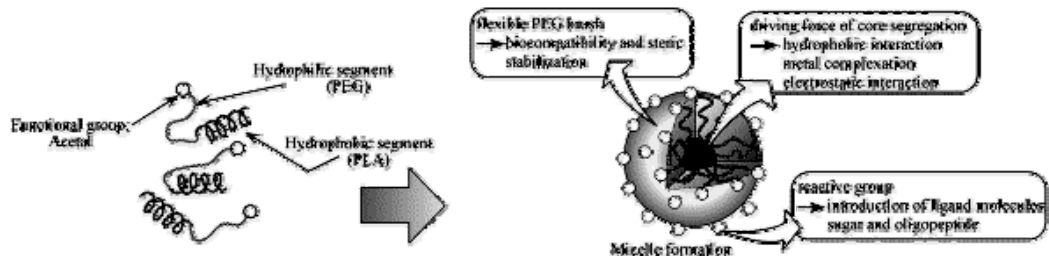


Figura 2.2: rappresentazione schematica del processo di micellizzazione

Studi di micellizzazione (in collaborazione con il Dipartimento di Farmacia e Tossicologia della facoltà di Farmacia della Università di Napoli ‘Federico II’)<sup>[8,9,10]</sup>, condotti su copolimeri a blocchi PCL-PEO a diversa architettura, lineare ed a stella, sintetizzati in precedenza nell’ambito del gruppo di ricerca presso cui ho svolto il lavoro di tesi, hanno confermato la naturale tendenza di questi sistemi costituiti da blocchi idrofilici di PEO ed idrofobici di PCL ad autoaggregarsi in ambiente acquoso dando vita a strutture ordinate di tipo “core-shell” di dimensioni nanoscopiche e, prevalentemente, di forma sferica. Non sono stati, inoltre, osservati per questi sistemi fenomeni di emolisi e di tossicità nei confronti di cellule sane. Si è riscontrato, invece, che la distribuzione delle catene di PEO sulla superficie delle micelle influenza l’internalizzazione cellulare.

## **2.2 Obiettivi**

E' ben noto dalla letteratura che i parametri che possono maggiormente incidere sui processi di micellizzazione, sulle dimensioni delle nanoparticelle e sulla CMC, a parità di natura chimica dei blocchi, sono: la composizione del copolimero, la lunghezza dei due blocchi, idrofilici e idrofobici, e l'architettura del copolimero. In un contesto più ampio, lo studio delle relazioni tra architettura e proprietà di biomateriali e biopolimeri, è attualmente uno degli argomenti di ricerca di ampio interesse nel campo biomedico.<sup>[11]</sup>

Lo scopo di questa parte del lavoro di tesi è stato quello di mettere a punto strategie di sintesi di poli(eter-esteri) a blocchi, tipicamente PCL-*b*-PEO, idonee a controllare parametri quali architettura, composizione e rapporto idrofobicità/idrofilicità. Lo studio dei diversi sistemi consente di determinare le caratteristiche strutturali in grado di ottimizzare la formazione di strutture di tipo "core/shell" costituite da un "core" di poliestere biodegradabile (PCL) e da uno "shell" idrofilo di PEO. Lo studio di nanoparticelle ottenute a partire da questi copolimeri ed il rilascio di sostanze bioattive è stato condotto in collaborazione con il gruppo di ricerca del Dip. di Chimica Farmaceutica e Tossicologica dell'Università di Napoli ' Federico II.

La componente esterea è costituita da segmenti di PCL aventi pesi molecolari variabili (4.0, 8.0, 12.0 KDa), mentre la componente eterea è costituita unicamente da segmenti di PEO di peso molecolare 2.0 KDa. In tal modo è stato possibile preparare sia copolimeri che, a parità di architettura, presentano composizione variabile, sia copolimeri che, a parità di composizione, hanno diversa architettura, al fine di investigare

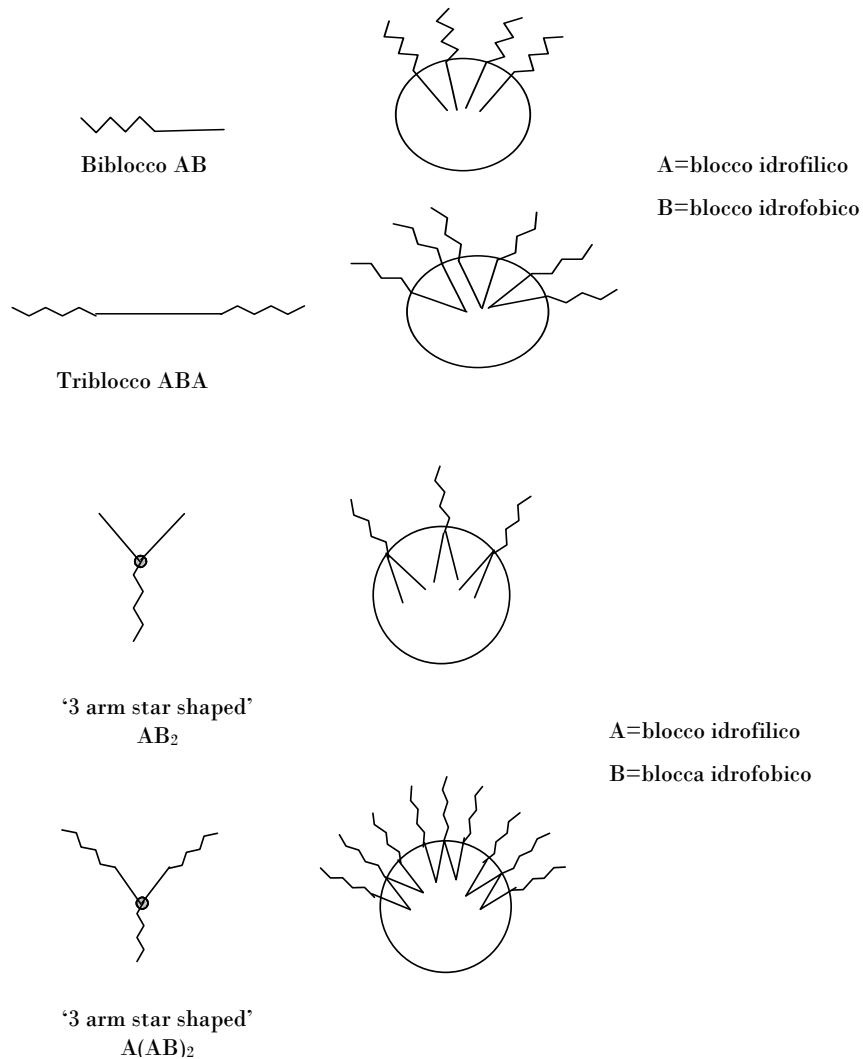
l'influenza che composizione e architettura esercitano sulla capacità di autoassemblaggio e di micellizzazione dei copolimeri.

Indicando con B il segmento PCL e con A il segmento PEO, è possibile raggruppare le architetture progettate in due classi:

1. lineare: diblocco AB, triblocco ABA

2. ramificata a stella: 3-arm star-shaped  $AB_2$  e  $A(BA)_2$

Le diverse architetture progettate sono rappresentate nella figura 2.3



**Figura 2.3:** architetture progettate e corrispondenti modelli ideali di micellizzazione ; ( $A=mPEO_{2k}$ ,  $B=PCL$ ).

## **2.3. Risultati e discussioni**

### **2.3.1 Strategie per l'ottenimento di copolimeri a struttura altamente regolare**

Come ampiamente riportato in letteratura, la tecnica più semplice utilizzata per la sintesi del PCL lineare è la polimerizzazione in massa per apertura dell'anello (ROP) del CL ad opera di un gruppo alcolico in presenza di  $\text{Sn}(\text{oct})_2$ . Il peso molecolare del PCL dipende dalla quantità di monomero introdotto rispetto all'iniziatore<sup>[12]</sup>. Studi recenti concordano nel ritenere che lo  $\text{Sn}(\text{oct})_2$  non sia l'effettivo catalizzatore, ma che tale funzione sia espletata da uno stagno(alcoossido) che si forma mediante reazione di interscambio tra i gruppi etilesanoato e i gruppi  $-\text{OH}$  dell'alcol. La polimerizzazione avviene per inserzione di molecole di CL nel legame metallo-ossigeno e presenta le tipiche caratteristiche di una polimerizzazione vivente<sup>[13,14]</sup>.

Oltre che ad opera del gruppo  $-\text{OH}$ , l'apertura dell'anello di CL può avvenire anche ad opera di gruppi  $-\text{NH}_2$  di una diammina alifatica in condizioni più blande e in assenza di catalizzatore. In tal modo si ha la formazione di una diammid-diolo che, solo dopo l'aggiunta di un catalizzatore, fungerà da iniziatore per la reazione di polimerizzazione con conseguente crescita del segmento di PCL.

Per i copolimeri ad architettura ramificata, in particolare, è stata messa a punto, una procedura di sintesi innovativa che prevede la crescita dei segmenti del PCL mediante ROP iniziata da gruppi  $-\text{NH}_2$  di una macromolecola preparata 'ad hoc' perché possa fungere da template per le diverse architetture progettate. Questo nuovo metodo di sintesi, permette di modulare con molta facilità la lunghezza del segmento

poliestereo e di conseguenza di controllare la composizione e l'architettura dei copolimeri.

La preparazione di copolimeri a blocchi con architetture complesse richiede una elevata regolarità strutturale e purezza in vista delle possibili applicazioni nei settori farmaceutico e biomedico.

Si ritiene che un significativo miglioramento in tal senso possa essere ottenuto mediante un'attenta scelta e purificazione dei macromerici utilizzati nelle reazioni di ROP del CL e di "coupling" tra macromerici. In particolare, sono stati affrontati i problemi di purificazione del  $\alpha$ -metil, $\omega$ -idrossi-poli(etilenossido) (*mPEO-OH*), e della sintesi di un poliossietilene con gruppi amminici terminali,  $\alpha$ -metossi- $\omega$ -ammino-poli(etilenossido) (*mPEO-NH<sub>2</sub>*).

*a) Purificazione del  $\alpha$ -metil, $\omega$ -idrossi-poli(etilenossido) (*mPEO-OH*)*

Nei *mPEO* commerciali sono presenti quantità non trascurabili di macromolecole di-funzionali come OH-PEO-OH (3-5%). La presenza di PEO difunzionali può portare alla formazione di strutture complesse e indesiderate laddove il metodo di sintesi (coupling e ROP) contempla la presenza di un unico gruppo alcolico.

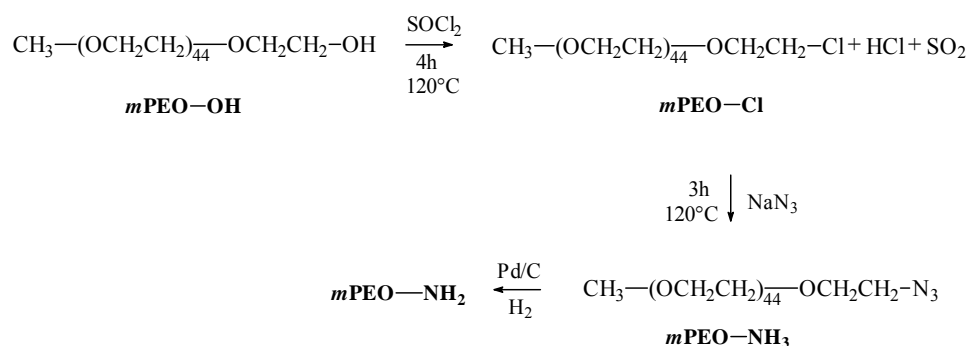
Per ovviare a tali inconvenienti si è messa a punto una procedura di purificazione del *mPEO* attraverso una cromatografia su colonna di silice (impaccata in CH<sub>3</sub>Cl con caricamento a secco del prodotto) eluita con una miscela di CH<sub>3</sub>Cl/MeOH aumentando gradualmente la percentuale in volume di MeOH (3%, 6%, 9%, 12%). Le frazioni sono state analizzate mediante cromatografia su strato sottile in CH<sub>3</sub>Cl/MeOH (1.2/0.8 v/v); la frazione contenente *mPEO* purificato mostra un valore di R<sub>f</sub>=0.28 mentre la frazione contenente OH-PEO-OH mostra un valore di

$R_f=0.16$ . Il prodotto è stato ulteriormente purificato mediante precipitazione in esano (resa 73%)<sup>[15]</sup>.

*b) Preparazione del  $\alpha$ -metossi- $\omega$ -ammino-poli(etilenossido) ( $mPEO-NH_2$ )*

L'utilizzo di  $mPEO-NH_2$  nei processi di coupling consente sia un più elevato grado di reazione, in virtù della più elevata reattività verso il gruppo carbossilico delle ammine primarie rispetto agli alcoli, sia la formazione di legami ammidici molto più stabili di legami di tipo estereo. A tale scopo è stata cambiata la funzionalità del gruppo terminale del  $mPEO$  commerciale da  $-OH$  in  $-NH_2$  <sup>[16,17]</sup>.

La sintesi del macromero  $mPEG-NH_2$  è stata condotta seguendo una strategia sintetica che ha previsto tre stadi. Inizialmente  $mPEG-OH$  è stato trasformato in  $mPEO-Cl$  per reazione con cloruro di tionile, in modo da avere un buon gruppo uscente come il cloro quale terminale di catena. In seguito, per trattamento con eccesso di sodio azide si è introdotta la funzione azotata mediante una reazione di sostituzione nucleofila. L'azide è stata successivamente ridotta ad ammina per idrogenazione in presenza di palladio su carbone attivo. Di seguito si riporta lo schema di reazione dei tre passaggi effettuati nel corso della sintesi (figura 2.4).



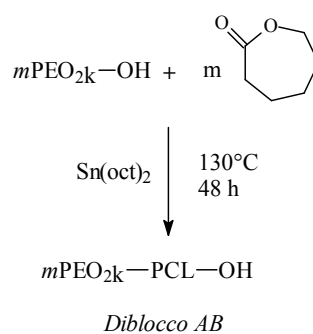
**Figura 2.4:** schema di sintesi del  $mPEO-NH_2$

Gli spettri  $^1\text{H-NMR}$  non consentono di osservare i segnali caratteristici dei protoni vicini ai gruppi funzionali d'interesse, in quanto il segnale risulta essere troppo debole e facilmente confondibile con il rumore di fondo. Pertanto è stato necessario ricorrere alla spettroscopia IR la quale ha consentito di rilevare la presenza (o assenza) delle caratteristiche bande di assorbimento dovute allo stretching C-Cl, N=N e C-N, consentendo in tal modo di seguire l'andamento delle reazioni.

### 2.3.2 Copolimeri ad architettura lineare

#### Copolimeri lineari diblocco AB

Nella fase di avvio del lavoro i copolimeri diblocco sono stati preparati mediante polimerizzazione in massa per apertura dell'anello di  $\epsilon$ -caprolattone (ROP) iniziata da  $\alpha$ -metil, $\omega$ -idrossi-poli(etilenossido) di peso molecolare 2.0 kDa (mPEO-OH) secondo il seguente schema (figura 2.5):



**Figura 2.5:** schema di sintesi del copolimero lineare diblocco

La sintesi è stata condotta in massa per 48 h a  $120^\circ\text{C}$  facendo reagire  $\epsilon$ -caprolattone(CL) e mPEO-OH in presenza di  $\text{Sn(oct)}_2$  aggiunto in soluzione di CL (  $\text{Sn(oct)}_2$  /OH in rapporto molare di 1:100).

Il peso molecolare del PCL dipende dal rapporto molare  $\epsilon$ -CL/iniziatore (mPEO-OH). Nel caso di bassi pesi molecolari è stato

utilizzato un eccesso di CL del 10% rispetto al peso molecolare programmato per bilanciare la non completa conversione del monomero. Il prodotto è stato purificato mediante precipitazione in etere ed ottenuto con una resa del 98%.

Con questa procedura sono stati sintetizzati copolimeri lineari con segmenti di PCL di peso molecolare 4.0 e 8.0 KDa, la cui composizione, in termini di rapporto in peso PCL/PEO, risulta essere rispettivamente 2/1 e 4/1. In particolare, il copolimero  $m\text{PEO}_{2\text{K}}\text{-PCL}_{8\text{K}}$  è stato anche utilizzato come precursore del triblocco  $m\text{PEO}_{2\text{k}}\text{-PCL}_{8\text{k}}\text{-PEO}_{m2\text{k}}$ .

I dati di caratterizzazione molecolare, viscosimetrica e termica relativi ai copolimeri sintetizzati sono riportati in seguito nella trattazione delle caratteristiche dei polimeri (tabella 2.1).

L'analisi  $^1\text{H-NMR}$  è stata utilizzata per confermare la struttura chimica del copolimero e per valutare il peso molecolare medio numerico ( $M_n$ ) del segmento poliestereo. Rapportando i valori delle integrazioni dei segnali relativi ai protoni  $-\text{CH}_2\text{-O-CO-}$  (f) del PCL ( $\delta = 4.0$ ) e  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$  (b) del PEO ( $\delta = 3.6$ ) è stato valutato il numero medio di unità di CL e si è trovato che il valore di  $M_n$  del segmento di PCL è quasi coincidente, nei limiti dell'errore sperimentale, con quello progettato (figura 2.6).



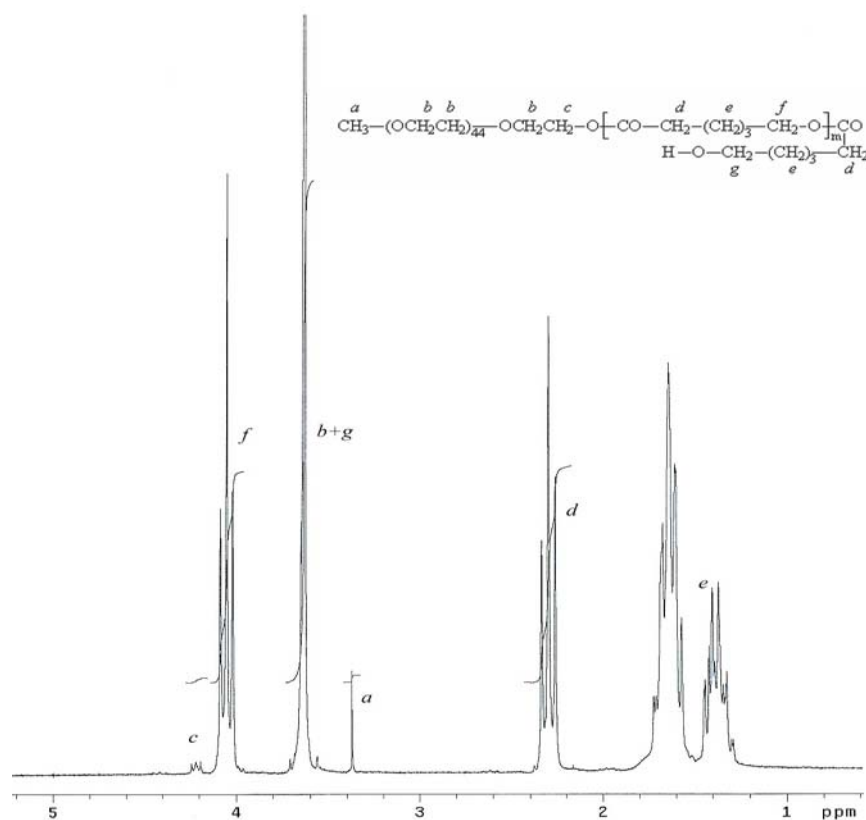
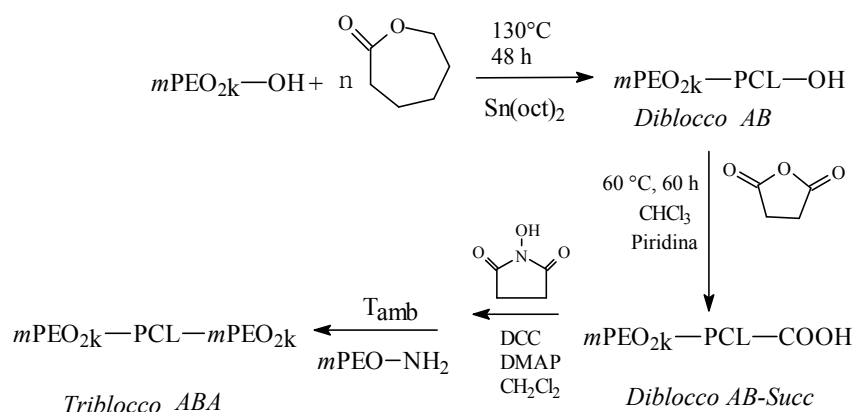


Figura 2.6: spettro  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del copolimero  $m\text{PEO}_{2k}-\text{PCL}_{4k}$

### Copolimero lineari triblocco ABA

Il copolimero triblocco è stato ottenuto mediante condensazione del copolimero diblocco  $m\text{PEO}_{2k}-\text{PCL}_{8k}-\text{OH}$  con macromeri di  $m\text{PEO}-\text{NH}_2$  di peso molecolare 2.0 KDa preparato secondo il metodo di sintesi sopra descritto. Si ottiene, in questo modo un copolimero lineare con un rapporto PCL/PEO pari a 2/1 (composizione che sarà costante anche nei copolimeri ad architettura ramificata descritti più avanti). La procedure di sintesi è rappresentata nella figura 2.7 e prevede due stadi:



**Figura 2.7:** schema di sintesi del copolimero lineare triblocco

**Primo stadio:** la funzionalità del diblocco di partenza è stata cambiata da  $-\text{OH}$  a  $-\text{COOH}$  mediante reazione con anidride succinica. La reazione è condotta per 60 h a temperatura ambiente, in cloroformio ed in presenza di un catalizzatore (piridina). E' stato scelto un rapporto molare gruppi  $-\text{OH}$  /anidride succinica di 1:3 allo scopo di far decorrere la reazione di funzionalizzazione in presenza di un eccesso di anidride succinica. L'uso di anidride succinica, quale reattivo funzionalizzante, è risultato vantaggioso in quanto l'eccesso impiegato nella reazione può essere facilmente allontanato per estrazione della soluzione cloroformica con  $\text{H}_2\text{O}$  debolmente acida (tale operazione consente anche l'eliminazione della piridina).

La struttura chimica e il grado di purezza dei prodotti sintetizzati sono stati confermati mediante spettroscopia  $^1\text{H-NMR}$ , prendendo come riferimento lo spettro  $^1\text{H-NMR}$  del diblocco di partenza utilizzato (figura 2.6). In effetti si osserva la comparsa dei segnali a  $\delta=2.62$ , relativi ai protoni  $-\text{OCOCH}_2\text{CH}_2\text{COO}-$  (h) dell'anidride succinica. Confrontando i valori degli integrali delle risonanze dei gruppi  $-\text{CH}_2\text{OCH}_2-$  (b) del *mPEO*

e  $-\text{OCOCH}_2\text{CH}_2\text{COO}-$  (h) dell' anid.succ., rispettivamente a  $\delta=3.6-3.7$  e  $2.62$ , si è può concludere che la reazione di succinazione è pressoché completa (90%).

Secondo stadio: Il copolimero diblocco  $\text{PEO}_{2k}\text{-PCL}_{8k}\text{-COOH}$  così ottenuto, previa attivazione del gruppo carbossilico con N-idrossi-succinimide (NHS), è stato condensato con il macromero  $m\text{PEG-NH}_2$  (rapporto molare 1:1) . È ampiamente documentato in letteratura che la resa di una reazione di condensazione tra un gruppo amminico ed un gruppo carbossilico aumenta se il gruppo carbossilico viene prima attivato con N-idrossisuccinimide ( NHS )<sup>[18]</sup>.

La sintesi è stata condotta a temperatura ambiente, aggiungendo alla soluzione del copolimero diblocco in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  l'attivatore del gruppo carbossilico, NHS, sciolto nello stesso solvente in presenza di DCC e DMAP, utilizzando un rapporto molare NHS/gruppi  $-\text{COOH}$  1:3 rispetto al rapporto stechiometrico; successivamente (dopo 24 ore) è stata aggiunta una soluzione di  $m\text{PEG}_{2k}\text{-NH}_2$  sciolto in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  utilizzando un eccesso del 5% per favorire una maggiore conversione del copolimero PCL-PEG diblocco. La diisopropilurea formatasi, viene allontanata per filtrazione della miscela di reazione. L'eccesso di prodotti non reagiti viene allontanato mediante precipitazione in un miscela 5:3 etere/MeOH. Il prodotto è stato ottenuto con una resa del 88%.

Nella tabella 2.1 si riportano i dati di caratterizzazione del copolimero.

L'analisi  $^1\text{H-NMR}$  ha confermato la struttura progettata dei copolimeri (figura 2.8). La formazione del triblocco è stata confermata dalla presenza del segnale a  $\delta = 3.46$  relativo ai protoni metilenici del gruppo  $-\text{CH}_2\text{-NH-CO-CH}_2-$  di giunzione tra il diblocco ed il segmento di *m*PEO. Il rapporto dei valori degli integrali delle risonanze dei gruppi  $-\text{CH}_2\text{-OCO-}$  del PCL a  $\delta = 4.05$  con quelli delle risonanze dei gruppi  $-\text{CH}_2\text{OCH}_2-$  o  $\text{CH}_3\text{O-}$  del *m*PEO, a  $\delta = 3.6-3.7$  e a  $\delta = 3.36$ , ha indicato che il grado di reazione è pari al 70%.

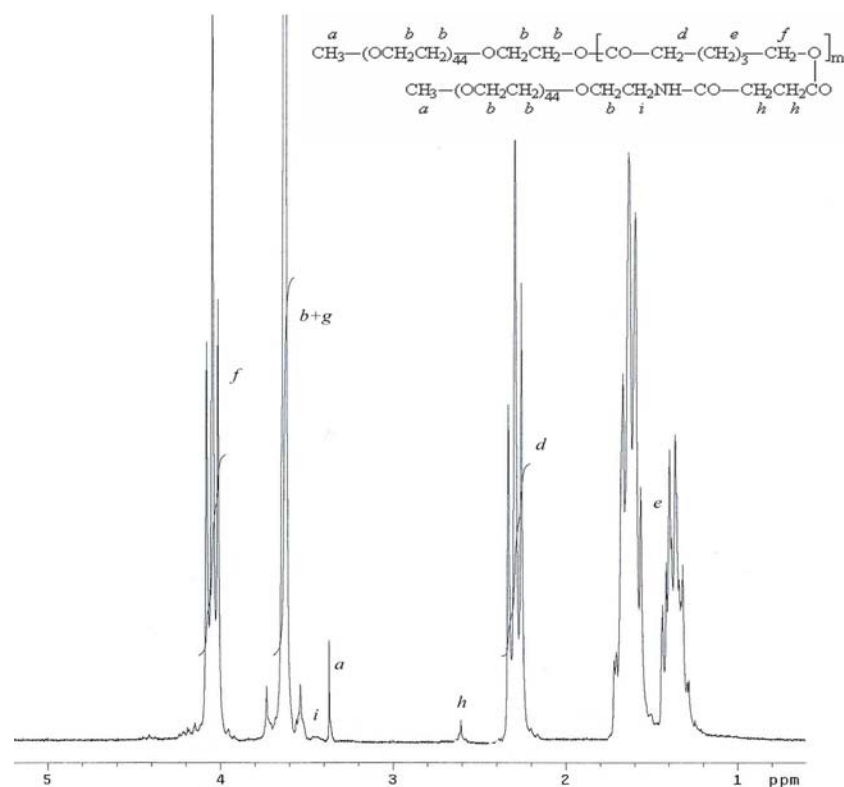


Figura 2.8:  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del copolimero  $\text{PEO}_{2k}\text{-PCL}_{8k}\text{-PEO}_{2k}$

### 2.3.3 Copolimeri ad architettura ramificata

Le architettura progettate prevedono due segmenti di PCL, oppure segmenti di PCL-PEO, ed un segmento di PEO che si originano da un singolo “centro”, ed è indicata in letteratura come “miktoarm star-block

copolymer”<sup>[19]</sup> per distinguerla da quella dei copolimeri a stella nei quali tutti i rami hanno la stessa struttura. Pertanto, è stata utilizzata come “centro” una molecola, come la  $N_{\alpha}$ - $N_{\epsilon}$ -di-Z-Lisina, che contiene gruppi funzionali di diversa natura che possono reagire in sequenza. Inizialmente, il gruppo carbossilico sul  $C_{\alpha}$  della  $N_{\alpha}$ , $N_{\epsilon}$ -di-Z-Lys è stato utilizzato in una reazione di coupling con  $\alpha$ -metossi- $\omega$ -amminopoli(etileneossido) ( $m$ PEO-NH<sub>2</sub>) con formazione di  $N_{\alpha}$ , $N_{\epsilon}$ -di-Z-Lys-CONH-PEO<sub>*m*</sub> che, dopo deprotezione dei gruppi amminici mediante idrogenazione catalitica, è stata impiegato come macroiniziatore per la ROP dell’  $\epsilon$ -CL. Di seguito è riportato uno schema descrittivo della strategia di sintesi impiegata (figura 2.9)

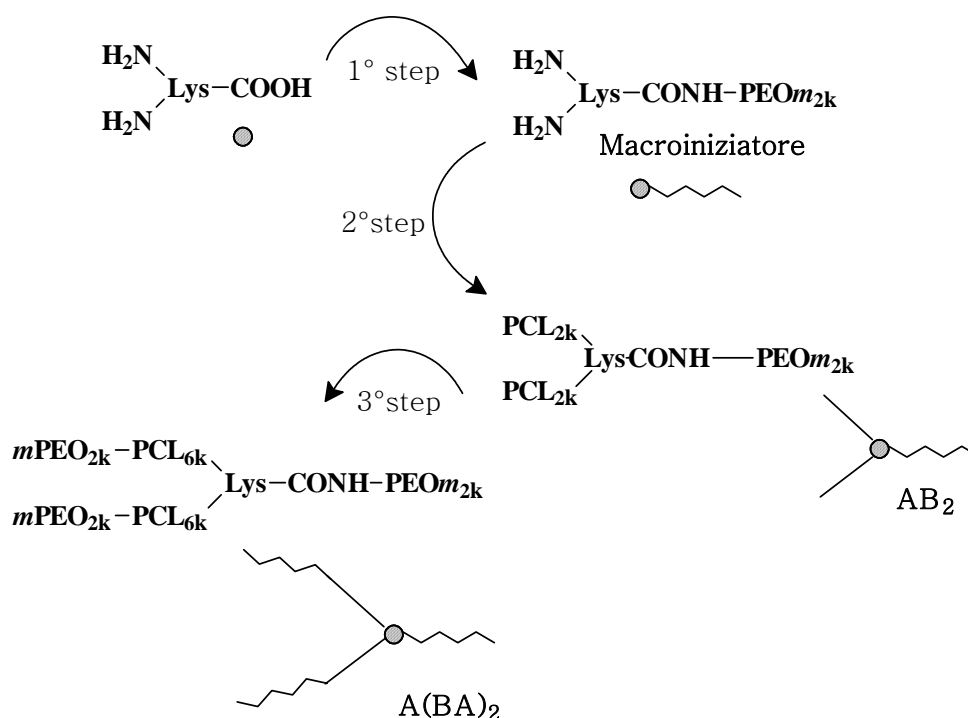
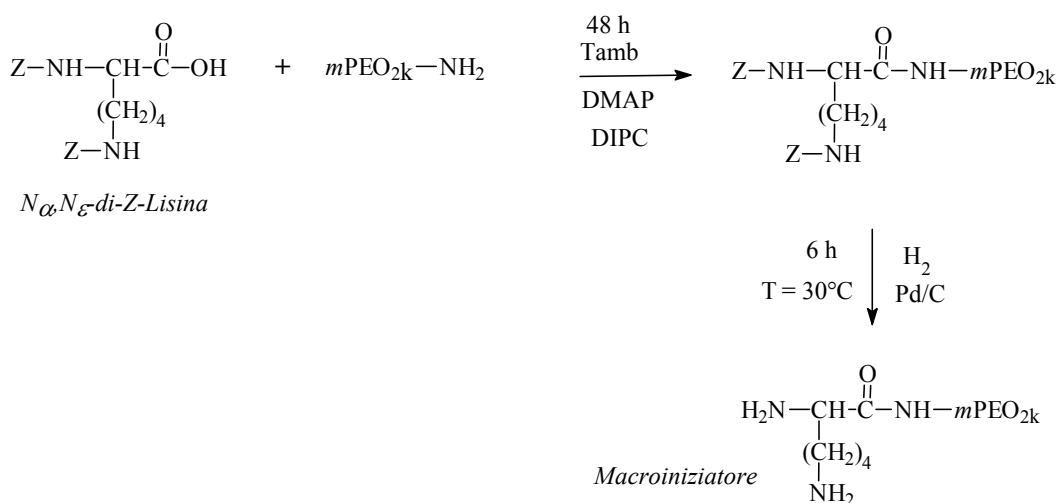


Figura 2.9: schema descrittivo per la sintesi di copolimeri ad architettura variabile

### Sintesi del macroiniziatore Lys-PEOm

Il macroiniziatore è stato ottenuto mediante una procedura a due stadi. Il primo stadio consiste nella reazione di coupling del gruppo carbossilico della  $N_{\alpha},N_{\epsilon}$ -di-Z-Lys con il gruppo amminico del  $m$ PEO-NH<sub>2</sub> ( $M_n$  2.0 KDa) utilizzando la N-idrossisuccinimide (NHS) come attivatore del gruppo carbossilico. E' opportuno evidenziare che si è utilizzato un eccesso del 5% della  $N_{\alpha},N_{\epsilon}$ -di-Z-Lys rispetto al rapporto stechiometrico, per diminuire la probabilità che, alla fine della reazione, rimangano catene  $m$ PEO-NH<sub>2</sub> non reagite che sono difficili da separare dal prodotto di reazione. Il prodotto è stato purificato dall' eccesso di  $N_{\alpha},N_{\epsilon}$ -di-Z-Lys mediante processi di estrazione H<sub>2</sub>O/CHCl<sub>3</sub>. Si è ottenuto un prodotto con un grado di coupling pari all' 84% con una resa dell' 80%; la frazione di  $m$ PEO-NH<sub>2</sub> non reagita è stata eliminata mediante cromatografia su colonna. Dopo rimozione dei gruppi protettori benzilossicarbonile (Z), mediante idrogenazione catalitica, il prodotto è stato impiegato come macroiniziatore della ROP del CL tramite i gruppi amminici liberi della Lys. Di seguito si riporta lo schema di reazione (figura 2.10):



**Figura 2.10:** schema di sintesi del macroiniziatore Lys-PEOm

La struttura chimica ed il grado di purezza del prodotto sintetizzato sono stati confermati dalla spettroscopia  $^1\text{H-NMR}$  prendendo come riferimento gli spettri del  $m\text{PEO-NH}_2$  e della  $\text{N}_\alpha, \text{N}_\varepsilon\text{-di-Z-Lys}$ . Nello spettro del  $\text{N}_\alpha, \text{N}_\varepsilon\text{-di-Z-Lys-PEO}$  (vedi figura 2.11) si osserva la comparsa del segnale a  $\delta=3.40$  relativo ai protoni  $-\text{CH}_2\text{-NH-CO-}$  (i) del  $m\text{PEO}$  che dimostra l'avvenuta reazione di coupling.

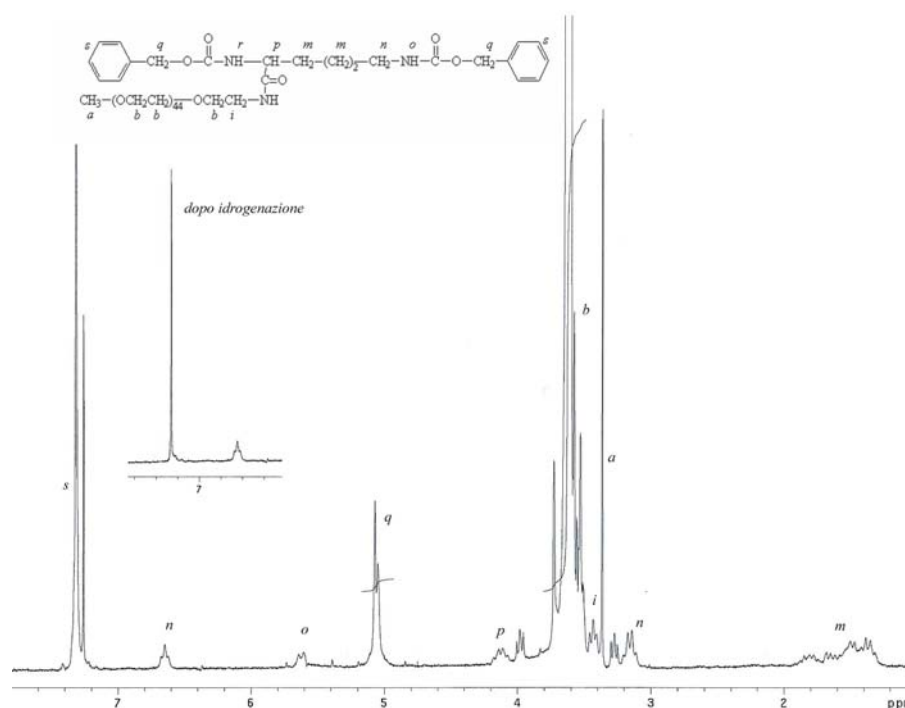


Figura 2.11 : spettro  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) di  $\text{N}_\alpha, \text{N}_\varepsilon\text{-di-Z-Lys-PEO}_{2k}$

Confrontando, inoltre, i valori degli integrali delle risonanze  $-\text{CH}_2\text{OCH}_2-$  (b) del  $m\text{PEO}$  con i  $-\text{CH}$  (s) aromatici del gruppo  $-\text{Z}$  della  $\text{N}_\alpha, \text{N}_\varepsilon\text{-di-Z-Lys}$ , rispettivamente a  $\delta=3.6\text{-}3.8$  e  $\delta=7.35$ , si può concludere che il prodotto è quello atteso. La deprotezione dei gruppi amminici (l'allontanamento del gruppo Z) è stata effettuata mediante un'idrogenazione catalitica in presenza di Pd/C. Nel riquadro in alto della

figura 2.11 si osserva l'assenza dei segnali tipici del gruppo protettore -Z relativi al gruppo benzile -CH<sub>2</sub>-Ø a δ=5.1 e δ=7.4.

### Sintesi dei copolimeri a stella AB<sub>2</sub>

I copolimeri del tipo AB<sub>2</sub> sono stati preparati mediante polimerizzazione in massa per apertura dell'anello di ε-caprolattone (ROP) iniziata dalla macromolecola Lys-PEO<sub>m</sub> progettata e sintetizzata 'ad hoc' per l'ottenimento delle architettura ramificata a 3 braccia . La reazione è stata condotta in due stadi; nel primo stadio, condotto per 24h a 80°C, il macromero Lys-PEO<sub>m</sub> per apertura dell' anello del CL forma l'addotto (l'ammide-diolo) che nello stadio successivo a 120° e con l'aggiunta del catalizzatore ( Sn(oct)<sub>2</sub> /OH in rapporto molare di 1:100) funge da iniziatore della reazione di polimerizzazione per crescita del segmento del PCL. Lo schema di reazione è di seguito riportato (figura 2.12):

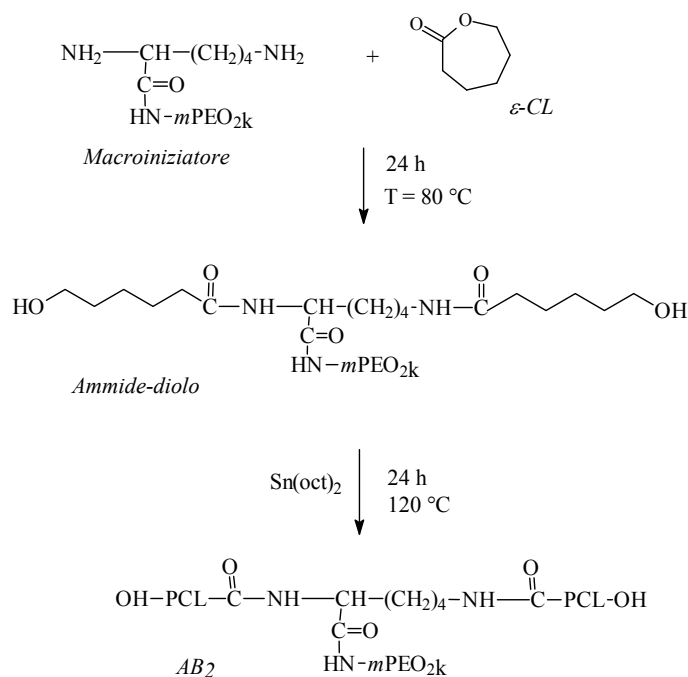


Figura 2.12 :schema di sintesi del copolimero AB<sub>2</sub>

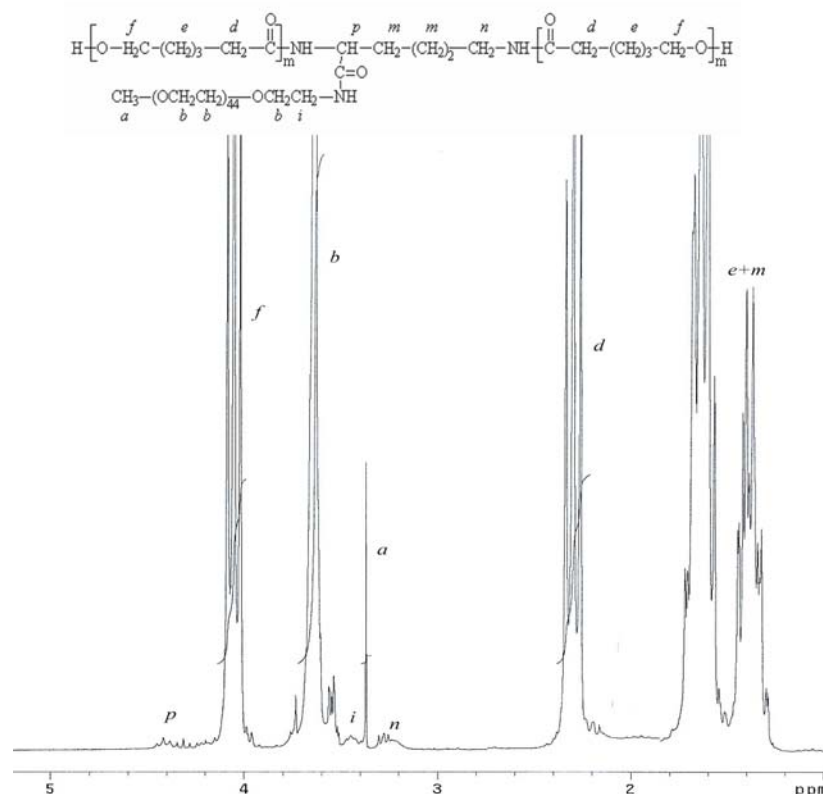


In metodo di sintesi che prevede l' utilizzo del macroiniziatore Lys-PEO<sub>m</sub>, iniziatore nella polimerizzazione dell'  $\epsilon$ -caprolattone, ha consentito di modulare la lunghezza dei segmenti esterei e, di conseguenza, la struttura del polimero, realizzando in questo modo, un copolimero ad architettura e composizione controllata.

Con questa procedura, sono stati sintetizzati copolimeri del tipo AB<sub>2</sub> con diverse lunghezze dei segmenti di PCL, precisamente PEO<sub>2k</sub>-Lys-(PCL<sub>2k</sub>)<sub>2</sub> e PEO<sub>2k</sub>-Lys-(PCL<sub>6k</sub>)<sub>2</sub>. la cui composizione, in termini di rapporto in peso PCL/PEO, risulta essere rispettivamente 2/1 e 6/1. In particolare, il copolimero PEO<sub>2k</sub>-Lys-(PCL<sub>6k</sub>)<sub>2</sub> è stato anche utilizzato come precursore del copolimero ramificato del tipo A(BA)<sub>2</sub>.

Nella tabella 2.1 si riportano i dati di viscosità, i risultati dell' analisi SEC con l'indice di polidispersione del peso molecolare, ed i valori di conversione del monomero, di composizione dei due copolimeri sintetizzati e del peso molecolare medio numerico, M<sub>n</sub>.

L'analisi <sup>1</sup>H-NMR (figura 2.13) ha confermato la struttura chimica del copolimero ed il numero medio di unità di CL in catena trovato sperimentalmente coincide con quello progettato. I valori di M<sub>n</sub> relativi ai segmenti di PCL sono stati valutati rapportando i valori dell'integrazione dei segnali relativi ai protoni -CH<sub>2</sub>-O-CO- (f) del PCL ( $\delta = 4.0$ ) e -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O- (b) del PEO ( $\delta = 3.6$ ).

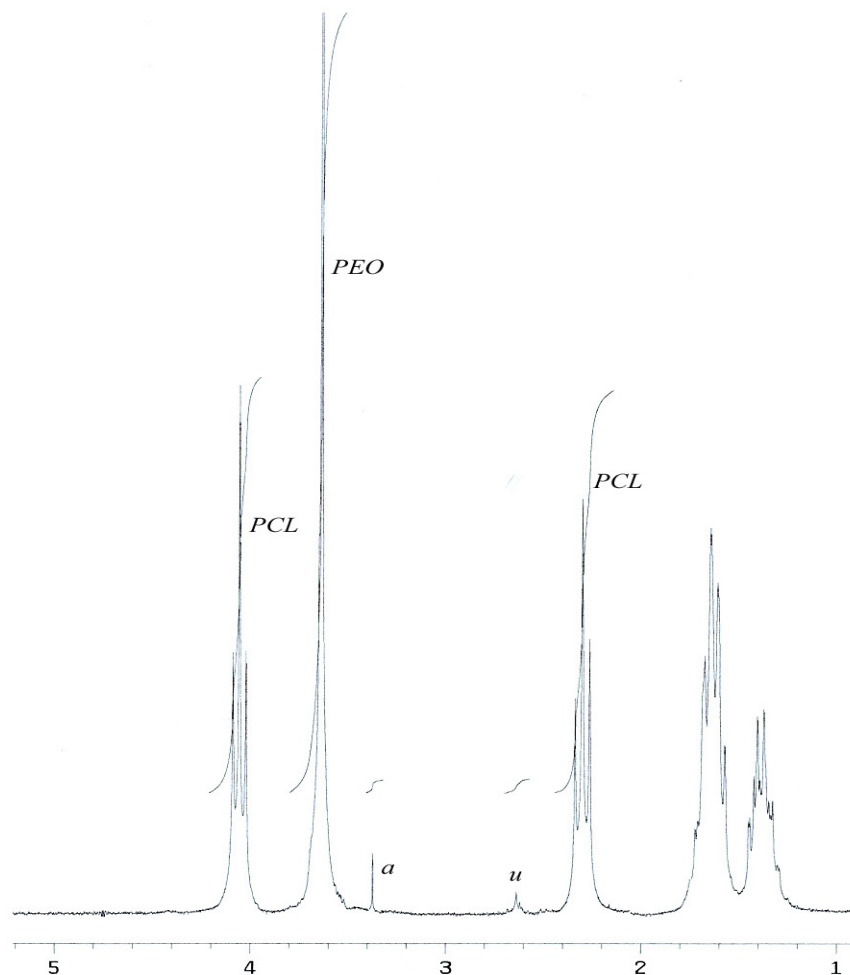
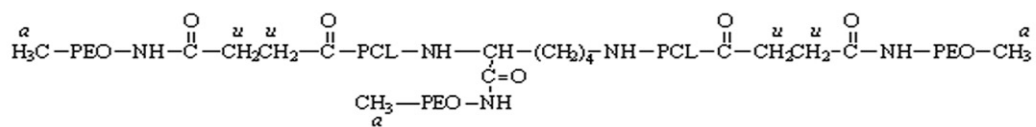


**Figura 2.13:** spettro  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\text{AB}_2$  [ $\text{PEO}_{2k}\text{-Lys}(\text{PCL}_{2k})_2$ ]

### *Sintesi e caratterizzazione del copolimero $A(\text{BA})_2$*

Il copolimero è stato preparato mediante una reazione di condensazione tra i gruppi terminali del copolimero a stella  $\text{AB}_2$ ,  $\text{PEO}_{2k}\text{-Lys}(\text{PCL}_{6k})_2$  (rapporto molare  $\text{PCL/PEO} = 6/1$ ) precedentemente preparato e il gruppo amminico del  $m\text{PEO}_{2k}\text{-NH}_2$ . La procedura seguita è la stessa usata nel coupling tra il copolimero diblocco lineare con  $m\text{PEO}_{2k}\text{-NH}_2$  per l'ottenimento del copolimero triblocco lineare. In un primo stadio, mediante reazione con anidride succinica, le catene del PCL sono state funzionalizzate con gruppi carbossilici terminali (grado di reazione 94%) successivamente attivati con NHS. Il copolimero  $\text{AB}_2$  funzionalizzato è stato condensato con il macromero  $m\text{PEO}_{2k}\text{-NH}_2$ .





**Figura 2.15:** spettro  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) di  $A(\text{BA})_2$  [ $\text{PEO}_{2k}\text{-Lys-}(\text{PCL}_{6k}\text{-PEO}_{2k})_2$ ]

### 2.3.4 Caratterizzazione molecolare e viscosimetrica

Nella tabella 2.1 si riportano i dati di viscosità e i dati di caratterizzazione molecolare dei copolimeri sintetizzati, come il peso molecolare medio numerico determinato mediante  $^1\text{H-NMR}$  e SEC e

l'indice di polidispersione. Viene anche riportata la percentuale di PCL nel copolimero calcolata usando i dati NMR.

**Tabella 2.1:** caratterizzazione dei copolimeri sintetizzati ( $A=PEO$ ,  $B=PCL$ )

Copolimeri	PCL (% in peso)	$M_n$ copolimero (KDa)			$^4) ID$	$^5) \eta_{inh}$ (dL/g)	
		$^1) M_n$	$^2) M_n$	$^3) M_n$			
<i>lineari</i>	$A_{2k}B_{4k}$	68	6.4	6.3	10.9	1.16	0.28
	$A_{2k}B_{8k}$	81	10.4	10.3	14.1	1.15	0.33
	$A_{2k}B_{8k}A_{2k}$	66	12.3	11.7	17.0	1.27	0.38
<i>ramificati</i>	$A_{2k}(B_{2k})_2$	68	6.3	6.2	7.9	1.48	0.18
	$A_{2k}(B_{6k})_2$	86	14.8	14.4	16.5	1.64	0.30
	$A_{2k}(B_{6k}A_{2k})_2$	66	18.4	17.9	19.6	1.48	0.36

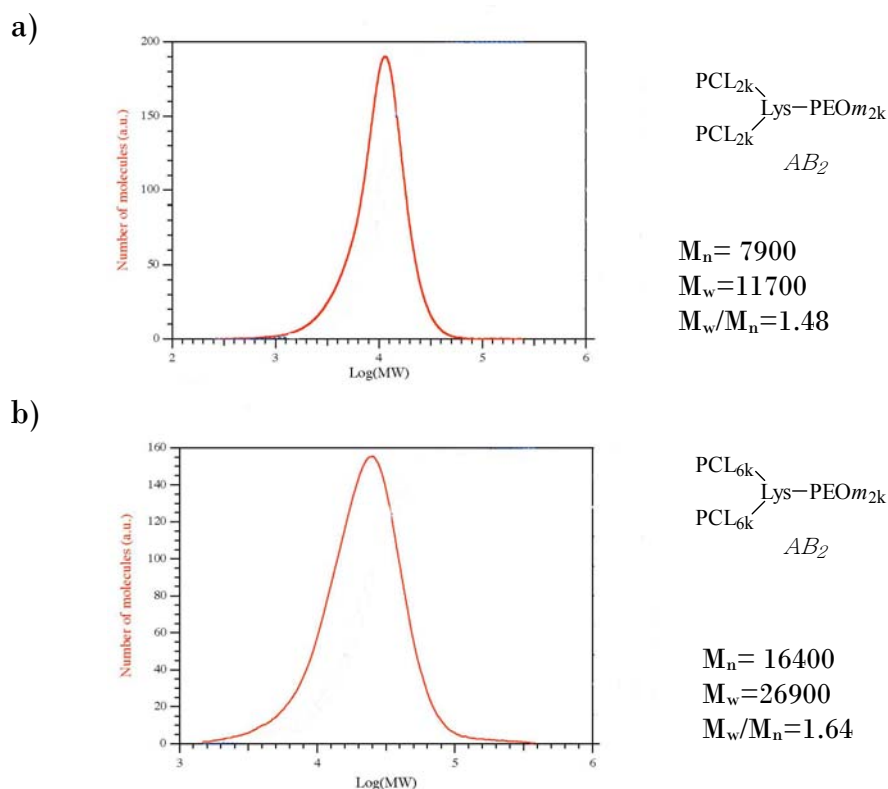
<sup>1)</sup> Peso molecolare medio teorico del copolimero; <sup>2)</sup> Peso molecolare medio del copolimero calcolato dall'analisi  $^1H$ -NMR; <sup>3)</sup> Peso molecolare medio del copolimero determinato mediante analisi SEC; <sup>4)</sup> Indice di polidispersione determinato mediante analisi SEC; <sup>5)</sup> Viscosità inerenti in  $CHCl_3$  ( $C = 05$  g/dL) a  $25^\circ C$ .

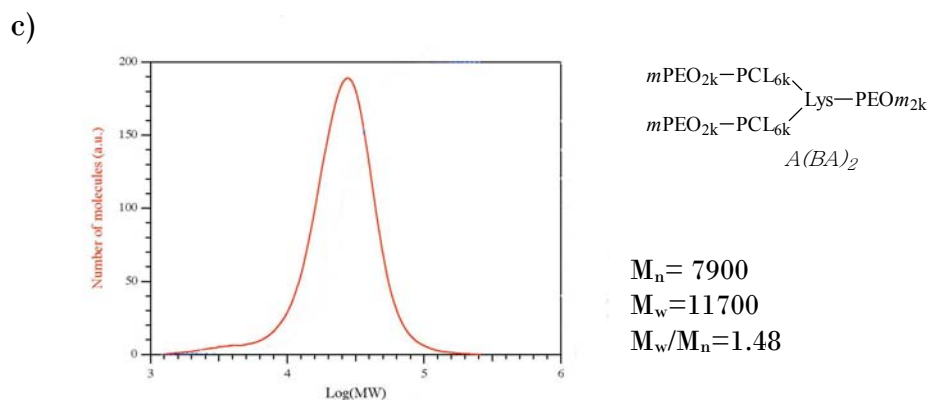
I valori di  $\eta_{inh}$  sono compatibili con la struttura chimica e l'architettura dei copolimeri sintetizzati. In particolare i valori di viscosità relativi alle strutture lineari AB ed ramificate  $AB_2$  confrontati con quelli dei blocchi di partenza, rispettivamente  $mPEO_{2k}$  (0.13 dL/g) e Lys- $PEO_{2k}$  (0.15 dL/g), confermano l'avvenuta crescita dei blocchi del PCL. Analogamente, si può osservare un aumento della viscosità dei sistemi dopo reazione di coupling del PEO-NH<sub>2</sub> con  $A_{2k}B_{8k}$  e  $A_{2k}(B_{6k})_2$ . Si evidenzia, inoltre, come l'architettura a stella comporti viscosità inerenti inferiori rispetto a quelle dei copolimeri lineari di analogo peso molecolare medio numerico (cfr. i copolimeri  $A_{2k}B_{4k}$  e  $A_{2k}(B_{2k})_2$ .)

Il buon accordo tra i valori di peso molecolare progettati e quelli determinati mediante  $^1H$ -NMR conferma che la lunghezza dei segmenti

del PCL è pressochè uguale al valore predeterminato per la ROP e che le reazioni di coupling decorrono in maniera quasi completa. Le curve di distribuzione dei pesi molecolari hanno evidenziato distribuzioni unimodali, con un massimo a valori di PM prossimi a quelli progettati ed indici di polidispersione abbastanza bassi in accordo con un' elevata regolarità strutturale dei copolimeri. I valori di  $M_n$  ricavati da SEC sono sempre più alti di quelli ottenuti mediante  $^1\text{H-NMR}$ : ciò è dovuto alle diverse caratteristiche idrodinamiche dei nostri copolimeri rispetto agli standard di polistirene usati nell' analisi SEC, come già riportato in letteratura per sistemi analoghi [20].

A titolo di esempio si riportano le curve di distribuzione relative ai copolimeri ad architettura ramificata del tipo  $AB_2$  e del tipo  $A(BA)_2$  (fig. 2.16) che presentano valori di ID (1.48-1.64) più alti dei sistemi lineari (1.15-1.27).





**Figura 2.16:** distribuzione dei pesi molecolari dei copolimeri ad architettura ramificata

La curva di distribuzione dei pesi molecolari relativa al copolimero  $AB_2$  con segmenti più lunghi di PCL (fig. 2.16, b) risulta essere spostata verso valori più elevati di PM rispetto a quella relativa al copolimero  $AB_2$  con più corti segmenti di PCL (fig. 2.16, a). Inoltre, la distribuzione dei pesi molecolari relativa al copolimero  $A(BA)_2$  (Fig. 2.16, c) risulta unimodale e leggermente più stretta rispetto a quella del copolimero  $AB_2$  di partenza (Fig. 2.16, b). La diminuzione del valore dell'indice di polidispersione ID è probabilmente dovuta a due ragioni: in primo luogo i segmenti di PEO hanno un indice di polidispersione molto basso (prossimo ad 1) ed aumentando il peso molecolare il divario tra segmenti polimerici più corti e segmenti più lunghi diminuisce; in secondo luogo, a seguito dell'attacco del PEO vengono effettuati degli ulteriori processi di purificazione che in genere diminuiscono la frazione di macromolecole più corte. Il valore relativamente basso dell'ID indica comunque una struttura abbastanza regolare.

### **2.3.5 Caratterizzazione termica e strutturale**

Il comportamento termico dei copolimeri è stato studiato mediante DSC, seguendo un ciclo termico così programmato: riscaldamento da 0°C a 80°C, isoterma a 80°C per 5 min, raffreddamento a 0°C ed ulteriore riscaldamento a 80°C. E' stata utilizzata una bassa velocità di scansione ( $2^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ) al fine di favorire nel ciclo di raffreddamento il processo di separazione di fase dei segmenti PCL e PEO nel processo di cristallizzazione. La presenza di due componenti altamente cristallizzabili e con temperature di fusione e di cristallizzazione molto vicine, rende piuttosto complesso lo studio del comportamento termico dei copolimeri studiati. L'interpretazione dei termogrammi DSC è, tuttavia, agevolata dalla caratterizzazione strutturale effettuata mediante misure WAXS. Nella Tabella 2.2 sono riassunte le proprietà termiche e i dati relativi alla cristallinità dei copolimeri sintetizzati. Sono riportati come paragone anche i dati relativi a due omopolimeri, PEO<sub>2k</sub> e PCL<sub>8k</sub>.



**Tabella 2.2:** proprietà termiche e cristallinità dei copolimeri lineari e ramificati ( $A=PEO$ ,  $B=PCL$ )

Copolimeri	$a,b) T_m$ (°C)		$a,b) \Delta H_m$ (J/g)		$a) \Delta H_c$ (J/g)		$a) T_c$ (°C)		$c) X_c$ (%)		
	PEO	PCL	PEO	PCL	PEO	PCL	PEO	PCL	PEO	PCL	
<i>lineari</i>	$A_{2k}B_{4k}$	46.6	53.4	11.0	49.6	16.4	52.1	26.8	34.3	14	54
	$A_{2k}B_{8k}$	--	55.1	--	59.7	<5	54.3	14.0	37.9	<5	54
	$A_{2k}B_{8k}A_{2k}$	53	54.9	--	42.9	--	40.3	--	36.0	<5	48
<i>ramificati</i>	$A_{2k}(B_{2k})_2$	43.0	47.9	20.0	42.0	14.5	40.2	20.0	30.5	25	45
	$A_{2k}(B_{6k})_2$	--	56.4	--	62.1	--	59.0	--	38.8	--	52
	$A_{2k}(B_{6k}A_{2k})_2$	--	54.2	--	47.6	--	47.1	--	38.3	--	40
<i>Omopolimeri</i>	$B_{8k}$	--	58	--	82	--	78	--	41	--	74
	$A_{2k}$	51	--	141	--	139	--	32	--	67	--

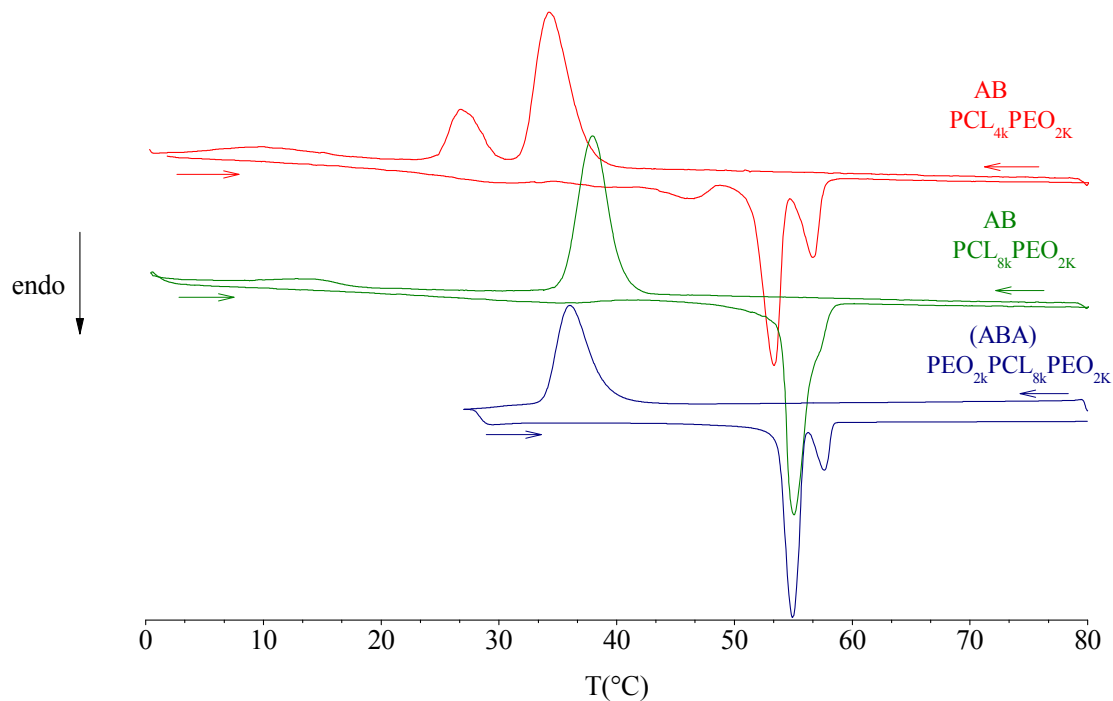
a) Misurati mediante DSC. b) valori relativi al secondo run di riscaldamento; c) Grado di cristallinità calcolata da WAXS.

Utilizzando gli spettri di diffrazione dei raggi X di omopolimeri PCL e PEO, è stato possibile determinare l'eventuale presenza d'una fase cristallina del PEO accanto a quella, sempre presente, del PCL che è il componente prevalente. In presenza di due distinte fasi cristalline, si sono anche valutati approssimativamente i valori del grado di cristallinità relativi al PCL e al PEO.

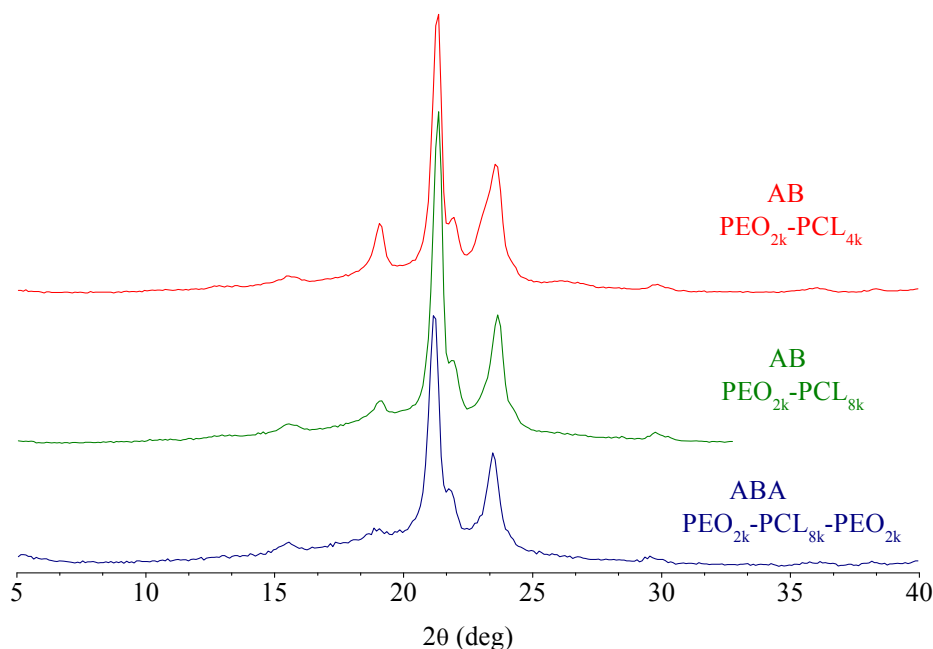
Si riportano di seguito i termogrammi relativi ai copolimeri studiati; in particolare vengono messi a confronto i termogrammi di 2<sup>a</sup> fusione e di cristallizzazione per ognuno dei copolimeri, con i relativi diffrattogrammi. Allo scopo di evidenziare la dipendenza che sul comportamento termico esercitano parametri come la lunghezza dei segmenti polimerici e l'architettura secondo la quale si dispongono, vengono paragonati tra di loro innanzitutto i copolimeri lineari (nei quali

il fattore fondamentale è la lunghezza dei blocchi), successivamente i copolimeri ramificati (nei quali un ruolo molto importante è svolto anche dall'architettura).

I termogrammi ed i diffrattogrammi dei copolimeri lineari di tipo AB e ABA, sono riportati nelle figure 2.17 e 2.18.



**Figura 2.17:** termogrammi di cristallizzazione e 2° fusione relativi ai copolimeri  $PEO_{2k}$ - $PCL_{4k}$  (AB) (curva rossa),  $PEO_{2k}$ - $PCL_{8k}$  (AB) (curva verde),  $PEO_{2k}$ - $PCL_{8k}$ - $PEO_{2k}$  (ABA) (curva blu).

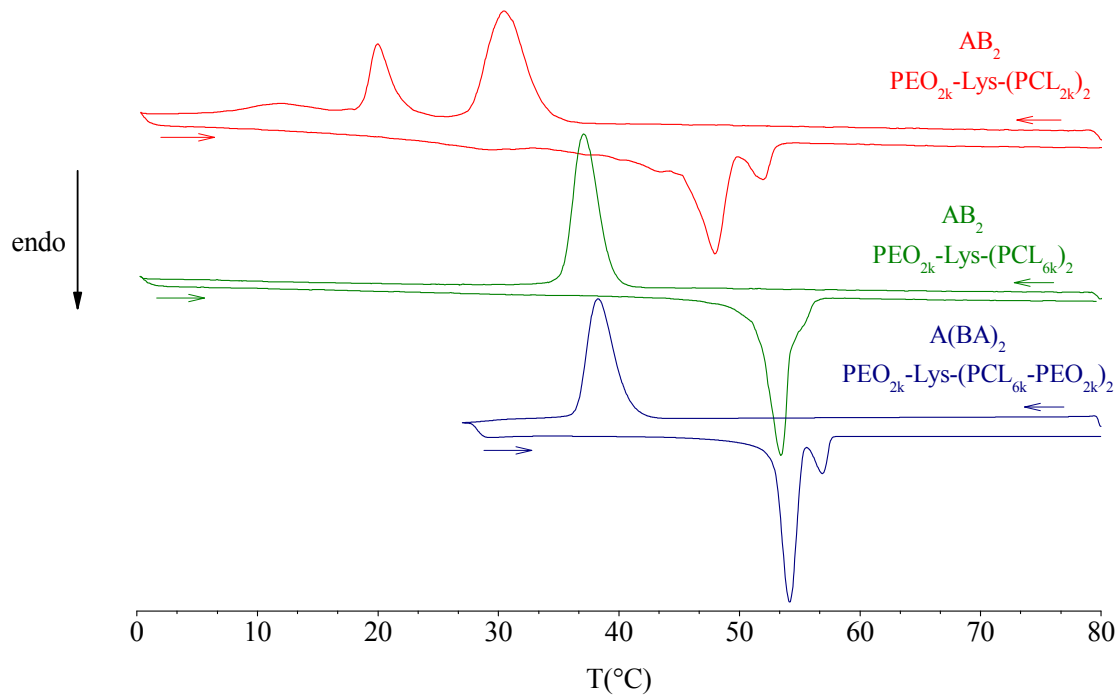


**Figura 2.18:** spettri di diffrazione dei RX relativi ai copolimeri  $PEO_{2k}-PCL_{4k}$  (AB) (curva rossa),  $PEO_{2k}-PCL_{8k}$  (AB) (curva verde) e  $PEO_{2k}-PCL_{8k}-PEO_{2k}$  (ABA) (curva blu)

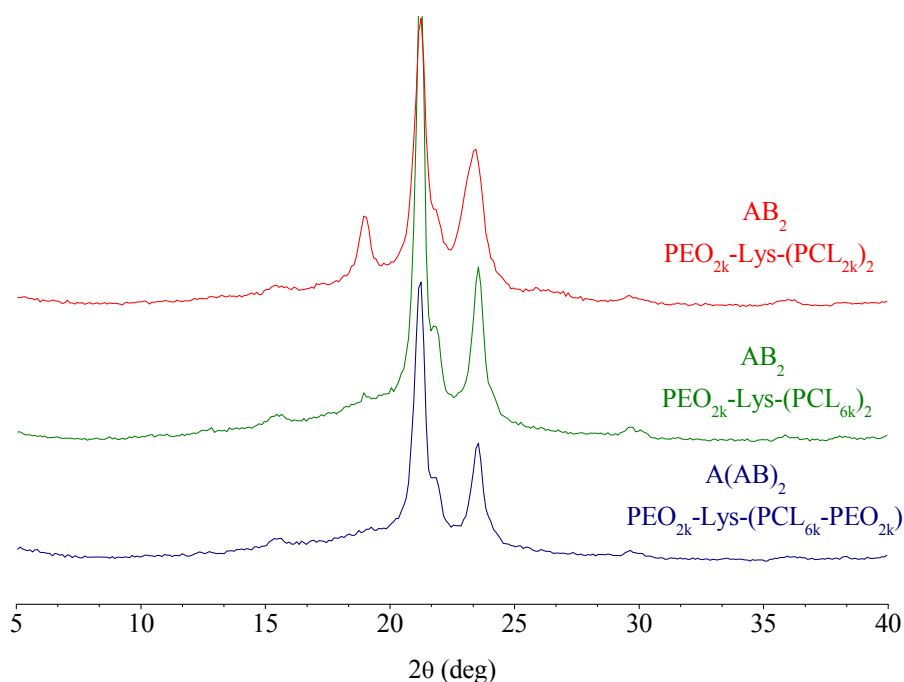
Nel caso dei copolimeri lineari (fig. 2.17 e 2.18) si può notare come la composizione e la lunghezza del segmento di PCL influenzino notevolmente la capacità del PEO di cristallizzare: quando il blocco di PCL supera una certa lunghezza e la composizione è fortemente spostata verso il PCL, quest'ultimo cristallizza per primo ed il PEO non riesce più ad organizzarsi in forma cristallina. Infatti, nei termogrammi del diblocco  $PEO_{2k}-PCL_{8k}$  e del triblocco  $PEO_{2k}-PCL_{8k}-PEO_{2k}$  si osservano una sola esoterma di cristallizzazione ed una endoterma di fusione, relative entrambe alla fase cristallina del PCL. In accordo con questa interpretazione, nei diffrattogrammi dei copolimeri con alto contenuto di PCL il riflesso relativo alla fase cristallina del PEO ( $2\theta = 19.2$ ) ha un'intensità estremamente bassa ed è appena osservabile, mentre nel caso del diblocco  $PEO_{2k}-PCL_{4k}$  si osservano riflessi relativi sia al PCL ( $2\theta=21.4$  e  $23.8$ ) che al PEO ( $2\theta=19.2$  e  $23.1$ ). E' da notare che per tutti i copolimeri

l'endoterma di fusione è splittata in due picchi a causa di fenomeni di fusione e ricristallizzazione durante il riscaldamento, fenomeno spesso riscontrabile a seguito di cristallizzazione dal fuso.

I termogrammi ed i diffrattogrammi dei copolimeri ramificati di tipo  $AB_2$  e  $A(BA)_2$ , sono riportati nelle figure 2.19 e 2.20.



**Figura 2.19** : termogrammi di cristallizzazione e di 2° fusione dei copolimeri  $PEO_{2k}-Lys-(PCL_{2k})_2$  ( $AB_2$ ) (curva rossa),  $PEO_{2k}-Lys-(PCL_{6k})_2$  ( $AB_2$ ) (curva verde),  $PEO_{2k}-Lys-(PCL_{6k}-PEO_{2k})_2$  [ $A(BA)_2$ ] (curva blu)



**Figura 2.20:** spettri di diffrazione RX dei copolimeri  $PEO_{2k}$ -Lys-( $PCL_{2k}$ ) $_2$  ( $AB_2$ ) (curva rossa),  $PEO_{2k}$ -Lys-( $PCL_{6k}$ ) $_2$  ( $AB_2$ ) (curva verde),  $PEO_{2k}$ -Lys-( $PCL_{6k}$ - $PEO_{2k}$ ) $_2$  [ $A(BA)_2$ ] (curva blu)

Nel caso del copolimero  $PEO_{2k}$ -Lys-( $PCL_{4k}$ ) $_2$ , cioè la struttura  $AB_2$  a minor contenuto di PCL, l'analisi dello spettro di diffrazione dei raggi X (curva rossa di figura 2.20), che evidenzia riflessi di entrambe le fase cristallina di PEO e PCL, è in accordo con la presenza di due ben distinte endoterme di fusione ed esoterme di cristallizzazione (curve rosse di fig. 2.19). Nel caso del copolimero  $PEO_{2k}$ -Lys-( $PCL_{6k}$ ) $_2$ , cioè la struttura  $AB_2$  a più alto contenuto di PCL, i singoli picchi di fusione e di cristallizzazione (curve verdi di fig. 2.19), in accordo con l'analisi RX (curva verde di fig. 2.20), sono attribuibili alla fase cristallina del PCL. Si può quindi dedurre, che i segmenti di PCL, componente prevalente (80% in peso), si organizzano per primi in una fase cristallina ostacolando la cristallizzazione del secondo componente (PEO) che quindi rimane in fase amorfa. Nel termogramma relativo al copolimero  $PEO_{2k}$ -Lys-( $PCL_{6k}$ - $PEO_{2k}$ ) $_2$ , a struttura  $A(BA)_2$ , si osservano la fusione e la cristallizzazione

del solo PCL. Lo spettro di diffrazione (curva blu, fig. 2.20) conferma la presenza di un'unica fase cristallina, quella del PCL. In conclusione, si può dedurre che:

- a pari architettura, le temperature di fusione e cristallizzazione del PCL e le cristallinità dei copolimeri aumentano all'aumentare della lunghezza dei segmenti di PCL;
- a parità di composizione, il passaggio da un'architettura lineare ad una ramificata comporta un moderato abbassamento della cristallinità e, nel caso che diminuisca la lunghezza dei blocchi di PCL, una diminuzione della sua  $T_m$  ;
- la cristallinità totale dei copolimeri è inferiore a quella degli omopolimeri di peso molecolare uguale o paragonabile. Si può ritenere, quindi, che la cristallizzazione di ciascuna fase sia influenzata negativamente dalla presenza dell'altra; un esempio può essere costituito dal paragone tra  $A_{2k}B_{8k}A_{2k}$  e  $B_{8k}$  ; tale fenomeno è particolarmente evidente nel caso del PEO e determina la scomparsa di una fase cristallina di PEO quando la % in peso dei segmenti idrofobici è fortemente prevalente;
- il PCL, componente prevalente, cristallizza per primo e la cristallizzazione dei segmenti di PEO in una fase separata è ostacolata dalla presenza della fase cristallina di PCL ed è osservabile solo se il rapporto in massa PCL/PEO  $\leq 2$ ;

#### **2.3.4 Studi di micellizzazione**

La formazione di strutture aggregate di tipo core-shell dei copolimeri anfifilici, in soluzione acquosa, è un processo spontaneo che minimizza l'energia libera descritta dall'equazione:

$$\Delta G = RT \ln(X_{CMC})$$

Dove  $X_{CMC}$  è la frazione molare del copolimero quando si raggiunge la concentrazione micellare critica (CMC), valore minimo di concentrazione alla quale si osserva l'aggregazione delle singole macromolecole (unimeri) in strutture micellari, indicatore fondamentale della stabilità delle micelle polimeriche. Tipici valori di CMC idonei per applicazioni farmaceutiche sono dell'ordine di  $10^{-6}$ - $10^{-7}$  M. L'elevata stabilità termodinamica delle micelle polimeriche, rispetto a quelle originate da tensioattivi convenzionali (CMC= $10^{-3}$ - $10^{-4}$  M), indica che le prime hanno una scarsa tendenza a disaggregarsi anche a concentrazioni molto basse e, quindi, la dissociazione delle micelle in unimeri è generalmente lenta anche quando il sistema viene diluito nel circolo ematico.

I copolimeri sintetizzati sono stati testati per la formulazione di sistemi nanoparticellari a rilascio controllato di farmaci. Studi preliminari condotti dal gruppo di ricerca della Prof. F. Quaglia del Dip. di Chimica Farmaceutica e Tossicologica dell'Università di Napoli 'Federico II' hanno evidenziato che, in ambiente acquoso, i copolimeri anfifilici sintetizzati mostrano buona capacità di autoaggregazione in strutture micellari sferiche di dimensioni nanometriche (< 100nm) di tipo 'core-shell', con valori di CMC che garantiscono la stabilità delle micelle dopo iniezione nel flusso ematico. E' noto dalla letteratura che la composizione (rapporto in massa tra segmenti idrofobici ed idrofili) e la lunghezza dei segmenti influenzano, rispettivamente, la CMC e le dimensioni delle micelle. Misure di CMC e dimensioni delle micelle relative a copolimeri con identica composizione e natura dei due componenti hanno permesso di

investigare in via preliminare l'influenza del parametro architettura sui processi di micellizzazione.

Di seguito sono confrontati i valori dimensionali e di CMC mostrate nei processi di micellizzazione dei copolimeri aventi le diverse architetture progettate, lineare e a stella, e composizione costante (rapporto in massa PCL/PEO  $\approx 2$ ).

**Tabella 2.3:** proprietà delle micelle ottenute dai copolimeri sintetizzati

Copolimeri		B/A	<sup>1)</sup> CMC $\mu\text{g/mL}$	<sup>1)</sup> CMC $\text{mol/L}$	$\Delta G$ $\text{KJ/mol}$	<sup>2)</sup> Diametro (nm)
Ramificati	AB <sub>2</sub>	2	0.63	$1.03 \cdot 10^{-7}$	-49.2	97
	A(AB) <sub>2</sub>	2	1.6	$0.91 \cdot 10^{-7}$	-49.7	109
Lineari	AB	2	0.35	$0.56 \cdot 10^{-7}$	-50.7	60
	ABA	2	14	$11.7 \cdot 10^{-7}$	-43.4	32

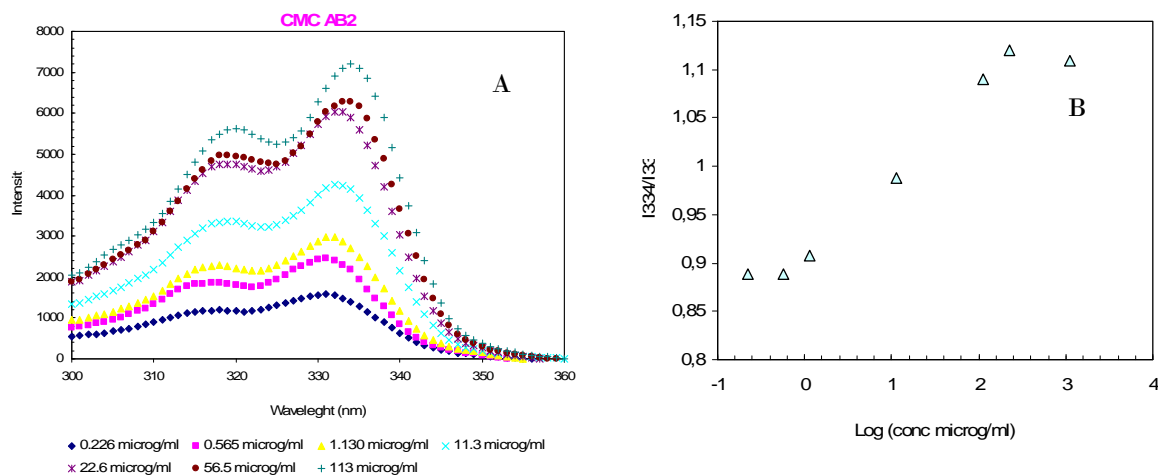
1) Concentrazione critica micellare determinata mediante spettroscopia in fluorescenza utilizzando pirene come molecola fluorescente 2) Diametro idrodinamico delle micelle determinato mediante spettroscopia a correlazione fotonica

I valori del diametro idrodinamico delle nanoparticelle, preparate mediante la tecnica della nanoprecipitazione (F.Quaglia et al. *J. Biomed. Mater. Research., A*, 87, 563-574, 2008) è stato determinato mediante spettroscopia a correlazione fotonica.

I valori di CMC micellari sono stati determinati mediante spettroscopia in fluorescenza utilizzando pirene come sonda fluorescente: il pirene mostra  $\lambda_{\text{exc}} = 331$  nm in ambiente acquoso ed un 'red schift' a  $\lambda_{\text{exc}} = 334$  nm in seguito all'incapsulamento del pirene nel core idrofobico della micella. Riportando in un grafico il rapporto delle intensità di emissione del pirene a  $\lambda_{\text{exc}} = 331$  nm e a  $\lambda_{\text{exc}} = 334$  nm, a varie concentrazioni di polimero aggiunto alla soluzione acquosa, è possibile



rilevare la concentrazione critica micellare del polimero per la quale si nota un aumento drastico del rapporto  $I_{331}/I_{334}$ . In figura è riportato un esempio relativo al processo di micellizzazione del copolimero  $AB_2$ .



**Figura:** spettro in fluorescenza (A) e  $I_{331}/I_{334}$  (B) del pirene in soluzione acquosa a differenti concentrazioni dei copolimero  $AB_2$ ;

Questi studi hanno, inoltre, confermato la capacità dei sistemi descritti di incapsulare sostanze idrofobiche come il pirene.

Si nota che i copolimeri ramificati del tipo  $AB_2$  e  $A(BA)_2$  presentano valori di CMC e dimensioni paragonabili tra loro ma maggiori rispetto al copolimero lineare diblocco AB evidenziando, così, una minore tendenza ad auto-assemblarsi in soluzioni acquose a causa della maggiore complessità dell'architettura. Il copolimero lineare triblocco presenta valori di CMC più alti sia dei copolimeri ramificati che del copolimero lineare diblocco, sebbene le dimensioni risultino, al contrario, più basse. L'interpretazione di questi dati non risulta facile in quanto anche in letterature sono riportati diversi trattamenti teorici spesso discordanti per interpretare la variazione delle proprietà delle micelle in funzione dell'

architettura (J. Chem. Phys., 121(10), 4998-5004, 2004) o della lunghezza dei blocchi e composizione dei copolimeri ( Macromolecules: 2005, 38, 5330 and 2008, 41, 6555.)

In generale la tendenza all'autoassemblamento è associata alla sostituzione di interazioni sfavorevoli acqua/blocco idrofobico nello stato disperso con interazioni idrofobiche favorevoli in seguito alla formazione del core. D'altra parte la geometria micellare costringe le catene polimeriche ad adottare conformazioni ristrette che determinano una perdita di entropia conformazionale e una più alta energia interfacciale core-corona. Quest'ultimo aspetto può spiegare la più difficile tendenza all'autoaggregazione del copolimero triblocco rispetto ai copolimeri diblocco e star per i quali è previsto un unico punto di giunzione tra i segmenti di PCL e PEO per macromolecola, contro i due presenti nel triblocco. Inoltre, il folding del segmento idrofobico di PEO, determinato dall'autoaggregazione del triblocco, può costituire un fattore energetico sfavorevole per la micellizzazione..

Il passaggio da strutture lineari a quelle ramificate può consentire di ottenere strutture micellari con una corona idrofilica ed un core idrofobico più densi, per cui architetture che comportano valori di CMC più elevate possono rilevarsi più efficaci dal punto di vista farmacocinetico; da questo punto di vista uno studio futuro potrà confermare un vantaggio nell'uso dei copolimeri ramificati di tipo AB<sub>2</sub> e A(BA)<sub>2</sub> rispetto ai copolimeri lineari del tipo AB che per ora hanno mostrato strutture micellari più stabili. Inoltre, strutture ramificate non ancora studiate, come PCL(PEO)<sub>2</sub> possono rivelarsi particolarmente idonee alla formazione di micelle caratterizzate da un'elevata densità di catene PEO nella corona

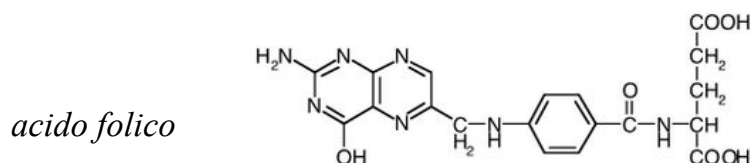
Studi di micellizzazione ancora in corso sono volti all'approfondimento dell' influenza della lunghezza del segmento idrofobico, a parità di architettura, sui parametri micellari.

### **2.3.5 Copolimeri anfifilici funzionalizzati con acido folico**

I sistemi finora descritti mostrano un elevato potenziale nel campo del rilascio controllato dei farmaci; i copolimeri a blocchi sintetizzati formano micelle le cui dimensioni (< 100 nm) e la presenza di uno shell idrofilico consentono di evitare l'esclusione renale ed il riconoscimento da parte del RES, permettendo una permanenza sufficiente a raggiungere siti maggiormente permeabili come cellule tumorali.

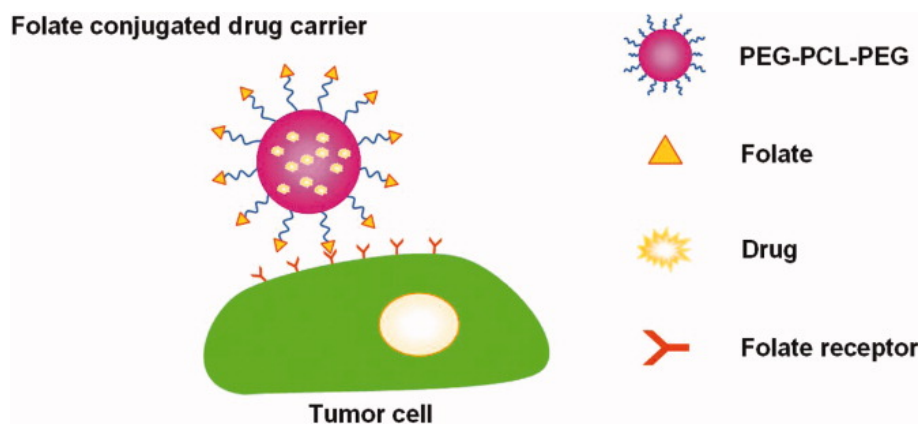
Il principale ostacolo che questi sistemi incontrano nel campo delle applicazioni cliniche, ed in particolare nei trattamenti chemioterapici, è il rilascio scarsamente selettivo di farmaci antitumorali nei confronti di tessuti malati con conseguente accumulo di farmaco anche in cellule sane. Un nuovo approccio per migliorare la selettività del rilascio verso cellule 'bersaglio' è l' inserimento sulla superficie dei nanovettori di molecole specifiche, "ligandi", in grado di essere riconosciute selettivamente da alcuni tessuti [21,22].

Sono state quindi studiate una serie di molecole che, legate chimicamente ai sistemi di rilascio, possono direzionare l'azione del farmaco in modo estremamente preciso ed efficace ("targeting"). A titolo di esempio possiamo citare l'acido folico, anche noto come vitamina B9 o folacina; la struttura chimica è di seguito riportata.



Esso è coinvolto in numerosi processi biologici, in primo luogo nella sintesi di DNA ed RNA, ed una sua carenza nell'organismo provoca anemia macrocitica, alterazione della cute e delle mucose, disturbi gastrointestinali, ecc [23,24].

Recentemente è stato scoperto che i recettori cellulari di molte cellule cancerose specifici per questo acido sono sovraespressi rispetto alle cellule sane e questo fenomeno è accentuato in alcuni tipi di tumore come il tumore ai reni [25]. Ciò significa che le cellule cancerose tendono a fagocitare e metabolizzare una quantità maggiore di acido folico rispetto alle cellule circostanti. Questa caratteristica può essere quindi sfruttata per colpire di preferenza le cellule tumorali funzionalizzando esternamente con acido folico i dispositivi di rilascio del farmaco antitumorale (fig.2.21) [26].



**Figura 2.21:** rilascio mirato di farmaci

Sulla base di queste premesse parte del lavoro di tesi è rivolto alla possibilità di immobilizzare acido folico sulla superficie dei nano vettori a base di copolimeri a blocchi PCL-*b*-PEO. In questo paragrafo verrà descritta la metodologia di sintesi di copolimeri a blocchi PCL-*b*-PEO a

diversa architettura recanti acido folico come ligando direzionante. L'autoassemblaggio in strutture di tipo core-shell dei copolimeri anfifilici suggerisce l'inserimento di molecole targeting come terminale di catena del PEO in modo che la molecola direzionante sia esposta all'esterno nello shell idrofilico.

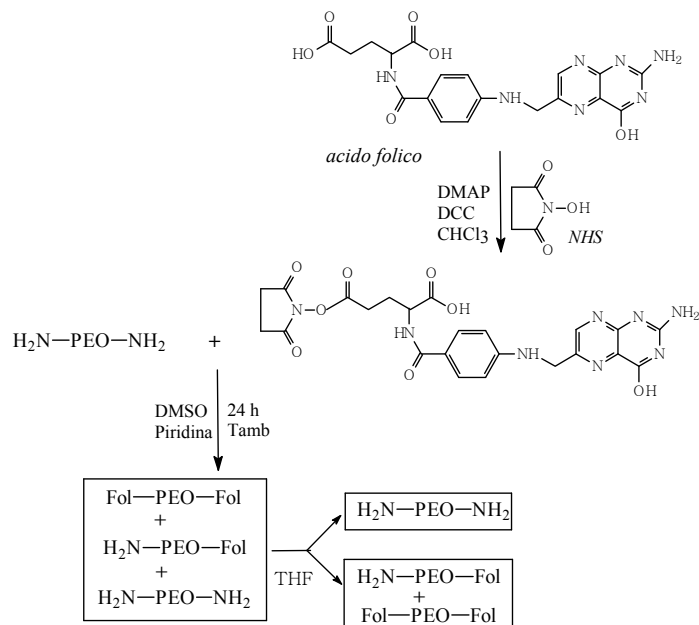
Per ottenere copolimeri del tipo descritto che contengano folato come gruppo terminale del segmento idrofilico si è proceduto alla modifica chimica di una molecola di PEO di-funzionale con l'inserimento di una molecola di acido folico ad una delle due estremità. La sintesi ha previsto di legare dapprima l'acido folico ad un terminale di  $\alpha,\omega$ -diamminopoliossietilene ( $H_2N$ -PEO- $NH_2$ ), di separare il Fol-PEO- $NH_2$  dagli altri prodotti ottenuti e di combinarlo, infine, con segmenti di PCL opportunamente funzionalizzati. Di seguito sono descritti in dettaglio tutti gli stadi di reazione:

#### *Funzionalizzazione del PEO con acido folico*

La sintesi ha previsto, in un primo stadio, l'attivazione con N-idrossisuccinimide (NHS) del gruppo carbossilico in  $\gamma$ <sup>nota</sup> dell'acido folico successivamente coinvolto in una reazione di coupling con il gruppo amminico del PEO. Di seguito è riportato lo schema di sintesi:

---

Nota: Indagini sulla reattività dei due gruppi carbossilici in  $\alpha$  e  $\gamma$  dell'acido folico hanno evidenziato che il  $-COOH$  in  $\gamma$  è molto più reattivo del gruppo in  $\alpha$ .



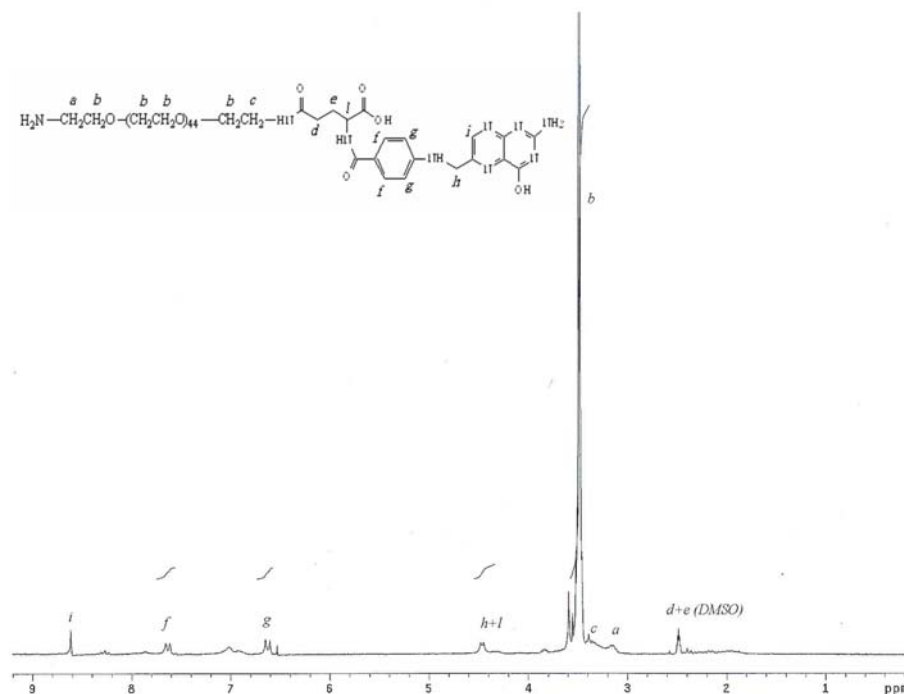
**Figura 2.22:** funzionalizzazione del PEO con acido folico

Questa procedura di preparazione, a causa della uguale reattività dei gruppi amminici del PEO- $\alpha,\omega$ -diammino nei confronti del gruppo  $\gamma$ -carbossilico dell'acido folico, conduce ad una miscela di prodotto monofolato (Fol-PEG-NH<sub>2</sub>), di-folato (Fol-PEO-Fol) e di-funzionale H<sub>2</sub>N-PEO-NH<sub>2</sub>.

Per favorire la formazione del prodotto desiderato Fol-PEO-NH<sub>2</sub> la reazione è condotta in difetto di acido folico rispetto al PEO- $\alpha,\omega$ -diammino (H<sub>2</sub>N-PEO-NH<sub>2</sub>/acido folico=1.2/1). Processi di purificazione del prodotto sono stati condotti sfruttando la diversa solubilità dei sottoprodotti indesiderati in solventi come il THF e H<sub>2</sub>O (mono-folato e di-folato insolubili in THF, di-funzionale non reagito solubile in THF, acido folico non reagito solubile in H<sub>2</sub>O). Tracce di acido folico non reagito

sono state eliminate mediante dialisi in H<sub>2</sub>O del prodotto di reazione sciolto in DMSO, mentre il PEO- $\alpha,\omega$ -diammino non reagito è stato allontanato mediante lavaggi con THF. Si è ottenuto un prodotto che consiste in una miscela di Fol-PEO-NH<sub>2</sub> e Fol-PEG-Fol. Data la non reattività di quest'ultimo sottoprodotto, si è proceduto comunque alle successive reazioni di coupling con PCL in quanto la purificazione del copolimero prevede la sua dissoluzione in THF che consente l'eliminazione del Fol-PEO-Fol, insolubile, presente nell'alimentazione.

La struttura chimica e l'effettiva composizione della miscela costituita da NH<sub>2</sub>-PEO-Fol e da Fol-PEO-Fol sono stati confermati dalla spettroscopia <sup>1</sup>H-NMR (fig. 2.23) prendendo come riferimento gli spettri <sup>1</sup>H-NMR del NH<sub>2</sub>-PEO-NH<sub>2</sub> e dell'acido folico e confrontando le integrazioni dei segnali relativi all'acido folico (f, g) a  $\delta = 6.6$  e  $\delta = 7.6$  ed al PEO (b) a  $\delta = 3.6-3.7$ .

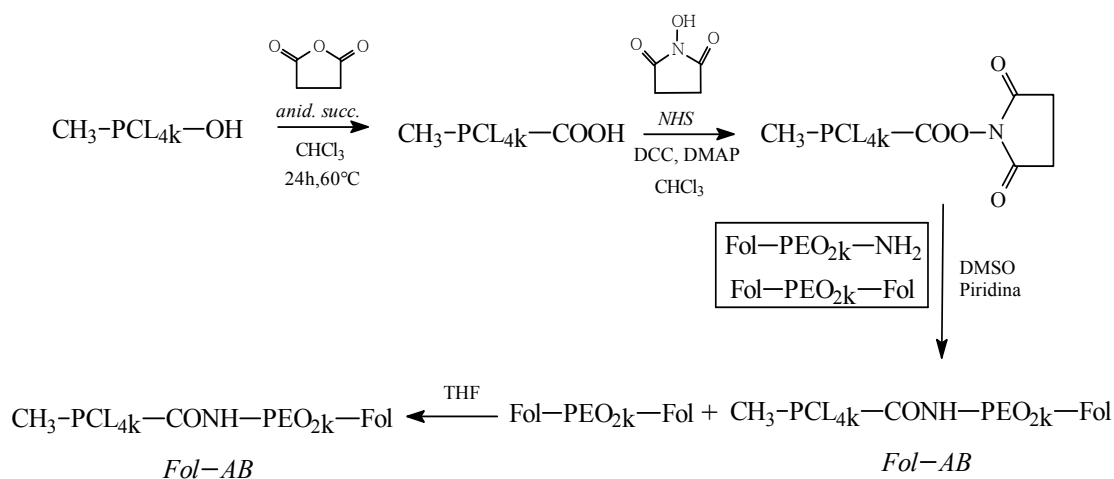


**Figura 2.23:** Spettro <sup>1</sup>H-NMR della miscela di composti Fol-PEO-Fol/Fol-PEO-NH<sub>2</sub> (200 MHz; DMSO-d<sub>6</sub>)

Di seguito sono mostrate gli schemi delle reazioni di coupling del Fol-PEO-NH<sub>2</sub> con diversi segmenti di PCL per ottenere rispettivamente copolimeri lineari del tipo AB e ramificati del tipo AB<sub>2</sub> funzionalizzati con acido folico.

### Copolimero Fol-AB

La reazione di coupling coinvolge il gruppo amminico del Fol-PEO-NH<sub>2</sub> ed il gruppo carbossilico (attivato con NHS) di un PCL -COOH terminato, ottenuto mediante polimerizzazione per apertura dell'anello del ε-caprolattone iniziata da un alcool monofunzionale e successiva carbossilazione mediante reazione con anidride succinica. Di seguito è descritta in dettaglio la procedura di sintesi mostrata in figura 2.24 :



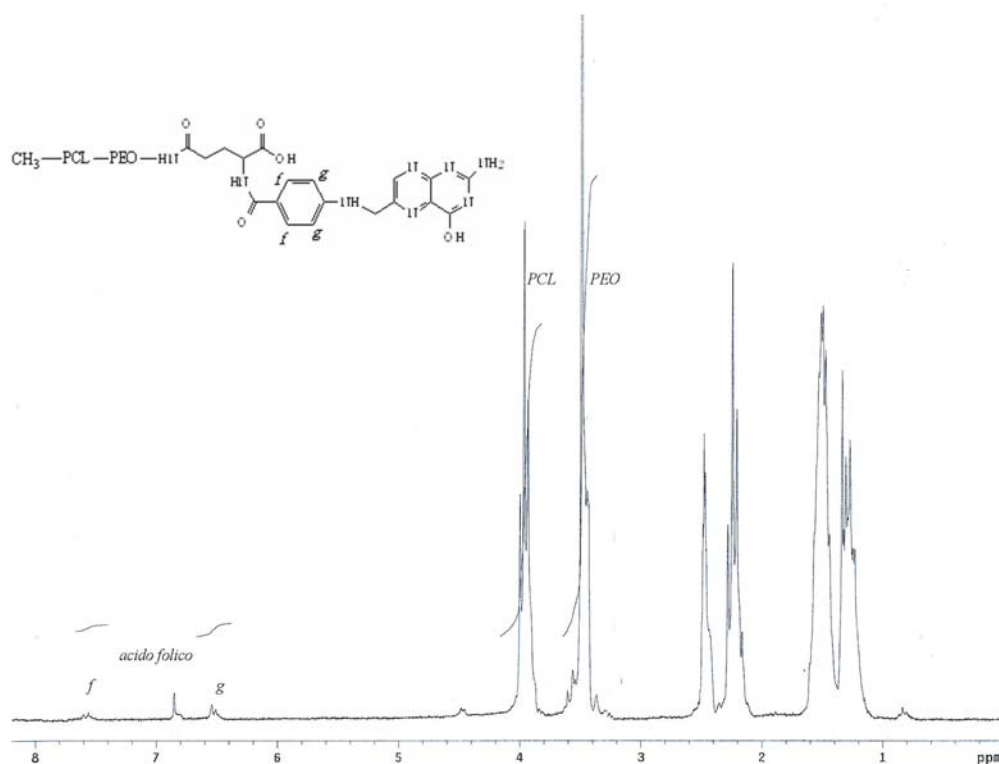
**Figura 2.24:** schema di sintesi del copolimero Fol-AB

Il primo step prevede la sintesi e successiva funzionalizzazione del segmento poliesterio; il PCL è stato sintetizzato mediante ROP in presenza di Sn(Oct)<sub>2</sub> ( Sn(oct)<sub>2</sub> /OH in rapporto molare di 1:100)



utilizzando come iniziatore un alcool monofunzionale, l'esanolo, preventivamente anidrificato per impedire che tracce di acqua presenti nel solvente possano iniziare la reazione di polimerizzazione portando quindi ad un peso molecolare medio del polimero diverso da quello progettato. Il prodotto ottenuto dalla polimerizzazione è stato poi recuperato e fatto reagire con anidride succinica allo scopo di trasformare il gruppo terminale -OH del PCL in gruppo carbossilico. Il grado di succinilazione è stato del 87%. Il gruppo -COOH è stato, in un secondo stadio, attivato con NHS per ottenere una resa maggiore nella reazione di coupling col PEO. Infine il PCL-COOH attivato con NHS è stato fatto reagire, in presenza di piridina, con la miscela Fol-PEO-NH<sub>2</sub>/Fol-PEO-Fol. La quantità di miscela utilizzata nella reazione è stata calcolata considerando che essa fosse costituita al 50% circa da ognuno dei due prodotti (come indicato da indagini <sup>1</sup>H-NMR). Il prodotto della reazione è stato quindi precipitato in etere e recuperato. Per separare il copolimero ottenuto dall'eccesso di Fol-PEO-Fol e di Fol-PEO-NH<sub>2</sub> non reagito è stato eseguito un lavaggio con THF, nel quale è solubile il solo copolimero.

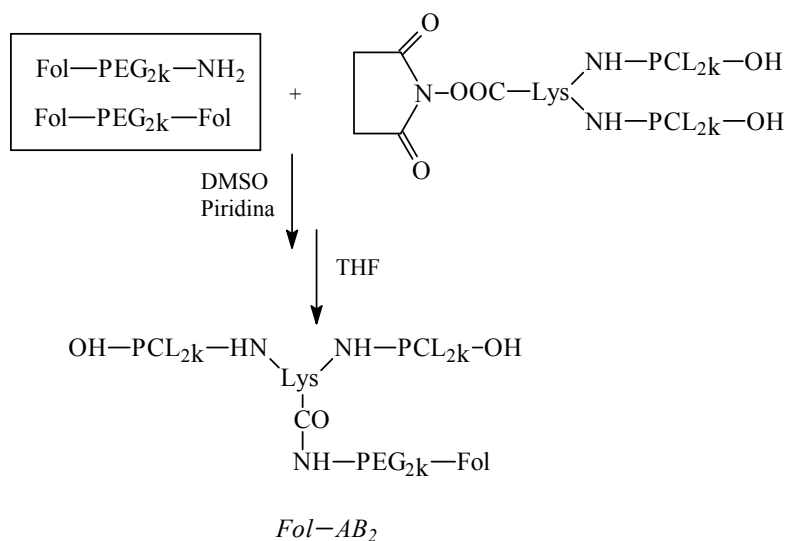
La struttura chimica ed il grado di purezza sono stati confermati dalla spettroscopia <sup>1</sup>H-NMR (figura 2.25). Il grado di coupling e la percentuale di acido folico legata al copolimero sono stati determinati valutando rispettivamente i rapporti tra le integrazioni relative alle aree dei segnali a  $\delta = 3.60-3.70$  del PEO e a  $\delta = 4.05$  del PCL, e i rapporti tra le integrazioni relative alle aree dei segnali a  $\delta = 7.6$  e  $6.6$  dell'acido folico (f, g) e di quello a  $\delta = 4.05$  del PCL.



**Figura 2.25:** spettro  $^1\text{H-NMR}$  del copolimero  $\text{PCL}_{4k}\text{-PEO}_{2k}\text{-Fol}$  (200 MHz;  $\text{DMSO-d}_6$ )

### *Copolimero Fol-AB<sub>2</sub>*

La procedura di sintesi è simile alla precedente; in questo caso, però, per ottenere la struttura ramificata si è partiti da una molecola, come la  $\text{N}_\alpha\text{-N}_\epsilon\text{-di-Z-Lisina}$  (di-Z-Lys). Inizialmente, dopo deprotezione dei gruppi amminici mediante idrogenazione catalitica, la  $\text{N}_\alpha\text{-N}_\epsilon\text{-di-Z-Lisina}$  è stata impiegata come macroiniziatore per la ROP dell'  $\epsilon\text{-CL}$ ; il gruppo carbossilico sul  $\text{C}_\alpha$  della  $\text{N}_\alpha\text{-N}_\epsilon\text{-di-Z-Lisina}$  (attivato con NHS) è stato utilizzato nella reazione di coupling con la miscela Fol-PEO-NH<sub>2</sub>/ Fol-PEO-Fol; il Fol-PEO-NH<sub>2</sub> non reagito e il Fol-PEO-Fol sono stati allontanati sfruttando la loro insolubilità in THF. In figura 2.26 è riportato lo schema di sintesi:



**Figura 2.26:** schema di sintesi del copolimero *Fol-AB<sub>2</sub>*

L'analisi <sup>1</sup>H-NMR (figura 2.27) è stata utilizzata per confermare la struttura chimica del composto e l'effettivo attacco del PEO-Fol. Il grado di coupling e la percentuale di acido folico legata al copolimero sono stati determinati valutando rispettivamente i rapporti tra le integrazioni relative alle aree dei segnali a  $\delta = 3.60\text{-}3.70$  del PEO e a  $\delta = 4.05$  del PCL, e i rapporti tra le integrazioni relative alle aree dei segnali a  $\delta = 7.6$  e  $6.6$  dell'acido folico (f, g) e di quello a  $\delta = 4.05$  del PCL.

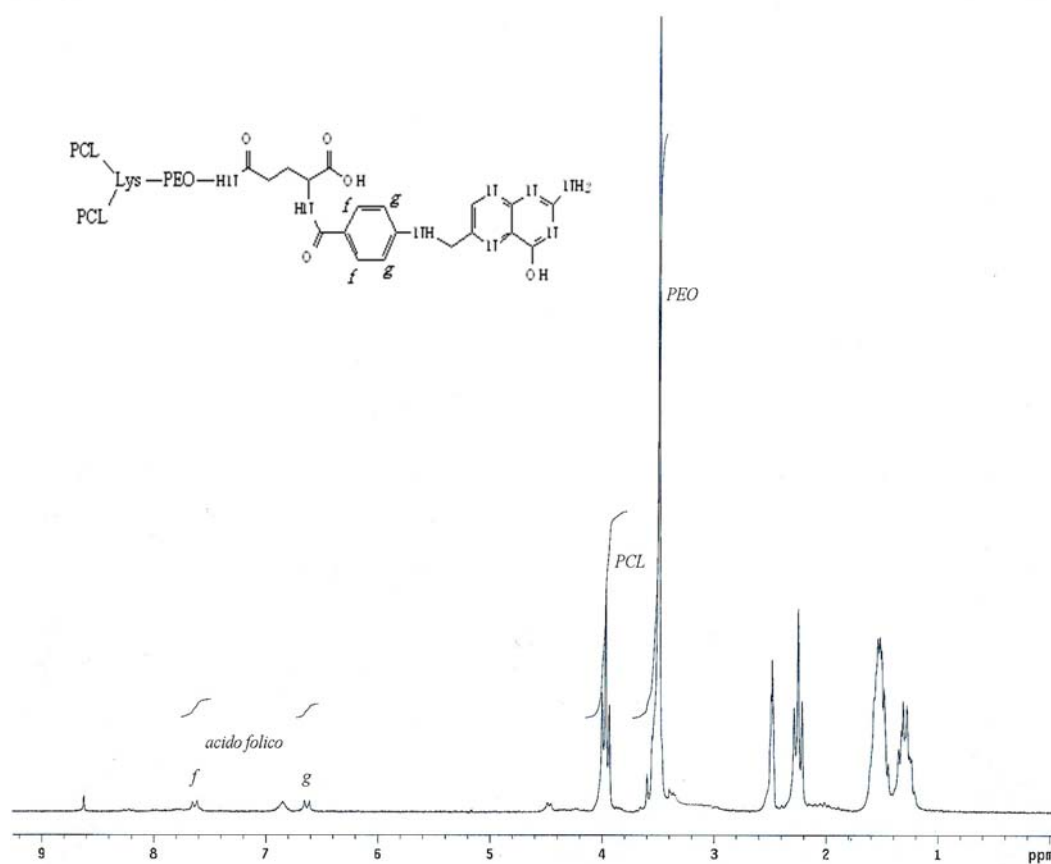


Figura 2.27: spettro  $^1\text{H-NMR}$  del copolimero  $(\text{PCL}_{2k})_2\text{-PEO}_{2k}\text{-Fol}$  (200 MHz;  $\text{DMSO-d}_6$ )

### Analisi spettroscopica UV

L'analisi UV è risultato essere il metodo più accurato per la determinazione della percentuale in moli di FA contenuta nei copolimeri Fol-AB e Fol-AB<sub>2</sub>. Confrontando il valore dell'assorbanza a  $\lambda=365$  nm del copolimero in DMSO con la curva di taratura, ottenuta riportando i valori delle assorbanze di soluzioni di acido folico in DMSO a varie concentrazioni è stata calcolata una percentuale del 60% per il copolimero Fol-AB e del 50% per il copolimero Fol-AB<sub>2</sub>, (valori pressoché uguali a quelli ottenuti dall'analisi  $^1\text{H-NMR}$ ). Le percentuali di acido folico sono accettabili per i fini diagnostici, visto che non è richiesta una totale

ricopertura della corona idrofilica delle micelle affinché il riconoscimento molecola target-cellula sia efficace.

#### Caratterizzazione molecolare e viscosimetrica

Nella tabella 2.4 sono riportati i dati di caratterizzazione dei copolimeri funzionalizzati con acido folico.

**Tabella 2.4:** Caratterizzazione dei copolimeri funzionalizzati ( $A=PEO$ ,  $B=PCL$ )

copolimeri		$M_n$ PCL		$^c)ID$	$^d)Fol$ %	resa %	$^e)\eta_{inh}$ dL/g
		$^a)M_n$ (Da)	$^b)M_n$ (Da)				
<i>lineare</i>	<i>Fol-A<sub>2k</sub>B<sub>4k</sub></i>	4200	5000	1.8	60	68	0.33
<i>ramificata</i>	<i>Fol-A<sub>2k</sub>(B<sub>2k</sub>)<sub>2</sub></i>	4200	4200	--	50	63	0.40

<sup>a)</sup> Peso molecolare medio teorico del blocco PCL; <sup>b)</sup> Peso molecolare medio del PCL calcolato dall'analisi <sup>1</sup>H-NMR; <sup>c)</sup> Indice di polidispersione calcolato da analisi SEC; <sup>d)</sup> Percentuale di acido folico nel copolimero determinata mediante analisi UV <sup>e)</sup> Viscosità inerenti (dL/g) in CHCl<sub>3</sub> at 25°C.

Le misure di viscosità condotte su entrambi i copolimeri funzionalizzati evidenziano valori di viscosità inerente più alti rispetto a quelli relativi ai copolimeri non funzionalizzati di analoga architettura e composizione: oltre all'incremento del peso molecolare, è probabile che i terminali di catena, costituiti da una molecola ingombrante e ricca di gruppi polari come l'acido folico, possano incrementare il raggio idrodinamico delle catene polimeriche e/o favorire lo stabilirsi di interazioni intercatena in soluzione. La curva di distribuzione dei pesi molecolari relativa al copolimero funzionalizzato lineare *Fol-AB* risulta essere unimodale ma alquanto allargata probabilmente a causa di una crescita non regolare dei segmenti di PCL durante la ROP iniziata da esanolo. Le basse rese di reazione sono da ricondursi ai processi di purificazione.

**Caratterizzazione termica e strutturale**

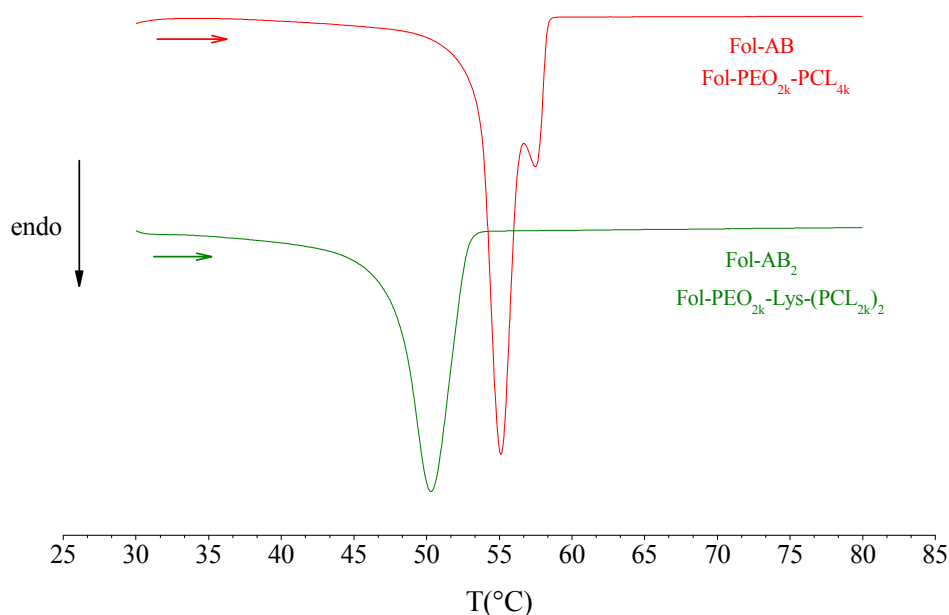
Nella Tabella 2.5 sono riassunte le proprietà termiche e i dati strutturali dei copolimeri funzionalizzati insieme con quelli dei corrispondenti copolimeri non funzionalizzati, a scopo di paragone.

**Tabella 2.4** : Proprietà termiche e cristallinità dei copolimeri funzionalizzati ( $A=PEO$ ,  $B=PCL$ )

Copolimero	<sup>a,b)</sup> $T_m$ (°C)		<sup>a,b)</sup> $\Delta H_m$ (J/g)		<sup>a)</sup> $\Delta H_c$ (J/g)		<sup>a)</sup> $T_c$ (°C)		<sup>c)</sup> $X_c$ (%)			
	PEO	PCL	PEO	PCL	PEO	PCL	PEO	PCL	PEO	PCL		
<i>lineare</i>	<i>Fol-A<sub>2k</sub>B<sub>4k</sub></i>		-	55.1	-	41.1	-	42.3	-	36.9	-	43
	<i>A<sub>2k</sub>B<sub>4k</sub></i>		46.6	53.4	11.0	49.6	16.4	52.1	26.8	34.3	14	54
<i>ramificata</i>	<i>Fol-A<sub>2k</sub>(B<sub>2k</sub>)<sub>2</sub></i>		-	50.3	-	28.5	-	35.0	-	28.2	10	27
	<i>A<sub>2k</sub>(B<sub>2k</sub>)<sub>2</sub></i>		43.0	47.9	20.0	42.0	14.5	40.2	20.0	30.5	25	45

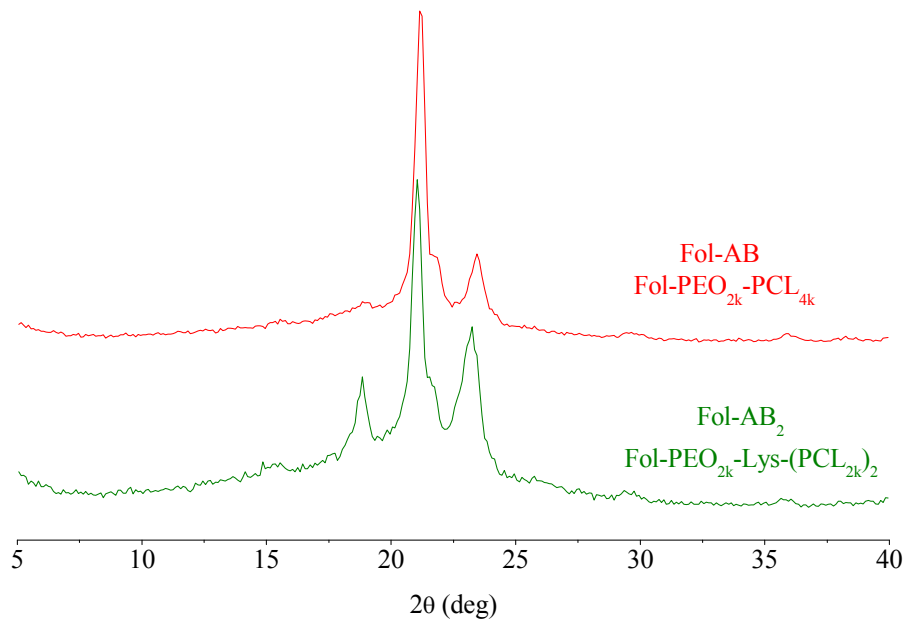
<sup>a)</sup>Misurati mediante DSC. <sup>b)</sup>valori relativi al secondo run di riscaldamento; <sup>c)</sup> Grado di cristallinità calcolata da WAXS.

Nelle figure 2.28 e 2.29 sono riportati, rispettivamente, i termogrammi di seconda fusione dei copolimeri funzionalizzati con acido folico ed i relativi diffrattogrammi ai raggi X.



**Figura 2.28:** termogrammi di fusione dei copolimeri  $Fol-PEO_{2k}-PCL_{4k}$  ( $Fol-AB$ ) (curva rossa),  $PEO_{2k}-Fol-(PCL_{2k})_2$  ( $Fol-AB_2$ ) (curva verde)

Nei termogrammi di fusione relativi al  $Fol-PEO_{2k}-PCL_{4k}$  (curva rossa di fig. 2.28) e al  $Fol-PEO_{2k}-Lys-(PCL_{4k})_2$  (curva verde, fig. 2.28) si osserva un solo picco di fusione, attribuibile ai blocchi di PCL, e accompagnato nel primo caso da un secondo picco dovuto a ricristallizzazione dopo fusione. Osservando i diffrattogrammi si può, tuttavia, vedere la presenza di due fasi cristalline nel caso del copolimero ramificato  $Fol-AB_2$  (curva verde fig. 2.29); è possibile che il picco di fusione del PEO sia parzialmente o totalmente sovrapposto al picco di fusione del PCL.



**Figura 2.29:** Spettri di diffrazione RX dei copolimeri *Fol-PEO<sub>2k</sub>-PCL<sub>4k</sub>* (*Fol-AB*) (curva rossa), *Fol-PEO<sub>2k</sub>-Lys-(PCL<sub>6k</sub>)<sub>2</sub>* (*Fol-AB<sub>2</sub>*) (curva verde)

I dati termici dei copolimeri funzionalizzati con acido folico, confrontati con quelli dei copolimeri analoghi non funzionalizzati, evidenziano che la presenza dell'acido folico disturba la cristallizzazione del PCL e, in misura più marcata, la cristallizzazione del PEO.



**Bibliografia**

- [1] E.Tomlison, in *Advances in Drug Delivery Systems*, Elsevier, Amsterdam, 1986
- [2] Otsuka H., Nagasaki Y., Kataoka K., *Advanced Drug Delivery Reviews*, , v. 55, 403,2003.
- [3] Moghimi S.M., Hunter A.C., Murray J.C., *Pharmacol Rev.*, v.53, 283, 2001.
- [4] Kwon G.S., *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* v. 20, 357, 2003.
- [5] Rosler A., Vandermeulen G.W., Klok H.A., *Adv Drug Deliv Rev.*, v.53, 95, 2001.
- [6] Y. Cui, X. Ma, X. Tang, Y. Luo, *Eur. Polym. J.*, 40, 299,2004.
- [7] Soo-Hong Lee, Soo Hyun Kim, Yang-Kyoo Han, Ha Kim, J. *Polym. Chem.*, 40, 2545-2555, 2002 .
- [8] Gisepe Nese, *Tesi di Dottorato in Scienze Chimiche XVII ciclo*, Università FedericoII di Napoli, a.a. 2001-2004
- [9] G. Maglio, G. Nese, M. Nuzzo, R. Palumbo, *Macromol. Rapid. Commun.*, 2004, 25, 1139-1144.
- [10] F. Quaglia, L. Ostacolo, G. De Rosa, M. La Rotonda, G. Nese, G.Maglio, R. Palumbo, *International Journal of Pharmaceutics*, 324, 56-66,2006.
- [11] M. Lang, Chih-Chang Chu, *J. Appl. Polym. Sci*, 86, 2296-2306, 2002.
- [12] Quaglia F., Vignola M.C., De Rosa G., La Rotonda M.I., Maglio G., Palumbo R. *Journal Of Controlled Release.* vol. 83 pp. 263-71
- [13] J. K. Wegrzyn, T. Stephan, R. Low, R. B. Grubbs J. *Polym. Sci*, 43 2977, 2005.
- [14] A. Kowalski, A. Duda, S. Penczek, *Macromol.*, 33, 7359-7370, 2000.
- [15] H. R. Kricheldorf, *Macromol. Symp.*, 153, 55-65, 2000.
- [16] K. Wegrzyn, T. Stephan, R. Low, R. B. Grubbs, J. *Polym. Sci*, 43, 2977, 2005.
- [17] S. Zalipsky, *Bioconjugate Chem*, 6, 150-165, 1995.
- [18] H.Zhao, L.Y.L.Yang, *International Journal of Pharmaceutics* 2007
- [19] Haifeng Gao, Ke Min, Krzysztof Matyjaszewski, *Macromolecular chemistry and physics*, 208, 1370-1378, 2007.
- [20] G.Maglio, A. Migliozi, R.Palumbo, *Polymer*, 44, 369-375, 2003.
- [21] Hallahan D., Geng L., et al., *Cancer Cell*, 3, 63-74, 2003.

## *Bibliografia*

- [22] Garnett M.C., *Adv. Drug Deliv.*, Rev.53, 171-216, 2001.
- [23] Sudimack J., Lee R.J., *Adv. Drug Deliv.*, Rev.41, 147-162, 2000.
- [24] Turek J., Leamon C., *J.Cell.Sci.*, 106, 423-430, 1993.
- [25] Garin-Chesa, P. Campbell, I. Saigo, P.E.Lewis, J.L.Jr.Old, *L.J. and Rettig ed. Am.J.Pathol.* 142, 557-567, 1993.
- [26] H.S.Yoo, T.G.Park, *J. Controlled release*, 96, 273-283, 2004.

## **Capitolo 3**

### ***Copolimeri anfifilici impiegati nella preparazione di membrane macroporose a base di PDLLA e PCL***

#### ***3.1 Stato dell'arte***

##### ***3.1.1 Scaffold***

Per scaffold si intende un supporto tridimensionale, preferibilmente poroso, realizzato con un materiale biocompatibile e bioriassorbibile in grado di favorire inizialmente l'adesione e, successivamente, la proliferazione cellulare fino a formazione di nuovo tessuto. La velocità di biodegradazione deve essere compatibile con quella di crescita tissutale.

Le principali proprietà funzionali e strutturali richieste ad un materiale per svolgere la funzione di scaffold sono:

- *Porosità elevata e tridimensionale* con la presenza di una rete di interconnessione dei pori in modo da consentire la crescita cellulare, il trasporto delle sostanze nutrienti e l'eliminazione delle sostanze di scarto: ciò permette di minimizzare la quantità totale di materiale impiantato e di incrementare l'area superficiale su cui andranno ad aderire le cellule;
- *Biocompatibilità* elevata in modo da non generare alcuna forma di rigetto da parte delle cellule ospiti;
- *Biodegradabilità* controllata;
- *Biorassorbibilità* con un grado di riassorbimento tale da consentire la crescita cellulare *in vitro* e/o *in vivo*;

- *Superficie* chimicamente adatta all'adesione, alla proliferazione e alla differenziazione delle cellule;
- *Proprietà meccaniche* simili a quelle dei tessuti che si devono riprodurre sullo scaffold;
- *Riproducibilità*, in modo semplice, in diverse forme e dimensioni.

Negli ultimi anni è stata rivolta una grande attenzione a miscele di polimeri biocompatibili e biodegradabili in vista di una loro applicazione in campo biomedico. La tecnica della miscelazione di differenti polimeri per preparare supporti per la crescita e rigenerazione dei tessuti danneggiati, permette di controllare le proprietà del dispositivo finale, come morfologia, cristallinità, biodegradabilità, proliferazione e adesione cellulare<sup>[1]</sup>. Tipici esempi sono costituiti da leghe poli-L-lattide/polietilenglicole e poli-DL-lattide/policaprolattone.

### ***3.1.2 Miscela polimeriche a base di PCL e PDLLA***

Grazie alle buone proprietà meccaniche, ad una discreta biodegradabilità ed ad un'eccellente biocompatibilità, l'acido poli-DL-lattico (PDLLA), un polimero amorfo, rigido ed abbastanza tenace, è un componente largamente impiegato nella preparazione di leghe polimeriche anche in funzione della sua buona degradabilità. Tuttavia il PDLLA non mostra un'elevata tendenza all'adesione e proliferazione cellulare<sup>[2]</sup>. Il PCL, invece, è in grado di promuovere un'elevata adesione cellulare<sup>[3]</sup>, anche se ha una minore velocità di degradazione e peggiori caratteristiche strutturali rispetto al PDLLA. Miscele dei due omopolimeri possono combinare opportunamente proprietà favorevoli di entrambi e costituire un adeguato supporto per la ricostruzione di tessuti.

Anche se PDLLA e PCL sono polimeri immiscibili tra di loro, essi non sono altamente incompatibili; la loro natura chimica simile

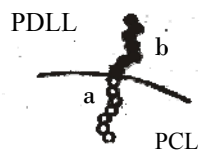
contribuisce ad abbassare la tensione interfacciale tra i due polimeri permettendo lo stabilirsi di specifiche interazioni polari intercatena attraverso l'interfaccia di separazione. Queste interazioni portano ad una morfologia dispersa diversa da quella grossolana tipiche di leghe binarie immiscibili tipo miscele poliammide/poliolefine<sup>[4]</sup>. È ampiamente riportato in letteratura che copolimeri a blocchi dei due omopolimeri componenti la lega, ad architettura controllata possono agire come emulsionanti in leghe polimeriche immiscibili<sup>[5]</sup>. Essi, posizionandosi all'interfaccia tra le fasi, migliorano l'adesione tra le fasi e, riducendo la tensione interfacciale, riducono l'effetto di coalescenza che porterebbe ad una dispersione grossolana delle particelle della fase dispersa nella matrice. L'effetto emulsionante del copolimero nelle miscele viene rivelato sia dalla riduzione delle dimensioni medie delle particelle disperse che dal miglioramento delle proprietà meccaniche rispetto alle analoghe leghe senza compatibilizzante.

Studi effettuati su scaffolds ottenuti da leghe con matrici a base di acido polilattico contenenti il 30% in peso di PCL come fase dispersa, hanno dimostrato che queste matrici sono in grado di promuovere un'ottima adesione, proliferazione e differenziazione cellulare<sup>[6]</sup>. Si è trovato che l'aggiunta di copolimero multiblocco random poli(D,L-lattide-co- $\epsilon$ -caprolattone) quale agente compatibilizzante ha ridotto le dimensioni dei domini di PCL di un ordine di grandezza (da decine di micron a pochi micron) ed ha portato ad una maggiore proliferazione cellulare. Ciò è attribuibile all'elevata selettività delle cellule nei confronti del PCL; l'intima dispersione del PCL nella matrice PDLLA aumenta l'interazione con l'ambiente fisiologico.

Anche la lunghezza e la natura chimica dei blocchi del copolimero sono parametri importanti nel determinare l'effetto sulla morfologia finale della lega. Ulteriori studi condotti dall'Istituto Di Chimica e Tecnologia dei Polimeri del C.N.R. (Dott. M. Malinconico) in collaborazione con l'Università Cattolica di Leuven del Belgio (Prof G. Groeninckx ) e con l'università di Napoli Federico II (Prof G. Maglio) hanno messo in evidenza come copolimeri a blocchi del PLLA con polietilenossido (PEO) siano in grado di svolgere un'azione emulsionante nei confronti del PCL in leghe PLLA/PCL, nonostante la diversa natura chimica dei blocchi<sup>[7,8]</sup>. Un copolimero di questo tipo contenente, cioè, un blocco (PEO) incompatibile sia nei confronti del PLLA che del PCL, dovrebbe essere in grado di posizionarsi all' interfaccia tra PLLA e PCL spinto da interazioni preferenziali di tipo repulsivo di ciascuno dei blocchi con gli omopolimeri. Questo risultato inatteso ha suggerito l'impiego di copolimeri PCL-co-PEO quali agenti compatibilizzanti anche in leghe a matrice PDLLA.

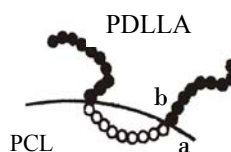
### ***3.1.3 Copolimeri a blocchi PCL-b-PEO utilizzati come compatibilizzanti per la preparazione delle membrane***

In un lavoro di tesi precedente<sup>[9]</sup> sono state preparate sia membrane binarie a base di PDLLA/PCL a composizione 70/30 in peso, che membrane ternarie ottenute per aggiunta del 5-10% di un copolimero PCL/PEO a struttura di- o tri-blocco quale agente compatibilizzante. Il copolimero a struttura più semplice, il diblocco, è costituito da un segmento PEO (b in figura) di 5,0 kDa ed un segmento PCL (a in figura) di 20,0 kDa, con un rapporto in massa PEO/PCL di 1:4. Il copolimero si può disporre all'interfaccia tra due omopolimeri immiscibili, PDLLA e PCL, come schematizzato:



*Copolimero lineare diblocco PCL-b-PEO*

Il segmento PCL entra nella fase dispersa del corrispondente omopolimero mentre il segmento PEO si inserisce nella matrice di PDLLA. Un meccanismo simile, schematizzato di seguito, può essere ipotizzato per il copolimero triblocco costituito da segmenti di lunghezze identiche a quelle del diblocco e che presenta, di conseguenza, un rapporto in massa PEO/PCL pari a 1:2. Il triblocco può consentire un migliore ancoraggio tra fase dispersa e matrice:



*Copolimero lineare triblocco PCL-PEO-PCL*

La quantità del 30% in peso del PCL è stata scelta in modo da favorire una buona colonizzazione cellulare senza compromettere la stabilità strutturale che la PDLLA conferisce alla membrana. Si è osservato, mediante l'analisi SEM, la presenza di micro e macropori caratterizzati da pareti non chiuse ad evidenza di una buona interconnessione. In particolare in presenza del copolimero la fase dispersa di PCL nella matrice di PDLLA presenta domini di dimensioni ridotte con una distribuzione più regolare rispetto alle membrane binarie. Tra i copolimeri utilizzati si è visto che il triblocco esplica un miglior effetto compatibilizzante rispetto al diblocco. Studi preliminari delle superfici delle membrane mediante spettroscopia FTIR-ATR hanno mostrato

qualitativamente un arricchimento in PCL delle superfici rispetto alla composizione del bulk; tale disomogeneità sembra aumentare in presenza del compatibilizzante.

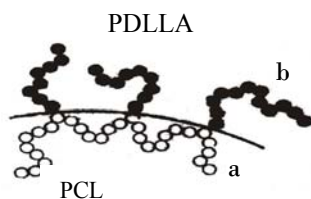
Una possibile interpretazione dell'effetto del copolimero sull'arricchimento in PCL delle superfici delle membrane, invece, è da attribuire alla bassa tendenza a precipitare dei copolimeri nel sistema solvente/non-solvente durante il processo di precipitazione. Pertanto, quando il sistema PDLLA/PCL/COPOL/SACCAR viene immerso nel non-solvente, il copolimero tende ad allontanarsi dalla miscela polimerica in fase di aggregazione e, per effetto delle interazioni tra il suo segmento di PCL e le catene di PCL omopolimero, aiuta la migrazione di quest'ultimo verso l'esterno del "bulk. La precipitazione del PCL si manifesta, quindi, con un maggiore arricchimento delle superfici esterne.

Membrane così ottenute hanno mostrato una struttura "core-skin" con un 'core' costituito da PDLLA che garantisce stabilità meccanica al supporto ed uno 'skin' ricco del componente che promuove l'adesione delle cellule.

### ***3.2 Obiettivi***

In questa parte del lavoro di tesi si è cercato di ottimizzare sia la dispersione del PCL nella matrice PDLLA che l'arricchimento sullo "skin" in PCL. Una diversa architettura del copolimero, rispetto a quelle dei copolimeri diblocco e triblocco sopra descritti, può influenzare queste due caratteristiche e, pertanto, sono state preparate nuove membrane utilizzando un copolimero "graft" PCL-g-PEO schematizzato sotto.





*Copolimero graft PCL-g-PEO*

Si è ipotizzato che la natura ramificata del graft può consentire di aumentare ulteriormente il numero di punti di ancoraggio (giunzioni tra blocchi diversi) per macromolecola rispetto al copolimero triblocco migliorando, in tal modo, la dispersione della fase dispersa nella matrice.

In virtù di queste considerazioni il principale obiettivo di questa parte del lavoro, è stato quello di preparare un copolimero a innesto (“graft”) PCL-g-PEO, a struttura regolare, da usare come agente compatibilizzante e paragonarne la sua efficienza con quella dei copolimeri diblocco PCL-PEO e triblocco PEO-PCL-PEO, sintetizzati e studiati in un precedente lavoro di tesi<sup>[9]</sup>. Sono stati anche variati altri parametri, come la natura del non-solvente e la percentuale in peso di copolimero, i quali possono svolgere un ruolo importante nella precipitazione dei componenti dalla soluzione influenzando, quindi, sulla morfologia e sulla struttura delle membrane

### ***3.3 Risultati e discussioni***

#### ***3.3.1 Strategia di sintesi del copolimero PCL-graft-PEO***

Il copolimero graft progettato in questo lavoro è costituito da una catena di PCL (a) sulla quale sono innestate catene laterali di PEO di peso molecolare pari a 5,0 kDa (b), come schematizzato di seguito. I segmenti di PEO devono disporsi ad intervalli regolari e tali che la lunghezza di

ciascun segmento poliestereo corrisponda ad un peso molecolare prossimo a 10 kDa.

E' stata seguita una via sintetica che si basa sulla crescita di catene di PCL su un macroiniziatore che contiene già in partenza un segmento di PEO<sub>5k</sub>. Si è utilizzato il macroiniziatore N<sub>α</sub>-N<sub>ε</sub>-di-Z-L-Lys-PEO<sub>5k</sub> che, dopo deprotezione dei due gruppi amminici mediante idrogenazione catalitica, viene utilizzato come iniziatore della ROP del CL come prima descritto per i copolimeri ad architettura ramificata di tipo AB<sub>2</sub> utilizzati nel campo del rilascio controllato di farmaci. Il rapporto molare macroiniziatore/monomero è stato calcolato in modo da ottenere 2 segmenti di PCL di peso molecolare pari a 5,0 kDa ciascuno, in modo da ottenere un rapporto in massa PCL/PEO pari a 2 come nel caso del copolimero triblocco.

Il copolimero "graft" è stato, infine, preparato mediante due successive reazioni di estensione di catena del macromero AB<sub>2</sub> utilizzando i gruppi terminali -OH dei segmenti di PCL. Nella prima si è effettuato un coupling tra il macromero ed il cloruro di sebacoile (SEB). Il polimero così ottenuto viene sottoposto ad una ulteriore reazione di post-polimerizzazione mediante condensazione intramolecolare tra i gruppi -COOH e -OH terminali, allo scopo di accrescere ulteriormente la catena. I vari stadi della sintesi (figura 3.1) sono descritti di seguito più in dettaglio:



polimerizzazione dell'  $\epsilon$ -caprolattone. Per ottenere un peso molecolare di ogni singolo segmento di PCL pari a 5,0 kDa, è stato usato un rapporto molare iniziatore/ $\epsilon$ -caprolattone di 1/87,7; il rapporto molare -OH/Sn utilizzato è stato di 100:1.

*Sintesi del copolimero “graft” PCL<sub>10k</sub>-g-PEO<sub>5k</sub>*

Il copolimero “graft” PCL<sub>10k</sub>-g-PEO<sub>5k</sub> è stato ottenuto, in un primo stadio, mediante una reazione di estensione di catena attraverso la condensazione in massa, a 70°C, tra i gruppi terminali -OH del macromero *m*PEO<sub>5k</sub>-Lys-(PCL<sub>5k</sub>)<sub>2</sub> ed i gruppi acilici (-COCl) del SEB, in rapporto stechiometrico 1:1. Alla fine della reazione, evidenziata dal cessare dello sviluppo di HCl, è stato aggiunto un eccesso del 15% di SEB per favorire un aumento del grado di polimerizzazione considerata la difficoltà a reagire dei terminali di catena in un sistema molto viscoso. Dopo aver isolato e caratterizzato il copolimero ottenuto, si è proceduto, in un secondo stadio, ad una reazione di post-polimerizzazione al fine di migliorare il grado di polimerizzazione. Statisticamente tali macromolecole possono terminare con un gruppi carbossilici, derivati da idrolisi di unità terminali di cloruro di sebacoile, o con un gruppo alcolico presente nel macromero *m*PEO<sub>5k</sub>-Lys-(PCL<sub>5k</sub>)<sub>2</sub>. Tenendo conto che nello stadio di reazione precedente si è aggiunto un eccesso del 15% di SEB, è stata stimata una presenza di circa un 65% di gruppi carbossilici ed un 35% di gruppi alcolici, come terminali di catena. Pertanto, un'ulteriore estensione di catena è stata condotta in presenza di un agente condensante come la di-cicloesilcarbodiimmide (DCC) in presenza di 4-dimetilamminopiridina come catalizzatore. Dopo 24 ore dall'inizio della reazione è stato aggiunto un 15% in moli di glicole etilenico al fine di bilanciare lo squilibrio stechiometrico tra gruppi terminali stabilitosi al

termine del 1° stadio. I dati viscosimetrici e di GPC hanno confermato l'aumento del grado di polimerizzazione in seguito a quest'ultimo step della reazione di sintesi relativa al copolimero graft (tabella 3.1).

### 3.3.2 Caratterizzazione molecolare e viscosimetrica

Il peso molecolare medio numerico ( $M_n$ ) di ciascun segmento poliestereo del macromero  $m\text{PEO-Lys-(PCL}_{5k})_2$ , valutato mediante analisi  $^1\text{H-NMR}$ , risulta essere vicino a quello progettato e pari a 5,4 kDa. Il cromatogramma SEC del macromero mostra una curva unimodale con una distribuzione di pesi molecolari piuttosto stretta ( $ID=1.49$ ) e spostata a valori maggiori rispetto a quella del macroiniziatore  $\text{Lys-PEO}_{5k}$ .

L'analisi  $^1\text{H-NMR}$  ha, inoltre, ha confermato la struttura chimica del copolimero graft (figura 3.3).

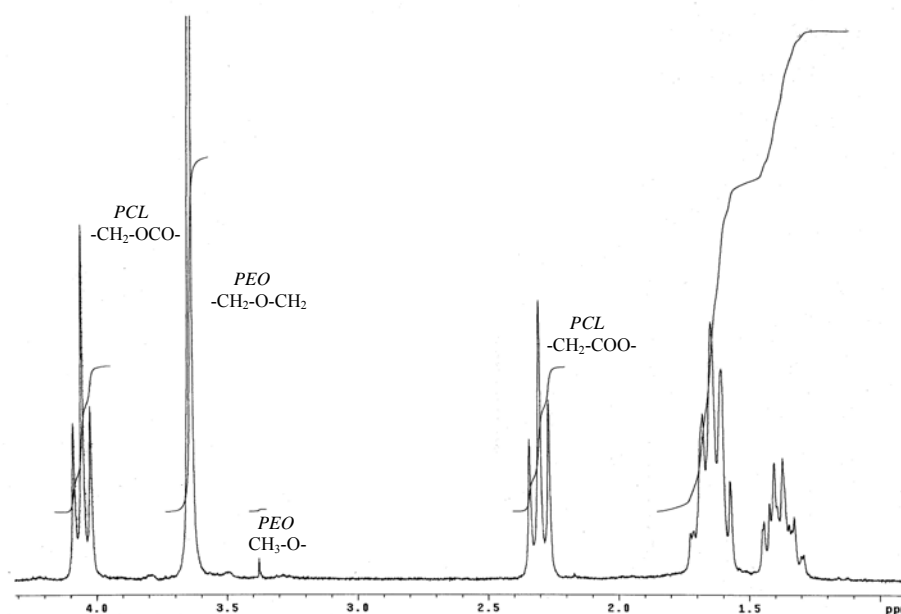


Figura 3.3: Spettro  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del copolimero "grafi"  $\text{PCL}_{10k}\text{-g-PEO}_{5k}$

In tabella 3.1 si riportano i valori di viscosità ( $\eta_{inh}$ ), peso molecolare medio numerico ( $M_n$ ) e indice di polidispersione (ID) calcolato mediante analisi SEC relativi al copolimero  $\text{PCL}_{10k}\text{-g-PEO}_{5k}$  prima e dopo

la seconda reazione di estensione di catena ed, inoltre, sono riportati per confronto i dati del macroiniziatore e del macromero di partenza.

**Tabella 3.1:** Caratterizzazione viscosimetrica,  $^1\text{H-NMR}$  e SEC

		Resa (%)	$\eta_{inh}^{a)}$ (dL/g)	$M_n^{b)}$ (KDa)	$M_w^{b)}$ (KDa)	ID <sup>b)</sup>
Macroiniziatore	$\text{N}_\alpha\text{-N}_\epsilon\text{-Lys-PEO}_{5k}$	--	0.22	3.7	4.3	1.16
Macromero	$m\text{PEO}_{5k}\text{-Lys-(PCL}_{5k})_{2k}$	89	0.36	11.4	17	1.49
<sup>c)</sup> copolimero graft	$\text{PCL}_{10k}\text{-g-PEO}_{5k}$	94	0.56	12.3	22.3	1.82
<sup>d)</sup> copolimero graft	$\text{PCL}_{10k}\text{-g-PEO}$	86	0.65	16.0	28.6	1.79

a) Viscosità inerente in  $\text{CHCl}_3$  a  $25^\circ\text{C}$  ( $c=0.5$  g/dL); b)  $M_n$ ,  $M_w$  e indice di polidispersione ( $M_w/M_n$ ) calcolati mediante SEC. c) Copolimero “graft” dopo la polimerizzazione in massa con il SEB (1°Stadio); d) Copolimero “graft” dopo la seconda reazione di estensione di catena (2°Stadio).

L' aumento del valore di viscosità inerente del copolimero graft rispetto al valore relativo al macromero di partenza dimostra l'avvenuta estensione di catena. In seguito alla seconda reazione di estensione di catena, si può osservare un significativo incremento della viscosità, da 0.56 dL/g a 0.65 dL/g, ed una lieve diminuzione del grado di polidispersione. Si può, quindi, concludere che il secondo processo di estensione di catena fa aumentare il peso molecolare del copolimero. Ciò è confermato qualitativamente anche dai valori di  $M_n$  e  $M_w$  determinati mediante SEC, tenendo presente che i valori assoluti sperimentali sono sempre più bassi di quelli effettivi, come già rilevato in precedenza (paragrafo 2.3.4 cap 2).

### 3.3.3 Caratterizzazione termica e strutturale

Il comportamento termico dei copolimeri è stato studiato mediante DSC, seguendo un ciclo termico che prevede un riscaldamento da  $0^\circ\text{C}$  a  $80^\circ\text{C}$ , un' isoterma a  $80^\circ\text{C}$  per 5 min, un raffreddamento a  $0^\circ\text{C}$  ed ulteriore

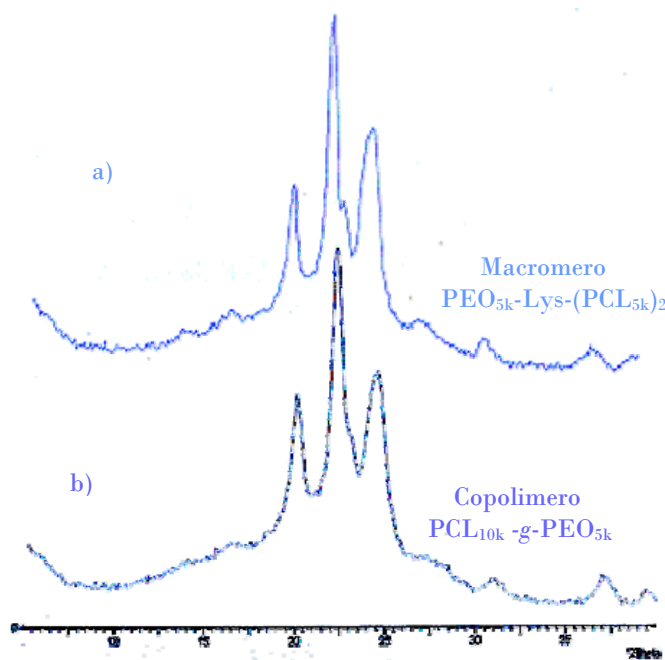
riscaldamento a 80°C, con una velocità di scansione di 2°C·min<sup>-1</sup>. In tabella 3.2 sono riportati i dati termici ed i gradi di cristallinità,  $X_c$ , ottenuti mediante diffrazione dei raggi X del macromero e del copolimero.

**Tabella 3.2:** Caratterizzazione termica e strutturale:  $T_c$ ,  $T_m$ ,  $\Delta H_m$  e gradi di cristallinità ( $X_c$ ) di ciascuna fase cristallina

		<sup>a)</sup> $\Delta H_m$ (J/g)	<sup>a)</sup> $T_m$ (°C)	$\Delta H_c$ (J/g)	$T_c$ (°C)	<sup>b)</sup> $X_c$ (%)
Macroiniziatore	$N_{\alpha}$ - $N_{\epsilon}$ -Lys-PEO <sub>5k</sub>	154	59.9	151	39.7	63
Macromero	$m$ PEO <sub>5k</sub> -Lys-(PCL <sub>5k</sub> ) <sub>2k</sub>	62	54.8	70	38.6 - (32.6) <sup>c)</sup>	49
Copolimero graft	PCL <sub>10k-g</sub> -PEO <sub>5k</sub>	83	57.0	72	36.2 - (32.3) <sup>c)</sup>	46

<sup>a)</sup> dati relativi al 2° ciclo di riscaldamento; <sup>b)</sup> Grado di cristallinità ricavato mediante diffrazione dei raggi X; <sup>c)</sup> valori relativi alla fase cristallina del PEO.

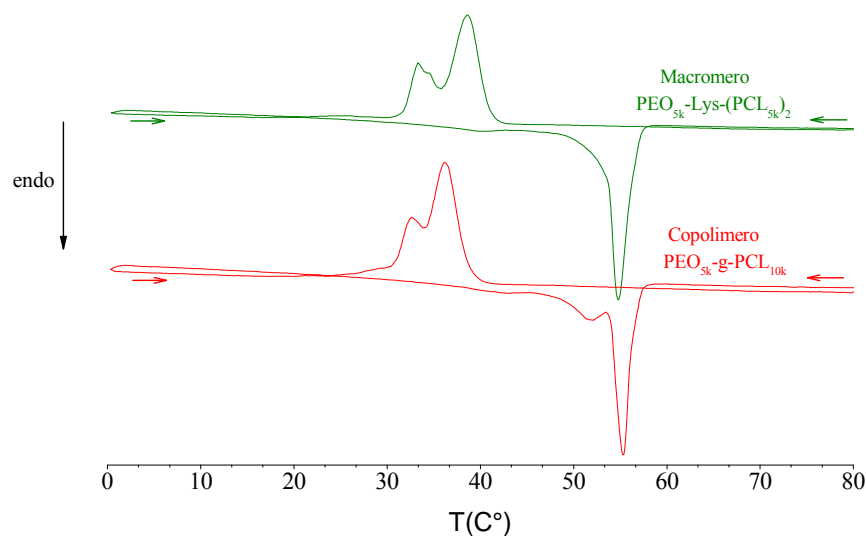
Per confronto vengono riportati i valori termici relativi al macroiniziatore. Gli spettri di diffrazione dei raggi X delle polveri del macromero  $m$ PEO<sub>5k</sub>-Lys-(PCL<sub>5k</sub>)<sub>2k</sub> e del copolimero graft  $m$ PEO<sub>5k</sub>-g-PCL<sub>10k</sub> evidenziano la presenza sia dei riflessi tipici del PCL ( $2\theta=21.5^\circ$  e  $2\theta=23.9^\circ$ ) che di quelli del PEO ( $2\theta=19.2^\circ$  e  $2\theta=23.1^\circ$ ), indicando la presenza di due fasi cristalline distinte. Si riporta in figura 3.4, lo spettro di diffrazione del macromero (a) e del copolimero graft (b):



**Figura 3.4:** Spettri di diffrazione RX del macromero  $PEO_{5k}\text{-Lys}\text{-(PCL}_{5k})_2$  e del copolimero  $PCL_{10k}\text{-g-PEO}_{5k}$

Analizzando i termogrammi DSC, riportati in figura 3.5, sia nel caso del macromero  $mPEO_{5k}\text{-Lys}\text{-(PCL}_{5k})_2$  (curva verde) che nel caso del copolimero  $PCL_{10k}\text{-g-PEO}_{5k}$  (curva rossa) si osserva un'endoterma di fusione piuttosto slargata preceduta da altri picchi di minor intensità dovuti probabilmente a fenomeni di fusione e riorganizzazione di cristalli disordinati di PCL e di PEO dovuti all'architettura ramificata dei copolimeri; nel raffreddamento si osservano, per entrambi, due distinte esoterme di cristallizzazione. Sulla base dei risultati WAXS si può ritenere che l'endoterma slargata risulti dalla parziale sovrapposizione dei picchi relativi alla fusione dei due diversi costituenti, mentre nel processo di cristallizzazione i segmenti di PCL, componente prevalente, riescono ad organizzarsi per primi in una fase cristallina che, una volta formata, ostacola leggermente la cristallizzazione del secondo componente (PEO) che quindi cristallizza a  $T_c$  più basse.





**Figura 3.5:** Termogramma DSC del macromero  $PEO_{5k}$ -Lys-( $PCL_{5k}$ )<sub>2</sub> e del copolimero  $PCL_{10k}$ -g- $PEO_{5k}$

### 3.4 Preparazione e struttura delle membrane

In collaborazione con l'Istituto Di Chimica e Tecnologia dei Polimeri del C.N.R. (Dott. M. Malinconico e Dott.ssa P. Laurienzo) sono state preparate membrane PDLLA/PCL 70/30 con l'aggiunta di varie percentuali di copolimero graft utilizzando diversi agenti precipitanti. Al fine di investigare l'influenza dell'architettura del copolimero e della coppia solvente/non solvente sulla morfologia e composizione superficiale delle membrane i risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli relativi a membrane PDLLA/PCL preparate seguendo la stessa procedura e contenenti analoghe percentuali di copolimero diblocco  $PEO_{5k}$ - $PCL_{20k}$ , triblocco  $PEO_{5k}$ - $PCL_{10k}$ - $PEO_{5k}$ .

Scaffold, a base di PDLLA e PCL, in forma di membrana, micro e macro porosa, sono stati ottenuti con la tecnica dell'inversione di fase (solvente/non-solvente), che porta alla formazione di una rete di micropori, abbinata a quella dell'estrazione di particelle ("particulate-leaching") [10] che consiste nell'aggiunta alla soluzione di una quantità

opportuna di saccarosio a granulometria controllata (100-500  $\mu\text{m}$ ), il quale, rimosso in acqua dopo formazione della membrana, genera pori di dimensioni maggiori (macropori) che permettono alle cellule di penetrare all'interno dello scaffold e di costruire un tessuto interconnettivo continuo (parte sperimentale paragrafo 6.3.4).

Le membrane preparate sono state caratterizzate spettroscopicamente utilizzando  $^1\text{H-NMR}$  e ATR-FTIR, morfologicamente mediante SEM.

L'analisi IR in riflettanza attenuata (ATR) ha consentito di effettuare un'analisi qualitativa e quantitativa della composizione chimica della superficie superiore ed inferiore delle membrane.

In Tabella 3.3 si riportano i valori delle composizioni superficiali, ottenuti attraverso la spettroscopia ATR-FTIR con l'ausilio di un programma di deconvoluzione, delle membrane PDLLA/PCL 70/30, preparate con la procedura standard con l'aggiunta del 10% e del 23% di copolimero a diversa architettura usando metanolo e butanolo come agente precipitante. Per confronto sono riportati anche i dati relativi alle membrane binarie PDLLA/PCL senza l'aggiunta del copolimero.

**Tabella 3.3:** Composizione superficiale delle membrane PDLLA/PCL (70/30) preparate a  $T=25^{\circ}\text{C}$

Non solvente	Copolimero		<i>a-b) Comp. sper.</i>	<i>c) Composizione superficiale PCL</i>	
			<i>PDLLA/PCL + % cop</i>	<i>Superiore</i>	<i>Inferiore</i>
Metanolo	--		73/27	66%	46%
	10%	Dibl	72/27+7%	83%	59%
		Tribl	70/30+5%	72%	55%
		Graft	74/26+5%	68%	56%
Metanolo	23%	Dibl	67/33+16%	79%	57%
		Tribl	64/36+14%	83%	49%
		Graft	62/38+9%	83%	68%
Butanolo	--		73/27	76%	47%
	10%	Dibl	72/27+7%	87%	60%
		Tribl	70/30+5%	77%	45%
		Graft	74/26+5%	92%	74%

<sup>a)</sup>Membrane progettate secondo la procedura standardizzata mediante la tecnica solvente-non solvente abbinata al "particulate-leaching"; <sup>b)</sup> Composizione determinata mediante  $^1\text{H-NMR}$   
<sup>c)</sup> Composizioni ricavate mediante (ATR-FTIR) con il programma di deconvoluzione "Grams 32", con un errore stimato tra il 5-7%

Dalla tabella si nota che la percentuale effettiva di copolimero determinata mediante  $^1\text{H-NMR}$  è significativamente minore di quella progettata, a causa della maggiore solubilità del copolimero nel solvente e, di conseguenza, di una sua più difficile precipitazione nella miscela solvente/non-solvente. Questo comportamento si è verificato per tutti copolimeri ed è dovuto alla presenza dei segmenti di PEO, molto solubili in cloroformio e relativamente meno insolubili nella miscela cloroformio/alcol rispetto a PCL e PDLLA. Infatti, questo comportamento è risultato più marcato per il triblocco e, soprattutto, per il "graft", a causa dell'aumentata percentuale di PEO. La struttura ramificata del copolimero graft costituisce, probabilmente, un ulteriore fattore di parziale solubilizzazione dello stesso nella miscela cloroformio/alcol.

Osservando i dati riportati in Tabella 3.3, si può notare come la composizione delle superfici sia in tutti i casi più ricca di PCL indipendentemente dal tipo di copolimero o dal tipo di non solvente utilizzato; in particolare quella superiore presenta una composizione quasi invertita rispetto alla composizione del ‘bulk’ calcolata via  $^1\text{H-NMR}$ . Questo fenomeno è più accentuato in presenza di uno dei tre copolimeri ed è accentuato in misura diversa a seconda della percentuale di copolimero aggiunto e del solvente utilizzato.

Utilizzando metanolo come non solvente si nota un arricchimento in PCL della superficie superiore fino all’ 83% per le membrane preparate con il copolimero diblocco. Con il copolimero triblocco e graft l’arricchimento sulla superficie superiore viene solo moderatamente favorito. L’aggiunta di una quantità maggiore di copolimero triblocco o graft determina un ulteriore incremento dell’arricchimento in PCL, diversamente da quanto accade nel caso del copolimero diblocco. In particolare, nel caso del copolimero graft, le superfici superiore ed inferiore passano, rispettivamente dal 68% al 83% e dal 56% al 68% in PCL.

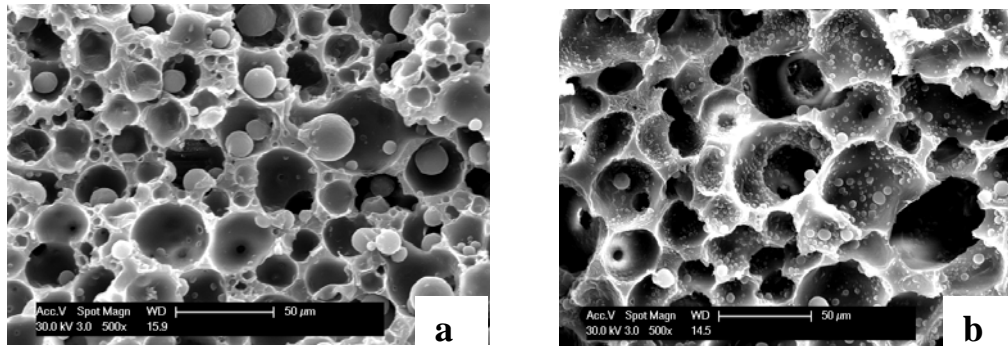
I dati mostrano che l’uso del butanolo, non-solvente meno efficace del metanolo, aumenta l’arricchimento in PCL della superficie superiore anche in assenza di copolimero. In presenza di copolimeri di- o tri-blocco non si osservano significative differenze rispetto alle corrispondenti membrane preparate in metanolo. Al contrario, il copolimero graft provoca un drastico cambiamento della composizione delle superfici superiore ed inferiore, raggiungendo rispettivamente il 92% ed il 74% di PCL. In quest’ultimo caso si è riusciti a realizzare una membrana con un “core” costituito prevalentemente dalla PDLLA ed uno “skin” costituito quasi esclusivamente da PCL.

Sulle membrane preparate è stato condotto uno studio morfologico, utilizzando la tecnica SEM, allo scopo sia di evidenziare la struttura macro e micro porosa che la separazione di fase tra i componenti.

L'osservazione al SEM delle superfici di frattura ottenute in azoto liquido, ha consentito di valutare l'influenza della presenza dei copolimeri sulla distribuzione e sulle dimensioni relative delle due fasi miscelate. Tutte le membrane mostrano una distribuzione bimodale della dimensione dei pori con una struttura micro e macro porosa ben interconnessa.

Come esempio, si riporta l'analisi relativa a campioni precipitati in metanolo a 25°C. Per la lega PDLLA/PCL 70/30 senza copolimero, si evidenzia la presenza di una fase dispersa di PCL, sotto forma di domini sferici, in una matrice continua di PDLLA. Le dimensioni medie di queste particelle disperse cadono nell'intervallo 10-20  $\mu\text{m}$ . Se alla miscela si aggiunge il copolimero diblocco si rileva una minore dimensione media dei domini della fase dispersa (8-10  $\mu\text{m}$ ). Con il copolimero triblocco le dimensioni medie dei domini della fase dispersa sono ancora inferiori (3-8  $\mu\text{m}$ ) e distribuite anche in maniera più monomodale. Infine membrane preparate con il 10% di copolimero "graft" mostrano dimensioni medie dei domini (4-20  $\mu\text{m}$ ).

L'aggiunta di una quantità maggiore di copolimero determina, in generale, una diminuzione delle dimensioni dei domini. Infatti, membrane con il 23% di copolimero presentano dimensioni medie dei domini di 2-8  $\mu\text{m}$ , nel caso del diblocco, e di 1-3  $\mu\text{m}$  nel caso del triblocco. Questa riduzione è più accentuata in presenza di copolimero graft, che porta a domini di dimensioni tipiche di 2-9  $\mu\text{m}$ . In figura sono riportate le micrografie relative alle membrane preparate con l'aggiunta del copolimero graft.



**Figura 3.6:** *micrografia del sistema PDLLA/PCL 70/30 + graft precipitato in metanolo .(sup di frattura) a) 10% graft b) 23% graft*

Studi preliminari effettuati in collaborazione con l'IBP del CNR di Napoli hanno mostrato che questi materiali sono in grado di sostenere l'attacco e lo "spreading" di alcune cellule, come mioblasti e fibroblasti epiteliali.

**Bibliografia**

- [1] S.A. Jones, G.P. Martin, P.G. Royall, *J. Appl.Polymer.Sci.*, 98, 2290, 2005.
- [2] J.P.M. Fennis, P.J.W. Stoelinga, M.A.W. Markx, J.A.Jansen, *Tissue Eng.*,11, 1045, 2005.
- [3] K.W. Ng, D.W. Hutmacher, J.T. Scantz, *Tissue Eng.*,7,441, 2001.
- [4] Dell'Erba R., Groeninckx G., Maglio G., Malinconico M., Migliozi A., *Polymer*, v. 42, 7831 ,2001.
- [5] HJ liang, *Macromolecules*,32, 8204, 1999.
- [6] L.Calandrelli, A.Calarco, V.Lanzetta, P.Laurienzo, M.Malinconico, R.Palumbo, G.Maglio, comunicazione in *Iupac macro 2004-Paris*.
- [7] Maglio G., Malinconico M., Migliozi A., Groeninckx G., *Macromol. Chem. Phys.*, v. 205, 946, 2004.
- [8] Anna Migliozi, *Tesi di Dottorato in Scienze Chimiche XIV*, Università FedericoII di Napoli, a.a. 1998-2001
- [9] V.Lanzetta, *Tesi Sperimentale in Chimica*, Università FedericoII di Napoli, a.a. 2003-2004
- [10] S. Aslan, L. Calandrelli, P. Laurienzo, M. Malinconico, C. Migliaresi, *J. Mater. Sci.*, 35, 205, (2000).

## ***Capitolo 4***

### ***Funzionalizzazione di polimeri e copolimeri a base di PCL per applicazioni in campo biomedico***

#### ***4.1 Stato dell'arte***

Polimeri sintetici biodegradabili e biocompatibili, ed in particolare poliesteri quali PLA, PLGA e PCL, sono stati ampiamente utilizzati quali matrici per scaffold tridimensionali in ragione della limitata tossicità, della buona biodegradabilità e biocompatibilità prima e dopo la degradazione. Uno degli svantaggi associati all'impiego di polimeri sintetici va ricondotto alla loro scarsa bioattività che può limitare l'adesione cellulare e la successiva integrazione del tessuto all'interfaccia impianto-tessuto ospite.

Il riconoscimento del materiale da parte della cellula avviene tramite i recettori della membrana cellulare che interagiscono con motivi “consensus” situati su proteine della matrice extracellulare come fibronectina e vitronectina. Finora si è cercato di migliorare le interazioni con il tessuto circostante mediante modifica fisica o chimica del biomateriale rivestendo la superficie del materiale con specifiche proteine della matrice extracellulare; l'uso di queste proteine presenta molte difficoltà come fenomeni di rigetto, infiammazioni, infezioni ecc.<sup>[1]</sup>. Una delle strategie adottate per migliorare questo aspetto è quella di modificare i polimeri di partenza introducendo in essi dei “motivi” che possono essere riconosciuti da particolari tipi di cellule <sup>[2]</sup>. Tali motivi di riconoscimento possono essere costituiti da frammenti peptidici, che



riproducono specifiche sequenze delle proteine della matrice extracellulare; in particolare la sequenza arginina-glicina-acido aspartico (RGD), risulta essere la sequenza minima responsabile dell'interazione del ligando con i recettori cellulari che influenza positivamente l'adesione cellulare<sup>[1]</sup>. I substrati polimerici sui quali è possibile immobilizzare frammenti peptidici devono necessariamente contenere gruppi funzionali (gruppi idrossilici, amminici o carbossilici) in grado di legare covalentemente la sequenza peptidica; l'introduzione di gruppi funzionali ai quali legare covalentemente il residuo peptidico è possibile mediante:

- modifica delle proprietà di superficie dello scaffold preformato attraverso trattamenti chimici o fisici (idrolisi alcalina, riduzione, ossidazione etc.);
- modifica chimica del polimero prima della preparazione dello scaffold attraverso tecniche di blending o di copolimerizzazione con altri polimeri che contengono gruppi funzionali <sup>[3,4]</sup>. Copolimeri acido polilattico-co-lisina aggraffati con RGD sono stati impiegati come scaffold temporanei per il trapianto di cellule <sup>[5]</sup>.

Tali considerazioni indicano chiaramente che nuove applicazioni biomediche dell'ingegneria tissutale potranno essere possibili solo ottimizzando le caratteristiche del substrato polimerico in modo da poter soddisfare esigenze cliniche specifiche.

Copolimeri multiblocchi basati sul PCL come i poli(eter-esteri)<sup>[6,7,8]</sup> (PEE) costituiscono classi di polimeri le cui caratteristiche di biocompatibilità e biodegradabilità li rendono promettenti in vista di un loro impiego in un vasto campo di applicazioni che includono impianti temporanei e sistemi per ingegneria tissutale. L'introduzione nella catena di PCL di segmenti di polioossietilene (PEO), molto flessibili e idrofilici,

aumenta, infatti, l'idrofilicità e riduce il grado di cristallinità dell'omopolimero PCL. Tuttavia, la mancanza di gruppi funzionali lungo la catena polimerica preclude la possibilità di legare covalentemente molecole di riconoscimento cellulare. La copolimerizzazione del PCL con unità monomeriche di Lys o Asp contenenti rispettivamente gruppi funzionali amminici o carbossilici, costituisce un'ottima strategia per l'inserimento in catena di gruppi funzionali. In letteratura sono riportati sintesi di copolimeri di PLLA (o PGA) con monomeri, che oltre ad aumentarne la biodegradabilità, introducono gruppi funzionali in catena<sup>[9]</sup>. Un esempio è rappresentato dai polidepsipeptidi, copolimeri di  $\alpha$ -amminoacidi e  $\alpha$ -idrossiacidi<sup>[10]</sup>. La loro sintesi avviene mediante ROP della L-lattide insieme ad un ciclodepsipeptide protetto, come comonomero, costituito da acido glicolico (Glc) e acido aspartico (Asp-Obzl) o lisina (Lys-Z) per dare poli[(Glc-AspOBzl)-co-LA] e poli[(Glc-LysZ)-co-LA]<sup>[11]</sup> con gruppi carbossilici o amminici distribuiti in catena. Questi copolimeri mostrano una biodegradabilità più elevata della PLLA a causa della diminuzione di cristallinità dovuta alla presenza dei residui della lisina ed inoltre degradano in acido lattico e lisina, componenti tollerati dal corpo umano. Inoltre è possibile inserire sequenze peptidiche RGD immobilizzate sui gruppi funzionali presenti in catena e promuovere così effettivamente l'adesione cellulare su una superficie polimerica altrimenti non aderente<sup>[12]</sup>. Cellule isolate da organi donatori possono essere coltivate su tali scaffolds in vitro per poi essere impiantati in pazienti che hanno bisogno della sostituzione dell'organo.

## **4.2 Obiettivi**

In virtù di queste considerazioni è stata progettata una strategia innovativa di sintesi di copolimeri multi-blocco PCL-PEO, contenenti segmenti idrofobici biodegradabili di PCL ( $M_n = 2.0-4.0$  kDa), blocchi idrofilici di PEO ( $M_n = 1.0$  kDa) ed unità di L-lisina, in grado quest'ultima di assicurare la presenza di gruppi  $-NH_2$  liberi disposti regolarmente a pendaglio lungo la catena polimerica. Tali gruppi amminici introdotti in catena possono essere sfruttati per la successiva fase di ancoraggio di opportune sequenze peptidiche in grado di riconoscere e di interagire con la membrana cellulare. E' importante che i pendagli siano sufficientemente flessibili e di lunghezza adeguata affinché il motivo di riconoscimento, su di esso immobilizzato, possa essere facilmente raggiunto e riconosciuto dalla cellula.

## **4.3 Risultati e discussione**

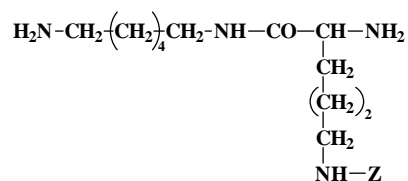
Come descritto nei capitoli precedenti, l'apertura dell'anello dell' $\epsilon$ -caprolattone può avvenire anche ad opera di una diammina alifatica in condizioni più blande e in assenza di catalizzatore. In tal modo si ha la formazione di un'ammide-diolo che, dopo l'aggiunta di un catalizzatore, fungerà da iniziatore per la reazione di polimerizzazione con la crescita del segmento di PCL, la cui lunghezza dipenderà dal rapporto iniziatore / $\epsilon$ -caprolattone.

Mediante polimerizzazione per apertura dell'anello del caprolattone usando come iniziatore difunzionale un'ammide-diammina contenente un residuo di lisina con il gruppo  $-NH_2$  protetto sul  $C_\epsilon$ , preparata "ad hoc", sono stati preparati macromeri del PCL, con opportuna massa molecolare contenenti corte catene laterali terminanti con gruppi funzionali capaci di

legare biomolecole direzionanti. Dal successivo processo di estensione di tale macromero con un opportuno macromero del PEO  $\alpha,\omega$ -COCl terminato si ottengono poli-eter-esteri multiblocco, PEEs, contenenti pendagli ammino-terminati distribuiti in una struttura altamente regolare del copolimero. Nella preparazione di tali copolimeri, particolare attenzione è stata dedicata sia alla frequenza dei gruppi funzionali  $-\text{NH}_2$  lungo la catena che al rapporto idrofilicità/idrofobicità variando opportunamente la lunghezza dei blocchi PCL e PEO.

#### **4.3.1 Sintesi dell' iniziatore Lys- $N_\epsilon$ -Z-EMD**

L' iniziatore è stato ottenuto per condensazione di 1,6-diamminoesano e L-lisina ed ha la seguente struttura molecolare:



*Iniziatore Lys- $N_\epsilon$ -Z-EMD*

La sintesi è stata effettuata mediante reazione di accoppiamento del gruppo  $-\text{NH}_2$  dell'N-Boc-1,6-diamminoesano, con il gruppo  $-\text{COOH}$  della  $N_\alpha$ -Boc-L-Lys(Z)-OH secondo lo schema mostrato in figura 4.1.



dall' analisi  $^1\text{H-NMR}$  (95%) e HPLC (91%). Nello spettro riportato in figura 4.2 si osservano i segnali a  $\delta=3.0$  ppm e a  $\delta=3.6$  ppm attribuiti ai protoni  $-\text{CH}_2\text{NH-CO}-$  (a) della esametilediammina e  $\text{NH}_2\text{-CH-CO}$  (c) della lisina che corrispondono ai gruppi di giunzione tra EMD e Lys.

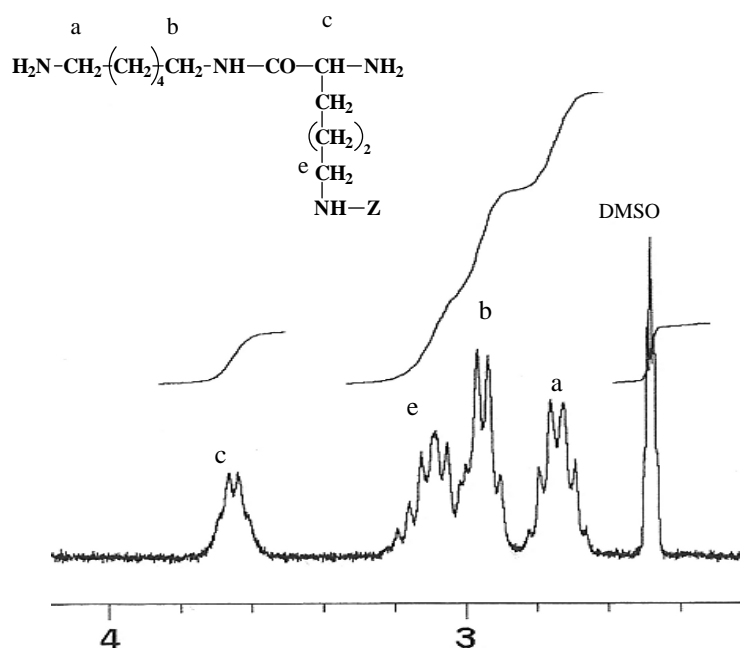
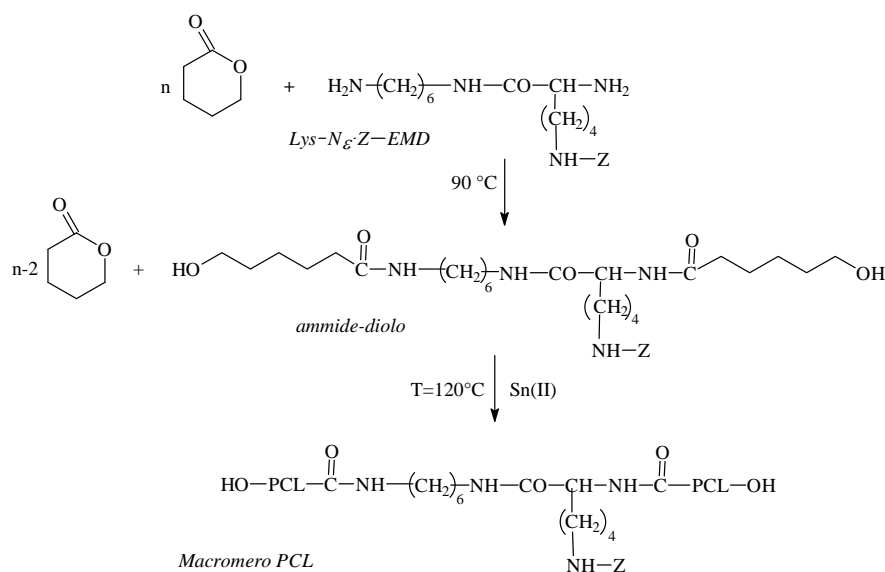


Figura 4.2: spettro  $^1\text{H-NMR}$  della Lys-N $\epsilon$ -Z-EMD ( 200 MHz in DMSO- $d_6$ )

#### 4.3.2 Sintesi e caratterizzazione dei macromeri funzionalizzati del PCL

La sintesi dei macromeri del PCL avviene mediante una procedura a due stadi, seguendo una procedura di sintesi analoga a quella descritta precedentemente nel paragrafo 2.3.3 capitolo 2. In figura 4.3 è descritto lo schema di sintesi:



**Figura 4.3:** sintesi del macromero funzionalizzato PCL-(Lys-N $\epsilon$ -Z)-PCL

Nel primo stadio l'ammide-diammina, Lys-N $\epsilon$ -Z-EMD, è stata aggiunta a T=90°C ad  $\epsilon$ -caprolattone, in assenza del catalizzatore; in queste condizioni si forma, mediante amminolisi del legame estereo, l'ammide-diolo che nel secondo stadio, con l'aggiunta del catalizzatore (Sn(oct)<sub>2</sub>/OH in rapporto molare di 1:100), funge da iniziatore nella ROP dell'  $\epsilon$ -caprolattone, che viene condotta per 24h a 120°C. Seguendo questa procedura di sintesi e variando il rapporto molare  $\epsilon$ -CL/iniziatore, sono stati sintetizzati macromeri del PCL a diverso peso molecolare (PCL<sub>3.8k</sub>, PCL<sub>2.6k</sub>, PCL<sub>1.7k</sub>) con gruppi -OH terminali ed un gruppo amminico protetto terminale del residuo della lisina introdotta nel segmento estereo.

La struttura molecolare dei prodotti di polimerizzazione è stata confermata dall' analisi spettroscopica <sup>1</sup>H-NMR (in figura 4.4 è riportato lo spettro del macromero PCL<sub>3.8k</sub>). Il rapporto tra i valori degli integrali dei segnali relativi ai protoni -CH<sub>2</sub>-OH (I<sub>h</sub>) terminali del PCL ( $\delta=3.6$ ) ed ai protoni -CH<sub>2</sub>-O-CO- (I<sub>m</sub>) del PCL ( $\delta = 4.0$ ) ha consentito di valutare il

numero medio di unità ripetitive del  $\epsilon$ -CL,  $N$ , e quindi il peso molecolare medio numerico del segmento poliesterico:

$$N = [2(I_m/I_h)] + 2 \quad (\text{equazione 1})$$

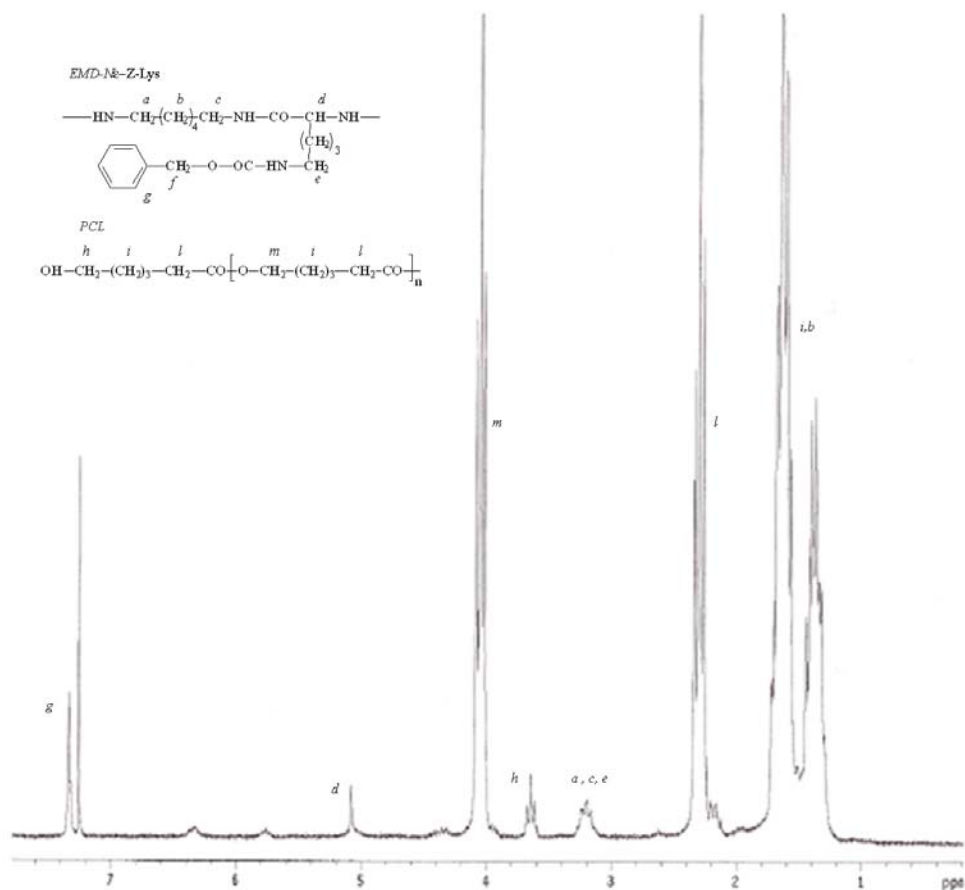


Figura 4.4:  $^1\text{H-NMR}$  (200 MHz in  $\text{CDCl}_3$ ) del macromero  $\text{PCL}_{3.8\text{k}}\text{-(Lys-N}_\epsilon\text{-Z)}$

Inoltre, confrontando i valori degli integrali dei segnali relativi ai protoni  $-\text{CH}_2\text{-OH}$  (h) terminali del PCL ( $\delta=3.6$ ) e  $-\text{CH}_2\text{-NH-CO-}$  (a,c,e) dell' iniziatore  $\text{Lys-N}_\epsilon\text{-Z-EMD}$  è stato possibile calcolare la composizione del macromero in termini di PCL/  $\text{Lys-N}_\epsilon\text{-Z-EMD}$  che risulta essere pari a 1/0.8 per i macromeri  $\text{PCL}_{1.7\text{k}}$  e  $\text{PCL}_{2.6\text{k}}$  e 1/0.9 per il macromero  $\text{PCL}_{3.8\text{k}}$ . Ciò indica la presenza, in tracce, di un iniziatore diverso da  $\text{Lys-N}_\epsilon\text{-Z-}$

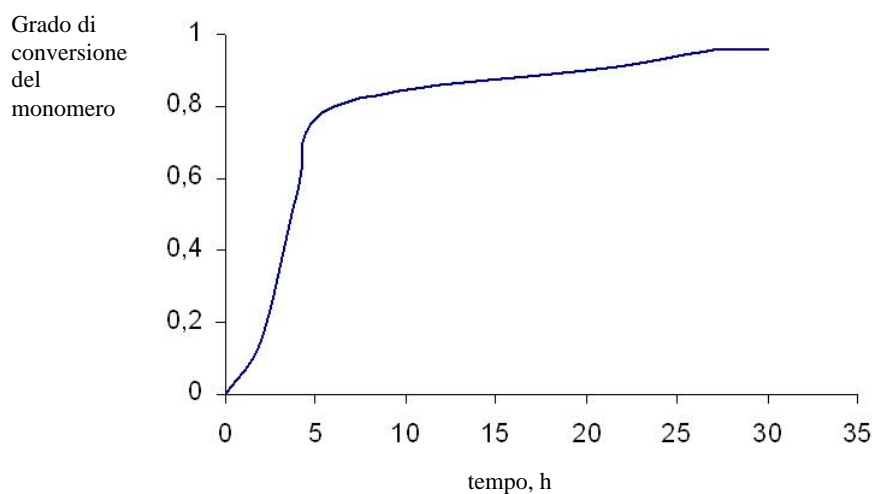


EMD (es. tracce di H<sub>2</sub>O) durante la reazione di polimerizzazione. In tutti i casi l'analisi <sup>1</sup>H-NMR ha indicato che il gruppo N<sub>ε</sub>-Z della lisina non è coinvolto nella reazione di polimerizzazione.

L'analisi spettroscopica FT-IR ha mostrato bande di assorbimento di media intensità a 1649 e 1540 cm<sup>-1</sup> tipiche dei legami ammidici, oltre che quelle a forte intensità tipiche dei legami C-H e C=O del PCL.

Al fine di analizzare l'andamento tipico della reazione di polimerizzazione del PCL, durante la reazione di sintesi del macromero PCL<sub>3.8k</sub> sono stati effettuati dei prelievi a vari tempi di reazione. Al tempo  $t = 0$  il prodotto di reazione è costituito dall'ammide-diolo la cui struttura è stata confermata dall'analisi <sup>1</sup>H-NMR. I prelievi successivi sono stati fatti a partire dall'aggiunta del catalizzatore al sistema di reazione con conseguente inizio della reazione di polimerizzazione del PCL ad opera dell'ammide-diolo.

In figura 4.5 è riportato il grado di conversione del monomero in funzione del tempo di reazione. Si nota un aumento lineare del grado di conversione nelle prime 5 h; dopo 24 h il valore sperimentale di N è molto vicino a quello progettato sulla base del rapporto molare  $\epsilon\text{-Cl/NH}_2$  presente nell'alimentazione:



**Figura 4.5:** grado di conversione del monomero vs tempo di reazione della reazione di polimerizzazione del PCL

In tabella si riportano i dati di caratterizzazione molecolare relativi ai macromeri sintetizzati:

**Tabella 4.1:** macromeri funzionalizzati del PCL preparati mediante ROP of  $\epsilon$ -CL usando *Lys-N<sub>ε</sub>-Z-EMD* come iniziatore.

Macromeri	$N^a)$	$M_n$ PCL $b)$ KDa	$M_n^c)$ KDa	PI $c)$	$\eta_{in}^d)$ (dL·g <sup>-1</sup> )	resa (%)
PCL <sub>1.7k</sub>	14.9 (17.9)	1.7 (2.0)	1.7	1.70	0.10	60
PCL <sub>2.6k</sub>	22.8 (25.6)	2.6 (2.9)	3.1	1.56	0.14	70
PCL <sub>3.8k</sub>	33.5 (33.5)	3.8 (3.8)	4.9	1.42	0.18	86

<sup>a)</sup> numero di unità ripetitive del  $\epsilon$ -CL calcolato dall'equazione 1 e, in parentesi, dal rapporto  $\epsilon$ -CL/iniziatore presente nell'alimentazione; <sup>b)</sup> Peso molecolare medio numerico del blocco PCL determinato via <sup>1</sup>H NMR e, in parentesi, dal rapporto  $\epsilon$ -CL/iniziatore presente nell'alimentazione; <sup>c)</sup> Peso molecolare medio numerico e indice di polidispersità dei macromeri del PCL determinato via SEC. <sup>d)</sup> Viscosità inerenti a 25 °C in CHCl<sub>3</sub>, c = 0.5 g · dL<sup>-1</sup>.

I valori delle viscosità inerenti, compresi tra 0.10-0.18 dL/g, sono indice di un buon grado di polimerizzazione. All'analisi SEC i macromeri del PCL funzionalizzato hanno mostrato curve unimodali e abbastanza

strette con indici di polidispersione che diminuiscono all' aumentare del peso molecolare dei macromeri.

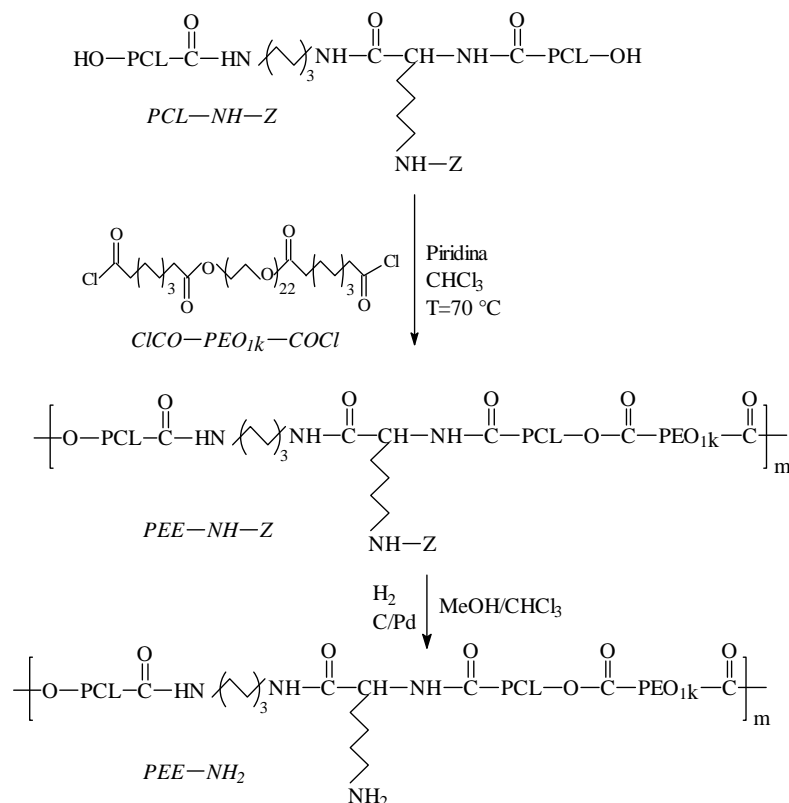
#### **4.3.3 Sintesi del macromero del PEO<sub>1.0k</sub>-COCl terminato**

Il macromero ClCO-PEO<sub>1.0k</sub>-COCl è stata ottenuto secondo una procedura di sintesi già nota (G.Maglio et al, *Macromol. Biosci.*, 2002, 2, 293). In breve: si aggiunge , lentamente e in ambiente rigorosamente anidro, una soluzione di cloroformio contenente polietilenglicole ( $M_n = 1.0$  kD) ad un largo eccesso di cloruro di sebacoile (SEB), con rapporto molare PEG/SEB= 1/10. Tali condizioni di reazione favoriscono l'ottenimento quasi esclusivo del prodotto progettato, limitando al massimo la formazione di composti diversi, quali prodotti monofunzionali oppure di oligomeri superiori contenenti più unità di polietilenglicole. L'eccesso di SEB viene agevolmente allontanato sfruttando la diversa solubilità in *n*-esano del prodotto ottenuto e del SEB. I prodotti che si ottengono sono liquidi viscosi solubili in solventi clorurati.

#### **4.3.4 Sintesi e caratterizzazione dei copolimeri funzionalizzati (PEE)**

I copolimeri multiblocchi, PEE, sono stati ottenuti mediante estensione di catena dei macromeri funzionalizzati del PCL con il macromero difunzionale ClCO-PEO<sub>1.0k</sub>-COCl. La policondensazione è stata condotta in massa alla temperatura di 70°C in presenza di piridina. La base aggiunta funge da accettore di HCl, che si libera durante la reazione, il quale potrebbe provocare scissioni di catena del PCL o favorire la deprotezione del gruppo -NH<sub>2</sub> della Lisina, dando luogo a reazioni di reticolazione. Il prodotto è stato recuperato sciogliendolo nella minima quantità di cloroformio e precipitandolo in metanolo.

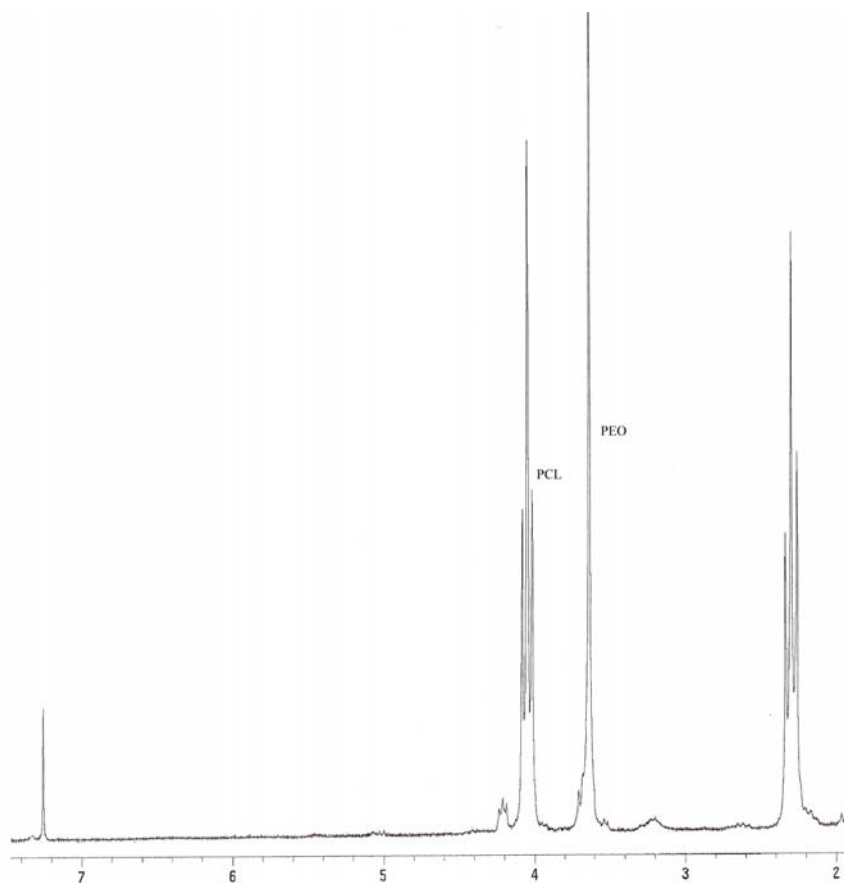
Il gruppo funzionale amminico, Z-protetto della L-lisina è stato deprotetto mediante idrogenazione catalitica in una miscela metanolo/acido acetico 6/4 in volume, in presenza di Pd/C. In figura 4.6 è descritto lo schema di reazione:



**Figura 4.6:** sintesi di PEEs mediante estensione di catena dei macromeri funzionalizzati del PCL con il macromero difunzionale ClCO-PEO<sub>1,0k</sub>-COCl

La struttura molecolare è stata analizzata via <sup>1</sup>H-NMR. Le composizioni sperimentali delle PEEs sintetizzate sono state ricavate confrontando i valori degli integrali relativi ai segnali dei protoni del gruppo -CH<sub>2</sub>-O-CO (l) del PCL con quelli del gruppo-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>- (g) del PEO. In figura 4.7 è riportato lo spettro <sup>1</sup>H-NMR relativo al copolimero

ottenuto mediante estensione di catena del macromero  $PCL_{3.8k}$  con il macromero difunzionale  $ClCO-PEO_{1.0k}-COCl$ , dopo deprotezione del gruppo amminico della catena laterale della lisina, confermata dalla scomparsa dei segnali relativi al gruppo Z a  $\delta=5.10$  e  $7.30$  ppm:



**Figura 4.7:**  $^1H$ -NMR relativo al copolimero  $PEE_3$  deprotetto, ottenuto mediante estensione di catena del macromero  $PCL_{3.8k}$  con il macromero difunzionale  $ClCO-PEO_{1.0k}-COCl$

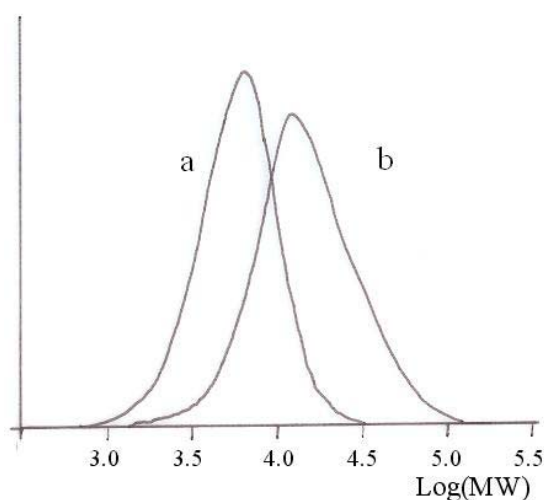
Di seguito sono riportate le caratteristiche delle PEEs sintetizzate:

**Tabella 4.2:** Copolimeri multiblocchi PEEs ottenuti mediante estensione di catena dei macromeri funzionalizzati del PCL con il macromero difunzionale ClCO-PEO<sub>1k</sub>-COCl

Copolimero		$M_n$ <sup>a)</sup> kDa	PI <sup>a)</sup>	PCL/MAC <sup>b)</sup> mol/mol	$\eta_{in}$ <sup>c)</sup> (dL·g <sup>-1</sup> )	Yield (%)
$PEE_1$	PCL <sub>1.7k</sub> -MAC <sub>1.0k</sub>	n.d	n.d.	1/0.96	0.25	55
$PEE_2$	PCL <sub>2.6k</sub> -MAC <sub>1.0k</sub>	8.0	1.54	1/1	0.26	73
$PEE_2^{*d)}$	PCL <sub>2.6k</sub> -MAC <sub>1.0k</sub>	n.d.	n.d.	0.92/1	0.27	76
$PEE_3$	PCL <sub>3.8</sub> -MAC <sub>1.0k</sub>	10.6	1.77	0.95/1	0.30	87

<sup>a)</sup> Determinato mediante SEC. <sup>b)</sup> Determinato mediante <sup>1</sup>H-NMR. <sup>c)</sup> viscosità inerente a 25 °C in CHCl<sub>3</sub>,  $c = 0.5 \text{ g} \cdot \text{dL}^{-1}$ . <sup>d)</sup> Dopo rimozione del gruppo Z.

I valori delle viscosità inerenti, compresi tra 0,25-0.30 dL/g, sono significativamente più alti di quelle dei macromeri di partenza, indicando un discreto grado di polimerizzazione. Inoltre l'analisi SEC mostra curve unimodali spostate verso valori più alti di peso molecolare rispetto a quelle dei corrispondenti macromeri di partenza come mostrato in figura 4.8.



**Figure 4.8:** distribuzione dei pesi molecolari di PCL<sub>3.8k</sub> (a) e PEE<sub>3</sub> (b) ottenute mediante analisi SEC.

### 4.3.5 Caratterizzazione termica e strutturale dei macromeri e dei copolimeri

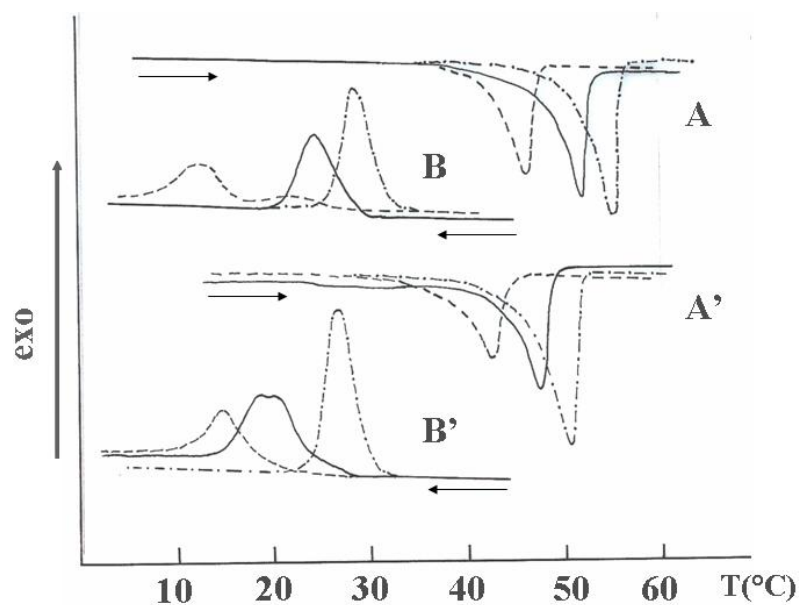
L'analisi termica dei macromeri del PCL e delle PEEs è stata effettuata tramite calorimetria differenziale a scansione. In tabella 4.3 sono riportati i valori delle temperature e delle entalpie di fusione e di cristallizzazione ottenute:

**Tabella 4.3:** caratteristiche termiche dei macromeri funzionalizzati del PCL e di PEEs

	$T_m^a)$ (°C)	$\Delta H_m^a)$ (J/g)	$T_c^b)$ (°C)	$T_m^c)$ (°C)	$\Delta H_m^c)$ (J/g)	$X_c^d)$ (%)
PCL <sub>1.7k</sub>	46.5	54	12.0	43.3	37	n.d.
PCL <sub>2.6k</sub>	52.0	82	23.2	47.1	62	30
PCL <sub>3.8</sub>	55.0	82	27.7	50.0	63	30
PEE <sub>1</sub>	42.6	36	14.8	33.0	32	n.d.
PEE <sub>2</sub>	48.0	46	18.8	42.2	39	21
PEE <sub>2</sub> *	48.1	44	21.3	43.3	38	20
PEE <sub>3</sub>	51.0	56	27.4	46.0	44	26
PCL <sub>2k</sub>	55.6	97	n.d.	48.0	81	56
PCL <sub>4k</sub>	60.0	106	n.d.	49.0	82	58

a) Temperatura ed entalpia di fusione ottenute mediante analisi DSC (1° riscaldamento); b) Temperatura di cristallizzazione c) Temperatura ed entalpia di fusione ottenute mediante analisi DSC (2° riscaldamento); d) grado di cristallinità calcolato mediante analisi WAXS;

Nella figura 4.9, inoltre, sono riportati i termogrammi di fusione (primo riscaldamento) e di cristallizzazione dei macromeri e dei copolimeri:



**Figure 4.9:** termogrammi di prima fusione (A, A') and cristallizzazione (B, B') dei macromeri del PCL (A, B) e dei copolimeri (A', B'). PCL<sub>1700</sub> (----), PCL<sub>2600</sub> (—), PCL<sub>3800</sub> (- · - · -)

L'analisi termica indica che tutti i macromeri sono semicristallini e mostrano temperature di fusione che aumentano all'aumentare del peso molecolare (46.5, 52.0 e 55.0 °C, per PCL<sub>1.6k</sub>, PCL<sub>2.7</sub> e PCL<sub>3.7k</sub> rispettivamente). I valori di temperatura ed entalpia di fusione dei macromeri, sono risultati essere più bassi rispetto a quelli relativi a segmenti di PCL di analogo peso molecolare ottenuti usando 1,4-butandiolo come iniziatore della ROP. Questo effetto è dovuto alla presenza della Lys-N<sub>ε</sub>-Z-EMD che, posta al centro del blocco idrofobico del PCL, disturba l'impacchettamento dei segmenti di PCL riducendo, di conseguenza, la cristallinità, le temperature e le entalpie di fusione.

Per tutti i copolimeri si osserva un'endoterma di fusione slargata ma unimodale e questo suggerisce la presenza di un'unica fase cristallina. L'analisi WAXS di polveri dei copolimeri conferma questa ipotesi. Gli spettri RX, infatti, mostrano forti riflessi a  $2\theta=21.4$  e a  $2\theta=23.8$ , tipici



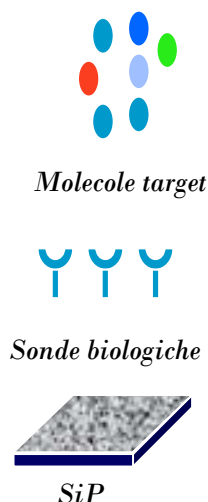
del PCL, mentre riflessi a  $2\theta=19.2$  e a  $2\theta=23.1$ , tipici del PEO cristallino, sono del tutto assenti. Questi risultati sono in accordo quindi con quanto dedotto dall'analisi DSC e indicano che il PEO a temperatura ambiente è amorfo e presumibilmente inglobato in una fase amorfa mista PCL-PEO. La temperatura di fusione e le cristallinità totali ricavate dai diagrammi di diffrazione WAXS, risultano essere inferiori a quelle dei macromeri PCL, come del resto atteso considerando che parte del materiale è costituito da segmenti PEO allo stato amorfo.

#### ***4.4 Esempio applicativo: modifica superficiale di biosensori di silicio mesoporoso mediante ricoprimento con copolimeri funzionalizzati del PCL***

I biosensori sono dispositivi analitici innovativi che utilizzano sonde biologiche fissate in superficie (enzimi, anticorpi, proteine, e acidi nucleici) per il riconoscimento di molecole target (co-enzimi, antigeni, ligandi, e sequenze complementari), da tempo impiegati come sistemi rapidi di analisi per le più diverse problematiche che spaziano dall'analisi ambientale (determinazione di pesticidi, erbicidi ed altre molecole tossiche per gli ecosistemi) alla diagnostica clinica (dalle strisce per il controllo della glicemia, ai sofisticati test genetici per lo screening di malattie geniche)<sup>[13]</sup>. Il cuore di un biosensore di questo tipo è costituito da un trasduttore e cioè da quella parte del dispositivo capace di tradurre l'interazione molecolare sonda-molecola target in un segnale. Il meccanismo di funzionamento di un biosensore è piuttosto complesso: l'interazione molecolare sonda-molecola target determina la variazione di un parametro chimico o fisico che viene rivelato da un elemento trasduttore che lo converte in un segnale ottico, elettrico o chimico. Tipicamente un biosensore si differenzia da un sensore tradizionale perché

impiega materiale biologico come sonda per riconoscere analiti target in una miscela complessa.

Un materiale quasi ideale ed innovativo per la sua biocompatibilità, da impiegare quale trasduttore nella realizzazione di biosensori ottici è il silicio mesoporoso (PSi)<sup>[14,15]</sup>. Il silicio mesoporoso presenta infatti una caratteristica morfologica peculiare dovuta al processo di fabbricazione che è quella di una struttura spugnosa nanostrutturata, ordinata o caotica a seconda delle procedure di produzione adottate. Questa morfologia tipica gli conferisce un'elevata superficie specifica e quindi una efficace possibilità di interazione con agenti esterni. I sensori ottici basati sul silicio poroso sfruttano le variazioni delle proprietà dielettriche di questo materiale in seguito all'adsorbimento sulla superficie porosa (fisico o chimico) dell'analita cui è esposto. Dal momento che il meccanismo di rivelazione non è selettivo e non riesce a distinguere analiti presenti in miscele complesse è necessario implementare la selettività del silicio poroso utilizzando sonde molecolari ad alta selettività che possono essere legate covalentemente alla sua superficie con opportune tecniche di funzionalizzazione chimica<sup>[16]</sup> (figura 4.10). Sulla base dei gruppi funzionali disponibili sulla sonda da immobilizzare (DNA a singola elica, proteine, enzimi), è possibile individuare una procedura di passivazione chimica adatta al processo di funzionalizzazione: per esempio, è possibile silanizzare la superficie del silicio poroso con un silossano NH<sub>2</sub> terminale in modo da consentire l'ancoraggio di biomolecole o crosslinker carbossi terminali.



**Figura 4.10:** rappresentazione schematica del processo di riconoscimento selettivo da parte di un biosensore di SiP.

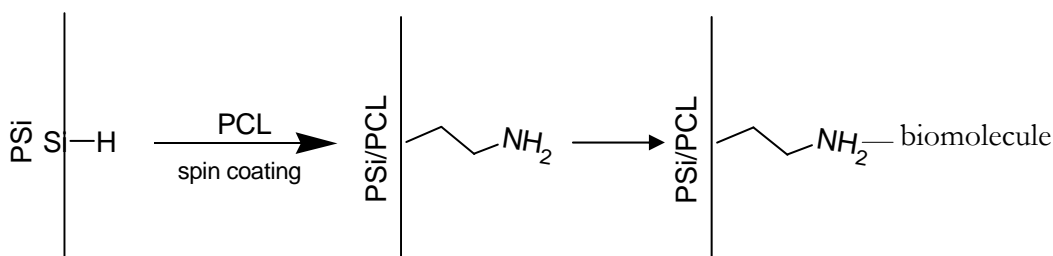
La caratterizzazione delle superfici, prima e dopo i trattamenti chimici, avviene attraverso tecniche di riflettometria in luce bianca o spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier e/o attraverso analisi in fluorescenza impiegando sonde marcate con fluorofori. Ad esempio, l'incremento dell'indice di rifrazione medio del dispositivo, dovuto all'introduzione di materiale organico nei pori del dispositivo, che ivi permane anche dopo lavaggi in quanto agganciato alla rispettiva sonda, è rilevabile sperimentalmente da uno spostamento verso lunghezze d'onda maggiori dello spettro in riflessione ottenuto facendo incidere sul dispositivo un fascio di luce collimato, proveniente da una sorgente ad ampio spettro (riflettometria in luce bianca).

In letteratura sono riportate le procedure di modifica chimica della superficie di silicio poroso in grado di ancorare in modo covalente le molecole sonda, già esplorate<sup>[17]</sup>.

In collaborazione con il gruppo di ricerca del Dott. De Stefano dell'Istituto per la Microelettronica e Microsistemi – Unità di Napoli (CNR) è stato avviato uno studio sull'uso dei copolimeri funzionalizzati del PCL

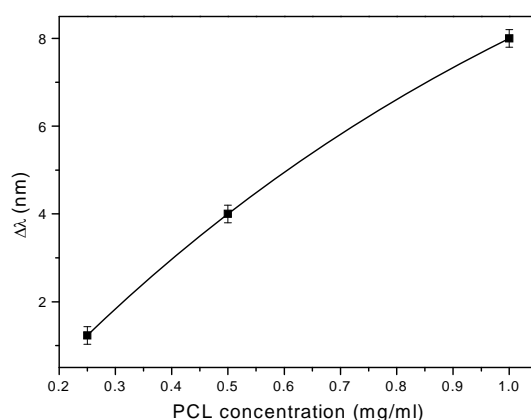
come metodo alternativo per la modifica superficiale del SiP allo scopo di migliorarne le caratteristiche chimiche e di biocompatibilità e di introdurre sulla superficie gruppi funzionali in grado di legare in maniera covalente proteine o molecole specifiche al fine di rendere selettivo il dispositivo. Studi preliminari sull' utilizzo del macromero del PCL<sub>3.8k</sub> funzionalizzato, la cui sintesi è stata precedentemente descritta, per il ricoprimento di substrati di SiP hanno mostrato, in tal senso, risultati incoraggianti.

Il ricoprimento di tali dispositivi con macromeri di PCL<sub>3.8k</sub>, recanti in catena gruppi amminici liberi, è stato realizzato attraverso tecniche di deposizione spin-coating che permettono l'infiltrazione della soluzione polimerica nella struttura porosa del Si che adsorbe il polimero grazie alle interazioni idrofobiche che si stabiliscono tra polimero e superficie.. Il processo è di seguito schematizzato:



Le variazioni delle proprietà del silicio poroso (indice di rifrazione, conduttività, porosità) in seguito all' infiltrazione del PCL sono, monitorate mediante spettroscopia ellissometrica (VASE) e riflettometrica che hanno permesso di valutare l'efficienza e l'omogeneità del ricoprimento.

Misure ottiche su monostrati di SiP dopo deposizione di soluzioni del macromero in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a varie concentrazioni registrano lo spostamento dello spettro di riflessione verso lunghezze d'onda maggiori. In figura 4.11 si riportano i 'red shifts' registrati negli spettri ottici in riflessione dei vari campioni di SiP modificati mediante deposizione di polimero:

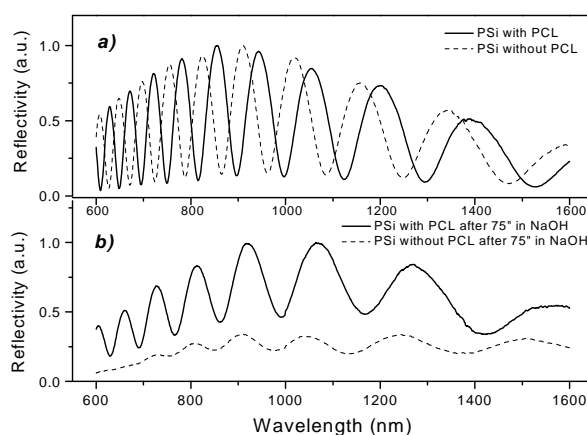


**Figura 4.11:** 'red shifts' registrati negli spettri ottici in riflessione dei vari campioni di SiP a varie concentrazioni della soluzione polimerica.

Lo spin-coating di una soluzione di PCL a concentrazione 0.35mg/ml su uno strato di silicio cristallino mostra la formazione di un film di 4 nm di spessore, comparabile con la dimensione dei pori dei campioni silicio mesoporoso utilizzati nei nostri esperimenti (5-30 nm). L'analisi ellissometrica condotta su uno strato di SiP non modificato di spessore 560 nm e con una porosità iniziale del 79% , rivela una riduzione della porosità fino al 75% dopo infiltrazione del  $\text{PCL}_{3.8k}$  ed una disomogeneità della distribuzione del polimero lungo le pareti dei pori. Misure di bagnabilità condotte su superfici di campioni di SiP mostrano una diminuzione dell'angolo di contatto da  $131^\circ$ , per campioni non modificati, a  $60.5^\circ$  per campioni infiltrati, indice che l'adsorbimento del

polimero nella struttura porosa attenua il carattere idrofobico del SiP rendendolo più permeabile alle soluzioni acquose che altrimenti avrebbero più difficoltà ad entrare nella struttura porosa altamente idrofobica del SiP.

Inoltre un campione di SiP ricoperto con PCL funzionalizzato mostra una resistenza maggiore in una soluzione acquosa di NaOH 0.1M rispetto ad uno strato di SiP non modificato<sup>[18]</sup>: dopo 75s il campione di SiP non modificato risulta essere quasi disciolto nella soluzione alcalina mentre il campione di SiP dopo infiltrazione della soluzione polimerica è ancora integro come mostrato nello spettro ottico registrato sui due campioni di SiP prima e dopo deposizione della soluzione polimerica (figura 4.12).



**Figura 4.12:** spettri ottici in riflessione relativi a campioni di SiP prima (linea discontinua) e dopo (linea continua) infiltrazione registrati prima (a) e dopo (b) l'immersione in una soluzione 0.1M NaOH.

Una volta messa a punto la procedura di spin-coating per il ricoprimento del silicio poroso sono stati condotti esperimenti di immobilizzazione di una molecola fluorescente, la fluoresceina, sui gruppi

amminici introdotti in superficie dopo il ricoprimento con il macromero del PCL funzionalizzato. L'intensità della fluorescenza delle immagini acquisite tramite un microscopio a fluorescenza, è rimasta uniforme su tutta la superficie del campione e dello stesso ordine di grandezza anche dopo numerosi lavaggi; ciò indica che i gruppi funzionali introdotti in superficie sono disponibili per legare chimicamente materiale biologico da impiegare come sonda per la realizzazione del biochip.

Prossimi esperimenti saranno focalizzati sull'infiltrazione di copolimeri funzionalizzati PCL/PEO, sopra descritti, allo scopo di poter studiare le proprietà fisiche e chimiche, così come la distribuzione dei gruppi funzionali, della superficie del SiP al variare della lunghezza dei segmenti PCL e PEO e quindi del rapporto idrofobicità-idrofilicità del copolimero.

**Bibliografia**

- [1] Ulrich Hersel, Claudia Dehmen, Horst Kessler, *Biomaterials*, 24, 4385-4415, 2003.
- [2] Y. Ikada, *Surface modification of polymers for medical applications Biomaterials*, 15, 725, 1994.
- [3] Han D.K., Hubbell J.A., *Macromolecules*, v. 30, 6077, 1997.
- [4] Jo S., Engel P.S., Mikos A.G., *Polymer*, v.41, 7595, 2000.
- [5] Cook A.D., Hrkach J.S., Johnson I.M., Pajvani U.B., Cannizzaro S.M., Langer R., *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 35, 513, 1997.
- [6] S. Li, H. Garreau, M. Vert, T. Petrova, N. Manolova, I. Rashkov, *J. Appl. Sci.*, 68, 989, 1998.
- [7] D. Cohn, T. Stern, M.F. Gonzalez, J. Epstein, *J. Biomed. Mater. Res.*, 59, 273, 2002.
- [8] J. W. Lee, f. Hua, D.S. Lee, *J. Controlled Release*, 73, 315, 2001.
- [9] A. Barrera, E. Zylstra, T. Lansbury, and R. Langer, *Macromolecules*, 28, 425-432, 1995.
- [10] Yuichi Ohya, Hideaki Matsunami, Etsuro Yamabe, Tatsuro Ouchi, *J Biomed Mater Res*, 65 A, 79-88, 2003.
- [11] Tatsuro Ouchi, Tatsuya Nozaki, Akira Ishikawa, Isao Fujimoto, Yuichi Ohya, *Journal of Polymer Science:Part A; Polymer Chemistry*, 35, 377-383, 1997.
- [12] A. Barrera, E. Zylstra, T. Lansbury, and R. Langer, *J. Am. Chem. Soc.*, 115, 11010-11011, 1993.
- [13] *Optical biosensors*, Eds. F.S. Ligler e C.A. Rowe Taitt, Elsevier, Amsterdam, the Netherlands, 2004.
- [14] S.M. Weiss, H. Ouyang, J. Zhang, and P.M.Fauchet, *Opt. Express* 13, 1090, 2005.
- [15] L. De Stefano, I. Rea, I. Rendina, L. Rotiroti, M.Rossi, and S. D'Auria, *Phys. Stat Sol (A)*, 203, 886-891, 2006.
- [16] H. Ouyang, M. Chrtistophersen, R.Viard, B. Miller, *Adv.Funct.Mater.*, 15, 1851-1859, 2005.
- [17] L. De Stefano, P. Arcari, A. Lamberti, C. Sanchez, L. Rotiroti, I. Rea, I. Rendina, *Sensors*, 7, 214-221, 2007.



- [18] S.H.C. Anderson, H. Elliot, D.J. Wallis, L.T. Canham, J.J. Powell,  
*Phys. Stat. Sol. (a)*, 197, 331,2003.

## **Capitolo 5**

### **Conclusioni**

Il lavoro di tesi è stato incentrato essenzialmente sulla sintesi e caratterizzazione chimico-fisica di copolimeri a blocchi a base di poli( $\epsilon$ -caprolattone), PCL, di diversa struttura chimica e composizione, aventi caratteristiche strutturali e proprietà chimico-fisiche e meccaniche mirate principalmente alla formulazione di sistemi nanoscopici per il rilascio controllato di farmaci e alla preparazione e funzionalizzazione di dispositivi utilizzati in campo biomedico.

In particolare, si è proceduto alla messa a punto di strategie di sintesi per la preparazione di :

- copolimeri anfifilici a blocchi ad architettura variabile basati su segmenti di PCL e polietilenossido (PEO).
- polimeri a base di PCL e copolimeri multiblocchi PCL-PEO, contenenti una serie di “innesti” terminanti con gruppi  $-NH_2$ , regolarmente disposti lungo la catena

#### ***COPOLIMERI AD ARCHITETTURA VARIABILE***

Sono state sintetizzate e caratterizzate da un punto di vista chimico-fisico, termico e strutturale diverse classi di copolimeri costituiti da blocchi di PCL e PEO, con diversa architettura e composizione. Sono state messe a punto diverse strategie di sintesi a seconda della struttura progettata. Indicando con B il segmento PCL e con A il segmento PEO, è possibile raggruppare le architetture progettate in tre classi :

-*lineare*: diblocco AB, triblocco ABA ;

-*ramificata a stella*: AB<sub>2</sub>, A(BA)<sub>2</sub> ;

-*a innesto (“graft”)*: A-g-B

Per i copolimeri ad architettura ramificata, in particolare, è stata messa a punto, una procedura di sintesi innovativa che prevede la crescita dei segmenti del PCL mediante ROP iniziata da una macromolecola preparata ‘ad hoc’ perché possa fungere da template per le diverse architetture progettate. Questo nuovo metodo di sintesi, permette di modulare con molta facilità la lunghezza del segmento poliestereo e di conseguenza di controllare la composizione dei copolimeri.

I polimeri sintetizzati sono stati caratterizzati mediante analisi <sup>1</sup>H-NMR, SEC, diffrazione dei raggi-X, misure di viscosità e DSC. Si è trovato che le strutture sono molto vicine a quelle progettate, con distribuzioni dei pesi molecolari unimodali e abbastanza strette. In massa, tutti copolimeri presentano la fase cristallina del PCL e per sistemi nei quali la percentuale in peso del PEO è maggiore del 20% si è osservata una separazione in microfasi cristalline diverse per i diversi blocchi.

I copolimeri ad architettura lineare e a stella, AB, ABA, AB<sub>2</sub>, A(BA)<sub>2</sub> sono stati valutati per la formulazione di sistemi nanoparticellari a rilascio controllato di farmaci in collaborazione col Dip. di Chimica Farmaceutica e Tossicologica dell’ Università ‘Federico II’ di Napoli. Le notevoli potenzialità di questi sistemi nell’ autorganizzarsi in nanostrutture di tipo micellare idonee per il rilascio controllato e mirato di farmaci sono state confermate dai bassi valori di CMC, indice di un’elevata stabilità termodinamica delle micelle, dalla buona capacità d’ incapsulare nel “core” farmaci lipofili e dalla possibilità di funzionalizzare la corona esterna delle micelle con opportuni ligandi direzionanti (“targeting”). Da questi studi è

emerso che, oltre la composizione dei copolimeri, anche la lunghezza dei blocchi e l'architettura influenzano il processo di auto-assemblaggio dei copolimeri e possono giocare un ruolo di rilievo nel determinare la stabilità e le dimensioni delle micelle. Il targeting è stato realizzato inserendo l'acido folico, come ligando direzionante, sul terminale libero di catena del PEO sia in sistemi lineari, diblocco PEO-PCL, che ramificati, PEO-Lys-(PCL)<sub>2</sub>. Lo studio dell'efficacia di questi sistemi come nanotrasportatori di farmaci ad azione mirata, particolarmente adatti nella terapia antitumorale, è in fase preliminare. I primi risultati ottenuti "in vitro" sono incoraggianti.

Il copolimero ramificato ad innesto, "graft", è stato utilizzato come agente compatibilizzante nella preparazione di membrane porose, costituite da miscele di due poliesteri biocompatibili e biorisorbibili come PDLLA e PCL, da utilizzare come supporto (scaffold) per l'adesione e proliferazione cellulare. Un approfondito studio, condotto in collaborazione con l'Istituto di Chimica e Tecnologia dei Polimeri del CNR di Napoli, sulle condizioni di ottenimento delle membrane ha rivelato che l'aggiunta del 10% copolimero PCL/PEO con struttura 'graft' migliora la dispersione dei domini di PCL nella matrice di PDLLA in maggior misura rispetto all'effetto di copolimeri a architettura lineare diblocco e triblocco. ed esalta, inoltre, l'arricchimento del PCL sulle superfici della membrana favorendo in tal modo la formazione di una struttura di tipo "core-skin" che può favorire l'adesione cellulare.

#### *POLIETERESTERAMMIDI FUNZIONALIZZATE*

Sono stati sintetizzati copolimeri multiblocco PCL-PEO recanti in catena residui di L-lisina aventi all'estremità il gruppo -NH<sub>2</sub> libero, disponibile per reazioni di attacco di gruppi amminoacidici in grado di

migliorare l'adesione cellulare in vista di una loro applicazione nel campo dell'ingegneria tissutale come "scaffold" per la ricrescita cellulare.

Anche in questo caso, per l'ottenimento di questi copolimeri è stata progettata e sintetizzata 'ad hoc' una molecola difunzionale, un' ammidiammina contenente un residuo di lisina con il gruppo amminico del C<sub>ε</sub> protetto, utilizzata come iniziatore per la preparazione di macromeri del PCL mediante ROP dell' ε-CL. Copolimeri multiblocco PCL-PEO contenenti 'pendagli' terminanti con gruppi amminici regolarmente distribuiti in catena sono stati ottenuti mediante policondensazione in massa dei macromeri del PCL con PEO difunzionale α,ω-COCl terminato. La strategia di sintesi messa a punto ha consentito di modulare la frequenza dei gruppi amminici in catena ed il rapporto idrofilicità/idrofobicità. Studi preliminari condotti su dispositivi di silicio mesoporoso, la cui superficie è stata modificata mediante adsorbimento dei copolimeri funzionalizzati sintetizzati, hanno confermato la possibilità di sfruttare i gruppi amminici introdotti in catena per l' ancoraggio di molecole riconoscibili da recettori della membrana cellulare.

## Capitolo 6

### Parte sperimentale

#### 5.1 Materiali e Tecniche di caratterizzazione

##### Solventi e prodotti utilizzati

Il diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) e il cloroformio ( $\text{CHCl}_3$ ) sono stati purificati seguendo procedure standard e sono stati conservati in atmosfera di azoto su setacci molecolari precedentemente attivati a  $160^\circ\text{C}$ , sotto alto vuoto, per 6 h. Il DMSO anidro è stato utilizzato come ricevuto (Fluka). L' $\varepsilon$ -caprolattone (Fluka) è stato seccato su  $\text{CaH}_2$  per 24 h a temperatura ambiente, distillato sotto vuoto  $\approx 10\text{mmHg}$ , a  $120^\circ\text{C}$  ed, infine, conservato, in atmosfera di azoto, su setacci molecolari. Il *poli(etilenglicol)-monometiltere*, *poli(etilenglicol)-monoammino* ed il *poli(etilenglicol)-diammino* (*m*PEG,  $M_n = 5.0$  e  $2.0$  kDa; *m*PEG-NH<sub>2</sub> e NH<sub>2</sub>-PEO-NH<sub>2</sub>,  $M_n = 2.0$  kDa, Aldrich) sono stati anidrificati mediante distillazione azeotropica da toluene, utilizzando un apparecchio Dean-Stark ed il prodotto anidro è stato conservato in atmosfera di azoto.

La  $N\alpha$ - $N\varepsilon$ -di-Z-L-Lisina, la  $N,N'$ -diisopropilcarbodiimmide (DIPC) e la 4-dimetilamminopiridina (DMAP), la  $N$ -Boc-1,6-diamminoesano ( $N$ -Boc-1,6-EMD), la  $N\alpha$ -Boc- $N\varepsilon$ -ZLys e la  $N,N$ -diidopropiletilammina (DIEA) sono state usate come ricevute. Lo stagno-2-etilesanoato,  $\text{Sn}(\text{Et})_2$ , (Aldrich), L'*acido folico* (Fluka) ed il carbone palladiato C/Pd (10% Pd, Fluka) sono stati utilizzati senza alcuna purificazione. La *piridina* (Fluka) è stata distillata sotto vuoto su NaOH e

conservata sotto azoto su setacci molecolari. L' *anidride succinica* (Fluka) è stata ricristallizzata da anidride acetica e conservata in atmosfera di azoto. La *N-idrossisuccinimide* (NHS) è stata anidrificata mediante trattamento con  $P_2O_5$  sotto vuoto e conservata sotto azoto. Il *cloruro di sebacoile* (SEB) è stato purificato mediante distillazione sotto vuoto  $\approx 10\text{mmHg}$  a  $130^\circ\text{C}$  ed infine, conservato, in atmosfera di azoto, su setacci molecolari. La *PDLLA*, fornita dalla Resomer ( $M_n=58000$ ,  $M_w=110000$ , ID=1.8) ed Il *PCL*, fornito dalla Solvay ( $M_n=50000$ ) sono stati utilizzati senza alcuna purificazione.

#### *Spettroscopia $^1\text{H-NMR}$*

Gli spettri  $^1\text{H-NMR}$  sono stati eseguiti a temperatura ambiente sciogliendo circa 10 mg di campione in 0.3-0.4 mL di solventi deuterati ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{DMSO-d}_6$ ), usando gli spettrometri Varian Gemini 200 (200 MHz) e Varian Gemini 300 (300 MHz).

#### *Spettroscopia FT-IR*

Gli spettri infrarossi sono stati registrati su pastiglie di KBr contenente il 5% in massa di campione, mediante uno spettrometro Jasco FT/IR-430.

#### *Calorimetria differenziale a scansione (DSC)*

Le proprietà termiche dei copolimeri sono state studiate utilizzando un calorimetro differenziale a scansione (DSC) Mettler Toledo; circa 7-8 mg di copolimero sono stati riscaldati, in atmosfera di azoto, da  $0^\circ\text{C}$  a  $80^\circ\text{C}$ , ad una velocità di  $2^\circ\text{C}/\text{min}$ ; successivamente, sono stati tenuti in isoterma (a  $80^\circ\text{C}$ ) per 5 minuti; quindi, sono stati portati da  $80^\circ\text{C}$  a  $0^\circ\text{C}$  a  $2^\circ\text{C}/\text{min}$  ed, infine, sono stati riscaldati da  $0^\circ\text{C}$  a  $80^\circ\text{C}$  a  $2^\circ\text{C}/\text{min}$ .

### *Diffrazione-raggi X (WAXS)*

Gli spettri di diffrazione dei raggi X, dei copolimeri, sono stati effettuati utilizzando un diffrattometro automatico per polveri Philips (mod. PW 1711) fornito di camera “focusing” e di contatore Geiger proporzionale, impiegando una radiazione  $\text{CuK}\alpha$ , di lunghezza d’onda 1,5418 Å, filtrata con nichel. I gradi di cristallinità sono stati determinati valutando il rapporto tra l’area dei picchi di diffrazione relativi alla fase cristallina e quella totale (fase amorfa più fase cristallina).

### *Viscosimetria*

Le viscosità inerenti dei copolimeri, misurate mediante un viscosimetro Cannon-Ubbelohde a 25°C in cloroformio ( $c=0,5\text{g/dL}$ ), sono state ricavate usando la seguente relazione:

$$\eta_{\text{inh}} = (1/c) * \ln(t/t_0)$$

dove,  $t/t_0$  è il rapporto tra i tempi di scorrimento della soluzione e del solvente e  $c$  è la concentrazione della soluzione espressa in g/dL

### *Cromatografia ad esclusione molecolare*

I pesi molecolari medi sono stati determinati mediante “size-exclusion chromatography” (SEC), presso il dipartimento di Chimica Farmaceutica e Tossicologica dell’Università Federico II di Napoli, o presso il Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale dell’Università di Pisa. L’analisi SEC è stata effettuata in THF alla temperatura di 20°C usando due colonne “Phenogel” connesse in serie ad un detector RI ed impiegando come standard campioni di polistirene monodispersi.



## 5.2 Sintesi dei copolimeri anfifilici per la realizzazione di dispositivi per il rilascio controllato di farmaci

### 5.2.1 Sintesi del copolimero diblocco $PCL_{4k}$ - $PEO_{2k}$

In un pallone da 50 mL, a 1.62 g di  $mPEO_{2k}$ -OH (0.81 mmol), sono stati aggiunti 3.813 g di  $\epsilon$ -CL (33.45 mmol) e 3 mg (8.11  $\mu$ mol) di catalizzatore  $Sn(Oct)_2$  al fine di avviare la polimerizzazione per apertura dell'anello dell' $\epsilon$ -CL. Il pallone di reazione è stato quindi immerso in un bagno ad olio e la temperatura dello stesso è stata impostata a 120°C per mezzo di un termostato ad immersione. La reazione è stata condotta per 24 h sotto agitazione. Il prodotto è stato successivamente recuperato e purificato per precipitazione in 300 mL di etere etilico. Il precipitato è stato raccolto su un setto poroso e seccato in stufa da vuoto. Alla fine del processo sono stati recuperati 5.321 g di prodotto (resa 98%,  $\eta_{inh}$  = 0.28 dL/g in  $CHCl_3$ ).

$^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ , ppm):  $\delta$ =3.70-3.60 (176H,  $-CH_2OCH_2-$  mPEO);  $\delta$ =4.22 (2H,  $-OCH_2CH_2OCO-$  mPEO);  $\delta$ =3.36 (3H,  $-OCH_3$  mPEO);  $\delta$ =4.05 (70H,  $-PCL-CH_2-OCO-$ );  $\delta$ =2.32 (70H,  $-CH_2CH_2CH_2CO-$  PCL).

### 5.2.2 Sintesi del copolimero triblocco $PEO_{2k}$ - $PCL_{8k}$ - $PEO_{2k}$

La sintesi del copolimero triblocco  $PEO_{2k}$ - $PCL_{8k}$ - $PEO_{2k}$  è stata condotta in quattro stadi:

#### a) Sintesi del copolimero diblocco $PEO_{2k}$ - $PCL_{8k}$

La procedura di sintesi di quest'ultimo è del tutto simile a quella del copolimero diblocco sopra descritta. In un pallone da 50 mL, munito di rubinetto laterale, sono stati posti a reagire 1.201 g di  $mPEO_{2k}$ -OH (0.60 mmol) insieme a 5.038 g di  $\epsilon$ -CL (44.19 mmol) in atmosfera di azoto

ed in presenza di 2 mg (6.00  $\mu\text{mol}$ ) di  $\text{Sn}(\text{Oct})_2$  come catalizzatore; è stata quindi attivata l'agitazione magnetica e la temperatura è stata impostata a 120°C. La reazione è stata terminata dopo 24 h. Il prodotto è stato precipitato in etere e recuperato per filtrazione; successivamente è stato essiccato in stufa sotto vuoto. Sono stati infine ottenuti 6.174 g di prodotto (resa 99%,  $\eta_{\text{inh}} = 0.33 \text{ dL/g}$  in  $\text{CHCl}_3$ ).

*b) Succinilazione del copolimero diblocco PCL<sub>8k</sub>-PEO<sub>2k</sub>*

In un pallone da 50 mL sono stati fatti reagire 0.998 g di mPEO<sub>2k</sub>-PCL<sub>8k</sub> (0.098 mmol) con 0.029 g di anidride succinica (0.294 mmol) sciolti in  $\text{CHCl}_3$  in presenza di 9 mg di piridina (0.098 mmol). La temperatura del sistema è stata impostata a 60°C e la reazione è decorsa per 48 h. Il prodotto è stato quindi precipitato in 300 mL di etere e recuperato mediante filtrazione. Esso è stato poi ulteriormente purificato dall'eccesso di anidride succinica e di piridina solubilizzandolo in 20 mL di acqua debolmente acida per HCl ( $\text{pH} \cong 5$ ) ed estratto con  $\text{CHCl}_3$ . Il prodotto è stato quindi portato a secco sotto vuoto.

*c) Attivazione del gruppo carbossilico del diblocco PEO<sub>2k</sub>-PCL<sub>8k</sub> con NHS*

In un pallone da 50 mL, 0.720 g di copolimero diblocco succinato PEO<sub>2k</sub>-PCL<sub>8k</sub>-COOH (0.072 mmol) sciolti in 7 mL di  $\text{CHCl}_3$  sono stati aggiunti 0.024 g di NHS (0.208 mmol), 0.043 g di DCC (0.208 mmol) e 0.008 g di DMAP (0.065 mmol). La reazione è stata condotta per 24 h a temperatura ambiente. La dicicloesilurea formata è stata separata per filtrazione della miscela di reazione. Il prodotto è stato quindi precipitato in 400 mL di miscela etere/MeOH 5:2 e successivamente filtrato su setto poroso e seccato in stufa sotto vuoto.

*d) Coupling del diblocco PEO<sub>2k</sub>-PCL<sub>8k</sub> con mPEO<sub>2k</sub>-NH<sub>2</sub>*

In un pallone da 50 mL sono stati fatti reagire 0.727 g di copolimero diblocco PEO<sub>2k</sub>-PCL<sub>8k</sub>-COO-NHS (0.071 mmol) insieme a 0.160 g di mPEO<sub>2k</sub>-NH<sub>2</sub> (0.08 mmol) in presenza di DIEA (0.08 mmol). Il tutto è stato sciolto in 9 mL di CHCl<sub>3</sub>. La reazione è stata condotta per 24 h a temperatura ambiente. Successivamente è stato eseguito un lavaggio in etere/metanolo 5:2 allo scopo di allontanare la NHS che si libera durante la reazione ed il PEO non reagito. Il prodotto purificato è stato quindi essiccato in stufa. Sono stati recuperati quindi 0.749 g di prodotto (resa 80%,  $\eta_{inh}$  = 0.38 dL/g in CHCl<sub>3</sub>).

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, ppm):  $\delta$ =4.22 (2H, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCO- di mPEO);  $\delta$ =3.60-3.70 (176H, -CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>- di mPEO )  $\delta$ =3.45 (2H, PEO-CH<sub>2</sub>-NH-CO-PCL);  $\delta$ =3.36 (3H, -OCH<sub>3</sub> di mPEO);  $\delta$ =4.05 (70H, -PCL-CH<sub>2</sub>-OCO-);  $\delta$ =2.32 (70H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO- PCL).

*5.2.3 Sintesi del macroiniziatore Lys-PEO<sub>2K</sub>*

Il macroiniziatore è stato ottenuto attraverso le seguenti fasi di reazione:

*a) Coupling del mPEO<sub>2k</sub> con N $\alpha$ -N $\epsilon$ -di-Z-L-Lisina*

In un pallone da 50 mL, munito di rubinetto laterale, sono stati posti 1.003 g (0.501 mmol) di mPEO<sub>2k</sub>-NH<sub>2</sub> sciolti in 7 mL di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0.255 g (0.481 mmol) di N $\alpha$ -N $\epsilon$ -di-Z-Lys (previa attivazione del gruppo carbossilico con NHS) sciolti in 5 mL di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0.206 g (1.01 mmol) di DCC e 0.030 g (0.245 mmol) di DMAP sciolti in 2 mL di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La miscela di reazione è stata mantenuta, sotto agitazione ed in atmosfera di azoto, a temperatura ambiente per 24 h; quindi filtrata per eliminare il precipitato costituito da dicicloesilurea. Il prodotto di reazione è stato poi

ulteriormente purificato dall'eccesso della  $N_\alpha$ - $N_\epsilon$ -di-Z-Lys e DMAP solubilizzandolo in 20 mL di acqua resa acida con HCl ( $\text{pH} \approx 5$ ). Dopo aver allontanato la  $N_\alpha$ - $N_\epsilon$ -di-Z-Lys insolubile in  $\text{H}_2\text{O}$ , la soluzione è stata estratta ripetutamente con  $\text{CHCl}_3$ . Successivamente la fase cloroformica è stata anidrificata su  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro. Il prodotto è stato ulteriormente purificato dall'eccesso di mPEO-NH<sub>2</sub> mediante cromatografia su gel di silice impiegando come miscela eluente  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  con gradiente lineare (2%, 4%, 8%). Dopo rimozione del solvente sotto vuoto, sono stati ottenuti 1.011 g di  $N_\alpha$ - $N_\epsilon$ -di-Z-Lys-PEO (resa 70%,  $\eta_{\text{inh}} = 0.15$  dL/g in  $\text{CHCl}_3$ ).

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , ppm):  $\delta = 7.35$  (10H, CH aromatici Z-Lys);  $\delta = 5.40$  (1H,  $-\text{CH}_2-\underline{\text{NH}}-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{O}$  Lys);  $\delta = 5.20-5.00$  (5H,  $-\text{O}-\underline{\text{CH}}_2-\text{O}$  Lys) +  $\text{CH}-\underline{\text{NH}}-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{O}$  Lys);  $\delta = 3.80-3.60$  (176H,  $-\text{CH}_2\text{OCH}_2-$  mPEO);  $\delta = 3.45$  (2H,  $-\text{Lys}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{PEO}_m$ );  $\delta = 3.36$  (3H,  $-\text{OCH}_3$  mPEO);  $\delta = 3.20$  (2H,  $-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}}_2-\text{NH}-\text{Z}$ );  $\delta = 2.00-1.00$  (6H,  $-\text{CH}-\underline{\text{CH}}_2-\underline{\text{CH}}_2-\underline{\text{CH}}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{Lys}$ ).

*b) Deprotezione del macromero  $N_\alpha$ - $N_\epsilon$ -di-Z-Lys-PEO<sub>2k</sub>.*

In un pallone da 50 mL sono stati pesati 1.498 g (0.620 mmol) del prodotto da deproteggere sciolti in 35 mL di metanolo, secondo i parametri di solubilità del prodotto. Alla soluzione sono stati aggiunti 0.266 g (0.248 mmol) di palladio su carbone attivo. Mediante un capillare è stato fatto gorgogliare idrogeno per 6 h a 30°C. La miscela di reazione è stata centrifugata alla velocità di 3500 giri/min per 35 min per eliminare il carbone. La soluzione supernatante, portata a secco, ha fornito 1.411 g di prodotto, Lys-PEO<sub>2k</sub>, (resa 80%).

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , ppm):  $\delta=3.80\text{-}3.60$  (176H,  $-\text{CH}_2\text{OCH}_2-$  mPEO);  $\delta=3.45$  (2H,  $-\text{Lys-CO-NH-CH}_2\text{-PEOm}$ );  $\delta=3.36$  (3H,  $-\text{OCH}_3$  mPEO);  $\delta=3.20$  (2H,  $-\text{CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-Z}$ );  $\delta=2.00\text{-}1.00$  (6H,  $-\text{CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH- Lys}$ ).

#### 5.2.4 Sintesi del copolimero ramificato a stella $\text{PEO}_{2k}\text{-Lys-(PCL}_{2k})_2$

In un pallone da 50 mL sono stati posti sotto flusso di azoto 0.940 g (0.438 mmol) di Lys- $\text{PEO}_{2k}$  e 1.889 g (16.571 mmol) di  $\epsilon\text{-CL}$ . Il pallone è stato tenuto in agitazione a  $80^\circ\text{C}$  per 24 h. Alla miscela di reazione sono stati aggiunti 4 mg (8.76  $\mu\text{mol}$ ) di  $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ . La polimerizzazione è stata condotta a  $120^\circ\text{C}$  per 24 h. Dopo raffreddamento, il prodotto è stato sciolto nella minima quantità di  $\text{CHCl}_3$  ( $\approx 5$  ml) e precipitato in un largo eccesso di etere etilico freddo (300 mL). Il precipitato è stato raccolto su un setto poroso e seccato in stufa da vuoto. Si sono ottenuti 2.405 g di macromero (resa 85%,  $\eta_{\text{inh}} = 0.18$  dL/g in  $\text{CHCl}_3$ ).

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , ppm):  $\delta=4.05$  (71H,  $-\text{CH}_2\text{-OCO- PCL}$ );  $\delta=3.65$  (176H,  $-\text{CH}_2\text{OCH}_2-$  mPEO + 4H,  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH- PCL}$ );  $\delta=3.45$  (2H,  $-\text{Lys-CO-NH-CH}_2\text{-PEOm}$ );  $\delta=3.36$  (3H,  $-\text{OCH}_3$ );  $\delta=2.3$  (71H,  $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO- PCL}$ );  $\delta=1.8\text{-}1.3$  (226H,  $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{- PCL}$  + 6H,  $-\text{CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH- Lys}$ ).

#### 5.2.5 Sintesi del copolimero ramificato a stella $\text{PEO}_{2k}\text{-Lys-(PCL}_{6k})_2$

Con lo stesso procedimento descritto sopra è stato ottenuto anche il copolimero  $\text{PEO}_{2k}\text{-Lys-(PCL}_{2k})_2$ .

In un pallone da 50 mL sono stati posti sotto flusso di azoto 0.361 g (0.168 mmol) di Lys- $\text{PEO}_{2k}$  e 2.178 g (19.11 mmol) di  $\epsilon\text{-CL}$ . Il pallone è stato tenuto in agitazione a  $80^\circ\text{C}$  per 24 h. Alla miscela di reazione sono stati aggiunti 1 mg (3.36  $\mu\text{mol}$ ) di  $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ . La polimerizzazione è stata

condotta a 120°C per 24 h. Dopo raffreddamento, il prodotto è stato sciolto nella minima quantità di CHCl<sub>3</sub> (≈5 mL) e precipitato in un largo eccesso di etere etilico freddo (300 mL). Il precipitato è stato raccolto su un setto poroso e seccato in stufa da vuoto. Si sono ottenuti 2.209 g di macromero (resa 87%,  $\eta_{inh}$  = 0.30 dL/g in CHCl<sub>3</sub>).

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, ppm):  $\delta$ =4.05 (142H, -CH<sub>2</sub>-OCO- PCL);  $\delta$ =3.65 (176H, -CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>- mPEO + 4H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH- PCL);  $\delta$ =3.45 (2H, -Lys-CO-NH-CH<sub>2</sub>-PEOm);  $\delta$ =3.36 (3H, -OCH<sub>3</sub>);  $\delta$ =2.3 (142H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO- PCL);  $\delta$ =1.8-1.3 (452H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- PCL + 6H, -CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH- Lys).

#### 5.2.6 Sintesi del copolimero ramificato a stella PEO<sub>2k</sub>-Lys-(PCL<sub>6k</sub>-PEO<sub>2k</sub>)<sub>2</sub>

La preparazione del copolimero PEO<sub>2k</sub>-Lys-(PCL<sub>6k</sub>-PEO<sub>2k</sub>)<sub>2</sub> è stata condotta in tre fasi:

##### a) Succinilazione del copolimero ramificato PEO<sub>2k</sub>-Lys-(PCL<sub>6k</sub>)

In un pallone da 50 mL sono stati fatti reagire 1.551 g (0.107 mmol) di PEO<sub>2k</sub>-Lys-(PCL<sub>6k</sub>)<sub>2</sub> sciolti in 8 mL di CHCl<sub>3</sub> insieme a 0.068 g di anidride succinica (0.68 mmol) in presenza di 4 mg di piridina (50.61  $\mu$ mol). La reazione è stata condotta per 48 h a 60°C. Il prodotto è stato quindi precipitato in 400 mL di etere etilico/MeOH 5:2 e successivamente filtrato su setto poroso. Dopo essiccazione, sono stati recuperati 1.423 g di prodotto (resa 85%).

##### b) Attivazione dei gruppi carbossilici del copolimero PEO<sub>2k</sub>-Lys-(PCL<sub>6k</sub>)<sub>2</sub> -COOH con NHS

In un pallone da 50 mL sono stati sciolti 0.643 g di PEO<sub>2k</sub>-Lys-(PCL<sub>6k</sub>)<sub>2</sub>-COOH (45,03  $\mu$ mol) in 6 mL di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; sono stati successivamente aggiunti 0.021 g di NHS (0.181 mmol), 0.037 g di DCC

(0.181 mmol), 4 mg di DMAP (32.78  $\mu$ mol) sciolti in 2ml di  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La reazione è stata condotta per 24 h a temperatura ambiente sotto costante agitazione. La soluzione è stata quindi filtrata per eliminare la dicicloesilurea formata durante la reazione. Il prodotto è stato purificato per precipitazione in 300 mL di etere/MeOH 5:2 e filtrazione su setto poroso. Esso è stato successivamente seccato in stufa a 35°C sotto vuoto.

*c) Coupling del  $\text{PEO}_{2k}\text{-Lys-(PCL}_{6k}\text{-COOH)}_2$  con  $m\text{PEO}_{2k}\text{-NH}_2$*

In un pallone da 50 mL sono stati sciolti 0.579 g (0.04 mmol) di copolimero  $\text{PEO}_{2k}\text{-Lys-(PCL}_{6k})_2$ , precedentemente attivato, in 10 mL di  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , in atmosfera di azoto, insieme a 0.217 g di  $m\text{PEO}_{2k}\text{-NH}_2$  (0.108 mmol). La reazione, dopo l'aggiunta sotto costante agitazione di 21 mg di DIEA (0.16 mmol), è stata condotta a temperatura ambiente per 24 h. Infine, la soluzione è stata precipitata in 300 mL di etere/metanolo 5:2 ed il prodotto è stato filtrato e portato a secco. Si sono ottenuti 670 mg di copolimero (resa 83%,  $\eta_{\text{inh}} = 0.36$  dL/g in  $\text{CHCl}_3$ ).

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , ppm):  $\delta = 4.05$  (71H,  $-\underline{\text{CH}_2}\text{-OCO- PCL}$ );  $\delta = 3.65$  (528H,  $-\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{- mPEO}$ );  $\delta = 3.45$  (2H,  $-\text{Lys-CO-NH-CH}_2\text{-PEO}_m$ );  $\delta = 3.36$  (9H,  $-\text{OCH}_3$ );  $\delta = 2.3$  (71H,  $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}\underline{\text{CH}_2}\text{-CO- PCL}$ );  $\delta = 1.8\text{-}1.3$  (226H,  $-\text{O-CH}_2\text{-}\underline{\text{CH}_2}\text{-}\underline{\text{CH}_2}\text{-}\underline{\text{CH}_2}\text{- PCL} + 6\text{H, }-\text{CH-}\underline{\text{CH}_2}\text{-}\underline{\text{CH}_2}\text{-}\underline{\text{CH}_2}\text{-CH}_2\text{-NH-Lys}$ ).

*5.2.7 Sintesi del copolimero diblocco lineare Fol- $\text{PEO}_{2k}\text{-PCL}_{4k}$*

La preparazione del copolimero diblocco lineare funzionalizzato con acido folico è stata effettuata come descritto di seguito.

*a) Attivazione dell'acido folico con NHS*

In un pallone da 100 mL sono stati posti 1.48 g di acido folico (3.363 mmol) sciolti in 25 mL di dimetilsolfossido (DMSO) con 0.773 mg

di NHS (6.722 mmol) e 0.164 g di DMAP (1.344 mmol). Sono stati successivamente aggiunti 1.38 g di DCC (6.699 mmol). La miscela di reazione è stata mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per 24 h. Il prodotto della reazione è stato precipitato in 400 mL di etere e successivamente lavato tre volte con metanolo per allontanare l'NHS non reagita. Infine, il prodotto è stato seccato in stufa sotto vuoto.

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , ppm):  $\delta=8.63$  (1H, C7-H Fol),  $\delta=7.64$  (2H, 2',6'-H Fol),  $\delta=6.64$  (2H, 3',5'-H Fol),  $\delta=4.45$  (1H,  $\alpha\text{-CH}_2\text{-Glu}$  del Fol + 2H,  $\text{-CH}_2\text{-NH-}$  Fol),  $\delta=2.8$  (4H,  $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NHS}$ );  $\delta=2.3$  (2H,  $\beta\text{-CH}_2\text{-Glu}$  del Fol);  $\delta=1.97$  (2H,  $\gamma\text{-CH}_2\text{-Glu}$  del Fol).

*b) Coupling dell'acido folico al PEO<sub>2k</sub> diammino (H<sub>2</sub>N-PEO<sub>2k</sub>-NH<sub>2</sub>)*

In un pallone da 50 mL sono stati sciolti 0.980 g di NH<sub>2</sub>-PEO<sub>2k</sub>-NH<sub>2</sub> (0.49 mmol) in 5 mL di DMSO con aggiunta di piridina (0.49 mmol). A parte sono stati solubilizzati 0.256 g di acido folico attivato (0.49 mmol) in 6 mL di DMSO. La soluzione di acido folico è stata aggiunta goccia a goccia e sotto agitazione a quella del polimero in modo da operare sempre in eccesso di quest'ultimo.

Il prodotto della reazione, costituito da una miscela di NH<sub>2</sub>-PEO<sub>2k</sub>-NH<sub>2</sub> non reagito, NH<sub>2</sub>-PEO<sub>2k</sub>-Fol e Fol-PEO<sub>2k</sub>-Fol è stato precipitato in un eccesso di etere ed è stato lavato più volte con etere fresco. Il PEO diammino non reagito, solubile in THF, è stato allontanato dalla miscela di reazione mediante successivi lavaggi in THF.

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , ppm):  $\delta=8.63$  (1H, C7-H Fol);  $\delta=7.64$  (2H, 2',6'-H Fol);  $\delta=6.64$  (2H, 3',5'-H Fol);  $\delta=4.45$  (3H,  $\alpha\text{-CH}_2\text{-Glu}$  del Fol +  $\text{-CH}_2\text{-NH-}$ );  $\delta=3.65$  (176H,  $\text{-CH}_2\text{OCH}_2\text{-PEO}$ );  $\delta=3.45$  (2H, PEO-CH<sub>2</sub>NH-Fol);  $\delta=2.8$  (2H, PEO-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>)  $\delta=2.3$  (2H,  $\beta\text{-CH}_2\text{-Glu}$  del Fol);  $\delta=1.97$  (2H, (3H,  $\gamma\text{-CH}_2\text{-Glu}$  del Fol).



*c) Preparazione di  $\alpha$ -esanoil, $\omega$ -ossidril-PCL (esPCL-OH) e reazione di succinilazione (esPCL-COOH)*

In un pallone da 50 mL sono stati fatti reagire 0.100 g di esanolo anidro (0.98 mmol ) con 3.831 g di  $\epsilon$ -CL (33.61 mmol ). La reazione di polimerizzazione è stata condotta per 24 h a 120°C in presenza di 8 mg (9.75  $\mu$ mol) di Sn(Oct)<sub>2</sub>. Il prodotto è stato recuperato e purificato per precipitazione in 300 mL di etere. Il polimero così ottenuto, sciolto in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, è stato fatto reagire in un pallone da 50 mL con 0.183 g di anidride succinica (1.83 mmol) per 48 h a 60°C in presenza di piridina. Successivamente è stata effettuata una precipitazione in 300 mL di etere per recuperare il prodotto di reazione mentre la piridina e l'anidride succinica non reagita sono state allontanate per lavaggio con miscela etere/metanolo 5:2. Il prodotto è stato infine seccato in stufa sotto vuoto (resa 79%,  $\eta_{inh}$  = 0.26 dL/g in CHCl<sub>3</sub>).

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, ppm):  $\delta$ =4.05 (97H, -PCL-CH<sub>2</sub>-OCO-);  $\delta$ =2.65 (4H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- Succ);  $\delta$ =2.32 (97H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO- PCL);  $\delta$ =1.9-1.4 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- alifatici PCL);  $\delta$ =0.85 (3H, CH<sub>3</sub>- EsOH).

*d) Attivazione del esPCL-COOH con NHS*

In un pallone da 50 mL sono stati posti 3.026 g di PCL-COOH (0.52 mmol), 0.179 mg di NHS (1.556 mmol), 0.321 g di DCC (1.556 mmol), 0.038 g di DMAP (0.311 mmol) sciolti in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La reazione è stata condotta per 24 h a temperatura ambiente. In seguito il prodotto è stato purificato mediante precipitazione in MeOH, recuperato mediante filtrazione ed infine essiccato sotto vuoto.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, ppm):  $\delta$ =4.05 (97H, -PCL-CH<sub>2</sub>-OCO-);  $\delta$ =2.8 (4H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- NHS);  $\delta$ =2.65 (4H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- Succ);  $\delta$ =2.32 (97H, -

$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO- PCL}$ );  $\delta=1.9-1.4$  ( $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$  alifatici PCL);  $\delta=0.85$  (3H,  $\text{CH}_3-$  EsOH).

*e) Coupling del esPCL-COOH attivato con miscela PEO monofolato e difolato (Fol-PEO-NH<sub>2</sub> e Fol-PEO-Fol)*

In un pallone da 50 mL sono stati posti a reagire 0.499 g di PCL-COOH attivato (0.09 mmol) sciolti in 15 mL di DMSO con un eccesso della miscela di PEO difolato e monofolato, composta all'incirca dal 50% di Fol-PEO-Fol e dal 50 % di NH<sub>2</sub>-PEO-Fol (504 mg miscela = 0,094 mmol NH<sub>2</sub>-PEO-Fol). La reazione è stata condotta sotto agitazione per 24 h a temperatura ambiente in presenza di piridina. Il prodotto grezzo è stato quindi precipitato in etere e seccato. Il copolimero diblocco puro è stato poi ottenuto trattando il grezzo con THF e sfruttando l'insolubilità del Fol-PEO<sub>2k</sub>-Fol in THF. Sono stati infine ottenuti 689 mg di prodotto (resa 68%,  $\eta_{\text{inh}}= 0.33$  dL/g in  $\text{CHCl}_3$ ).

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, ppm):  $\delta=8.63$  (1H, C7-H Fol);  $\delta=7.64$  (2H, 2',6'-H Fol);  $\delta=6.64$  (2H, 3',5'-H Fol);  $\delta=4.45$  (3H,  $\alpha\text{-CH}_2-$  Glu del Fol +  $-\text{CH}_2\text{-NH-}$ );  $\delta=4.05$  (97H,  $-\text{PCL-CH}_2\text{-OCO-}$ );  $\delta=3.65$  (176H,  $-\text{CH}_2\text{OCH}_2-$  PEO);  $\delta=3.45$  (4H,  $\text{PEO-CH}_2\text{NH-Fol} + \text{PEO-CH}_2\text{-NH-PCL}$ );  $\delta=2.65$  (4H,  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2-$  Succ);  $\delta=2.32$  (99H,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO- PCL} + \beta\text{-CH}_2-$  Glu del Fol);  $\delta=1.97-1.4$  (293H,  $\gamma\text{-CH}_2-$  Glu del Fol +  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$  alifatici PCL);  $\delta=0.85$  (3H,  $\text{CH}_3-$  EsOH).

### 5.2.8 Sintesi del copolimero ramificato a stella PEO<sub>2k</sub>-Lys-(PCL<sub>2k</sub>)<sub>2</sub> funzionalizzato con acido folico

La preparazione del copolimero ramificato funzionalizzato con acido folico ha richiesto tre diversi stadi:

*a) Sintesi del (PCL)<sub>2</sub>-Lys-COOH*

In un pallone da 50 mL sono stati quindi posti a reagire 0.102 g di L-lisina (0,698 mmol) con 2,784 g di  $\epsilon$ -CL (24,42 mmol) a 80°C per 24 h. Successivamente sono stati aggiunti 5,6 mg di Sn(Oct)<sub>2</sub> come catalizzatore per avviare la polimerizzazione ed ottenere l'accrescimento del PCL per apertura dell'anello dell'  $\epsilon$ -CL. Il prodotto della reazione è stato recuperato mediante precipitazione in etere, lavato due volte con etere fresco ed infine seccato in stufa sotto vuoto (resa 80%,  $\eta_{inh}$  = 0.30 dL/g in CHCl<sub>3</sub>).

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, ppm):  $\delta$ =4.05 (71H, -CH<sub>2</sub>-OCO- PCL);  $\delta$ =3.65 (4H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH- PCL);  $\delta$ =2.3 (71H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO- PCL);  $\delta$ =1.3-1.8 (213H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- PCL + 6H, -CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH- Lys).

*b) Attivazione del (PCL)<sub>2</sub>-Lys-COOH con NHS*

In un pallone da 50 mL sono stati fatti reagire 0.547 g di (PCL)<sub>2</sub>-Lys-COOH (0,11 mmol) con 0.055 g di NHS (0,48 mmol), 0.099 g di DCC (0,48 mmol) e 0.013 g di DMAP ( 0,11 mmol) in 7 mL di DMSO.

La reazione è stata condotta per 24 h a temperatura ambiente sotto agitazione; il prodotto di reazione è stato poi filtrato per allontanare l'urea formata durante la reazione e successivamente precipitato in 400 mL di etere/MeOH 5:2 per eliminare NHS non reagita. Il prodotto è stato infine essiccato sottovuoto.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, ppm):  $\delta$ =4.05 (71H, -CH<sub>2</sub>-OCO- PCL);  $\delta$ =3.65 (4H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH- PCL);  $\delta$  =2.8 (4H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- NHS);  $\delta$ =2.3 (71H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO- PCL);  $\delta$ =1.3-1.8 (213H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- PCL + 6H, -CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH- Lys).

**b) Coupling del (PCL)<sub>2</sub>-Lys-COOH attivato con miscela PEO monofolato e difolato (Fol-PEO-NH<sub>2</sub> e Fol-PEO-Fol)**

In un pallone da 50 mL sono stati sciolti 0.280 g di miscela Fol-PEO-Fol/NH<sub>2</sub>-PEO-Fol in 8 mL di DMSO, ai quali sono stati successivamente aggiunti 0.260 g di (PCL)<sub>2</sub>-Lys-CONHS (0,06 mmol) e 8 mg di DIEA (0,06 mmol).

La reazione è decorsa a temperatura ambiente per 24 h sotto agitazione; il prodotto è stato quindi recuperato per precipitazione in etere e successivamente lavato in miscela etere/metanolo 1:1 per allontanare l'NHS formatasi durante la reazione. Il prodotto del coupling è stato poi lavato con THF per allontanare l'eccesso di NH<sub>2</sub>-PEO-Fol non reagito ed il Fol-PEO-Fol. Sono stati infine ottenuti 340 mg di prodotto (resa 63%,  $\eta_{inh} = 0.40$  dL/g in CHCl<sub>3</sub>).

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, ppm):  $\delta = 8.63$  (1H, C7-H Fol);  $\delta = 7.64$  (2H, 2',6'-H Fol);  $\delta = 6.64$  (2H, 3',5'-H Fol);  $\delta = 4.45$  (3H,  $\alpha$ -CH<sub>2</sub>- Glu del Fol + -CH<sub>2</sub>-NH- Fol);  $\delta = 4.05$  (71H, -PCL-CH<sub>2</sub>-OCO-);  $\delta = 3.65$  (176H, -CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>-PEO);  $\delta = 3.45$  (4H, PEO-CH<sub>2</sub>NH-Fol + PEO-CH<sub>2</sub>-NH-PCL);  $\delta = 2.32$  (71H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO- PCL + 2H,  $\beta$ -CH<sub>2</sub>- Glu del Fol);  $\delta = 1.97-1.4$  (2H,  $\gamma$ -CH<sub>2</sub>- Glu del Fol + 213H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- alifatici PCL + 6H, -CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH- Lys).

**5.3 Sintesi dei copolimeri anfifilici nella preparazione di membrane macroporose a base di PDLLA e PCL**

**5.3.1 Sintesi del macroiniziatore N $\alpha$ -N $\epsilon$ -Lys-PEO<sub>5k</sub>**

Sono state eseguite le stesse modalità di sintesi del macroiniziatore Lys-PEO<sub>2k</sub> descritte nel paragrafo 5.2.3. E' stato ottenuto un prodotto con una resa del 89%

### 5.3.2 Sintesi del macromero $mPEO_{5k}\text{-Lys}\text{-}(PCL_{5k})_2$

La sintesi del macromero è analoga a quella descritta per i copolimeri ramificati a stella (paragrafo 5.2.4 e 5.2.5) (resa=89%,  $\eta_{inh}=0.36$  in  $CHCl_3$ )

### 5.3.3 Sintesi del copolimero a innesto “graft” $PCL_{10k}\text{-g-}PEO_{5k}$

La sintesi del copolimero graft avviene attraverso due diverse reazioni di estensione di catena:

#### *a) Reazione dei gruppi terminali $-OH$ del macromero $mPEO_{5k}\text{-Lys}\text{-}(PCL_{5k})_2$ con cloruro di sebacoile (SEB)*

In un pallone a cuore a due colli di 10ml sono stati pesati, sotto flusso di azoto, 2.360 g (0.148 mmol) di  $mPEO_{5k}\text{-Lys}\text{-}(PCL_{5k})_2$  sciolto in  $\approx 5$  ml di  $CH_2Cl_2$ ; successivamente, a  $T=70^\circ C$ , si aggiungono 0.035 g (0.148 mmol) di SEB sciolto in 1 ml di  $CH_2Cl_2$  ed il sistema di reazione è tenuto a questa temperatura per circa 4 h.

Il flusso di azoto proveniente da un capillare immerso nella miscela di reazione assicura l'agitazione del sistema, l'allontanamento del solvente e dell'acido cloridrico. Dopo aver aggiunto una soluzione di 0.004 g di SEB in 0.08ml di  $CH_2Cl_2$ , la reazione è stata lasciata per 1 h.

A fine reazione il prodotto è stato sciolto nella minima quantità di  $CH_2Cl_2$  (5ml) e precipitato in 300 ml di etere etilico freddo; il precipitato è stato raccolto su un setto poroso e seccato in stufa da vuoto a  $T=30^\circ C$ .

Si ottengono 2.210 g di copolimero (resa=94%,  $\eta_{inh}=0.52$  in  $CHCl_3$ ).

$^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ , chemical shifts (in ppm)):  $\delta=1.3\text{-}1.8$  (  $-O\text{-}CH_2\text{-}\underline{CH_2}\text{-}\underline{CH_2}\text{-}CH_2\text{-}$  di PCL + 6H,  $-CH\text{-}\underline{CH_2}\text{-}\underline{CH_2}\text{-}\underline{CH_2}\text{-}CH_2\text{-}NH\text{-}$  di 1, Lisina),  $\delta=2.3$  (188 H,  $-O\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}\underline{CH_2}\text{-}CO\text{-}$  di PCL)  $\delta=3.36$  (3H, -

OCH<sub>3</sub>);  $\delta=3.65$  (452H, -CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>- di mPEO);  $\delta=4.05$  (188 H, -CH<sub>2</sub>-OCO- di PCL);

*b) Reazione di coupling dei gruppi terminali -OH e COOH del polimero*

In un pallone di 50 ml, munito di rubinetto laterale, sono stati posti 1.060 g (0.033 mmol) di prodotto proveniente dal precedente stadio di reazione, 0.001 g (0.010 mmol) di DMAP, 0.006 g (0.048 mmol) di DIPC e  $\approx 20$  ml di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> in atmosfera di azoto.

La miscela di reazione è stata mantenuta, sotto agitazione ed in atmosfera di azoto, a temperatura ambiente per 24 h.

Successivamente si aggiungono 0.031 g (0.0049) di etilen-glicol e 0.002 g (0.016 mmol) di DIPC ed è stata lasciata in agitazione sotto flusso di azoto a temperatura ambiente per 48 h. La soluzione è stata filtrata per eliminare il primo precipitato costituito da diisopropilurea, poi portata a secco e la diisopropilurea residua eliminata mediante ripetute estrazioni con  $\approx 10$  ml di diclorometano.

Per eliminare la DMAP, il prodotto di reazione è stato disciolto in 20 mL di CHCl<sub>3</sub> e la soluzione è stata estratta più volte con acqua debolmente acida per HCl (pH $\approx$ 5). La fase cloroformica, infine, è stata lavata con H<sub>2</sub>O distillata e anidrificata su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e portata a secco, il prodotto di reazione è stato sciolto nella minima quantità di CHCl<sub>3</sub> (5ml) e precipitato in 300 ml di etere etilico freddo. Il precipitato è stato raccolto su un setto poroso e seccato in stufa da vuoto a T=30°C.

Si ottengono 0.788 g di copolimero (resa = 74%,  $\eta_{inh}=0.59$  in CHCl<sub>3</sub>).

Ulteriore purificazione, da eventuali frazioni a basso peso molecolare, è stata fatta sciogliendo il copolimero in 7 ml di CHCl<sub>3</sub>, aggiungendo successivamente 300 ml di una miscela metanolo-etere in rapporto 1:4. Si ottengono 0.680 g di copolimero (resa=86% ,  $\eta_{inh}=0.59$  in CHCl<sub>3</sub>).

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , chemical shifts (in ppm):  $\delta=2.3$  (188 H,  $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-}$  di PCL),  $\delta=3.36$  (3H,  $-\text{OCH}_3$ );  $\delta=3.65$  (452H,  $-\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{-}$  di mPEO);  $\delta=4.05$  (188 H,  $-\text{CH}_2\text{-OCO-}$  di PCL);

In figura 5 è riportato lo spettro  $^1\text{H-NMR}$  del graft- $\text{N}\alpha\text{-N}\epsilon\text{-di-PCL}_{5400}\text{-L-Lisina-mPEO}_{5000}$  dopo la reazione di coupling.

### 5.3.4 Preparazione degli scaffolds

Gli scaffolds sono stati realizzati sotto forma di membrane micro e macro porose, attraverso miscelazione da soluzione, mediante la tecnica dell' inversione di fase (solvente-non solvente) associata al rilascio di saccarosio, per la creazione dei macropori, in ambiente acquoso [46].

Si riporta, come esempio, la procedura di preparazione del sistema 70/30 + 10% copolimero  $\text{PEO}_{5k}\text{-g-PCL}_{10k}$ .

1.05 g di PDLLA, 0.45 g di PCL e 0.15 g di copolimero sono stati disciolti, a T ambiente, in 10 mL di cloroformio; alla soluzione sono stati aggiunti 4.0 g di saccarosio setacciato e la dispersione, così creata, è stata agitata, mediante un miscelatore ad alta efficienza Ultraturrax, per 2 minuti. Il sistema è stato prontamente versato in una capsula di Petri e quest' ultima è stata rapidamente immersa in un bagno di 400 mL di metanolo, termostato a 25 °C; dopo 24 ore lo scaffold è stato recuperato e lavato con 1500 mL di acqua distillata, a 25 °C, per 1 ora senza agitazione ed, infine, è stato essiccato sotto vuoto, alla T ambiente, fino a peso costante.

Nel caso degli scaffolds usati per i test di adesione e proliferazione cellulare, dopo lavaggio con 1500 mL di acqua distillata sterile, essi sono stati prontamente immersi in etanolo e tagliati, in condizioni sterili, sotto forma di dischi di area pari a circa 2.5 cm<sup>2</sup> ; tali dischi, infine, riposti sul fondo dei pozzetti di una piastra per colture cellulari e immersi in etanolo, sono stati sottoposti ai test biologici presso il gruppo di ricerca del prof.

Peluso, del dipartimento di Oncologia Sperimentale dell' istituto Pascale di Napoli.

#### **5.4 Funzionalizzazione di polimeri e copolimeri a base di PCL per applicazioni in campo biomedico**

##### **5.3.1 Sintesi dell' iniziatore Lys-N<sub>ε</sub>-Z-EMD**

*a) Reazione di accoppiamento della N-Boc-1,6 diamminoesano con N<sub>α</sub>-Boc-Lys(Z)-OH.*

In un pallone da 100ml viene sciolta la N<sub>α</sub>-Boc-N<sub>ε</sub>-Z-Lys (0.380g, 1.0 mmol) in 25ml di diclorometano anidro ed in sequenza vengono aggiunti TBTU (0.447g, 1.4 mmol), N-Boc-1,6-diamminoesano (0.216g, 1.0 mmol) e la DIEA (16.8mmol). La reazione viene mantenuta per quattro ore a temperatura ambiente sotto agitazione magnetica e controllata via TLC in Etilacetato/Esano 7:3. Le lastrine vengono sviluppate con lampada UV-vis e ninidrina. La miscela di reazione è stata dibattuta con una soluzione acquosa di acido citrico al 10%, con una satura di NaHCO<sub>3</sub> e infine con H<sub>2</sub>O distillata. La fase organica è stata anidrificata su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e portata a secco. Il prodotto si presenta come un olio giallo che viene purificato mediante cromatografia su colonna di silice (Silica Gel 60) impaccata in CHCl<sub>3</sub>/MeOH (9.8:0.2 v/v), con caricamento a secco del prodotto. L'analisi delle frazioni è stata effettuata via TLC su lastrine di silice (eluente: Etilacetato/Esano 7:3). La resa della reazione è dell'88% con una purezza del prodotto, stimata via HPLC (A: H<sub>2</sub>O-0.1%TFA; B: CH<sub>3</sub>CN-0.1%TFA; gradiente di concentrazione di B: 30% a 80% in 35 min; t<sub>r</sub>=34.42 min), del 95% circa. La molecola è stata caratterizzata via NMR in CDCl<sub>3</sub>.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ=1.20-1.80 (-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-, di esametildiammina + -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-, di Lisina



+  $-(\text{CH}_3)_3$  di gruppi BOC); 3.00 ( $-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_2}-\text{NH}-$  di esametildiammina); 3.10 ( $-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_2}-\text{NH}-\text{CO}-\text{O}-$  di esametildiammina); 3.15 ( $-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_2}-\text{NH}-\text{CO}-\text{O}-$  di 1, Lisina); 4.00 ( $-\text{CO}-\underline{\text{CH}}-\text{NH}-$  di Lisina); 5.00 ( $-\text{O}-\text{CH}_2-\emptyset$ , di Lisina), 7.20 ( $-\text{CH}_2-\underline{\text{NH}}-\text{CO}-$ , di esametildiammina); 7.30 (CH aromatici, di Lisina); 8.40 ( $\text{CH}_2-\underline{\text{NH}}-\text{CO}-\text{O}-$ , di Lisina).

*b) Reazione di deprotezione del macromero Boc- Lys- $N_\epsilon$ -Z-EMD -Boc.*

La deprotezione della molecola dai gruppi Boc è stata effettuata per acidolisi in diclorometano/acido trifluoroacetico 1:1.

In un pallone da 50 ml il prodotto da deproteggere è stato disciolto in 8.0 ml di diclorometano a cui vengono aggiunti 8.0 ml TFA. La reazione è condotta per 1 ora a temperatura ambiente e sotto agitazione magnetica. La miscela è quindi portata a secco sotto vuoto, allontanando la miscela azeotropica che l'acido trifluoroacetico forma con l'etere etilico. Il controllo sulla reazione viene fatto via TLC: Etilacetato/MeOH (8:2), La purezza del prodotto, pari al 93.5%, è stata stimata per via HPLC (A:  $\text{H}_2\text{O}-0.1\% \text{TFA}$ ; B:  $\text{CH}_3\text{CN}-0.1\% \text{TFA}$ ; gradiente di concentrazione di B: 5% a 70% in 30min;  $t_r=20.2\text{min}$ ). Successivamente il prodotto ottenuto è stato disciolto in una soluzione acquosa di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (0.18g, 1.7 mmol). La soluzione acquosa è stata ripetutamente estratta con  $\text{CHCl}_3$ ; la fase organica è stata, quindi, anidrificata su  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Dopo rimozione del solvente sono stati ottenuti 0.340 g di Lys- $N_\epsilon$ -Z-EMD desalificata (resa 77%, purezza 91% come determinato via HPLC). La molecola è stata caratterizzata mediante  $^1\text{H-NMR}$  in DMSO.

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO):  $\delta=1.20-1.80$  ( $-\text{NH}-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$ , di esametildiammina +  $-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$ , di, Lisina); 2.70 ( $-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_2}-\text{NH}_2$  di esametildiammina); 3.00 ( $-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_2}-\text{NH}-\text{CO}-$  di

esametilendiammina); 3.15 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-CO-O- di Lisina); 3.70 (-CH-NH<sub>2</sub> di Lisina); 5.00 (-O-CH<sub>2</sub>-Ø , di Lisina), 7.20 (-CH<sub>2</sub>-NH-CO-, di esametilendiammina); 7.30 ( CH aromatici, di Lisina); 8.40 ( CH<sub>2</sub>-NH-CO-O-, di Lisina).

MS (electrospray)=  $m/z=379$  (MH<sup>+</sup>)

### 5.3.2 Sintesi dei copolimeri multiblocco PEEs

La sintesi di tali copolimeri è stata effettuata in due fasi successive:

#### a) Preparazione del macromero PCL<sub>1.3k</sub>-Lys-N<sub>ε</sub>-Z-EMD-PCL<sub>1.3k</sub>

Primo stadio: in un palloncino a due colli da 10 ml sono stati pesati 0.11 g (0.299 mmol) di Lys-N<sub>ε</sub>-Z-EMD, precedentemente desalificata con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, e ad essi si sono aggiunti, sotto flusso di azoto, 0.874 g (7.66 mmol) di ε-CL. Il pallone è stato tenuto in agitazione e sotto flusso di azoto alla temperatura di 90°C per 24 h.

Secondo stadio: alla miscela di reazione è stata aggiunta una soluzione di Stagno(II) 2-etilesanoato 1.21 mg (3x10<sup>-3</sup> mmol) in 0.012 ml di ε-CL (0.11 mmol); la polimerizzazione è stata condotta a 115°C per 48 h. Una volta raffreddato a temperatura ambiente, il prodotto di reazione, costituito da un solido ceroso bianco, è stato sciolto nella minima quantità di CHCl<sub>3</sub> e precipitato in un largo eccesso etere. Il precipitato è stato raccolto su un setto poroso e seccato in stufa da vuoto. Sono stati ottenuti 0.690 g di polimero (resa=70%, M<sub>n</sub>=2.62 kDa calcolato via 1H-NMR, η<sub>inh</sub>=0.14 dL/g in CHCl<sub>3</sub> ).

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ= 1.20-1.80 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O- di PCL, + -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O- e -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO- di PCL, + -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH- di esametilendiammina, + -CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH- di l, Lisina);

2.20-2.40 (-CH<sub>2</sub>-CO- di PCL); 3.20 (-NH-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>-NH- di esametildiammina, + -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH- di Lisina); 3.60 (-CH<sub>2</sub>-OH di PCL); 4.00-4.10 (-CH<sub>2</sub>-O-CO-, di PCL); 5.15 (-O-CH<sub>2</sub>-Ø di Lisina (-Z)); 7.10 (CH aromatici, gruppo -Z di Lisina).

Allo stesso modo sono stati preparati i macromeri *PCL*<sub>1.9k</sub>-Lys-N<sub>ε</sub>-Z-EMD-*PCL*<sub>1.9k</sub> (resa 86%, η<sub>inh</sub>=0.18 dL/g in CHCl<sub>3</sub>) e *PCL*<sub>0.85k</sub>-Lys-N<sub>ε</sub>-Z-EMD-*PCL*<sub>0.85k</sub> (resa 60%, η<sub>inh</sub>=0.10 dL/g in CHCl<sub>3</sub>)

#### a) Preparazione del PEO difunzionale ClCO-PEO<sub>1k</sub>-COCl

Per la sintesi del PEO difunzionale ClCO-PEO<sub>1k</sub>-COCl è stata seguita una procedura descritta in letteratura (G.Maglio et al., *Macrom. Biosc.*, 2, 293, 2002). In breve una soluzione di PEO<sub>1k</sub> in DCM è stata aggiunta goccia a goccia ad un eccesso di cloruro di sebacoile (SEB) disciolto nello stesso solvente (PEO/SEB=1:10, mol/mol) alla temperatura di 50°C. La miscela di reazione è stata ripetutamente lavata con esano anidro fino a completa rimozione del SEB in eccesso.

#### c) Polimerizzazione in massa del macromero *PCL*<sub>1.3k</sub>-Lys-N<sub>ε</sub>-Z-EMD-*PCL*<sub>1.3k</sub> con ClCO-PEO<sub>1k</sub>-COCl

Di seguito è riportata la sintesi del copolimero PEE<sub>2</sub> (vedi tabella 4.2) In un pallone a cuore a due colli sono stati pesati, sotto flusso di azoto, 0.510 g (0.11 mmoli) di ClCO-PEO<sub>1k</sub>-COCl; successivamente, a T = 70°C, sono stati aggiunti goccia a goccia 1.040 g (0.346 mmol) del macromero *PCL*<sub>1.3k</sub>-Lys-N<sub>ε</sub>-Z-EMD-*PCL*<sub>1.3k</sub> e 0.054 g (0.692 mmol) di piridina entrambi sciolti in 2 ml di CHCl<sub>3</sub>. Il sistema di reazione è stato tenuto per circa 3 h a tale temperatura, sotto flusso di azoto e in agitazione mediante un tubo capillare immerso nella soluzione. Durante il decorso della reazione è stato notato un incremento della viscosità della miscela. A temperatura ambiente il prodotto di reazione è stato sciolto

nella minima quantità di  $\text{CHCl}_3$  e precipitato in 100 ml di etere. Si ottiene un solido di colore bianco che è stato filtrato, ripetutamente lavato con etere e quindi seccato sotto vuoto a  $T=30^\circ\text{C}$ . Il polimero è stato sciolto in  $\text{CHCl}_3$  e filtrato su imbuto a setto poroso. Sono stati ottenuti 1.140 g (resa=74%,  $\eta_{\text{inh}}=0.26$  dL/g in  $\text{CHCl}_3$ ) di copolimero  $\text{PEE}_2$ .

### 5.3.3 Reazione di deprotezione dei gruppi $-\text{NH}_2$ dal gruppo benzilossi (Z)

La procedura di deprotezione del gruppo  $-\text{NH}_2$  protetto è di seguito riportata ed è relativa al copolimero  $\text{PEE}_2$  ma è la stessa utilizzata per tutti gli altri copolimeri.

In un pallone a due colli sono stati pesati 0.166 g di polimero sciolti successivamente in 12 ml di una soluzione 3:2 metanolo/acido acetico. Alla soluzione sono stati aggiunti 58 mg g di palladio su carbone attivo. Mediante un capillare è stato quindi fatto gorgogliare idrogeno per 4 h a  $30^\circ\text{C}$ . La miscela di reazione è stata centrifugata per eliminare la maggior parte di carbone e in seguito portata a secco, ripresa con cloroformio e filtrata su Celite. Il prodotto recuperato è pari a 127 mg, resa = 76%  $\eta_{\text{inh}}=0.27$ dL/g in  $\text{CHCl}_3$ .

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta= 1.20-1.80$  ( $-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$  +  $-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$  di SEB, +  $-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$  di PCL, +  $-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-\text{O}-$  e  $-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-\text{CO}-$  di PCL +  $-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-\text{CO}-$  di SEB, +  $-\text{NH}-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_2}-\underline{\text{CH}_2}-\underline{\text{CH}_2}-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-\text{NH}-$  di esametildiammina, +  $-\text{CH}-\underline{\text{CH}_2}-\underline{\text{CH}_2}-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-\text{NH}-$  di Lisina); 2.20-2.40 ( $-\text{CH}_2-\text{CO}-$  di PCL e di SEB); 3.20 ( $-\text{NH}-\underline{\text{CH}_2}-\text{(CH}_2)_4-\underline{\text{CH}_2}-\text{NH}-$  di esametildiammina,); 3.60-3.80 ( $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$  di PEO); 4.00-4.10 ( $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-$ , di PCL), 4.20-4.30 ( $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-$  di PEO).

IR (KBr): 1107, 1191 (s, C-O); 1534, 1650 (m, CO-NH); 1725 (vs, C=O); 2865, 2943 (m, C-H); 3440  $\text{cm}^{-1}$  (w, N-H).

#### *5.3.4 Funzionalizzazione del SiP*

##### *Spin-coating*

Il ricoprimento della superficie dei campioni di SiP è stato ottenuto depositando 100  $\mu\text{l}$  di una soluzione del polimero in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , a varie concentrazioni, direttamente sulla superficie del campione di SiP posto in rotazione a 2000 rpm per 5 secondi.

## Indice

<b>Summary</b> .....	1
<b>Introduzione</b>	
1.1 Biomateriali polimerici.....	7
1.2 Polimeri biorassorbibili.....	11
1.3 Applicazioni in campo farmaceutico.....	16
1.3.1 Dispositivi per il rilascio controllato di farmaci.....	19
1.4 Applicazioni in campo biomedico .....	24
Bibliografia.....	27
<b>Capitolo 1: Potenzialità applicative dei poliesteri alifatici in campo biomedico</b>	
1.1 Stato dell'arte.....	29
1.2 L'acido polilattico (PLA).....	31
1.3 Poli( $\epsilon$ -caprolattone) (PCL).....	32
1.4 Copolimeri a blocchi.....	34
1.5 Miscele polimeriche.....	36
1.6 Descrizione del lavoro di tesi .....	39
Bibliografia.....	42
<b>Capitolo 2: Copolimeri anfifilici per la realizzazione di dispositivi per il rilascio controllato di farmaci</b>	
2.1. Stato dell'arte.....	43
2.1.1 Veicolanti polimerici di farmaci.....	43
2.1.2 Micro e nanoparticelle.....	44
2.1.3 Impiego di copolimeri anfifilici per la preparazione di sistemi nano particellari.....	46
2.2 Obiettivi.....	49
2.3. Risultati e discussioni.....	51
2.3.1 Strategie per l'ottenimento di copolimeri a struttura altamente regolare.....	51
2.3.2 Copolimeri ad architettura lineare.....	54
2.3.3 Copolimeri ad architettura ramificata.....	59

2.3.4	Caratterizzazione molecolare e viscosimetrica.....	67
2.3.5	Caratterizzazione termica e strutturale.....	70
2.3.4	Studi di micellizzazione.....	77
2.3.5	Copolimeri anfifilici funzionalizzati con acido folico.....	82
	Bibliografia.....	96
<b>Capitolo 3: Copolimeri anfifilici impiegati nella preparazione di membrane macroporose a base di PDLLA e PCL</b>		
3.1	Stato dell'arte.....	98
3.1.1	Scaffold.....	98
3.1.2	Miscele polimeriche a base di PCL e PDLLA.....	99
3.1.3	Copolimeri a blocchi PCL-b-PEO utilizzati come compatibilizzanti per la preparazione delle membrane.....	99
3.2	Obiettivi.....	101
3.3	Risultati e discussioni.....	103
3.3.1	Strategia di sintesi del copolimero PCL-graft-PEO.....	104
3.3.2	Caratterizzazione molecolare e viscosimetrica.....	108
3.3.3	Caratterizzazione termica e strutturale.....	109
3.4	Preparazione e struttura delle membrane.....	112
	Bibliografia.....	118
<b>Capitolo 4: Funzionalizzazione di polimeri e copolimeri a base di PCL per applicazioni in campo biomedico</b>		
4.1	Stato dell'arte.....	119
4.2	Obiettivi.....	122
4.3	Risultati e discussione.....	122
4.3.1	Sintesi dell' iniziatore Lys-N $\epsilon$ -Z-EMD.....	123
4.3.2	Sintesi e caratterizzazione dei macromeri funzionalizzati del PCL.....	125
4.3.3	Sintesi del macromero del PEO-COCl terminato.....	130
4.3.4	Sintesi e caratterizzazione dei copolimeri funzionalizzati (PEE).....	130
4.3.5	Caratterizzazione termica e strutturale dei macromeri e dei copolimeri.....	134
4.4	Esempio applicativo .....	136
	Bibliografia.....	143

<b>Capitolo 5: Conclusioni</b> .....	145
<b>Capitolo 6: Parte sperimentale</b>	
5.1 <i>Materiali e Tecniche di caratterizzazione</i> .....	149
5.2 <i>Sintesi dei copolimeri anfifilici per la realizzazione di dispositivi per il rilascio controllato di farmaci</i> .....	152
5.3 <i>Sintesi dei copolimeri anfifilici nella preparazione di membrane macroporose a base di PDLLA e PCL</i> .....	163
5.4 <i>Funzionalizzazione di polimeri e copolimeri a base di PCL per applicazioni in campo biomedico</i> .....	167