



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA IN CHIMICA

**DERIVATI IONIZZABILI DELL'ACIDO LIPOICO PER IL DELIVERY DEGLI ACIDI
NUCLEICI**

Relatore: Prof. Fabrizio Mancin

Laureanda: Anna Zilio

1226201

ANNO ACCADEMICO 2022 / 2023

INDICE

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUZIONE | 3 |
| 1.1 | <i>Nanoparticelle</i> | 3 |
| 1.2 | <i>Nanoparticelle polimeriche</i> | 3 |
| 1.3 | <i>Vettori sensibili alla variazione di concentrazione di glutatione</i> | 4 |
| 1.4 | <i>Nanoparticelle basate su derivati dell'acido lipoico</i> | 5 |
| 1.5 | <i>Nanoprecipitazione</i> | 7 |
| 2 | SCOPO | 9 |
| 3 | RISULTATI E DISCUSSIONE | 10 |
| 3.1 | <i>Sintesi dei precursori</i> | 10 |
| 3.2 | <i>Sintesi delle nanoparticelle</i> | 12 |
| 4 | CONCLUSIONI | 17 |
| 5 | PARTE SPERIMENTALE | 18 |
| 5.1 | <i>Strumenti utilizzati</i> | 18 |
| 5.2 | <i>Sintesi dei precursori</i> | 18 |
| 5.2.1 | <i>Sintesi precursore [1]</i> | 18 |
| 5.2.2 | <i>Sintesi precursore [2]</i> | 20 |
| 5.2.3 | <i>Sintesi precursore [3]</i> | 22 |
| 5.3 | <i>Sintesi delle nanoparticelle</i> | 25 |
| 5.3.1 | <i>Soluzioni usate per le sintesi</i> | 25 |
| 5.3.2 | <i>Sintesi nanoparticelle con il precursore [1]</i> | 25 |
| 5.3.3 | <i>Sintesi nanoparticelle con il precursore [2]</i> | 26 |
| 5.3.4 | <i>Sintesi nanoparticelle con il precursore [3]</i> | 26 |
| 5.3.5 | <i>Purificazione nanoparticelle a base di acido lipoico</i> | 26 |
| 6 | BIBLIOGRAFIA | 27 |

1. INTRODUZIONE

1.1 NANOPARTICELLE

Le nanoparticelle vengono solitamente descritte come particelle colloidali solide con dimensioni comprese nell'intervallo tra 1 e 100 nm ^[1]. Sono oggetto di intensa ricerca nell'ambito della nanomedicina, per applicazioni come il drug delivery e nello sviluppo di nuovi approcci terapeutici. Un esempio molto noto è costituito dai vaccini ad RNA utilizzati per combattere la recente pandemia da COVID19. In questo caso le nanoparticelle si sono rivelate, infatti, nanovettori intelligenti, ideati per preservare gli acidi nucleici dalla degradazione prima che essi arrivino al target, ottimizzandone al contempo il trasporto specifico all'organo bersaglio ^[2], in questo caso il sistema immunitario.

Il trasporto di farmaci, e in particolare di acidi nucleici sono in effetti le applicazioni più promettenti al momento. Per sviluppare un efficace sistema di trasporto devono essere rispettati diversi requisiti. In primo luogo, è necessario che i veicoli utilizzati nella somministrazione dei farmaci siano sicuri ed efficaci. Queste caratteristiche sono legate a come questi nanosistemi viaggiano nel corpo fino al target: essi devono evitare la cattura da organi diversi da quelli bersaglio ma anche la rimozione dal circolo sanguigno da parte dei reni. Devono inoltre superare il sistema immunitario, le proteine fibrose presenti nell'ambiente extracellulare e infine le pareti cellulari, dal momento che per assolvere alle loro funzioni le nanoparticelle devono arrivare fino al citoplasma. La rilevanza di tutte queste barriere è confermata da diversi studi che hanno verificato come, in seguito alla somministrazione di NPs, si ha soprattutto un accumulo negli organi filtranti, quali il fegato, milza, reni e polmoni. ^[3,4]

1.2 NANOPARTICELLE POLIMERICHE

L'uso di materiali organici, in particolare i polimeri biodegradabili, per la costruzione di nanovettori risulta essere interessante grazie alla loro minor tossicità rispetto ai materiali inorganici, oltre ad una maggior biocompatibilità e solubilità.

Tra i polimeri biodegradabili più utilizzati sono l'acido polilattico (PLA), l'acido poliglicolico (PGA) ed il loro copolimero, l'acido poli(lattico-co-glicolico) (PLGA). Quest'ultimo ha ricevuto l'approvazione dalla FDA ed è impiegato principalmente per la distribuzione di molecole terapeutiche. ^[2] Sebbene comporti numerosi vantaggi, come la possibilità di programmare

il tempo di degradazione e la degradazione idrolitica a monomeri presenti nell'organismo, l'uso delle particelle di PLGA incontra anche alcuni problemi proprio collegati con la loro facile idrolisi: ad esempio, non possono essere formulate in sospensione acquosa, in cui subirebbero degradazione, e possono andare incontro al rilascio prematuro del carico.

1.3 VETTORI SENSIBILI ALLA VARIAZIONE DI CONCENTRAZIONE DI GLUTATIONE

D'altro canto, nel caso di particelle costituite da polimeri inerti all'acqua, una volta raggiunto l'organo bersaglio, rimane il problema del rilascio del carico attivo. In questi casi, la soluzione sta nello sfruttare le diverse caratteristiche chimiche del bersaglio rispetto al resto dell'organismo. Ad esempio, il glutatione è un tripeptide composto da acido glutammico (Glu), cisteina (Cys), e glicina (Gly) ed è il principale antiossidante presente nelle cellule. All'interno delle cellule la concentrazione di glutatione, in forma ridotta (GSH), è circa 50-100 volte superiore rispetto a quella di glutatione ossidato (GSSG), ^[6] e viene mantenuta costante grazie all'enzima glutatione riduttasi, il quale riduce il GSSG, e alla continua sintesi di GSH a partire dai tre amminoacidi. La concentrazione di GSH all'interno delle cellule è compresa tra 0.5 mM e 10 mM, mentre diminuisce ad una concentrazione di 10-30 μ M nel flusso sanguigno. Questa differenza di concentrazione è tale da indurre la rottura preferenziale dei legami disolfuro in polimeri o molecole che li contengano nel citoplasma, cioè nei compartimenti intracellulari, mentre rimangono stabili nell'ambiente extracellulare, e questo effetto fornisce un interessante metodo di drug delivery. ^[7] I gruppi disolfuro sono quindi molto utilizzati per programmare sistemi di rilascio attivo di farmaci e anche la degradazione sito-selettiva delle particelle stesse.

Un altro aspetto rilevante è la differenza tra i microambienti delle cellule normali da quelle tumorali. Questo è dovuto al fatto che la concentrazione di glutatione nelle cellule tumorali è sette volte maggiore rispetto alle cellule normali e cinquemila volte superiore all'ambiente esterno. ^[5]

Questa strategia è largamente studiata, soprattutto per il rilascio selettivo del RNA nelle cellule tumorali, dimostrando quindi l'efficacia del silenziamento genico da parte degli acidi nucleici. ^[7]

Una strategia alternativa che può essere utilizzata è quella studiata dal gruppo di ricerca di Kataoka, il quale studia la combinazione di legami incrociati disolfuro con gruppi amminici cationici che comporta un'ulteriore stabilizzazione delle micelle in ambiente fisiologico. È

stato verificato, infatti, che una struttura micellare che presenta legami cross-linkati comporta un'efficienza di trasfezione cento volte maggiore rispetto ad una struttura priva di questi legami incrociati. [6]

Nel drug delivery viene quindi sfruttato il gradiente di concentrazione presente tra l'ambiente extracellulare e intracellulare per il rilascio selettivo dell'agente terapeutico. [2,7]

1.4 NANOPARTICELLE BASATE SU DERIVATI DELL'ACIDO LIPOICO

Come abbiamo visto nei paragrafi precedenti, la ricerca di nanoparticelle che siano biocompatibili, invisibili al sistema immunitario, stabili in ambiente acquoso e che rilasciano il carico terapeutico solo una volta raggiunto il target può trovare una soluzione efficace nell'applicazione di polimeri che presentano legami disolfuro, i quali sono stabili in soluzioni acquose e sensibili alla presenza di tioli. Quest'ultimi sono presenti in abbondanza all'interno delle cellule a causa della presenza del glutathione (vedi paragrafo 1.3). Di conseguenza, tali NPs polimeriche mantengono la struttura in ambiente extracellulare ed iniziano a degradarsi solamente una volta dentro la cellula dell'organo bersaglio.

Una molecola che può essere sfruttata per le creazioni di tali nanoparticelle è l'acido lipoico, una molecola endogena che presenta inoltre proprietà antiossidanti e antitumorali. [5]

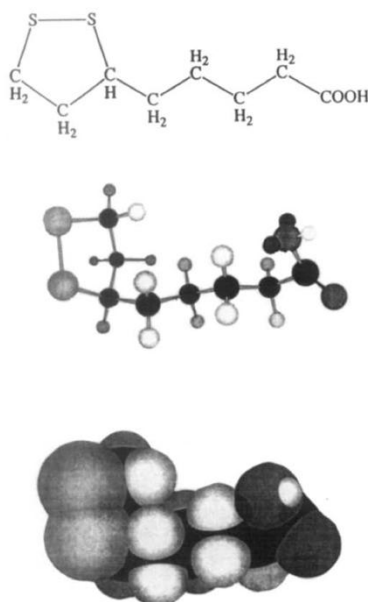


Figura 1. Struttura dell'acido lipoico riportata come struttura chimica (in alto), modello ball-and-stick (in centro), modello tridimensionale (in basso). [8]

In presenza di cisteina o altri tioli che fungono da catalizzatori, il legame disolfuro dell'anello lipoico si rompe e riorganizza formando un polidisolfuro. Questa reazione, detta RODEP (Ring Opening Disulfide Polymerization) consente la sintesi di polidisolfuri biodegradabili. La polimerizzazione viene poi invertita all'interno del citoplasma delle cellule tumorali, a causa dell'alta concentrazione di glutazione. È verificato che i polimeri reticolati con disolfuro degradano velocemente in questo ambiente, rilasciando di conseguenza il farmaco nel citoplasma.^[5]

Di conseguenza, l'acido lipoico è la scelta ottimale poiché esso è facilmente sintetizzabile, biodegradabile e non tossico. ^[5]

Un sistema polimerico progettato per applicazioni in settori biomedici dovrebbe essere privo di additivi o reagenti come tensioattivi. Esistono vari metodi per la preparazione di nanoparticelle polimeriche nei quali si assemblano polimeri già utilizzati per ottenere le nanoparticelle. Tuttavia, questi processi sintetici non permettono il cross-link delle catene polimeriche, che sarebbe in grado di accrescere la stabilità. ^[1]

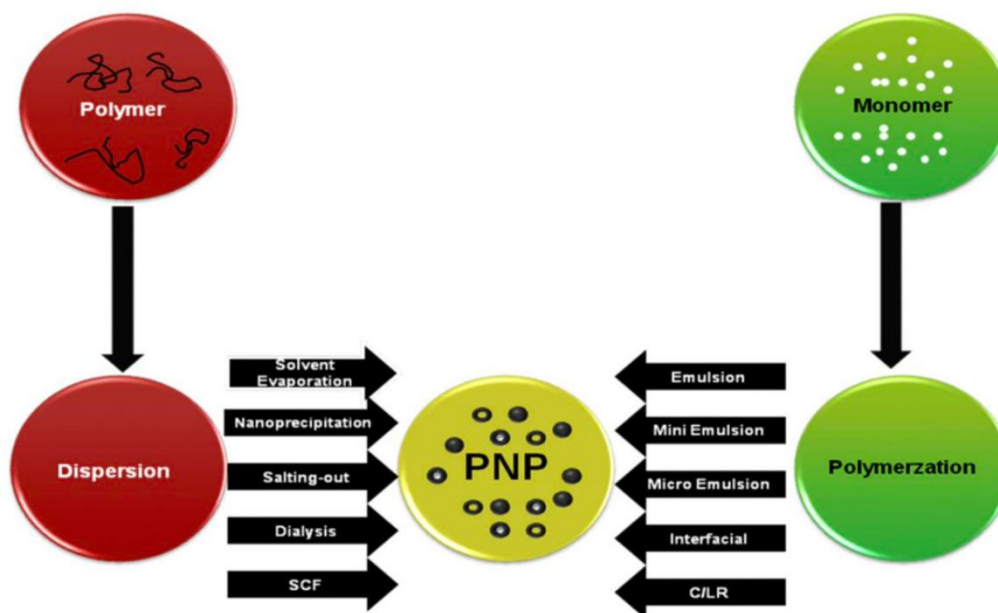


Figura 2. Tecniche di preparazione di nanoparticelle polimeriche. ^[1]

1.5 NANOPRECIPITAZIONE

Le particelle di acido lipoico vengono preparate mediante un protocollo che prevede una nanoprecipitazione seguita da una polimerizzazione.

Il processo di nanoprecipitazione, noto anche come “*solvent displacement*”, si serve di due solventi: uno in cui il precursore che formerà le nanoparticelle è solubile (solvente) e uno in cui è insolubile (non-solvente). Considerando che i due solventi devono essere miscibili tra loro, solitamente si impiegano liquidi organici polari come solventi (ad esempio acetone e metanolo) in cui il precursore viene disciolto, mentre il non-solvente è composto da una soluzione acquosa a cui si aggiunge un tensioattivo. [1]

Il tensioattivo utilizzato per svolgere l'elaborato, Pluronic F127, è un copolimero composto da una parte idrofila, formata da glicole polietilenico (PEG), e da una parte idrofobica, costituita da glicole polipropilenico (PPG). Il tensioattivo è stato approvato dalla FDA come additivo sicuro e inerte che garantisce, inoltre, alle nanoparticelle proprietà *stealth*. [4] Infatti questo polimero è idrofilo, costituendo una barriera attorno alle NPs offrendo quindi una protezione dall'ambiente fisiologico. [3]

La PEGilazione dei nanovettori solitamente prolunga il tempo di circolazione nel sangue e alcuni ligandi guidano i trasportatori verso i tessuti bersaglio. [6]

Quando la fase organica si disperde in quella acquosa il precursore si aggrega per formare le nanoparticelle stabilizzate dalla specie tensioattiva. Infine, il solvente organico viene rimosso mediante evaporazione.

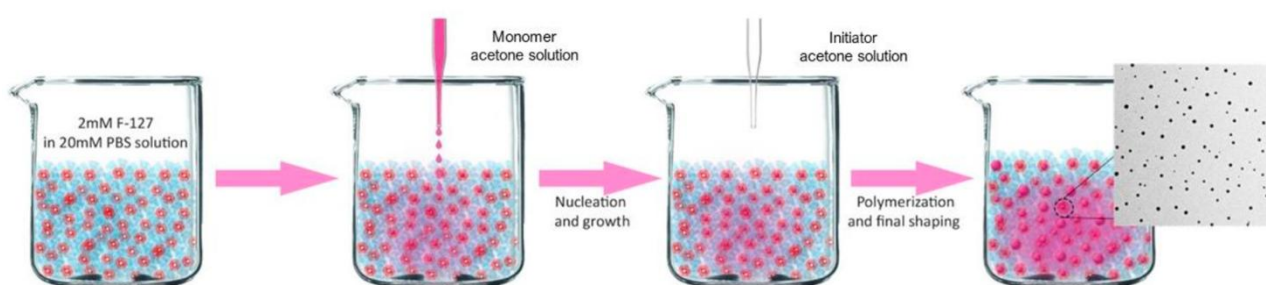


Figura 3. Metodo di nanoprecipitazione usato per ottenere le nanoparticelle. [4]

Nella fase successiva, la polimerizzazione dei precursori inclusi nel nucleo avviene tramite l'aggiunta di 1-ottantiolo, un tiolo lipofilico che agisce come nucleofilo sul gruppo disolfuro, inducendo l'apertura dell'anello. Questa reazione è nota come Ring Opening Disulfide-Exchange Polymerization (RODEP), una reazione totalmente compatibile con la presenza

di acqua. Dal momento che i precursori utilizzati contengono due o tre residui di acido lipoico legati ad un linker, si ottengono nanoparticelle polimeriche cross-linkate e stabilizzate dal tensioattivo. La polimerizzazione termina grazie all'aggiunta di 2-iodoacetamide, il quale impedisce la formazione di un eccesso di iniziatore. Le NPs a base di acido lipoico devono soddisfare determinati requisiti, quali la sicurezza, la capacità di trasportare macromolecole e una bassa tossicità. Quest'ultima è stata verificata mediante un esperimento *in vivo* sui ratti. Dopo la somministrazione di nanoparticelle basate su acido lipoico marcate con Rodamina, si è trovato che queste diffondono rapidamente nel corpo raggiungendo inizialmente i polmoni, successivamente il cuore e infine milza e fegato. Risulta notevole osservare come il cuore sembri trattenere la maggioranza di nanoparticelle, rendendole promettenti candidate come vettori in applicazioni cardiovascolari. [4]

Inoltre, si è dimostrato come l'aggiunta di un tensioattivo ionizzabile consente l'intrappolamento di RNA all'interno delle particelle, rendendone un potenziale efficace veicolo per la terapia genica.

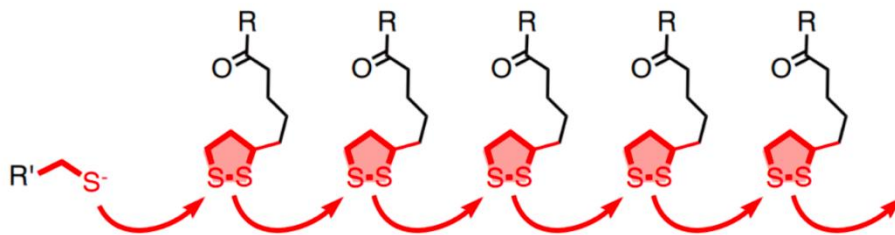


Figura 4. Rappresentazione del meccanismo RODEP [9]

2. SCOPO

In questa tesi si è studiata la possibilità di preparare nanoparticelle a base di acido lipoico polimerizzato contenenti gruppi funzionali in grado di abilitarle come nanovettori per trasportare acidi nucleici nell'organismo.

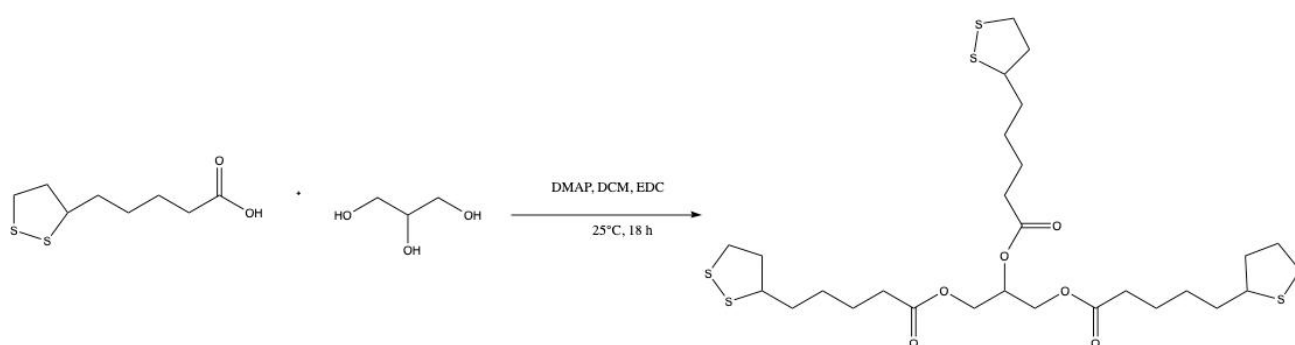
Le nanoparticelle a base di acido lipoico sono di grande interesse per le loro proprietà caratteristiche, quali la facilità di sintesi, stabilità in acqua, la loro non-tossicità e la sensibilità alla presenza di tioli liberi, presenti a livello citoplasmatico, rilasciando il possibile farmaco solamente una volta all'interno della cellula dell'organo bersaglio. Presentano però lo svantaggio di non essere adatte, a causa del carattere idrofobico del loro interno, al trasporto di acidi nucleici. Come menzionato nell'introduzione, questo problema può essere risolto in modo simile a quanto si fa generalmente nel caso delle particelle SLN (solid lipid nanoparticles): aggiungendo un lipide ionizzabile. Queste molecole anfifiliche sono cariche positivamente a pH acido, e quindi si legano agli acidi nucleici neutralizzandone la carica e rendendoli lipofili, ma sono neutre a pH fisiologico, e quindi non conferiscono carica alle particelle (è noto infatti che le particelle cariche positivamente sono velocemente eliminate dal sistema immunitario). L'ipotesi che ho voluto verificare è stata la possibilità di sostituire il tensioattivo ionizzabile con un derivato ionizzabile dell'acido lipoico in grado di copolimerizzare con la matrice delle particelle.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 SINTESI DEI PRECURSORI

Nel corso del mio lavoro di tesi ho sintetizzato in primo luogo due monomeri normalmente utilizzati nella sintesi delle particelle di acido polilipoico. Il primo monomero sintetizzato è il derivato dell'acido lipoico, denominato precursore [1], composto da 3 equivalenti di acido lipoico e 1 equivalente di glicerolo. Tale precursore è stato studiato per consentire la formazione di polimeri altamente reticolati e perché i prodotti di degradazione (acido lipoico e glicerolo) siano completamente endogeni.

La reazione sfruttata è l'esterificazione di Steglich in diclorometano e in presenza di 4-dimetilamminopiridina (DMAP) e 1-etil-3-(3-dimetilamminopropil) carbodiimmide (EDC). Questi due composti vengono utilizzati rispettivamente come catalizzatore per evitare la formazione di prodotti secondari e come attivatore dell'acido lipoico. [10]

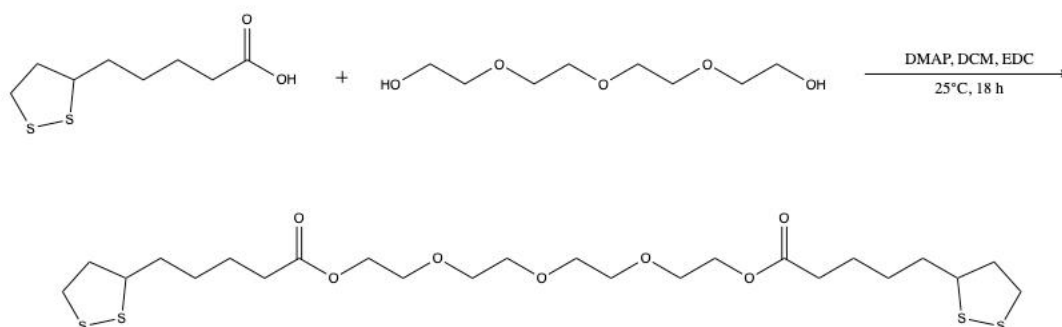


Il prodotto, presentatosi sottoforma di olio giallo, è purificato tramite colonna cromatografica flash (eluente DCM:AcOEt 9:1), ottenendo infine una resa del 85%. Viene poi caratterizzato tramite analisi ^1H , ^{13}C NMR, per confermarne l'identità e la purezza.

L'analisi ESI-MS non è svolta poiché il composto ottenuto era già stato caratterizzato dal gruppo di ricerca del professor Mancin. [4]

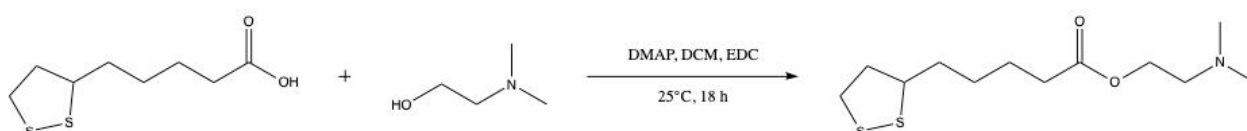
Come già noto da studi precedenti, questo precursore è solubile in acetone e quindi adatto alla sintesi di nanoparticelle per nanoprecipitazione/RODEP.

Il secondo precursore, denominato precursore [2], viene ottenuto da due equivalenti di acido lipoico legate ad un tetraetilenglicole attraverso legame estereo, ottenuto mediante la reazione di Steglich.



Il prodotto è purificato tramite colonna cromatografica, con una resa del 17%. Infine, caratterizzato con analisi NMR per verificarne l'identità e la purezza. Anch'esso è in grado di formare polimeri reticolati, seppure in misura minore rispetto a [1], ma è solubile anche in etanolo, solvente preferibile per la formulazione di nanoparticelle per applicazioni biomediche.

Il terzo precursore sintetizzato, denominato precursore [3], è composto da un equivalente di acido lipoico e un equivalente di dimetiletanolamina, utilizzando la medesima strategia di sintesi del precursore [1]. Questo composto ha lo scopo di sostituire eventualmente il lipide ionizzabile utilizzato in precedenza. Esso, infatti, fornisce un gruppo amminico terziario, in grado di protonarsi a pH acidi e di tornare allo stato di base neutra a pH 7, e un residuo di acido lipoico in grado di co-polimerizzare con la matrice della particella.



Il prodotto è poi separato con colonna cromatografica flash, ottenendo una resa del 18% e caratterizzato mediante NMR ed ESI-MS.

L'acido lipoico è solito a polimerizzare spontaneamente, anche in assenza di un iniziatore, attraverso il meccanismo di Ring Opening Disulfide-Exchange Polymerization (RODEP). Questo processo causa un cambiamento dell'aspetto del composto, che passa dal presentarsi sottoforma di un olio ad un elastomero. La polimerizzazione spontanea può essere causata da fattori esterni, quali la luce, temperatura e il solvente utilizzato nella sintesi. Per tale motivo, la reazione di esterificazione di Steglich utilizzata nelle sintesi dei precursori è condotta al buio ed alla temperatura di 25°C. Inoltre, i prodotti ottenuti sono conservati in frigo già nella forma di soluzione utilizzata in seguito per la sintesi delle nanoparticelle (5 mg/mL).^[11,12,13] Si è infatti notato che la polimerizzazione avviene più facilmente nel composto puro che nelle particelle.

3.2 SINTESI DELLE NANOPARTICELLE

Successivamente, mi sono dedicata a valutare se la presenza del monomero [3] consentisse la sintesi delle nanoparticelle di acido polilipoico. La procedura standard per la sintesi di nanoparticelle di acido lipoico prevede la dissoluzione del precursore in acetone o etanolo, combinando il processo di nanoprecipitazione con il meccanismo RODEP.

La sintesi prevede che ad una soluzione di tampone fosfato salino (PBS) 20 mM a pH 7.4 e una molecola di tensioattivo (F-127) 2mM venga aggiunta una soluzione in acetone (o in etanolo), contenente il derivato dell'acido lipoico, alla concentrazione di 5 mg/mL, sotto vigorosa agitazione. La polimerizzazione si attiva solo nel momento in cui è aggiunto l'iniziatore, 1-ottantiolo, e continua a cascata fino a quando non viene aggiunto il terminatore, 2-iodioacetamide.

La soluzione è filtrata con dei filtri di cellulosa (0.20 µm) e in seguito purificata attraverso centrifugazioni successive, lavata due volte con acqua milliQ e una volta con PBS.

Le nanoparticelle ottenute sono analizzate tramite dispersione dinamica della luce (DLS).

Nelle seguenti misure i valori riportati nelle tabelle sono i seguenti:

N = raggio idrodinamico medio delle particelle più numerose;

V = raggio idrodinamico medio delle particelle che occupano il valore maggiore in nm;

I = raggio idrodinamico medio delle particelle che danno scattering più intenso;

PDI = polydispersion Index, indice di polidispersione, adimensionale.

| Nanoparticelle | Number | Volume | Intesity | PDI |
|-------------------------|------------|-------------|------------|-------|
| <i>Precursore [1]</i> | 236.0 ± 82 | 323.7 ± 108 | 296.0 ± 96 | 0.191 |
| <i>Precursore [1-3]</i> | 94.44 ± 30 | 134.6 ± 61 | 149.8 ± 56 | 0.292 |
| <i>Precursore [2-3]</i> | 176.3 ± 62 | 246.6 ± 88 | 231.3 ± 75 | 0.128 |

Tabella 1. Sintesi delle nanoparticelle dai precursori a pH 7.4 (PBS).

| Nanoparticelle | Number | Volume | Intesity | PDI |
|-------------------------|------------|------------|------------|-------|
| <i>Precursore [1-3]</i> | 93.41 ± 27 | 122.0 ± 46 | 136.9 ± 44 | 0.348 |
| <i>Precursore [2-3]</i> | 173.1 ± 64 | 254.2 ± 97 | 236.0 ± 83 | 0.128 |

Tabella 2. Sintesi delle nanoparticelle dai precursori a pH 4.

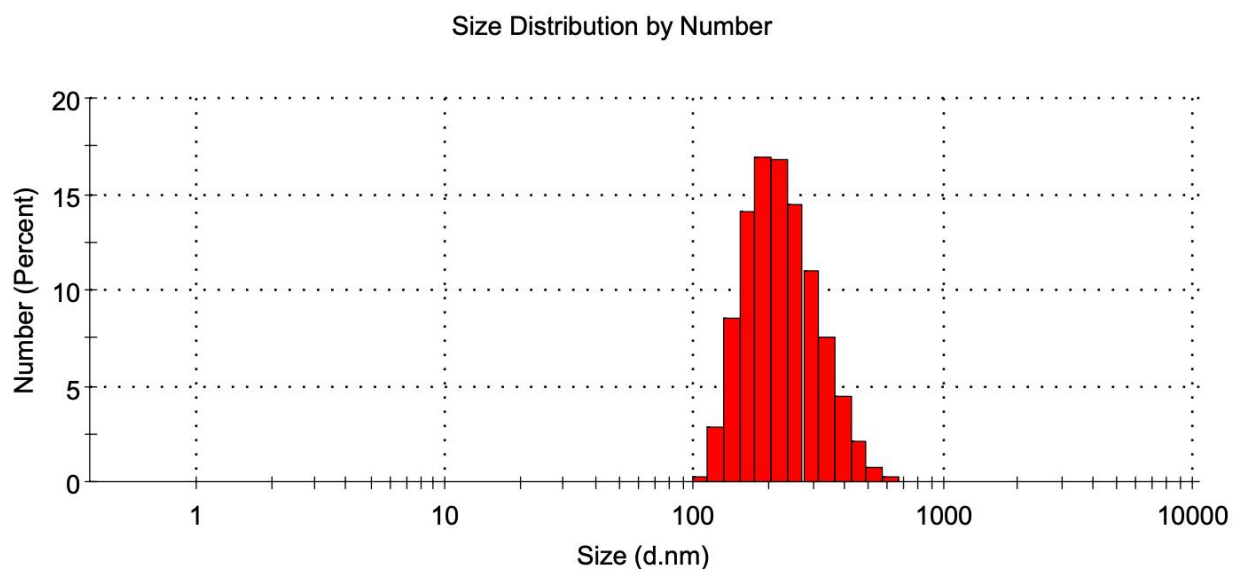


Figura 5. Distribuzione dimensionale determinata tramite analisi DLS delle nanoparticelle ottenute con il precursore [1] a pH 7.4.

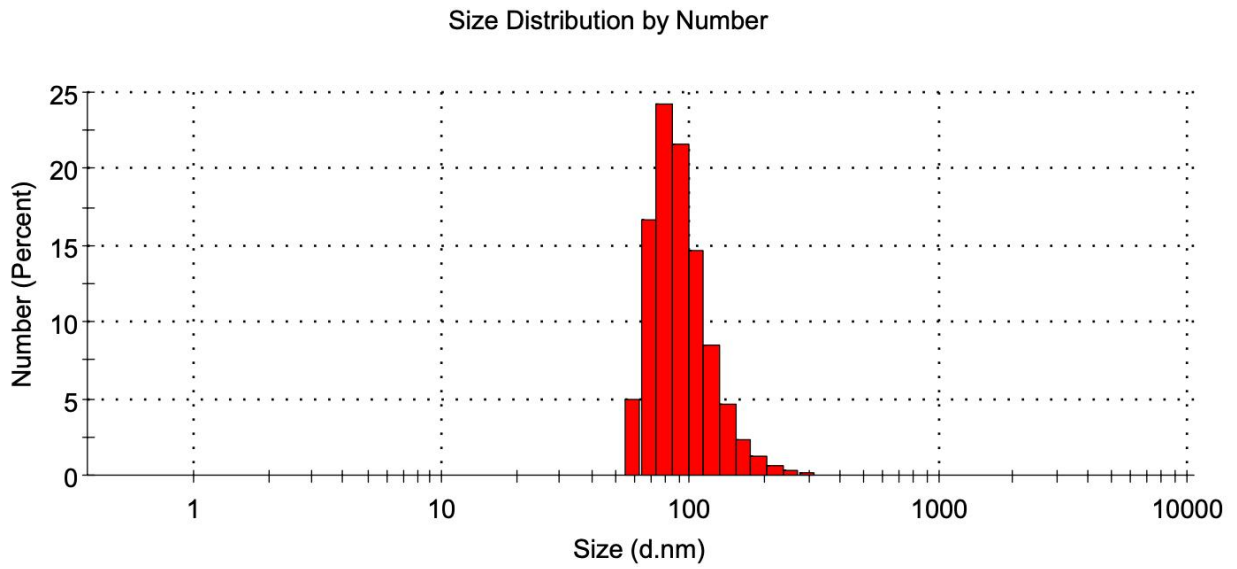


Figura 6. Distribuzione dimensionale determinata tramite analisi DLS delle nanoparticelle ottenute con il precursore [1-3] a pH 7.4.

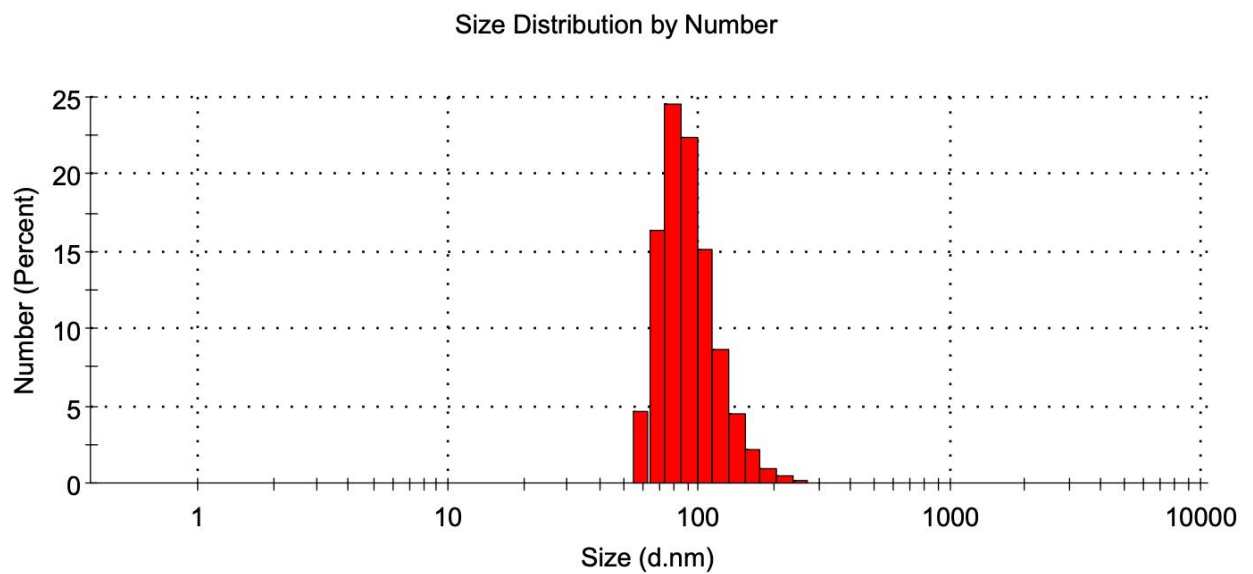


Figura 6. Distribuzione dimensionale determinata tramite analisi DLS delle nanoparticelle ottenute con il precursore [1-3] a pH 4.

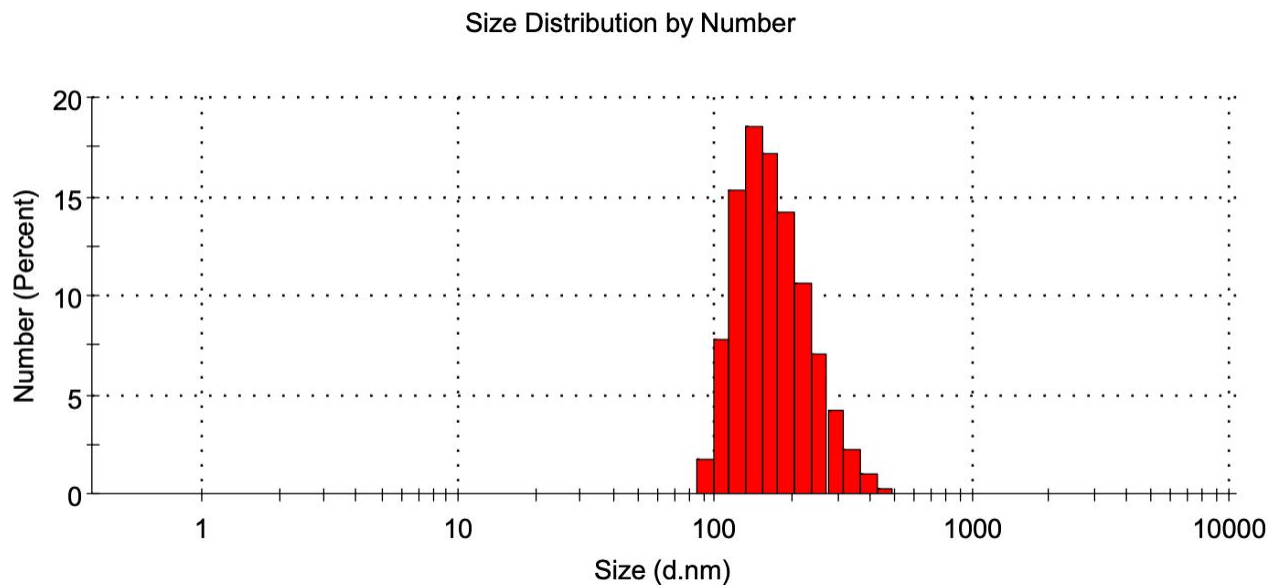


Figura 7. Distribuzione dimensionale determinata tramite analisi DLS delle nanoparticelle ottenute con il precursore [2-3] a pH 7.4.

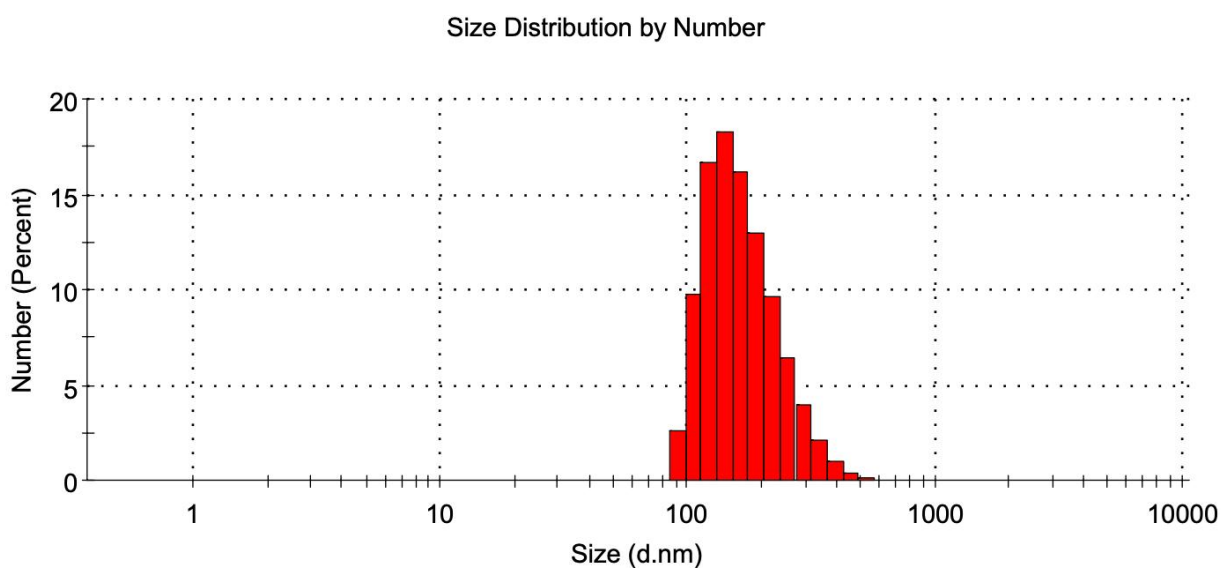


Figura 8. Distribuzione dimensionale determinata tramite analisi DLS delle nanoparticelle ottenute con il precursore [2-3] a pH 4.

Il successo delle sintesi delle nanoparticelle a base di acido lipoico è stato confermato dall'analisi DLS (diffusione dinamica della luce), la quale registra il raggio idrodinamico a partire dalle fluttuazioni di intensità di luce diffusa dal campione. Quest'analisi fornisce le dimensioni medie delle particelle (o meglio il loro raggio idrodinamico) ed il valore dell'indice di polidispersività (PDI), il quale rappresenta il grado di monodispersione delle particelle, ed ha un valore ottimale sotto 0.1 e accettabile se inferiore a 0.3.^[5] Come già noto, le particelle sintetizzate con il monomero [1] hanno un diametro inferiore rispetto a

quelle preparate con il precursore [2]. Apparentemente, infatti, le dimensioni delle particelle risultano inversamente correlate con il grado di lipofilicità dei monomeri. Nel corso dello studio sulle NPs è stata condotta un'analisi DLS sia a pH neutro (pH = 7) sia a pH acido (pH = 4) mostrando che le dimensioni delle nanoparticelle rimangono pressoché identiche. In teoria, mi sarei aspettata un aumento di diametro a pH acido, dal momento che la protonazione dei gruppi amminici dovrebbe indurre un rigonfiamento. Una possibile spiegazione per il mantenimento delle dimensioni potrebbe derivare dalla presenza di un'elevata reticolazione, che rende il nucleo troppo rigido per rigonfiarsi. D'altro canto, è anche possibile che il monomero amminico sia troppo idrofilico e non venga inglobato nelle particelle.

4. CONCLUSIONI

Nel presente elaborato, è stato iniziato uno studio per un'alternativa alla tecnica standard di caricamento di nanoparticelle polimeriche con acidi nucleici, che non richieda l'uso di tensioattivi ionizzabili. A tale scopo abbiamo disegnato e sintetizzato con successo il monomero [3], che possiede un gruppo amminico terziario, che può protonarsi a pH acidi e tornare allo stato neutro a pH 7, e un residuo di acido lipoico in grado di co-polimerizzare con la matrice delle particelle, stabilizzate grazie al tensioattivo Pluronic F-127.

Il derivato realizzato è inoltre rivelato solubile in etanolo, che rappresenta il solvente ideale per la sintesi delle particelle al contrario dell'acetone utilizzato in precedenza.

Gli studi effettuati confermano come il derivato [3] non impedisca la formazione delle particelle, ma non hanno portato a nessuna evidenza sulla sua inclusione nelle stesse. A tale scopo, saranno necessarie ulteriori investigazioni. Come precedentemente menzionato, per creare nanovettori "intelligenti" è essenziale che essi mantengano la loro struttura molecolare intatta fino a quando raggiungono il loro obiettivo, allo scopo di preservare il carico che trasportano. È altrettanto cruciale che tali sistemi di distribuzione si degradino una volta raggiunto il sito d'azione, nel nostro caso l'ambiente intracellulare, in cui la concentrazione di glutazione è significativamente superiore rispetto a quella extracellulare. I risultati riportati dimostrano chiaramente la fattibilità di impiegare queste nanoparticelle come veicoli per il drug delivery.

Le nanoparticelle oggetto di studio costituiscono un eccellente esempio di un nanosistema polimerico, biocompatibile e biodegradabile, dotato di notevoli proprietà per un'eventuale applicazione nel campo biomedico. È importante sottolineare la loro proprietà "stealth", che le rende invisibili al sistema immunitario e consentendo di rimanere integre durante la circolazione, fino all'ambiente intracellulare.

5. PARTE SPERIMENTALE

5.1 STRUMENTI UTILIZZATI

Centrifuga: Hettich universal 320 R che opera con un rotore rotante oscillante ($\text{rpm} \leq 5000$) oppure con un rotatore ad angolo fisso ($\text{rpm} \leq 12000$) è utilizzata per la centrifugazione delle nanoparticelle senza siRNA.

DLS: Zetasizer NanoS (Malvern Instruments), angolo di scattering 176° , laser $\lambda = 633 \text{ nm}$.

NMR: spettrometro Bruker 200 e AVIII 500 operante, rispettivamente, a 300 e 500 MHz.

ESI-MS: Agilent Technologies 1100 Series system dotato di pompa binaria (G1312A) e trappola ionica MSD SL (G2445D SL).

5.2 SINTESI DEI PRECURSORI

5.2.1 Sintesi precursore [1].

| REAGENTI | MM (g/mol) | Massa (g) | Volume (mL) | mmol | equivalenti | Densità (g/mL) |
|----------------------|-----------------------|----------------------|------------------------|-------------|--------------------|---------------------------|
| <i>Acido lipoico</i> | 206.33 | 1.506 | | 7.30 | 3 | |
| <i>Glicerolo</i> | 92.08 | | 0.18 | 2.4 | 1 | 1.25 |
| <i>4-DMAP</i> | 122.17 | 0.891 | | 7.29 | 3 | |
| <i>EDC</i> | 191.70 | 1.406 | | 7.33 | 3 | |
| <i>DCM anidro</i> | 84.93 | | 25 | | | 1.325 |

Tabella 3. Tabella dei reagenti.

In un pallone sono disciolti acido lipoico (1.506 g, 7.30 mmol, 3 equivalenti), glicerolo (0.18 mL, 2.4 mmol, 1 equivalente) e DMAP (0.891 g, 7.29 mmol, 3 equivalenti) in 25 mL di diclorometano anidro (DCM) in atmosfera di azoto e agitati per 15 minuti alla temperatura di 0°C tramite l'aggiunta di un bagno a ghiaccio.

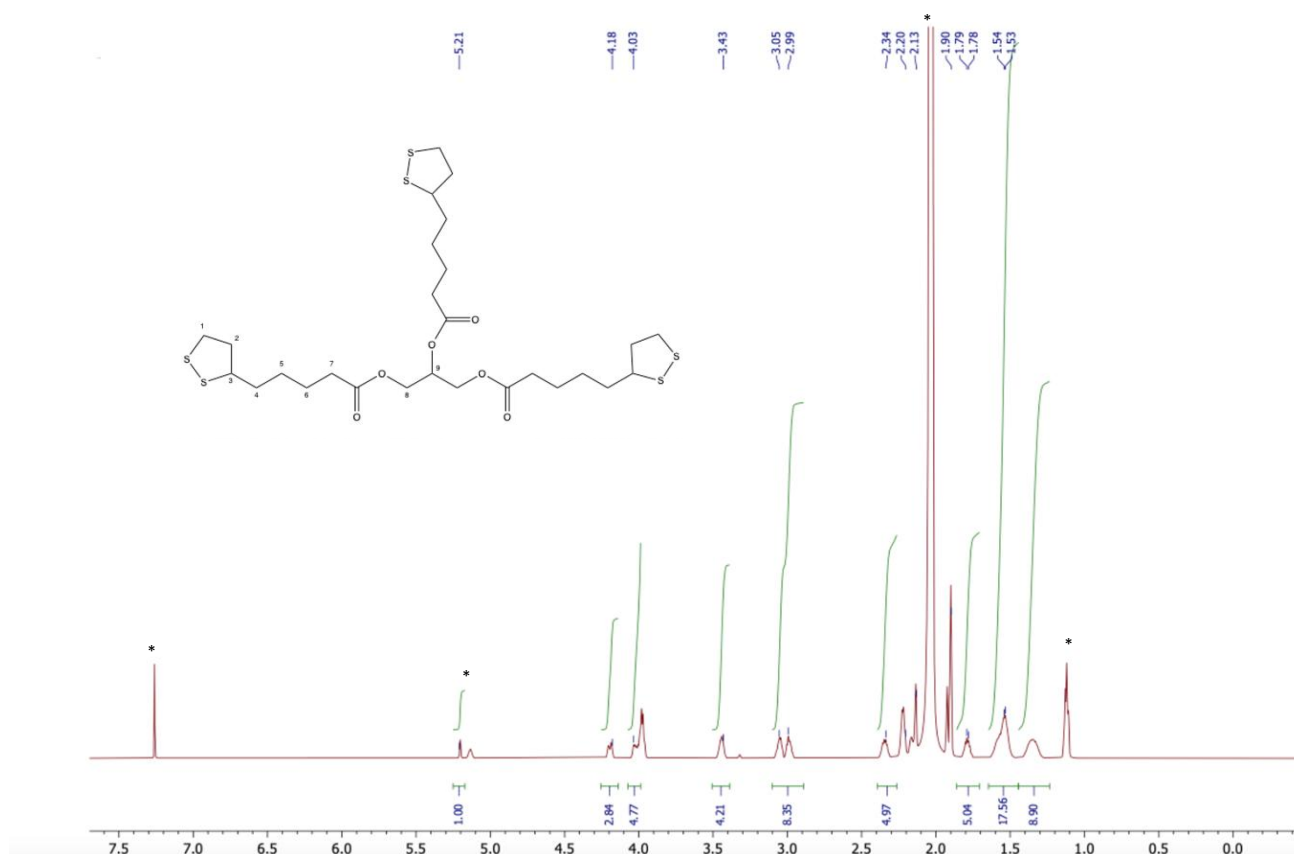
Successivamente, è aggiunto EDC (1.406 g, 7.33 mmol, 3 equivalenti) alla soluzione, la quale viene mantenuta sotto agitazione a 25°C per tutta la notte ed al buio.

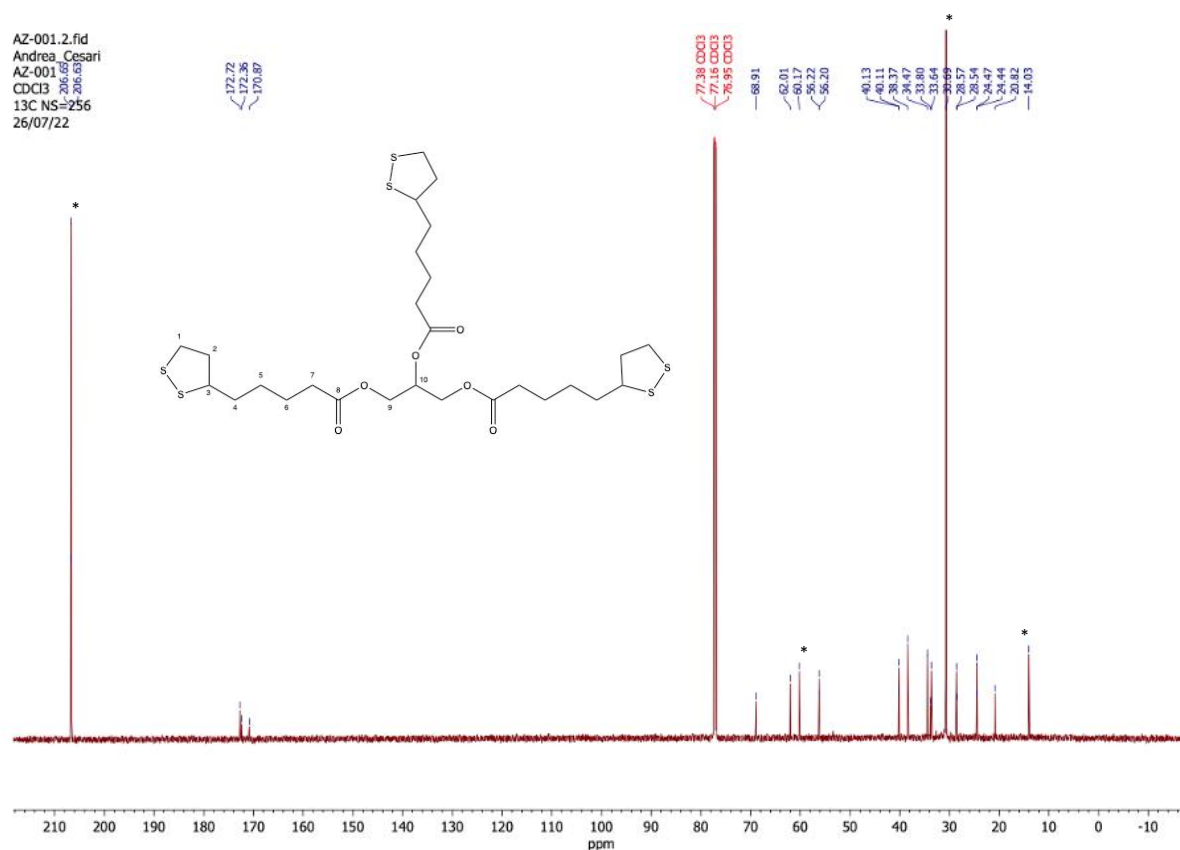
Utilizzando l'evaporatore rotante a pressione ridotta, la miscela è parzialmente concentrata poiché se fosse completamente concentrata il monomero polimerizzerebbe. Tramite TLC è controllato il decorso della reazione ed in seguito è scelto l'eluente per la colonna.

Per facilitare l'introduzione del prodotto nella colonna questo è disciolto insieme allo stesso eluente scelto. È quindi purificato attraverso cromatografia flash su gel di silice, con eluente DCM:AcOEt 9:1, ed infine portato a secco con l'evaporatore rotante.

L'aspetto finale del prodotto è un olio giallo (1.875 g), ottenendo una resa del 85% (per evitare che il prodotto polimerizzasse è lasciato del solvente con esso) caratterizzato tramite NMR.

Caratterizzazioni:





¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃), δ: 1.3 (H₅), 1.53 (H₄₋₆), 1.78 - 2.20 (H₂), 2.34 (H₇), 2.99-3.05 (H₃), 3.43 (H₁), 4.03-4.18 (H₈), 5.21 (H₉).

¹³C-NMR: (300 MHz, CDCl₃), δ: 28.54, 28.57, 33.80, 34.47, 38.37, 40.12, 56.21, 62.01, 68.91, 172.36.

ESI-MS: 679 m/z (M+Na⁺), 695 m/z (M+K⁺) [2]

5.2.2 Sintesi del precursore [2].

| REAGENTI | MM (g/mol) | Massa (g) | Volume (mL) | mmol | equivalenti | Densità (g/mL) |
|--------------------|-----------------------|----------------------|------------------------|-------------|--------------------|---------------------------|
| Acido lipoico | 206.33 | 2.48 | | 12.01 | 2 | |
| Tetraetilenglicole | 194.23 | 1.25 | 1111.2 µL | 6.44 | 1 | 1.125 |
| 4-DMAP | 122.17 | 1.486 | | 12.16 | 2.2 | |
| EDC | 191.70 | 2.3 | | 12.00 | 2 | |
| DCM anidro | 84.93 | | 25 | | | 1.325 |

Tabella 6. Tabella dei reagenti.

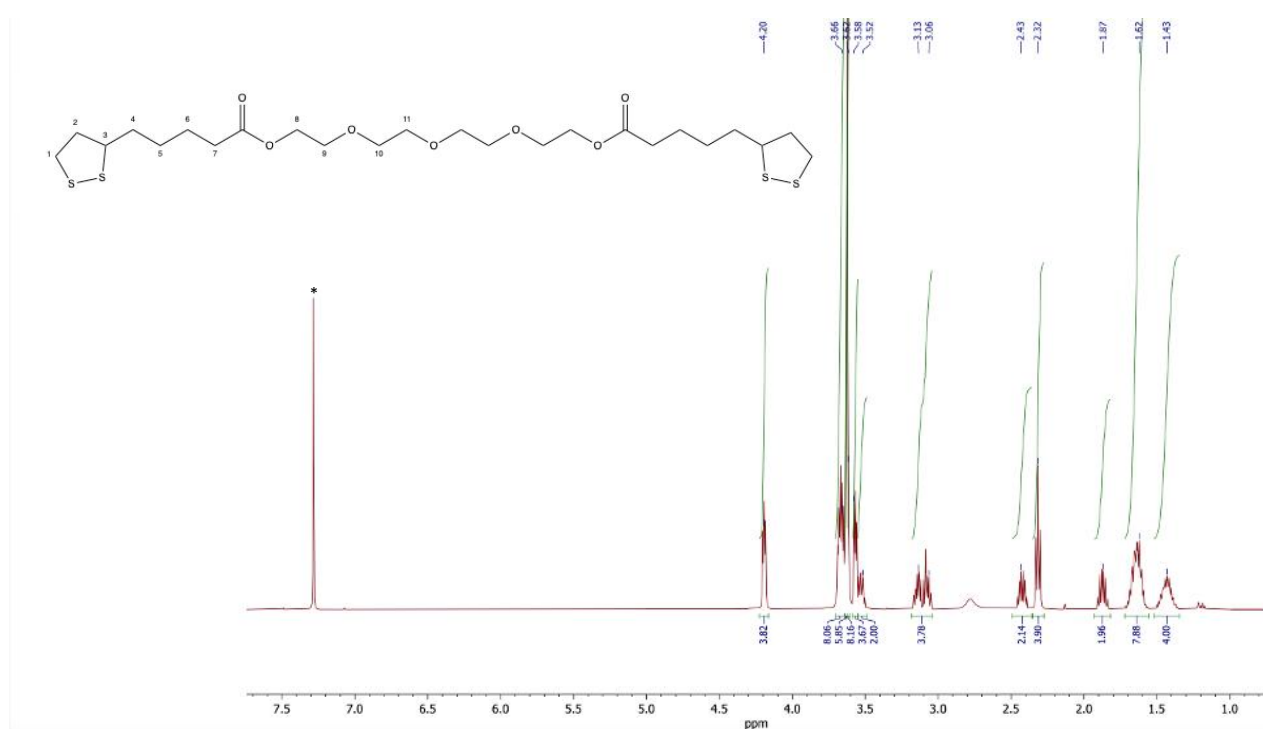
In un pallone sono stati disciolti acido lipoico (2.48 g, 12.01 mmol, 2 equivalenti), tetraetilenglicole (1111.2 μ L, 6.44 mmol, 1 equivalente), DMAP (1.486 g, 12.16 mmol, 2.2 equivalenti) in 25 mL di diclorometano anidro in atmosfera di azoto sotto agitazione per 15 minuti, portando la temperatura a 0°C tramite l'aggiunta di un bagno a ghiaccio. Successivamente è stato aggiunto EDC (2.3 g, 12.00 mmol, 2 equivalenti), lasciando quindi la miscela di reazione sotto agitazione a 25°C per tutta la notte al buio.

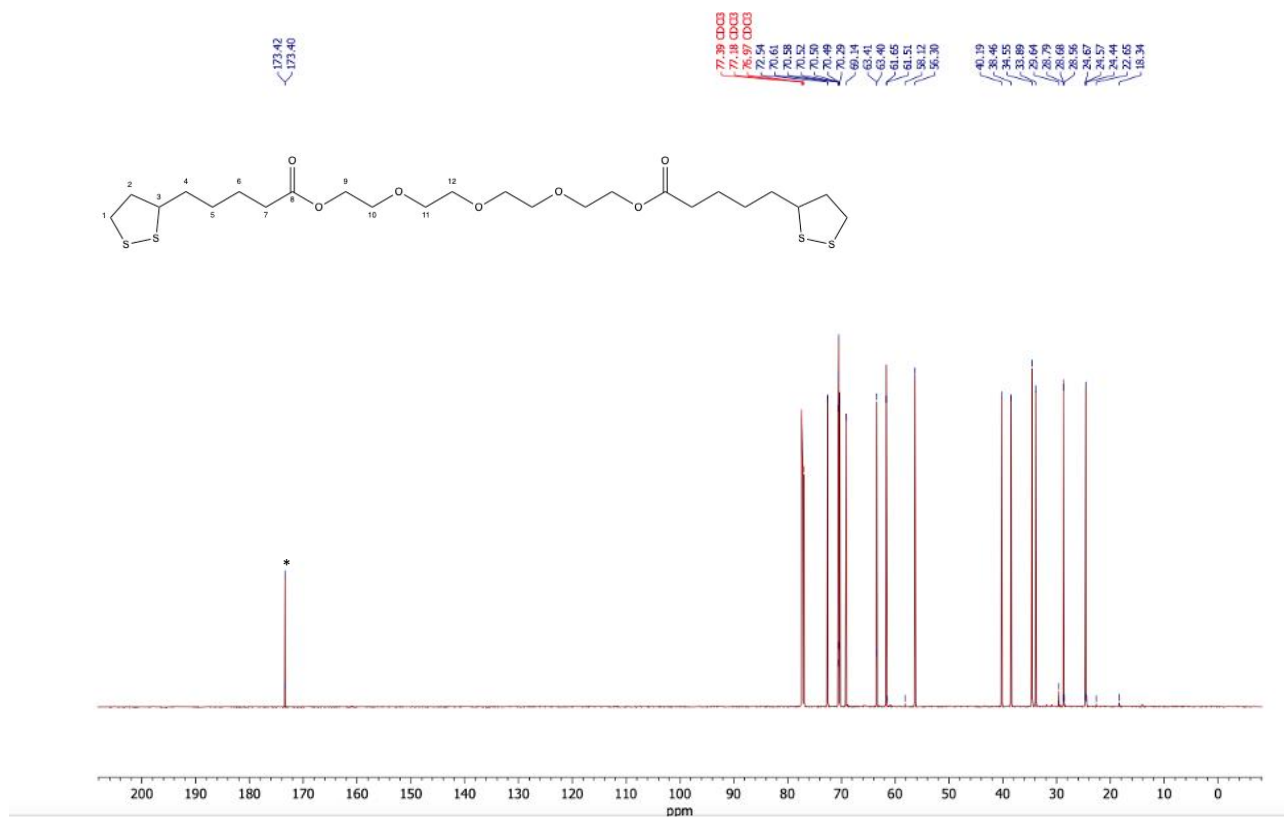
La miscela risultante è stata concentrata a pressione ridotta con l'evaporatore rotante, e controllato l'andamento e la scelta dell'eluente per la colonna tramite TLC.

Per facilitare l'introduzione del prodotto nella colonna è stato sciolto insieme ad esso l'eluente scelto, è stato quindi purificato attraverso cromatografia flash su gel di silice, con eluente CH₂Cl₂: MeOH 9:1, e infine portato a secco con rotavapor.

Il prodotto ottenuto è stato suddiviso in due palloni e concentrati con rotavapor. Il prodotto ottenuto, in entrambi i palloni, ha l'aspetto di un olio giallo ottenendo una resa del 17% (per evitare che il prodotto polimerizzasse è lasciato del solvente con esso). Infine, è stato caratterizzato tramite NMR e ESI-MS.

Caratterizzazioni:





* Solvent impurity: EtOAc, acetone

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ: 1.43 (H₅), 1.62 (H₄₋₆), 2.32 (H₇), 2.43-1.87 (H₂) 3.06-3.13 (H₁), 3.52 (H₃), 3.66 – 3.58 (H₉₋₁₀₋₁₁), 4.20 (H₈)

¹³C-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ: 18.34, 24.57, 29.64 - 28.56, 33.89, 40.19, 56-63, 69.14, 70.29 – 72.54, 173.41.

5.2.3 Sintesi del precursore [3].

| REAGENTI | MM (g/mol) | Massa (g) | Volume (mL) | mmol | equivalenti | Densità (g/mL) |
|--------------------|-----------------------|----------------------|------------------------|-------------|--------------------|---------------------------|
| Acido lipoico | 206.33 | 1.157 | | 5.61 | 1 | |
| dimetiletanolamina | 89.14 | 0.500 | 564 µL | 5.61 | 1 | |
| 4-DMAP | 122.17 | 0.752 | | 6.16 | 1.1 | |
| EDC | 191.70 | 0.958 | | 6.17 | 1.1 | |
| DCM anidro | 84.93 | | 25 | | | 1.325 |

Tabella 5. Tabella dei reagenti.

In un pallone sono stati disciolti acido lipoico (1.157 g, 5.61 mmol, 1 equivalente), dimetiletanolammina (0.500 g, 5.61 mmol, 1 equivalente), DMAP (0.752 g, 6.16 mmol, 1.1 equivalenti) in 25 mL di diclorometano anidro in atmosfera di azoto sotto agitazione per 15 minuti, portando la temperatura a 0°C tramite l'aggiunta di un bagno a ghiaccio e successivamente è stato aggiunto EDC (0.958 g, 6.17 mmol, 1.1 equivalenti), lasciando quindi la miscela di reazione sotto agitazione a 25°C per tutta la notte al buio.

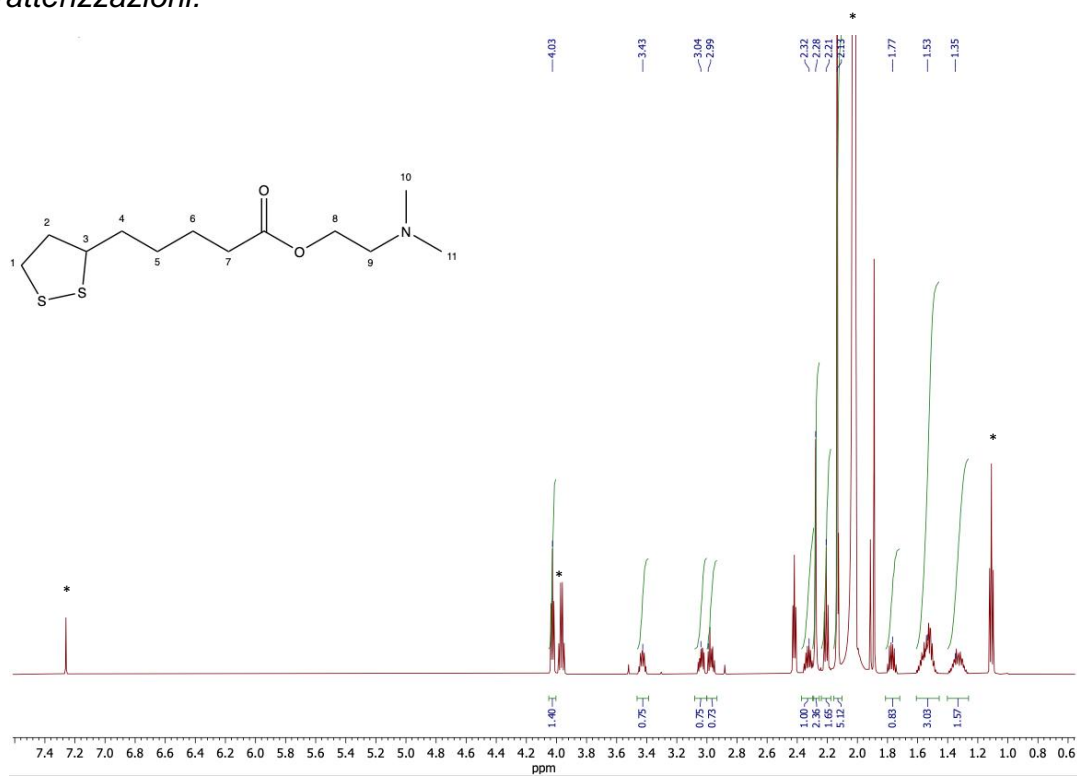
La miscela risultante è stata concentrata a pressione ridotta con l'evaporatore rotante, e controllato il decorso della reazione e la scelta dell'eluente per la colonna tramite TLC. Per verificare se fosse migliore il diclorometano (DCM) oppure l'acetato di etile (AcOEt) come eluente è eseguita una TLC bidimensionale.

Per facilitare l'introduzione del prodotto nella colonna questo è disciolto insieme allo stesso eluente scelto, è quindi purificato mediante colonna cromatografica caricata ad umido, con eluente AcOEt:MeOH 9.5:0.5.

Il prodotto ottenuto è stato suddiviso in due palloni e concentrati con rotavapor. Il prodotto ottenuto, in entrambi i palloni, ha l'aspetto di un olio giallo ottenendo una resa del 18 % (per evitare che il prodotto polimerizzasse è lasciato del solvente con esso). Il valore ottenuto della resa è relativamente basso perché nell'altra frazione caratterizzata è presente una miscela contenente il prodotto e altri sottoprodotti.

Infine, è stato caratterizzato tramite NMR ed ESI-MS.

Caratterizzazioni:



* Impurity solvent: EtOAc, acetone

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃), δ: 1.35 (H₅), 1.53 (H₄₋₆), 2.13 (H₁₀), 2.21 (H₇), 1.77 - 2.32 (H₂), 2.41 (H₉), 2.99 - 3.04 (H₁), 3.43 (H₃), 4.03 (H₈).

¹³C-NMR (300 MHz, CDCl₃), δ: 24.51, 28.58, 33.83, 34.46, 38.33, 40.07, 45.53, 56.20 - 57.69, 61.94, 173.35.

ESI-MS: 278.1 m/z (M+Na⁺).

5.3 SINTESI DELLE NANOPARTICELLE

5.3.1 Soluzioni utilizzate per le sintesi.

- Soluzione tampone fosfato salino (PBS) 20 mM a pH 7.4;
- Soluzione tensioattivo Pluronic F-127 2mM;
- *Soluzione (1)*: precursore [1] alla concentrazione 100 mg/mL in acetone, ottenuta aggiungendo 18.5 mL di acetone al precursore [1] (1850 mg);
- *Soluzione (2)*: precursore [2] alla concentrazione 100 mg/mL in etanolo, ottenuta aggiungendo 6.14 mL di etanolo al precursore [2] (614 mg);
- *Soluzione (3)*: precursore [3] alla concentrazione 100 mg/mL in etanolo, ottenuta aggiungendo 2930 µL di etanolo al precursore [3] (293 mg);
- Soluzione di iniziatore 1-ottantiolo 5 mg/mL in acetone (in etanolo per la terza sintesi);
- Soluzione di terminatore 1-iodoacetamide 5 mg/mL in acetone (in etanolo per la terza sintesi).

5.3.2 Sintesi nanoparticelle con il precursore [1].

È preparata in un pallone da 250 mL una soluzione contenente 100 mL di PBS e 100 mL di tensioattivo Pluronic F-127 e agitata in modo vigoroso (1000 rpm) per 30 minuti. Successivamente, sono aggiunti 20 mL di una soluzione, ottenuta mescolando 1 mL di soluzione (1) e 19 mL di acetone, e rapidamente aggiunti 1520 µL di iniziatore 1-ottantiolo, mantenendola in agitazione per ulteriori 90 minuti. Infine, sono aggiunti 1520 µL di terminatore iodoacetamide, agitando per ulteriori 30 minuti.

5.3.3 Sintesi nanoparticelle con il precursore [2].

È preparata in un pallone da 250 mL una soluzione contenente 100 mL di PBS e 100 mL di tensioattivo Pluronic F-127 e agitata in modo vigoroso per 30 minuti. Successivamente, sono aggiunti 20 mL di una soluzione, ottenuta mescolando 1 mL di soluzione (2) e 19 mL di etanolo, e rapidamente aggiunti 1520 μ L di iniziatore 1-ottantiolo, mantenendola in agitazione per ulteriori 90 minuti. Infine, sono aggiunti 1520 μ L di terminatore iodioacetamide, agitando per ulteriori 30 minuti.

5.3.4 Sintesi nanoparticelle con il precursore [3].

È preparata in un pallone da 250 mL una soluzione contenente 100 mL di PBS e 100 mL di tensioattivo Pluronic F-127 e agitata in modo vigoroso per 30 minuti. Successivamente, sono aggiunti 20 mL di una soluzione, ottenuta mescolando 19 mL di etanolo e 0.1 mL di soluzione (3), e rapidamente aggiunti 1520 μ L di iniziatore 1-ottantiolo, mantenendola in agitazione per ulteriori 90 minuti. Infine, sono aggiunti 1520 μ L di terminatore iodioacetamide, agitando per ulteriori 30 minuti.

5.3.5 Purificazione nanoparticelle a base di acido lipoico

Tutte le soluzioni ottenute sono filtrate con filtri di cellulosa con dimensione dei pori 0.20 μ m. Sono purificate tramite centrifugazione utilizzando amicon tube con 14 mL (1200 rpm, 30 minuti), eseguendo due lavaggi con acqua milliQ e uno con PBS. Il surnatante è stato rimosso cautamente.

Le nanoparticelle ottenute sono caratterizzate tramite analisi DLS, per le nanoparticelle ottenute con il precursore [2] e quelle ottenute con il precursore [3] è svolta l'analisi a pH 5 e pH 7.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Rao, J. P. & Geckeler, K. E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science (Oxford)* 36, 887–913 (2011).
2. Ramasamy, T., Munusamy, S., Ruttala, H. B. & Kim, J. O. Smart Nanocarriers for the Delivery of Nucleic Acid-Based Therapeutics: A Comprehensive Review. *Biotechnology Journal* 16 (2021).
3. Whitehead, K. A., Langer, R. & Anderson, D. G. Knocking down barriers: Advances in siRNA delivery. *Nature Reviews Drug Discovery* 8, 129–138 (2009).
4. Trzciński, J. W., Morillas-Becerril, L., Scarpa, S., Tannorella, M., Muraca, F., Rastrelli, F., Castellani, C., Fedrigo, M., Angelini, A., Tavano, R., Papini, E. & Mancin, F. Poly(lipoic acid)- Based Nanoparticles as Self-Organized, Biocompatible, and Corona-Free Nanovectors. *Biomacromolecules* 22, 467–480 (2021).
5. Gu, F., Hu, C., Tai, Z., Yao, C., Tian, J., Zhang, L., Xia, Q., Gong, C., Gao, Y. & Gao, S. Tumour microenvironment-responsive lipoic acid nanoparticles for targeted delivery of docetaxel to lung cancer. *Scientific Reports* 6, 1–15 (2016).
6. Matsumoto, S., Christie, R. J., Nishiyama, N., Miyata, K., Ishii, A., Oba, M., Koyama, H., Yamasaki, Y. & Kataoka, K. Environment-responsive block copolymer micelles with a disulfide cross-linked core for enhanced siRNA delivery. *Biomacromolecules* 10, (2009).
7. Kim, H. J., Kim, A., Miyata, K. & Kataoka, K. Recent progress in development of siRNA delivery vehicles for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* 104, 61– 77 (2016).
8. Lester Packer, Eric H. Witt, Hans Jürgen Tritschler. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radical Biology and Medicine*, Volume 19, Issue 2, 227-250, (1995).
9. Carmine, A., Domoto, Y., Sakai, N. & Matile, S. Comparison of Lipoic and Asparagusic Acid for Surface-Initiated Disulfide-Exchange Polymerization. *Chemistry - A European Journal* 19, 11558–11563 (2013).
10. Neises, B. & Steglich, W. Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids. *Angewandte Chemie International Edition in English* 17, 522–524 (1978).
11. Liu, Y., Jia, Y., Wu, Q. & Moore, J. S. Architecture-Controlled Ring-Opening Polymerization for Dynamic Covalent Poly(disulfide)s. *Journal of the American Chemical Society* 141, 17075– 17080 (2019).

- 12.** Thomas, R. C. & Reed, L. J. Disulfide Polymers of DL- α -Lipoic Acid. *Journal of the American Chemical Society* 78, 6148–6149 (1956).
- 13.** Brown, P. R. & Edwards, J. O. Effect of Solvent on the Photolysis of α -Lipoic Acid. *The Journal of Organic Chemistry* 34, 3131-3135 (1969).