

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE FARMACOLOGICHE,
BIOLOGICHE E CHIMICHE APPLICATE**

**DOTTORATO DI RICERCA IN
FARMACOLOGIA E TOSSICOLOGIA SPERIMENTALI
XXI CICLO**

**STUDIO CHIMICO-FISICO E BIOLOGICO DI NUOVE
MOLECOLE BIOATTIVE IN SOLUZIONE**

Coordinatore: Chiar.ma Prof.ssa ELISABETTA BAROCELLI

Tutor: Chiar.ma Prof.ssa EMILIA FISICARO

**Dottorando:
Dott. MARIANO BIEMMI**

TRIENNIO ACCADEMICO 2005-2008

SOMMARIO

PROGETTO DI RICERCA	2
INTRODUZIONE	7
<i>LA TERAPIA GENICA</i>	8
<i>METODI DI TRASFEZIONE</i>	11
Metodi non-vettoriali	16
Metodi vettoriali	26
<i>I LIPIDI CATIONICI ED I LORO AGGREGATI: LIPOSOMI E LIPOPLESSI</i>	26
Aspetti chimico-fisici	26
L'interazione con la cellula e la trasfezione	38
Relazioni struttura-attività	45
Aspetti farmacocinetici	65
Tossicità	70
Applicazioni terapeutiche	74
<i>GEMINI: UNA NUOVA CLASSE DI TENSIOATTIVI PER GENE DELIVERY</i>	82
MATERIALI	86
METODI	91
ELABORAZIONE DEI DATI	99
RISULTATI	106
DISCUSSIONE	198
<i>DEDAB</i>	199
<i>TENSIOATTIVI GLUCOCATIONICI ACETILATI</i>	205
<i>TENSIOATTIVI GLUCOCATIONICI DISACETILATI</i>	212
<i>TENSIOATTIVI GLUCOCATIONICI ACETILATI E DISACETILATI</i>	219
<i>TENSIOATTIVI GEMINI DIPIRIDINICI</i>	223
<i>PROCESSI DI IDRATAZIONE IDROFOBICA</i>	241
<i>INIBITORI DI HIV-1 INTEGRASI</i>	259
CONCLUSIONI	269
BIBLIOGRAFIA	275
<i>PUBBLICAZIONI</i>	292
<i>COMUNICAZIONI A CONGRESSI</i>	293
<i>PARTECIPAZIONI A SCUOLE E CONGRESSI</i>	294

PROGETTO DI RICERCA

La ricerca su molecole bioattive in soluzione, condotta durante il Dottorato, si è sviluppata lungo tre direzioni principali.

TENSIOATTIVI CATIONICI PER GENE DELIVERY

La parte più ampia delle ricerche ha riguardato la caratterizzazione chimico-fisica e biologica di nuovi tensioattivi cationici di potenziale impiego come vettori non-virali in terapia genica.

La terapia genica è una modalità terapeutica che prevede un intervento diretto sull'origine della malattia genetica attraverso il delivery nella cellula e la conseguente espressione di DNA esogeno che codifica per il prodotto del gene mancante o difettoso. La terapia genica viene indicata come una promettente alternativa alle terapie convenzionali per patologie come cancro, fibrosi cistica, disordini neurologici e cardiovascolari.

Il delivery cellulare di DNA è principalmente effettuato con l'uso di veicoli. Questi sono classificabili in due categorie: i vettori virali e non-virali.

I vettori virali sono stati utilizzati per primi ma, accanto ad un'alta efficienza di trasfezione, presentano risvolti tossici legati alla notevole risposta immune e al rischio di mutagenesi e carcinogenesi. Per questo motivo l'uso di vettori non-virali, nato una ventina d'anni fa, ma sviluppatosi intensamente solo negli ultimi dieci anni, è diventato un approccio fondamentale in terapia genica. Esso prevede l'utilizzo di polimeri cationici o, come nell'oggetto della nostra ricerca, di lipidi cationici. Entrambe queste classi di agenti compattanti servono a condensare il DNA carico negativamente in un complesso (poliplesso o lipoplesso) con carica netta positiva, necessaria per consentire al materiale genico l'ingresso attraverso le membrane cellulari, dotate di carica negativa.

Per realizzare lipidi cationici sempre più efficienti, specifici e sicuri, è necessario contribuire a chiarire il più possibile le relazioni tra la struttura e le caratteristiche chimico-fisiche di queste molecole, oltre a tentare di proporre un modello (basato su saggi di trasfezione transiente e su osservazioni dei lipoplessi con microscopia a forza atomica) del processo trasfettivo che correli la conformazione che questi tensioattivi assumono in soluzione con la loro efficienza di trasfezione. Entrambi questi obiettivi hanno ispirato le ricerche condotte.

Il progetto, che si avvale per la parte sintetica della collaborazione con il Dipartimento di Chimica Generale ed Organica Applicata dell'Università di Torino, ha riguardato lo studio di due classi principali di tensioattivi:

1) tensioattivi glucocationici monomerici di nuova sintesi, recanti uno zucchero legato covalentemente alla testa polare costituita da un gruppo ammonio quaternario, nella prospettiva di ottenere tensioattivi adatti al targeting cellulare, in grado di essere riconosciuti dalle cellule dotate di recettori per lo zucchero.

2) tensioattivi gemini (composti da due unità monomeriche) con teste polari di tipo piridinio e catene lipofile sature a 12 o 16 atomi di carbonio, anch'essi di nuova sintesi.

Dei tensioattivi glucocationici è stata variata la lunghezza della catena alchilica ed è stata presa in considerazione la presenza o meno di un gruppo acetilico sugli ossidrilili. I tensioattivi gemini sono stati modulati per lunghezza della catena alchilica, per lunghezza dello spaziatore e per tipo di controione. Queste modifiche sono state fatte per poter valutare l'effetto di ciascuno dei parametri sulle proprietà chimico-fisiche e strutturali e sulla capacità trasfettiva.

Lo studio si è articolato prendendo in considerazione i seguenti aspetti:

a) Studio della termodinamica dei sistemi binari tensioattivo-acqua e del processo di micellizzazione delle classi di tensioattivi sopra elencati. Sono state determinate le entalpie, le energie libere, i volumi e le compressibilità adiabatiche tutti in funzione della concentrazione e, applicando opportuni modelli chimico fisici (e. g. modello di transizione di pseudo-fase), la variazione di queste grandezze nel corso del processo di formazione delle micelle. Inoltre, sono state determinate le curve di tensione superficiale per ottenere, attraverso l'isoterma di adsorbimento di Gibbs, informazioni specifiche sull'area superficiale occupata per molecola e sul grado di associazione dei controioni.

b) Studio dell'interazione DNA-tensioattivo attraverso metodologie di elettroforesi (Electrophoresis Mobility Shift Assay, EMSA).

c) Studio strutturale dell'interazione DNA-tensioattivo mediante l'impiego di microscopia a forza atomica (AFM) per la visualizzazione dei lipoplessi.

d) Valutazione dell'efficacia trasfettiva attraverso saggi di trasfezione transiente misurando l'espressione di EGFP (Green Fluorescent Protein) tramite microscopio a fluorescenza.

e) Studio dell'interazione dei composti in esame con membrane modello, mimetiche delle membrane cellulari, principalmente tramite calorimetria differenziale a scansione (DSC).

Attraverso le determinazioni termodinamiche descritte al punto a) è stato studiato anche il comportamento in soluzione del dodeciletildimetilammonio bromuro (DEDAB).

Lo studio di questo tensioattivo è stato utile come termine di confronto per valutare il contributo del gruppo β -D-glucopiranosil etilico (acetilato e disacetilato) dei tensioattivi glucocationici sulle grandezze termodinamiche e volumetriche. È servito anche per estendere ai tensioattivi gemini, ed in particolare al loro spaziatore, le considerazioni sull'effetto del gruppo $-\text{CH}_2-$ aggiunto alla testa polare anziché alla coda alchilica del tensioattivo (ciò che avviene nel passaggio da DTAB a DEDAB).

PROCESSI DI IDRATAZIONE IDROFOBICA

Parlando di tensioattivi non si può prescindere dallo studio dell'idratazione idrofobica, chiamata in causa riguardo alla micellizzazione di queste sostanze. La seconda parte delle ricerche è stata quindi rivolta all'approfondimento dello studio dei processi di idratazione idrofobica mediante il modello termodinamico-statistico messo a punto dal gruppo di ricerca dove ho svolto il Dottorato.

Utilizzando dati presenti in letteratura e dati provenienti da misure di conducibilità (da noi condotte sulla formazione di micelle in acqua da parte di DeTAB, DTAB, TTAB, CTAB) sono stati analizzati diversi processi idrofobici (e. g. la dissoluzione in acqua di gas non polari, la denaturazione di proteine, la formazione di micelle in acqua, ecc.), raggruppabili in due classi (classe A e B) a seconda che il processo portasse alla creazione di una cavità per ospitare il soluto e rilasciasse molecole d'acqua (numero di molecole d'acqua $n_w > 0$) oppure, nel caso opposto, che si riempisse la cavità e si condensassero molecole d'acqua ($n_w < 0$). Il parametro n_w , che si è dimostrato avere significato fisico in quanto correlato con le dimensioni delle molecole, potrebbe costituire un utile indicatore chimico-fisico da inserire nelle relazioni struttura-attività.

INIBITORI DI HIV-1 INTEGRASI

La terza parte delle ricerche ha riguardato lo studio di molecole di uso terapeutico per la cura dell'AIDS.

Negli ultimi anni il trattamento di questa patologia ha visto nell'enzima HIV-1 integrasi — l'enzima responsabile dell'integrazione del genoma virale all'interno dei cromosomi umani — un target promettente, anche a causa di una potenziale selettività verso il virus, suggerita dall'assenza di una controparte umana di questo enzima.

Come conseguenza della scoperta di questo nuovo target si è avuto lo sviluppo di una classe di inibitori dell'integrasi, i β -dicheto acidi.

Poiché a livello fisiologico l'inibizione dell'HIV-1 integrasi avviene attraverso la coordinazione del β -dicheto acido con uno ione metallico divalente (verosimilmente Mg^{2+}), è stata studiata, attraverso titolazioni potenziometriche, la distribuzione in soluzione dei complessi formati tra due β -dicheto acidi (sintetizzati presso l'Università di Sassari) e gli ioni Ca^{2+} e Mn^{2+} (lo ione Mg^{2+} era già stato considerato in uno studio precedente) al fine di caratterizzare meglio l'abilità di complessazione di queste molecole.

INTRODUZIONE

LA TERAPIA GENICA

La terapia genica è ritenuta da molti ricercatori la terapia del futuro poiché si pone come obiettivo l'intervento sulla causa della malattia genetica piuttosto che sui sintomi. Per raggiungere questo scopo la terapia genica sfrutta il delivery nel nucleo cellulare di una copia normale e funzionante del gene mutato e dei suoi elementi regolatori accessori [1-3]. Tuttavia, l'inserimento efficiente e l'espressione a livello fisiologico dei geni nelle cellule dell'organismo (la cosiddetta trasfezione) sono risultati abbastanza difficili da ottenere.

Sia i geni, formati da DNA, che le superfici cellulari sono carichi negativamente: di conseguenza, l'ingresso spontaneo del DNA nelle cellule non è un processo efficiente. L'iniezione di DNA nudo nei tessuti è infatti un metodo trasfettivo che ha scarsa efficienza. Altri metodi di trasfezione di tipo fisico consentono sì l'ingresso del DNA nudo nella cellula, ma facendo variare la permeabilità della membrana plasmatica. Anche questi metodi, descritti a p. 13-15, presentano però notevoli limitazioni pratiche.

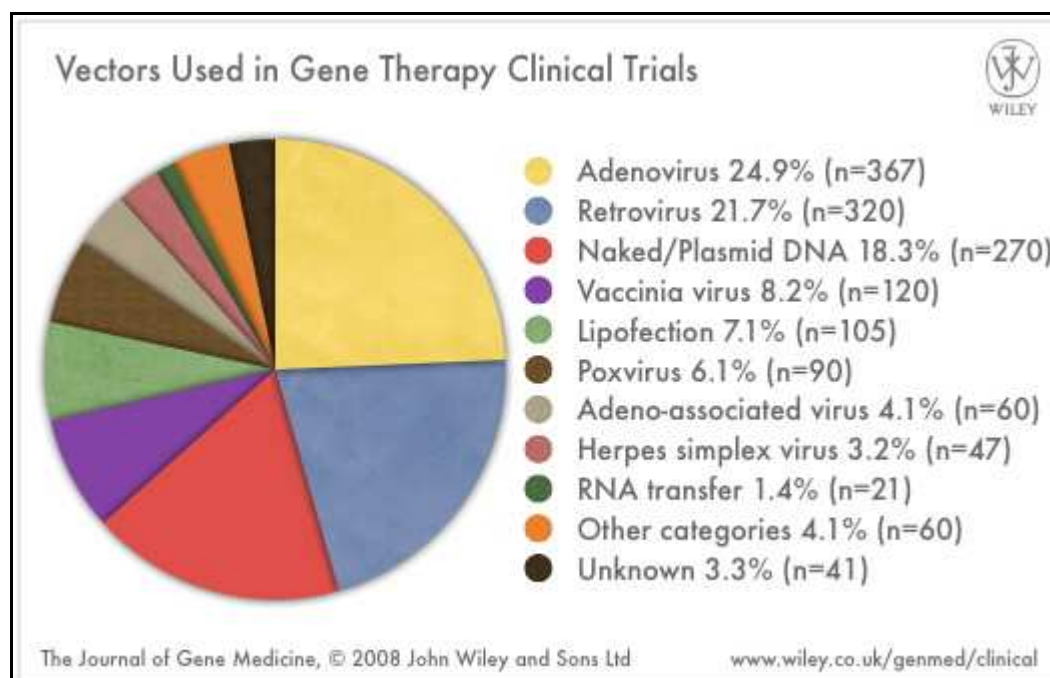


Fig. 1. Vettori per la terapia genica usati nei clinical trials nel 2008 [4].

Si è reso pertanto necessario lo sviluppo di metodi di gene delivery che abbiano una possibile applicazione clinica e che nel contempo siano il più efficienti e sicuri

possibile: sono nati i vettori di trasfezione, che hanno suscitato un interesse crescente negli ultimi dieci anni (Fig. 1).

Attualmente, i vettori di trasfezione possono essere classificati in due grandi classi: virali e non-virali.

I virus sono i veicoli infettanti per eccellenza e nel corso dell'evoluzione hanno sviluppato meccanismi per inserire il loro materiale genetico nelle cellule dell'ospite. I virus sono stati quindi utilizzati come vettori in terapia genica rimpiazzando i geni essenziali alla fase replicativa virale con i geni di interesse terapeutico. La maggior parte dei clinical trials che impiegano virus sono basati solo su sei tipi di virus: a p. 16-18 saranno descritti i principali. Benché i vettori virali siano efficienti nel trasfettare le nostre cellule, essi sono potenzialmente in grado di: generare, attraverso ricombinazione genica con il genoma dell'ospite, virus in grado di replicarsi; indurre risposte avverse infiammatorie e immunogeniche; produrre mutagenesi inserzionale attraverso un'integrazione casuale nel genoma dell'ospite. Ad esempio, il primo caso mortale in terapia genica con vettori virali è stato attribuito ad una reazione infiammatoria causata da un vettore adenovirale [5]. È anche stato dimostrato che l'integrazione cromosomiale ectopica del DNA oltre ad inattivare l'espressione di un gene oncosoppressore, attiva un oncogene [6, 7], portando alla trasformazione maligna delle cellule [8]. Recentemente è stato riportato che l'inserzione di un vettore retrovirale vicino al promotore del proto-oncogene LMO2 in due pazienti umani affetti da SCID-XI è in grado di innescare la proliferazione sregolata di cellule pre-maligne con una frequenza inattesa [9]. Tutti questi problemi relativi alla sicurezza dei vettori virali richiedono una riflessione sulla loro applicabilità clinica [10].

Al contrario, i vettori non-virali, principalmente rappresentati da polimeri cationici (descritti a p. 19-23) e lipidi cationici (di cui si parlerà più diffusamente in tutto il resto della tesi), possiedono molti più vantaggi sotto l'aspetto della sicurezza. In particolare, i liposomi cationici, aggregati ordinati di lipidi cationici, sono significativamente molto meno immunogenici dei vettori virali.

La produzione di vettori virali su larga scala è tecnicamente impegnativa, con costi di preparazione molto alti, mentre la produzione di lipidi cationici, usati per preparare i liposomi, è più facilmente realizzabile. A differenza dei virus, i liposomi cationici non hanno restrizioni relativamente alle dimensioni del DNA che possono ospitare: possono alloggiare materiale genetico di dimensioni illimitate, addirittura cromosomi artificiali. Si può esercitare un elevato grado di controllo sulla struttura lipidica a livello

molecolare e i prodotti possono essere altamente purificati. L'uso dei lipidi cationici non richiede capacità particolari nelle tecniche di produzione e manipolazione. I liposomi cationici si possono coniugare con ligandi recettore-specifici per ottenere un gene delivery mirato a cellule o tessuti precisi. Questa grande quantità di caratteristiche favorevoli sta contribuendo al ruolo di sempre maggior spicco dei vettori non-virali in terapia genica, anche se la vera svolta nell'uso dei vettori non-virali sarebbe un aumento significativo dell'efficienza di trasfezione, purtroppo ancora troppo bassa rispetto a quella dei vettori virali. Il basso livello trasfettivo è di solito attribuito alla scarsa efficienza nel superamento delle barriere sistemiche (discusse nella sezione "Aspetti farmacocinetici" a p. 65-69) e cellulari (si veda la sezione "L'interazione con la cellula e la trasfezione" a p. 38-44). Una volta che è riuscito a raggiungere la cellula target, il vettore deve superare parecchi ostacoli prima di raggiungere il nucleo. Il primo è l'ingresso nella membrana plasmatica, superata la quale il vettore viene intrappolato in un endosoma, da cui deve fuggire prima che l'endosoma si fonda con il lisosoma, ricco di enzimi digestivi. Nel citoplasma, il vettore deve liberare il DNA, che può infine raggiungere l'ultima barriera, la membrana nucleare. Con l'arrivo del DNA nel nucleo può avere luogo l'espressione genica.

In questa Introduzione verranno passati in rassegna i vari metodi di trasfezione, sia vettoriali che non-vettoriali. Saranno poi discussi in modo approfondito i lipidi cationici ed i loro aggregati: verranno descritti gli aspetti chimico-fisici relativi alla loro formazione, il trafficking intracellulare, le relazioni struttura-attività, la biodistribuzione e la biodisponibilità, la tossicità e le applicazioni terapeutiche.

METODI DI TRASFEZIONE

La prima grande suddivisione dei principali metodi di trasfezione è quella tra i metodi che non utilizzano un vettore e i metodi che invece lo usano.

All'interno dei metodi non-vettoriali si distinguono la semplice iniezione di DNA nudo e l'uso di trattamenti fisici (gene gun, elettroporazione, ultrasuoni, gene delivery idrodinamico).

I vettori si suddividono in virali (verranno descritti retrovirus, adenovirus, virus adeno-associati e il virus dell'herpes simplex) e non virali, questi ultimi rappresentati principalmente da polimeri cationici e lipidi cationici.

È opportuno ricordare che il metodo di trasfezione perfetto per ora non esiste: tutte le tecniche presentano indicazioni e svantaggi, caratteristiche che rendono ciascuna di esse più adatta a certi scopi e meno ad altri.

METODI NON-VETTORIALI

INIEZIONE DI DNA NUDO

La semplice iniezione di DNA plasmidico direttamente in un tessuto senza ulteriori aiuti né di agenti chimici, né di forze fisiche, è in grado di trasfettare le cellule. L'iniezione locale di DNA plasmidico in muscolo [11], fegato [12-14], pelle [15], o l'instillazione nei polmoni [16], porta a bassi livelli di espressione genica. I recettori specifici o non-specifici sulla superficie cellulare che legano e internalizzano il DNA sono stati chiamati in causa nel meccanismo d'azione, ma i dettagli sono ancora carenti. Come nell'uso dei carrier (si veda a p. 38-44), anche in questo caso il DNA subisce l'internalizzazione nelle cellule attraverso endocitosi [17].

A livello pratico, sono due le aree che verosimilmente beneficeranno del trasferimento genico attraverso DNA nudo, a patto che ulteriori miglioramenti siano fatti nell'efficienza di delivery e nella durata dell'espressione transgenica: il gene delivery nelle vie aeree e l'iniezione intramuscolare di DNA nudo, per il trattamento di malattie acute, e l'immunizzazione a base di DNA. Un'applicazione sistemica del DNA nudo per la terapia genica non è concepibile in quanto il DNA, essendo di grandi dimensioni e molto idrofilo, è efficientemente tenuto fuori dalle cellule dell'intero

organismo da diverse barriere fisiche. Queste includono l'endotelio vascolare, le matrici interstiziali, lo strato di muco e le tight junctions specializzate delle cellule epiteliali, e la membrana plasmatica di tutte le cellule. Inoltre, la degradazione del DNA da parte delle nucleasi intra- ed extracellulari riduce ulteriormente la possibilità che il DNA che entra nel nucleo sia intatto e funzionale.

La strategia attuale per migliorare il trasferimento genico con DNA nudo è di coniugare il DNA nudo con ligandi per specifici recettori presenti sulla superficie cellulare [18]. Il ligando può essere attaccato covalentemente o al DNA [19-22] o ad una DNA-binding protein [23-27]. L'efficacia di questa tecnica dipende, tra l'altro, dalla stabilità del complesso DNA-ligando, dalla distribuzione dei recettori sulla superficie cellulare, dal loro numero e dall'affinità di legame tra il recettore e il complesso DNA-ligando. Il fegato è stato il target principale del gene delivery mediato da recettore, sfruttando i recettori degli epatociti per l'asialoglicoproteina [28-30] e il galattosio [31]. Altri esempi riguardano macrofagi alveolari e cellule epiteliali dell'apparato respiratorio attraverso i recettori per il mannosio [32] ed il lattosio [33], cellule di carcinoma squamoso attraverso il recettore per il fattore di crescita dell'epidermide (EGF) [34, 35] e cellule di neuroblastoma attraverso i recettori tirosin-chinasici [36]. Anche la coniugazione con transferrina ha dimostrato di aumentare la trasfezione in vitro [37].

Un'altra strategia consiste nell'includere nella soluzione di DNA sostanze in grado di aumentare l'efficienza di internalizzazione del DNA da parte delle cellule target. L'aggiunta di solventi non miscibili con acqua [38, 39], polimeri non-ionici [40], tensioattivi [41], o l'uso di soluzioni ipotoniche [42] ha elevato il trasferimento genico attraverso le membrane cellulari. Inoltre, molti inibitori delle nucleasi hanno aumentato il trasferimento genico di DNA nudo in colture cellulari [43], muscolo [44] e polmoni [45].

METODI FISICI

I trattamenti fisici sono stati esplorati per il trasferimento genico sia in vitro che in vivo. Gli approcci fisici inducono nella membrana cellulare danni o difetti transienti, cosicché il DNA possa entrare nelle cellule per diffusione.

Gene gun

Il bombardamento di particelle con una gene gun è un metodo ideale per il trasferimento genico ad un'area confinata di pelle, mucosa o tessuti chirurgicamente esposti [46]. Il DNA è depositato sulla superficie di particelle d'oro o di tungsteno, che vengono poi accelerate per mezzo di un gas pressurizzato (in genere elio) ed espulse sulle cellule o su un tessuto. Le particelle hanno un diametro di 1-5 μm e sono sufficientemente piccole per attraversare la membrana cellulare senza creare un danno misurabile e possono portare da 0.5 a 5 μg di DNA per mg d'oro. L'impulso consente alle particelle d'oro di penetrare pochi millimetri in profondità nel tessuto e di rilasciare il DNA nelle cellule lungo il loro cammino.

Il gene gun è stato applicato soprattutto nel trattamento del cancro [47, 48], inserendo geni codificanti per citochine vicino al sito del tumore per aumentare la risposta immune dell'organismo [49-55].

Alcuni miglioramenti potrebbero includere modifiche chimiche della superficie delle particelle d'oro per consentire una più alta capacità ed una migliore consistenza per la copertura con DNA e un controllo migliore della forza di espulsione per gestire con più precisione la deposizione del DNA nelle cellule di vari tessuti [56].

Elettroporazione

L'elettroporazione è un metodo versatile che è stato ampiamente studiato in molti tipi di tessuti in vivo [57, 58], soprattutto pelle e muscoli, benché questo sistema possa funzionare in qualsiasi tessuto in cui si possa inserire una coppia di elettrodi. Consiste nell'applicazione di un campo elettrico per indurre una riorganizzazione strutturale transiente di una parte localizzata della membrana cellulare [59] che consente l'introduzione del DNA [60-62].

Hasson ha dimostrato che l'elettroporazione aumenta sensibilmente l'espressione transgenica nel polmone isolato in un sistema ex vivo [63] e Dean ha mostrato che questo approccio funziona anche in animali in cui sono stati posti due elettrodi nel torace [64]. Il livello dell'espressione del gene reporter è stato di due o tre ordini di

grandezza più alto di quello del DNA da solo. Un DNA di 100 kb è stato efficacemente inserito in cellule muscolari [65] ed è stata osservata un'espressione genica a lungo termine dopo un anno da una singola elettroporazione [66].

L'elettroporazione è stata sperimentata con successo in animali da esperimento per il trattamento di tumori (glioma, colon, mammella) [67, 68-70].

Questa tecnica ha mostrato una minore variabilità tra specie diverse rispetto all'iniezione diretta del DNA. Parametri importanti sembrano anche essere la quantità di DNA usato e la sua distribuzione nel tessuto prima dell'elettroporazione.

Il trattamento del muscolo con ialuronidasi prima dell'iniezione di DNA per disgregare la matrice cellulare ha aumentato la trasfezione, probabilmente favorendo la distribuzione di DNA al tessuto [71, 72].

La somministrazione di DNA plasmidico attraverso la vena porta, seguita da elettroporazione, ha dato una trasfezione degli epatociti del lobo trattato, ma non dei lobi circostanti [73]. Questo risultato aumenta la possibilità di trasfezione fornendo il DNA con il sistema circolatorio ed applicando poi l'elettroporazione ad un'area ristretta per ottenere un trasferimento genico localizzato.

Questa tecnica presenta molti limiti per la sua applicazione in vivo. Primo, ha un range efficace di circa 1 cm tra gli elettrodi, cosa che rende difficile trasfettare cellule in zone estese di tessuto. Secondo, è richiesta una procedura chirurgica per inserire gli elettrodi in profondità negli organi interni. Terzo, gli alti voltaggi applicati possono causare un danno tissutale irreversibile in seguito a riscaldamento [74], oltre ad influenzare la stabilità del DNA. Quarto, l'influsso di Ca^{2+} dovuto alla distruzione della membrana cellulare potrebbe indurre un'attivazione delle proteasi mediata da Ca^{2+} , con conseguente danno tissutale [75]. È quindi indubbiamente necessaria un'ottimizzazione di questa tecnica.

Ultrasuoni

A differenza dell'elettroporazione, che sposta il DNA lungo un campo elettrico, gli ultrasuoni creano pori nella membrana e facilitano il trasferimento genico intracellulare con la diffusione passiva di DNA attraverso questi pori [76, 77]. Si sono ottenute espressioni di geni reporter superiori di 10-20 volte rispetto a quelle del DNA nudo. L'efficienza di questo sistema è determinata dalla frequenza degli ultrasuoni, dalla forza di output, dalla durata del trattamento, dalla quantità e dalle dimensioni del DNA plasmidico [78]. Sforzi per ridurre le dimensioni del DNA hanno portato ad un aumento

di trasfezione. Poiché gli ultrasuoni possono penetrare in tessuti molli ed essere applicati ad un'area specifica, sono indicati per la trasfezione negli organi interni. A tutt'oggi, il limite principale di questa tecnica è la bassa efficienza di delivery.

Gene delivery idrodinamico

Il gene delivery idrodinamico è un metodo semplice per introdurre DNA plasmidico nudo nelle cellule di organi altamente perfusi, soprattutto il fegato. La sua efficienza di trasfezione è molto alta [79, 80] ed è determinata dalla struttura anatomica dell'organo, dal volume e dalla velocità di iniezione. In un modello murino, è stato iniettato un volume di soluzione di DNA pari all'8-9% del peso dell'animale. L'iniezione è stata fatta nella vena cava, per una durata di 5 secondi. Una tale iniezione causa un overflow transiente della soluzione verso la vena cava inferiore che eccede l'output cardiaco. Ne consegue che l'iniezione induce un flusso retrogrado della soluzione di DNA nel fegato, un rapido innalzamento della pressione intraepatica, un'espansione del fegato e una disgregazione reversibile delle *fenestrae* epatiche. Difetti transienti nella membrana degli epatociti osservati con microscopia elettronica subito dopo il trattamento idrodinamico potrebbero spiegare il meccanismo di ingresso del DNA negli epatociti [81].

Questo metodo è stato usato nel topo e nel ratto per esprimere proteine di valore terapeutico come fattori emofilici [82, 83], antitripsine [84-86], citochine [87], fattori di crescita epatici [88] ed eritropoietina [89].

La vera sfida di questa tecnica è riuscire ad applicarla all'uomo: usare un volume pari all'8-9% del peso dell'uomo porterebbe all'iniezione di 7.5 l di soluzione ad alta velocità, un volume di molte volte superiore a quello che una persona può tollerare.

METODI VETTORIALI

VETTORI VIRALI PRINCIPALI

Retrovirus

I retrovirus sono virus a RNA che infettano animali e uomo [90]. Il genoma dei retrovirus comprende un singolo filamento di RNA, compreso tra 7 e 10 kb, contenente i geni *gag*, *pol* e *env* che codificano per le proteine coinvolte nella replicazione e nel packaging del virione. L'ingresso nelle cellule è ottenuto attraverso l'attacco dell'envelope virale a proteine specifiche nella membrana della cellula ospite [90-92], seguito dalla fusione con la membrana e dall'ingresso nel citoplasma. Una volta all'interno della cellula ospite, l'envelope virale viene perso, esponendo il core nucleocapsidico che contiene il genoma virale. La trascrittasi inversa, codificata da *pol*, converte il genoma virale in DNA a doppio filamento. La divisione cellulare, che coinvolge la rottura della membrana nucleare, è essenziale per permettere al nucleocapside di accedere al nucleo e, aiutato dall'integrasi e dai siti nei long terminal repeats (LTR) del genoma virale, il DNA virale si integra in un sito casuale del genoma dell'ospite. Poiché il sito di integrazione non è definito, può avvenire una mutagenesi inserzionale [93].

La maggior parte dei vettori retrovirali sono basati sul genoma del virus della leucemia del topo Moloney (MMLV). MMLV inserisce oncogeni o promotori oncogenici nel genoma dell'ospite ma, se si rimuovono i geni che codificano per le proteine coinvolte nella proliferazione virale, il potenziale oncogeno è ridotto e il virus è reso incapace di replicarsi, in grado solo di un'infezione iniziale nella cellula ospite e di integrarsi nel suo genoma. Per questo motivo, le cellule infettate devono fornire le proteine strutturali per il packaging virale [94]. L'inserzione del vettore nel genoma è stabile e può quindi essere trasmessa alle cellule figlie attraverso la mitosi, facilitando l'espansione clonale del gene terapeutico che può portare all'espressione a lungo termine del prodotto genico [95].

Un limite dei vettori retrovirali è la necessità della mitosi per l'integrazione nel genoma dell'ospite, il che implica che solo le cellule in divisione possono essere trasfettate. Solo un sottogruppo dei retrovirus – i lentivirus – possono infettare le cellule che non sono in divisione. Il virus HIV appartiene al gruppo dei lentivirus e, poiché

possiede un tropismo naturale per le cellule ematopoietiche, si potrebbe applicare per malattie come l'AIDS, patologie delle cellule T e cancro [96].

Adenovirus

L'adenovirus è un virus a doppio filamento lineare che infetta molti tessuti [97, 98] e può causare infezioni nei tratti gastroenterico e respiratorio superiore [99]. A differenza dei retrovirus, gli adenovirus infettano sia cellule in divisione che non. Per la propagazione non hanno bisogno di integrarsi nel genoma dell'ospite. Nel loro genoma di 35 kb sono presenti i geni E1, E2, E3, E4 che dirigono l'espressione genica virale, la replicazione e la propagazione. La loro rimozione genera un virus incapace di replicarsi, in cui si possono inserire 35 kb di DNA [100-102]. Anche in questo caso le cellule infettate devono fornire le proteine strutturali per il packaging virale [103, 104].

Un grande svantaggio dei vettori adenovirali, soprattutto nelle applicazioni in vivo, è un'intensa risposta immune indirizzata contro le proteine adenovirali strutturali. Questa risposta è sia umorale che cellulo-mediata e le cellule infette sono rapidamente eliminate, abolendo così l'effetto terapeutico del vettore entro le due settimane successive all'infezione [105].

Generalmente il genoma dei vettori adenovirali è mantenuto a livello episomiale (extracromosomiale) ed è più adatto ad un'espressione genica transiente piuttosto che a lungo termine [106, 107].

La maggior parte dei protocolli per l'uso clinico dei vettori adenovirali riguarda il trattamento della fibrosi cistica, ma si stanno anche sperimentando per il cancro [108-110] e per il morbo di Parkinson [111].

Virus adeno-associati

Il virus adeno-associato (AAV) è un virus a DNA che infetta le cellule eucariotiche anche non in divisione [112] e che richiede la presenza di un virus helper come l'adenovirus [113, 114] o il virus dell'herpes simplex [115] per diventare infettivo. Senza il virus helper, l'AAV si integra nel genoma dell'ospite e rimane dormiente come provirus. L'integrazione è sito-specifica, proprietà unica dell'AAV, e non è associata a nessuna patologia.

Il genoma dell'AAV è una molecola di DNA a singolo filamento di circa 4.7 kb contenente i geni *rep* e *cap* che codificano rispettivamente per 4 proteine non-strutturali e 3 del capsido [116], fiancheggiati da inverted terminal repeats (ITR) [117]. Le

proteine codificate da *rep* sono responsabili del legame al DNA [118, 119] e dell'integrazione sito- e filamento-specifica [119-121]. Rimuovendo i geni *rep* e *cap*, ma lasciando intatti gli ITR per l'integrazione e la replicazione virali [122], si ottiene un vettore ricombinante in grado di alloggiare 4.5 kb [123]. In assenza dei prodotti del gene *rep*, l'integrazione nel genoma dell'ospite diventa casuale [124], aumentando la probabilità di mutagenesi e di mantenimento episomiale del DNA virale in certi tipi di cellule [125].

Gli AAV sono stati usati per infettare muscolo, cervello, fegato, polmone e cellule ematopoietiche [126-131]. Possono anche effettuare sostituzione genica, terapia in cui i geni sono indirizzati in sequenze omologhe del cromosoma dell'ospite per correggere una mutazione [132-134]: in questo caso le cellule trasdotte sono circa l'1%.

Virus dell'herpes simplex

Il virus dell'herpes simplex (HSV) è un virus a DNA a doppio filamento che, a causa della sua capacità di attaccarsi all'eparan solfato presente sulla superficie cellulare di molte cellule, è in grado di infettare vari tipi di cellule [135, 136]. Il suo naturale tropismo per il tessuto nervoso, nel quale può permanere in modo latente, lo fa essere un candidato per la terapia genica di malattie neurologiche [137, 138]. È stato anche usato per cellule di melanoma [139], muscolo [140] e fibroblasti sinoviali [141].

Il genoma dell'HSV è di 152 kb e alloggia 84 geni espressi sequenzialmente nei differenti momenti dell'infezione. I prodotti genici del primo stadio dell'infezione preparano la cellula per l'espressione delle proteine virali, la replicazione del DNA e la produzione del virione. La rimozione di questi geni rende il virus incapace di replicazione e quindi adatto a ricevere un DNA esogeno di 10-100 kb [139, 142, 143].

L'infezione da HSV può essere litica o latente. L'infezione litica è adatta per la terapia del cancro, in cui la tossicità cellulare dovuta all'espressione delle proteine di HSV e all'alterata sintesi proteica della cellula ospite [144] può avere vantaggiosi effetti antitumorali [145, 146]. Tuttavia, ad eccezione del trattamento del cancro, la citotossicità rimane l'ostacolo principale che limita l'uso in vivo di questi vettori, ed è stato dimostrato che essa ha come conseguenza il silenziamento dell'espressione genica entro due settimane dall'infezione [147]. Al contrario, l'infezione latente permette un'espressione genica che persiste nell'SNC per più di 18 mesi [137, 148].

VETTORI NON-VIRALI

Polimeri cationici

Come i lipidi cationici, anche i polimeri con gruppi protonati a pH fisiologico sono stati impiegati come vettori genici. Anche nel caso dei polimeri le attrazioni elettrostatiche tra la carica cationica del polimero e quella negativa del DNA portano alla formazione di un complesso. Questo complesso è chiamato poliplesso e rappresenta l'unità trasfettante.

Oltre al limite della bassa capacità transfettiva, i sistemi polimerici hanno dei problemi nel controllo delle distribuzioni del peso molecolare, nella dispersione dei poliplessi, ed in altri risvolti del controllo di qualità. Alcuni polimeri hanno insite potenti proprietà farmacologiche (come l'ipocolesterolemia indotta dai chitosani) che li rendono poco indicati per l'uso umano.

Polilisina

Il primo policatione usato per il gene delivery è stato la poli-L-lisina (PLL) (Fig. 2) coniugata con asialoorosomucoide per il gene targeting epatocellulare [149].

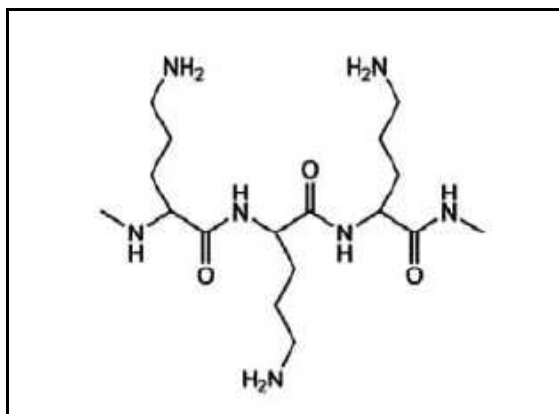


Fig. 2. Polilisina

La coniugazione con un ligando è necessaria in quanto, in caso contrario, per questo polimero la trasfezione sarebbe inefficace [150]. Sono stati sintetizzati copolimeri della polilisina che incorporano altri amminoacidi (e.g. istidina, triptofano) [151, 152], con migliori esiti di trasfezione. La PLL è biodegradabile, caratteristica che renderebbe questo polimero indicato per l'uso in vivo se non avesse un'alta tossicità, che può essere

in parte limitata con la coniugazione al polietilenglicole (PEG) (si veda p. 68). La PEG-PLL presenta una buona efficienza trasfettiva in vitro [153, 154].

Polietilenimina

La polietilenimina (PEI) (Fig. 3) è il polimero più studiato in terapia genica e si può ottenere sia in forma lineare che ramificata. Benché la PEI protegga il DNA dalla degradazione delle DNAsi [155], i suoi svantaggi principali sono la sua mancanza di biodegradabilità e l'alta tossicità [156-159], quest'ultima correlata al peso molecolare (la PEI di 25 kDa è la più tossica, quella di 10 kDa la meno tossica) [160]. Per ovviare a questo problema si sono usate PEI a più basso peso molecolare, tenute insieme con un cross-linking [160]. Anche la PEI è stata coniugata al PEG [161], il che ha portato ad una diminuzione di tossicità e di interazioni non-specifiche, con conseguente emivita più lunga [162-164] (si veda p. 68). Altre modificazioni chimiche, come la N-acilazione degli atomi di azoto [165], hanno migliorato l'efficienza di trasfezione, sebbene la PEI somministrata per via intravenosa riesca in generale a raggiungere le cellule solo se coniugata a ligandi che ne facilitino il target.

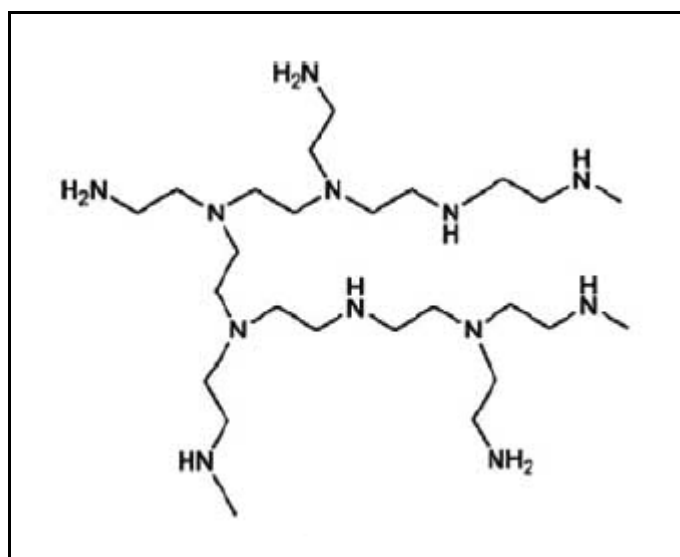


Fig. 3. Polietilenimina ramificata

Per la PEI ed in suoi derivati, ed in generale per i polimeri cationici, è stato proposto un meccanismo di “spugna protonica” per spiegare il trasferimento genico. La maggior parte dei gruppi amminici della PEI non sono completamente protonati al di sotto del

pH fisiologico. Tuttavia, essi si possono protonare quando il pH nell'endosoma scende sotto 6.0 (si veda p. 40-42), tamponando il pH endosomiale. L'ingresso dei protoni richiama nell'endosoma anche gli ioni cloruro, innalzando la pressione osmotica e causando il rigonfiamento e la successiva rottura di queste vescicole [166, 167].

Dendrimeri

I dendrimeri (Fig. 4) sono polimeri altamente ramificati molto solubili in soluzione acquosa. Nonostante abbiano una struttura molto ramificata, si ritiene che la formazione dei dendriplessi (complessi DNA/dendrimer) sia basata sulle sole interazioni di carica [168, 169]. I dendrimeri più efficienti e meglio tollerati dalle cellule sono quelli derivati dalla poliamidoamina [170, 171]. L'attacco covalente del peptide anfipatico GALA è risultato in un'aumento di trasfezione [172], così come la presenza di composti addizionali come DEAE e tensioattivi [173]. È stato recentemente postulato che il gene delivery da parte dei dendrimeri operi attraverso un meccanismo dipendente dal colesterolo [174].

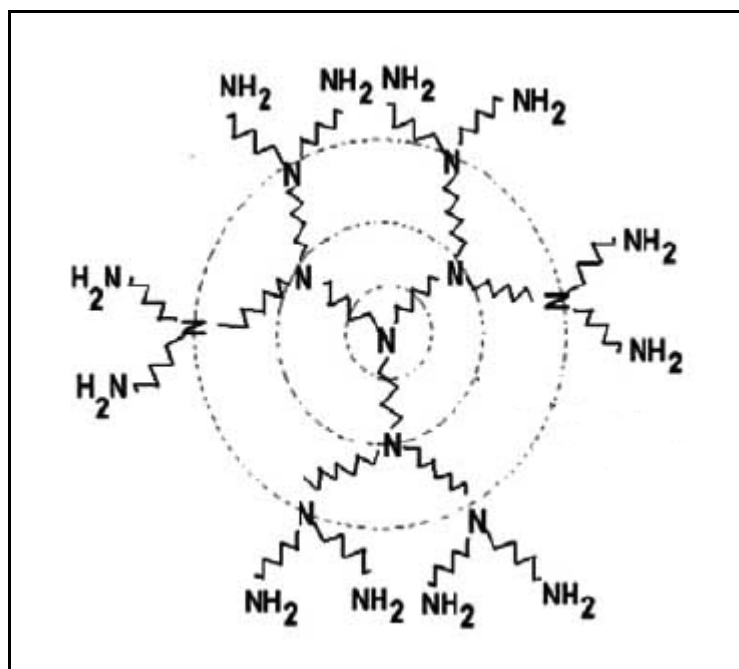


Fig. 4. Dendrimerico

Altri Polimeri

Il poli[2-(dimetilammino) etil metacrilato] (Fig.5) ed i suoi copolimeri, che condensano il DNA in piccole particelle in grado di trasfettare vari tipi cellulari, sono risultati più efficaci della PEI ramificata e della PLL [175].

Anche i biodegradabili poli(β -ammino esteri) (Fig. 6) con un gruppo imidazolico o due ammine vicine si sono comportati in modo simile [176].

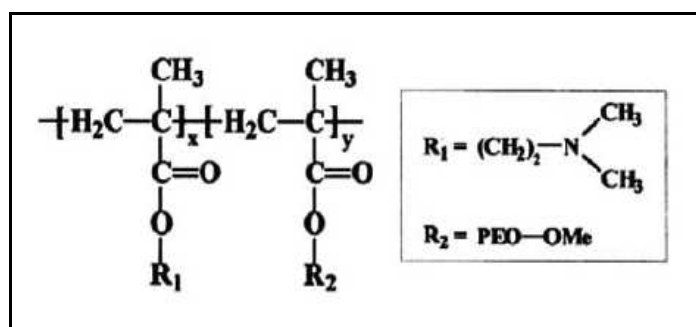


Fig. 5. Poli[2-(dimetilammino) etil metacrilato]

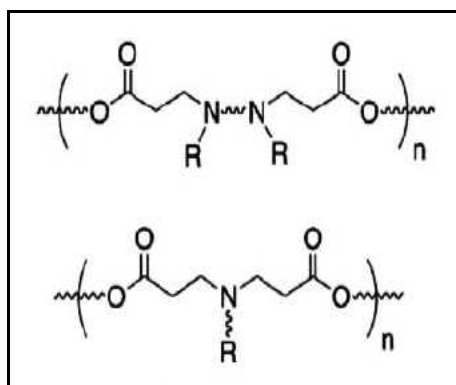


Fig. 6. Poli(β -ammino esteri)

Le molecole di chitosano (Fig. 7) condensano il DNA in particelle di forma allungata o toroidale [177], ma sono molto immunogeniche [178] e hanno un notevole effetto ipocolesterolemizzante.

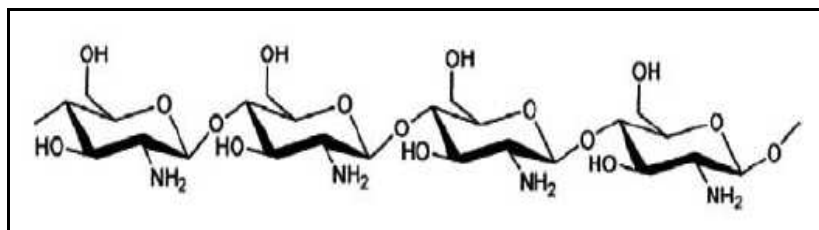


Fig. 7. Chitosano

Lipidi Cationici

I lipidi cationici sono molecole anfifiliche che, quando si trovano in ambiente acquoso, formano spontaneamente, sopra una certa concentrazione, i liposomi, aggregati vescicolari che circondano un interno acquoso. I liposomi sono visti da molto tempo come sistemi promettenti di delivery di farmaci a causa della loro somiglianza con le membrane cellulari. Le loro dimensioni in genere variano da 50 nm a 300 nm circa, ma in certe condizioni di preparazione si può anche arrivare al micron di grandezza. All'interno della vescicola, i lipidi sono disposti in doppi strati catena contro catena, con il gruppo idrofilo polare che si affaccia all'esterno, proteggendo il dominio idrofobo dalla soluzione acquosa. A seconda della carica totale portata dalla testa polare, i liposomi possono essere anionici, cationici, zwitterionici, non-ionici. A causa della carica opposta, i liposomi cationici possono formare un complesso dotato di carica totale positiva con le molecole di DNA cariche negativamente. Questo complesso, chiamato lipoplezzo, non è limitato, a differenza del DNA nudo, da barriere elettrostatiche nel suo ingresso nella cellula e nell'endocitosi da parte della membrana plasmatica.

I liposomi cationici sono preparati a partire da lipidi cationici che contengono una o più funzionalità cariche positivamente nella loro testa polare. I liposomi cationici sono spesso formulati in combinazione con lipidi helper, come dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) o colesterolo. Se preparati in condizioni appropriate, i lipoplezzi conservano una carica totale positiva, che consente loro di legarsi efficientemente alla membrana cellulare carica negativamente e di subire endocitosi per entrare nelle cellule. Inoltre, la complessazione con liposomi cationici protegge il DNA dalle nucleasi del siero o del citoplasma.

Struttura Modulare dei Lipidi Cationici

Un lipide cationico è una molecola anfifila carica positivamente, che contiene al massimo cinque domini strutturali [179-181]. In figura 8 è riportato, come esempio, il DOTMA. Si può vedere come i domini strutturali indispensabili siano i primi tre descritti di seguito.

1. Una testa idrofila carica positivamente, di solito per la presenza di uno (lipide monovalente) o più (lipide multivalente) gruppi amminici protonati. Si possono utilizzare anche gruppi di tipo ammonio quaternario, amidinio, guanidinio, o eterociclici come l'imidazolico e il piridinico, come nei tensioattivi gemini dipiridinici, il cui studio è descritto in questa tesi. In genere, una testa polare multivalente è più efficace nella compattazione del DNA.

2. Una porzione idrofobica costituita da uno steroide (il più diffuso è il colesterolo) o da una o più (fino a quattro) catene alchiliche sature o insature [182]. I lipidi a doppia catena rappresentano la maggior parte dei lipidi sintetizzati. La catena oleoilica (18:1) è la più frequente tra le insature, mentre tra le sature le più diffuse hanno 14, 16 o 18 atomi di carbonio.

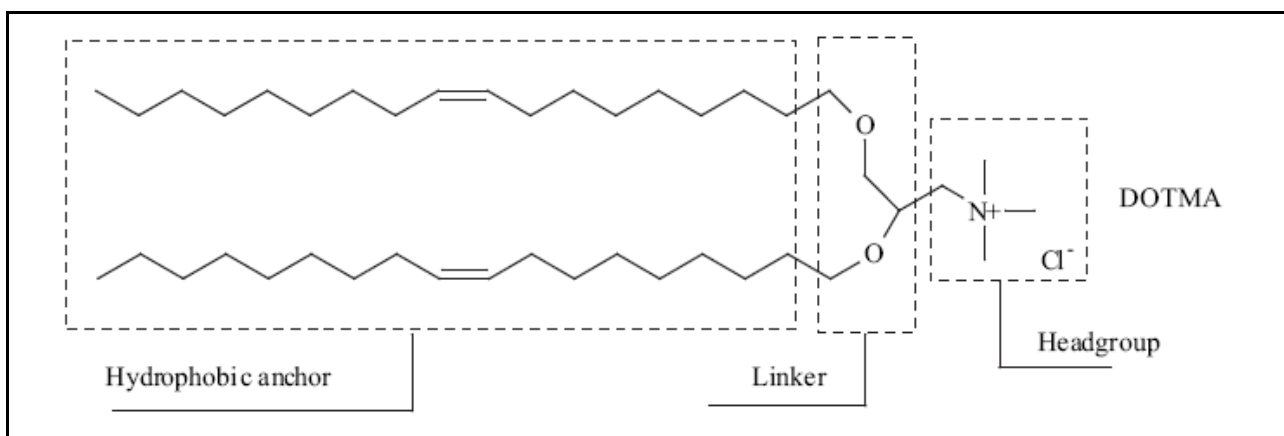


Fig. 8. I tre domini strutturali indispensabili nei lipidi cationici. L'esempio del DOTMA.

3. Un linker (che connette la testa cationica con la porzione idrofobica) la cui natura e lunghezza influenzano la stabilità, la biodegradabilità e l'emivita del vettore. Il linker è importante nell'assicurare il contatto ottimale tra la testa polare cationica e i fosfati del

DNA carichi negativamente. I linker più comuni, con caratteristiche diverse riguardo alla loro stabilità chimica e biodegradabilità, includono eteri, esteri, carbammati, amidi, carbonati, fosfonati, disolfuri. Nel caso dei gemini dipiridinici, il linker è sostituito da uno spacer metilenico a lunghezza variabile che connette le due teste piridiniche.

4. Uno scaffold (o backbone), una porzione del lipide cationico sul quale sono legati sia il gruppo idrofobico che la testa idrofila. Il glicerolo è stato lo scaffold più testato, benché molto spesso sia riportato il legame diretto delle catene alchiliche alla testa polare.

5. Un ligando specifico attaccato alla testa polare che aumenti il targeting cellulare o la stabilità nel siero [183]. Come ligandi sono stati usati PEG, folato, aloperidolo, carboidrati, come nei tensioattivi glucocationici da noi studiati, in cui un gruppo glucopiranosil etilico è connesso all'azoto quaternario per sfruttare il legame con specifici recettori cellulari per i carboidrati.

I LIPIDI CATIONICI ED I LORO AGGREGATI: LIPOSOMI E LIPOPLESSI

ASPETTI CHIMICO-FISICI

CONSIDERAZIONI GENERALI SULLA FORMAZIONE DEL LIPOPLESSO

L'organizzazione del lipoplesso è stata studiata usando metodi chimici, fisici e biochimici. Il lipoplesso è caratterizzato da range dimensionale, carica superficiale, organizzazione del DNA e del lipide, accessibilità del DNA e stabilità colloidale. I lipoplessi sono stati studiati con dynamic light scattering, microscopia elettronica [184], sonde enzimatiche [185], elettroforesi [186], centrifugazione [187], risonanza magnetica nucleare [188], diffrazione di raggi X [189] e microscopia a forza atomica, tecniche che forniscono una maggiore comprensione delle interazioni lipide cationico-DNA. Il ruolo primario di tutti i vettori o carrier di DNA è di compattare il DNA e di proteggerlo durante il relativo transito dall'ambiente extracellulare al citoplasma. Quando i lipidi cationici sono mescolati con DNA, sia il lipide che il DNA subiscono rispettivamente riarrangiamenti in organizzazione e struttura, che portano alla formazione di particelle colloidali (lipoplessi). La formazione del lipoplesso è un processo spontaneo, determinato soprattutto dalle interazioni elettrostatiche ed idrofobe fra il lipide cationico e il DNA anionico (per i gruppi fosfato) [190-193]. La formazione del complesso è un processo endotermico, con meno di 1 kcal assorbita per mole di lipide o carica di DNA e guidato principalmente dalle variazioni di entropia. La variazione di entalpia è stata attribuita alla repulsione reciproca DNA-DNA all'interno del complesso lamellare. I cambiamenti di entropia nella formazione del lipoplesso sono in gran parte dovuti al rilascio dei controioni da entrambe le specie interagenti e, in certa misura, alla deidratazione del DNA e dei liposomi. I contributi entropici delle interazioni elettrostatiche sono stati confermati studiando il legame tra il DNA e il lipide a forze ioniche e temperature differenti [190-193]. Durante la formazione del lipoplesso, la riorganizzazione strutturale si presenta simultaneamente nel liposoma e nel DNA.

I risultati sono spiegati nei termini del semplice modello di carica che riflette la compensazione fra l'entropia del controione e la repulsione interna al DNA e al bilayer

[194]. Alle forze ioniche fisiologiche, la forza di legame di un singolo nucleotide è molto debole; tuttavia, l'interazione simultanea di un gran numero di cariche del polimero di DNA con i lipidi conduce ad un'associazione molto forte. Le singole molecole del lipide non possono dissociarsi dal complesso poiché sono trattenute nel bilayer dalle forti interazioni idrofobe che formano una matrice continua a cui si può legare il DNA.

Diversamente dai cationi semplici, che non possiedono la capacità di compattare il DNA, gli anfifili cationici lo condensano efficientemente a causa dell'organizzazione delle code idrofobe nelle lamelle. Come previsto, lunghezze maggiori nella catena degli anfifili aumentano le forze di legame. L'organizzazione del lipoplesso all'equilibrio è governata dalla densità di carica superficiale e dalle proprietà elastiche dei costituenti del lipoplesso. Il DNA è una molecola rigida ed impone limitazioni alle geometrie possibili del lipoplesso [190].

La cinetica della formazione del lipoplesso, benché rapida, richiede tempi molto lunghi per raggiungere la stabilità. Le misure di fluorescenza hanno indicato che la stabilizzazione richiede almeno 5 ore di incubazione e l'efficienza di trasfezione del lipoplesso dipende dal tempo di incubazione e secondariamente delle dimensioni del lipoplesso [195, 196].

Le indagini biochimiche sui lipoplessi sono normalmente eseguite misurando l'accessibilità del DNA alle nucleasi e/o alle molecole che legano il DNA [184, 197]. L'accessibilità del DNA a questi agenti diminuisce progressivamente all'aumentare del contenuto di lipide dei complessi. La condensazione del DNA è una conseguenza incontestata del legame col lipide; tuttavia, il DNA, durante la formazione del lipoplesso, subisce anche mutamenti strutturali secondari [185, 198]. Gli studi di dicroismo circolare hanno indicato che il DNA cambia la sua conformazione da B- a C-parziale [199]. Usando un saggio per valutare la competenza trascrizionale, Prasad ha indicato che in seguito all'interazione con DNA, i lipidi cationici determinano il disavvolgimento parziale del DNA con conseguente aumento della velocità di trascrizione a rapporti di carica inferiori ad 1 [185].

GEOMETRIA DEI LIPIDI CATIONICI E STRUTTURA DEI LIPOPLESSI

Un'importante proprietà degli anfifili cationici, che si ripercuote nell'applicazione come vettori, è la loro geometria. Come ogni anfifilo, quando vengono sospesi in ambiente acquoso, i lipidi cationici possono adottare varie fasi strutturali, incluse la fase micellare, lamellare, cubica ed esagonale inversa. Il tipo di struttura può essere predetto da un fattore noto come parametro d'impaccamento, P . Questo parametro, $P = v/al_c$, è definito come il rapporto tra il volume dell'idrocarburo, v , e il prodotto dell'area effettiva della testa polare, a , e la lunghezza critica della catena lipidica, l_c [200]. In breve, questo parametro sottolinea l'importanza del rapporto dell'area occupata dalla sezione trasversale della porzione idrofobica rispetto a quella idrofila [201].

La maggior parte dei lipidi adotta la struttura lamellare L_α , che deriva da una forma cilindrica del lipide, in cui il rapporto tra le aree delle sezioni trasversali delle porzioni idrofobica e idrofila è $\frac{1}{2} < P < 1$ (Fig. 9).

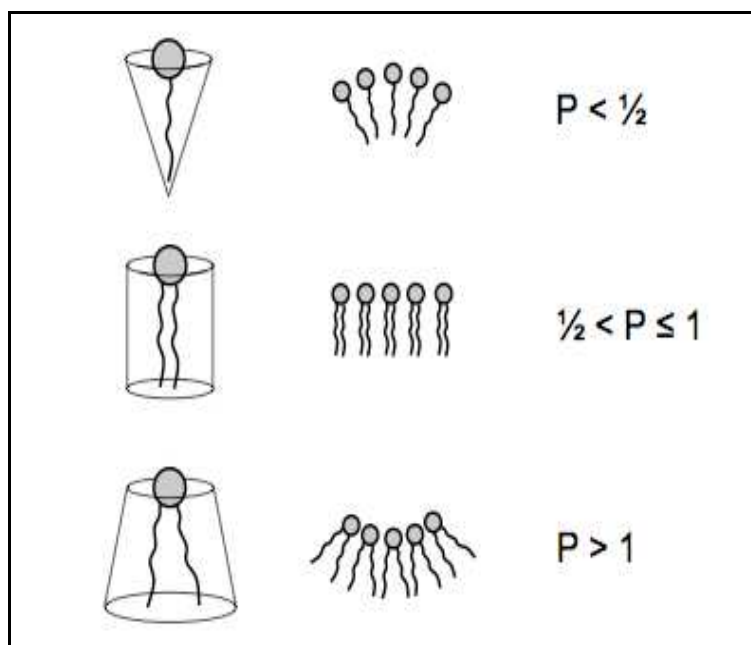


Fig. 9. Rappresentazione schematica della struttura del liposoma in funzione del parametro di impaccamento P del lipide. Per $P < 1/2$ il monomero a forma di cono si assembla in strutture con curvatura positiva corrispondenti ad una fase micellare (micelle sferiche, cilindriche o fasi esagonali H_I non inverse). Per P compreso tra $1/2$ e 1 la curvatura del liposoma è vicina a 0 e genera una fase lamellare L_α (bilayers). Per $P > 1$ la struttura ha una curvatura negativa che porta a fasi inverse (micelle inverse o fasi esagonali inverse H_{II}) [202].

La struttura lamellare L_{α} rende ragione della maggiore diffusione, a lungo raggio, della struttura multilamellare dei lipoplessi: la struttura multilamellare (Fig. 10 C) si trova più frequentemente nei lipoplessi perché la maggior parte dei lipidi possiede una struttura lamellare L_{α} . La struttura a lungo raggio multilamellare, risultata essere la più stabile da un modello di calcolo per l'autoassemblaggio lipidico, vede il DNA disposto a sandwich tra i doppi strati del lipide cationico [203, 204]. Altre due strutture a lungo raggio rinvenute nei lipoplessi sono: una struttura in cui i lipoplessi stanno come sfere sul filamento del DNA [203] (Fig. 10 A); una struttura tubulare a forma di spaghetti o una combinazione di una struttura a spaghetti con "meatballs" multilamellari [206] (Fig. 10 B).

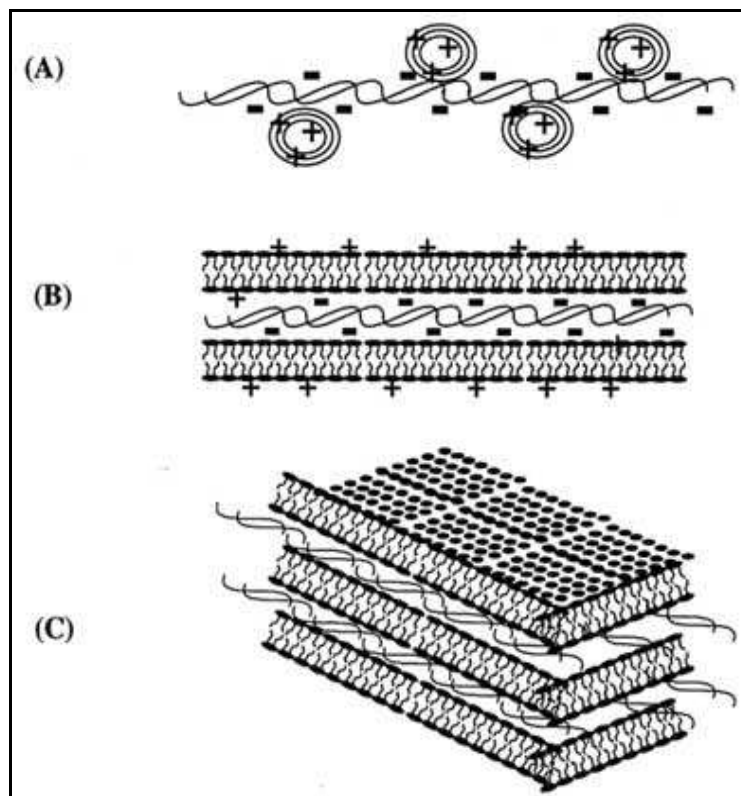


Fig. 10. Le tre strutture principali di assemblaggio dei lipoplessi. (A) Struttura a sfere. (B) Struttura tubulare. (C) Struttura multilamellare [207].

I lipidi cationici con una testa polare relativamente piccola e catene insature alchiliche o aciliche che occupano un'area estesa hanno la tendenza ad adottare una fase esagonale inversa H_{II} . Una struttura simile, a forma di cono, viene preferita dal fosfolipide DOPE ($P>1$).

Al contrario, le strutture micellari (non invertite) sono quelle preferite dai lipidi con una testa che occupa un'area superficiale relativamente ampia se confrontata con l'area della sezione trasversale occupata dalle catene idrofobiche ($P < 1/2$), come per esempio nel caso dei lisofosfolipidi.

PREPARAZIONE DEI LIPOPLESSI

I lipoplessi sono di solito preparati semplicemente mescolando una soluzione di DNA plasmidico che codifica per i geni di interesse con i liposomi cationici [208].

Le dimensioni e la stabilità colloidale dipendono dal rapporto di carica lipide/DNA [209]. Sulla base delle dimensioni e della carica superficiale, la struttura e la stabilità dei lipoplessi possono essere di tre tipi, a seconda che il rapporto di carica lipide/DNA sia 1, minore di 1 o maggiore di 1 [210]. A rapporti di carica minori di 1, si formano complessi anionici stabili, con il DNA che condensa sui liposomi. Quando il rapporto di carica lipide/DNA è 1, i complessi sono neutri, con conseguenti aggregati molto instabili. A rapporti di carica maggiori di 1, il DNA è completamente isolato dal solvente, con la formazione di lipoplessi cationici stabili.

Usando quindi un eccesso di lipidi cationici [211], il sistema di particelle risultante di solito porta una carica superficiale positiva [212], necessaria per avere un'efficace interazione con le membrane cellulari. Le dimensioni delle particelle generalmente cadono nell'intervallo delle dimensioni colloidali [150, 208], con un diametro medio compreso tra i 100 e i 450 nm [203, 213-215]. I complessi di questo tipo hanno una distribuzione dimensionale omogenea e sono in grado di compattare completamente il DNA, conferendogli un'elevata resistenza alle DNAsi [216].

Gli studi sull'influenza della variazione di sale, di pH e di concentrazione di DNA sulla formazione del lipoplesso indicano che le particelle con rapporti di carica identici ma diverse composizioni generano differenti stabilità colloidali, suggerendo che oltre al rapporto di carica, altri parametri giocano un ruolo importante nella stabilità del lipoplesso [217].

È ben noto che il mescolamento rapido dei componenti dà origine a lipoplessi piccoli, mentre un mescolamento molto lento causa precipitazione [218]: di questo si deve tener conto nella preparazione dei lipoplessi.

ASSEMBLAGGIO DEL LIPOPLESSO

I lipoplessi sono nanosistemi auto-assemblanti e la loro formazione richiede un meccanismo multistep, rivelato da studi dettagliati che usano monolayer e microscopie a forza atomica e crio-elettronica [219-221]. In un millisecondo avviene il primo passo delle interazioni elettrostatiche tra il fosfato del DNA e le teste polari amminiche cariche positivamente del lipide cationico. L'interazione della superficie DNA-liposoma presumibilmente dà origine a forze di impaccamento nel bilayer e i difetti innescano interazioni estensive tra i bilayer adiacenti [220-222], che portano ad un mescolamento lipidico estensivo e ad una rottura della struttura ordinata della membrana [219-221, 223]. La rottura presumibilmente causa l'esposizione delle estremità idrofobiche che possono servire come siti di nucleazione per l'interazione con strutture simili adiacenti. Si arriva ad una successiva fusione di membrana, un mescolamento lipidico e ad una crescita degli aggregati.

Si è anche proposto, in base a recenti esperimenti di microscopia a forza atomica, che la crescita delle dimensioni dei lipoplessi sia innescata dalla parziale esposizione del plasmide (risultato delle imperfezioni nel processo della formazione del complesso), che può agire da sito di nucleazione per il clustering massivo dei lipoplessi [220].

Alla fine, i lipidi cationici sono interamente avvolti intorno ai plasmidi e le superfici del complesso assemblato appaiono lisce, cosa che indica un corretto impaccamento del DNA. A questo punto, cessa la tendenza dei complessi adiacenti a subire un altro mescolamento lipidico estensivo [219-220], in quanto i potenziali siti di interazione sono bloccati.

Il rilascio del controione dal lipide cationico e dal DNA, una concomitante diminuzione nell'idratazione e il risultante aumento dell'entropia sono la driving force nell'assemblaggio dei lipoplessi [221, 224].

Come verrà detto anche a p. 33, una forza ionica aumentata ridurrà l'entità del rilascio del controione dal DNA e dal lipide cationico, e questo influenza l'intima interazione DNA/lipide cationico, che diminuisce [221, 225]. Un aumento della forza ionica avrà quindi un effetto pronunciato sulla morfologia degli aggregati.

Durante l'interazione elettrostatica tra le vescicole cariche positivamente e i gruppi fosfato carichi negativamente, avviene il collasso della struttura del DNA, conosciuto come condensazione o compattazione, che si verifica in modo tale che il DNA sia effettivamente schermato dai lipidi.

Oltre alle proprietà chimico-fisiche dell'anfilo, ci sono altri parametri che determinano l'esito del processo di assemblaggio in termini di struttura e stabilità del lipoplesso, che ovviamente si ripercuote sulla capacità trasfettiva: la natura della preparazione liposomiale iniziale e le dimensioni del plasmide modulano i difetti di instabilità del lipoplesso [226] e le dimensioni del lipoplesso [223, 227] e determinano l'efficienza generale di trasfezione. Anche l'inclusione del lipide helper nel vettore cationico è importante. Il DOPE, che da solo preferisce la fase esagonale inversa, non è richiesto per l'assemblaggio del lipoplesso, ma questo colipide può facilitare questo processo [228], aumentando la plasticità del lipide e favorendo ulteriormente l'avvolgimento del DNA.

La velocità di assemblaggio del complesso è influenzata dall'ordine di addizione del complesso e del DNA. La cinetica di formazione del complesso può portare alla coesistenza di strutture di diverse dimensioni, probabilmente in relazione alla diversa stabilità della particella che, a sua volta, può riflettere le diverse fasi strutturali. Varie fasi strutturali coesistenti si possono originare anche quando i lipidi cationici e i lipidi helper si mescolano male, cosa che provoca un assemblaggio di complessi poco stabili [221, 229] o di complessi in cui il DNA sia impaccato inefficientemente nel guscio del lipide cationico, causando una protrusione di filamenti che influenza negativamente l'interazione dei lipoplessi con la membrana cellulare [230] e la successiva trasfezione, come è dimostrato dalle immagini di microscopia a forza atomica e dai saggi di trasfezione transiente nel caso dei nostri gemini dipiridinici con spaziatore diverso da quello a quattro atomi di carbonio (si vedano le sezioni "Risultati" e "Discussione").

CARICA SUPERFICIALE E POTENZIALE ZETA DEI LIPOLESSI

I lipoplessi sono colloidali la cui stabilità dipende criticamente dalla carica superficiale delle particelle [231]. Nelle strutture in cui la carica è neutra, la stabilità della particella cade bruscamente con conseguente aggregazione e precipitazione. In situazioni di eccesso di lipide, il lipoplesso possiede la carica positiva che non solo aumenta la sua stabilità colloidale, ma lo aiuta anche nell'interazione con la membrana cellulare. Quindi, la carica superficiale, misurata come potenziale zeta, è critica per la stabilità ed il legame alle cellule. Il potenziale zeta, definito come la differenza nel potenziale fra lo strato immobile legato alla superficie della fase dispersa ed il mezzo di dispersione, dovrebbe essere alto (superiore ai 30 mV) per mantenere la stabilità colloidale. Valori

più bassi di potenziale zeta riducono la stabilità dei lipoplessi durante lo stoccaggio o in presenza di siero.

Parecchie ricerche hanno riguardato la misura di potenziale zeta dei lipoplessi per correlarlo all'efficienza di trasfezione [186, 232]. Benché complessi positivi si siano rivelati necessari per la trasfezione, i lipoplessi con potenziale zeta positivo non garantiscono la trasfezione. Uno studio recente, basato su formulazioni con una densità di carica variabile sulla membrana, propone la carica media per unità di superficie della membrana come parametro universale che governa l'efficienza di trasfezione [217]. Questa conclusione è basata su risultati in cui vari lipidi con cariche cationiche singole o multiple hanno prodotto un'identica efficienza di trasfezione se messi in grafico contro la carica superficiale. Nelle varie fasi delle interazioni del lipoplesso con le componenti cellulari, la carica superficiale assume più importanza della fase del lipide. Infatti, in presenza delle proteine sieriche il potenziale zeta si abbassa, portando ad una scarsa associazione dei lipoplessi con la cellula [233].

FORZA IONICA DEL MEZZO DI REAZIONE

Studi calorimetrici sull'effetto del buffer e della forza ionica sull'entalpia di legame tra il DNA e i lipidi cationici indicano che un aumento della forza ionica ha come risultato una progressiva diminuzione del calore di legame ed un aumento del rapporto di carica lipide/DNA al quale avviene l'aggregazione. Il processo di interazione lipide/DNA è guidato dall'entropia e il contributo dell'entalpia è positivo o negativo a seconda del lipide helper usato (colesterolo o DOPE) [234]. I lipoplessi sono di solito preparati a bassa forza ionica per diminuire la precipitazione. A basse forze ioniche, le forze attrattive elettrostatiche coinvolte nella formazione del lipoplesso aumentano, portando così ad una più veloce ed intensa interazione del DNA e i liposomi cationici, che sembra prevenire l'aggregazione e la sedimentazione dei complessi.

RUOLO DI DOPE E COLESTEROLO

Il DOPE (dioleoilfosfatidiletanolamina) (Fig. 11) è spesso incluso nelle miscele dei lipidi cationici come cosiddetto "lipide helper", in quanto, in quasi tutti i sistemi formati da lipidi cationici, l'inclusione del DOPE ha dimostrato di aumentare l'efficienza di trasfezione in vitro.

Il lipide neutro DOPE a pH circa 9.0 è carico negativamente e adotta una fase lamellare ma, a pH vicino alla neutralità o a pH acido [235], che si genera nella maturazione dell'endosoma, il lipide diventa uno zwitterione e va incontro ad una transizione da fase lamellare a fase esagonale inversa (non lamellare) H_{II} . Questa fase, in sostanza, è una struttura che destabilizza il bilayer. L'adozione di questa fase sembra un passaggio importante nel meccanismo con cui il materiale genetico, dopo l'internalizzazione del lipoplesso, esce dalle vescicole endocitiche e passa nel citosol [236, 237] (si veda p. 41-43)

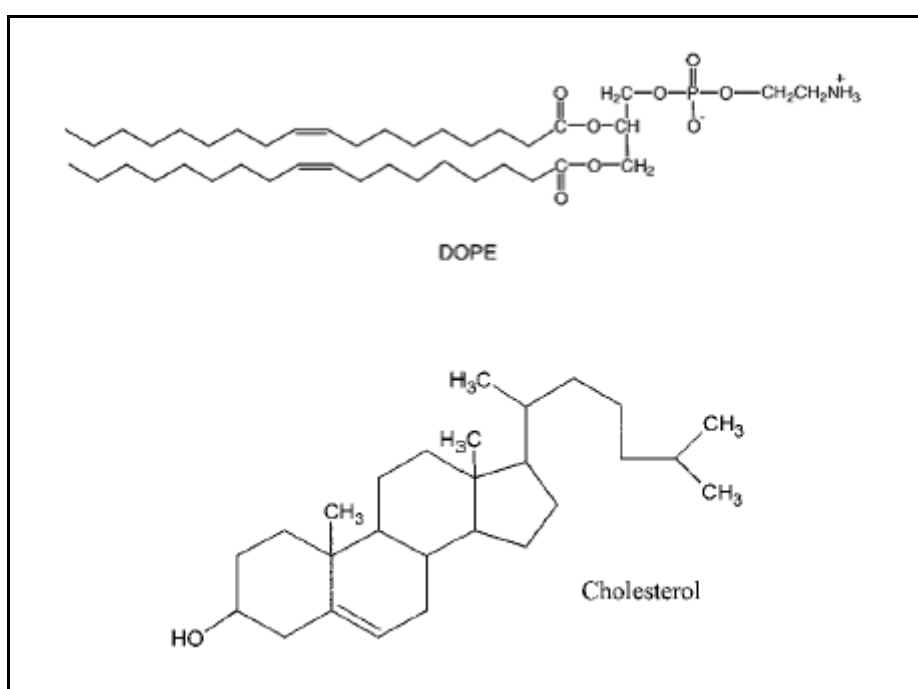


Fig. 11. Struttura di DOPE e colesterolo.

I lipidi cationici come il DOTAP (Fig. 15 (9) p. 46) e SAINT-2 preferiscono un'organizzazione a doppio strato, tuttavia, mescolandoli con una quantità equimolare di DOPE si ottiene un cambiamento nel loro parametro d'impaccamento e, quando il P medio additivo diventa sufficientemente grande (>1), il sistema si converte ad una fase esagonale inversa [238-240], come osservato anche per il DOTMA (Fig. 14 (1) p. 45) [241]. All'interno della fase esagonale inversa adottata dai lipoplessi, i filamenti di DNA rivestiti dai lipidi si organizzano su un lattice esagonale, al contrario dell'organizzazione a sandwich tra i doppi strati lipidici dei lipoplessi con organizzazione lamellare [238] (Fig. 12). Non è da escludere che in questa fase ci sia un

legame meno stretto del lipide cationico al DNA, se confrontato con i complessi privi di DOPE, come si vede dall'intercalazione dell'etidio bromuro nei complessi che contengono DOPE [229]. Il legame diretto del DOPE al DNA può essere importante in questo senso [242], con i gruppi amminici del DOPE che interagiscono con i gruppi fosfato del DNA e indeboliscono le interazioni tra i lipidi cationici e il DNA [236].

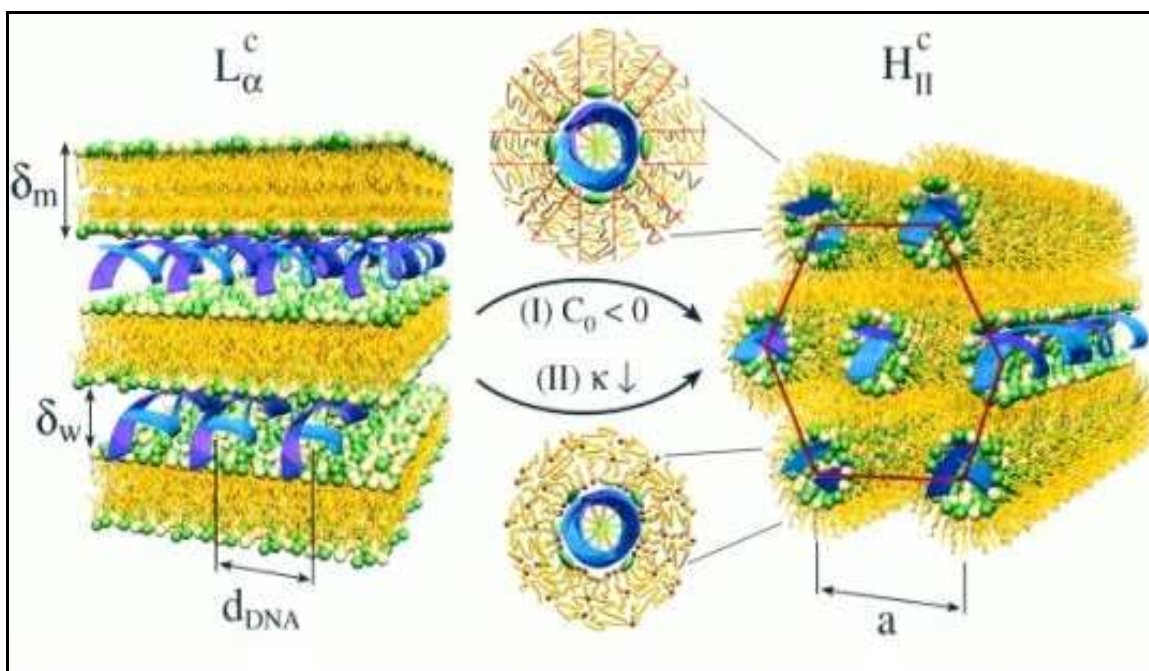


Fig. 12. Transizione da una struttura lamellare ad un esagonale inversa (il DNA è il filamento blu) [238].

L'efficienza con cui il DOPE promuove questa transizione può dipendere da diverse condizioni. Per il lipide cationico SAINT-2, che si organizza in fase lamellare a pH 7.4 in acqua, l'aggiunta di DOPE facilita la conversione a H_{II} e lo fa ulteriormente quando il sistema è sospeso in una soluzione fisiologica di sali [240]. Eliminare la repulsione tra le teste polari attraverso una schematura delle cariche a forza ionica fisiologica, aumenterà il parametro di impaccamento P , promuovendo lo spostamento osservato verso la fase esagonale.

Inoltre, diminuire il rapporto molare del DOPE da 50 a 20 mol% porta alla formazione nel lipide di una fase cubica più curvata [243], indicando che il DOPE è funzionale nel promuovere la transizione verso la fase esagonale del lipopleppo, con la fase cubica come fase di transizione tra la fase lamellare e quella esagonale H_{II} [244].

Tutte queste considerazioni ci hanno spinto a valutare il comportamento del DOPE come colipide nel lipoplessi formati dai tensioattivi da noi studiati. Per una trattazione dettagliata si rimanda alle sezioni “Risultati” e “Discussione”.

Anche il colesterolo (Fig. 11) è stato utilizzato come colipide per i liposomi cationici, producendo complessi più stabili ma meno efficienti in vitro. In seguito a somministrazione in vivo, invece, i complessi contenenti colesterolo si sono dimostrati molto attivi [211, 245-249], probabilmente a causa di un ridotto legame con i componenti del sangue che prolunga l'emivita dei lipoplessi [250] (si veda la sezione “Aspetti farmacocinetici” a p. 65-69). Inoltre, l'inclusione del colesterolo nel liposoma permette l'uso di maggiori concentrazioni di lipide e DNA senza influenzare la stabilità del lipoplesso. Sembra che il meccanismo d'azione del colesterolo come colipide, al pari del DOPE, sia quello di promuovere la transizione del lipoplesso verso una struttura non lamellare [251].

INFLUENZA DELLE DIMENSIONI DEL LIPOPLESSO SULLA TRASFEZIONE

Indipendentemente dalla natura chimica del lipide, il rapporto fra efficienza di trasfezione e dimensioni del lipoplesso è descritto da una curva a campana, in cui in un particolare intervallo di dimensioni si ha il massimo di trasfezione [252]. Parecchi autori hanno studiato l'effetto delle dimensioni del lipoplesso sulla trasfezione [233]. Lipoplessi di dimensioni definite sono stati ottenuti o variando le dimensioni del liposoma, o aggiungendo molecole addizionali di lipide cationico per ottenere una dimensione uniforme, oppure attraverso la separazione per centrifugazione di lipoplessi con densità differenti [253, 254]. I lipoplessi formati da piccole vescicole unilamellari di lipidi cationici hanno condotto ad una trasfezione più bassa se confrontata con quelli formati da grandi vescicole unilamellari [255]. In cellule CHO (cellule di ovaio di hamster cinese), l'efficienza di trasfezione, l'associazione delle cellule e l'uptake dei lipoplessi aumentano all'aumentare delle dimensioni del lipoplesso [256].

Tentativi di comprendere la dipendenza della trasfezione dalle dimensioni si sono rivelati infruttuosi poiché è difficile ottenere i lipoplessi di dimensioni diverse ma con altre proprietà fisiche simili. DOTAP (Fig. 15 (9) p.46) è uno dei lipidi cationici più ampiamente usati sia per le applicazioni in vivo che in vitro. Uno studio dettagliato sulla

caratterizzazione dimensionale di lipoplessi a base di DOTAP (che variano da 50 nm a 2 μ m) e sulla loro efficienza di trasfezione in cellule di CHO ha mostrato una correlazione positiva eccellente. Tuttavia, pochi studi hanno segnalato la mancanza di correlazione o una correlazione negativa fra le dimensioni e l'efficienza di trasfezione.

Le dimensioni del lipoplesso sono influenzate dalla presenza di siero [257, 258]. In presenza delle proteine sieriche le dimensioni del lipoplesso aumentano ed il relativo potenziale zeta diventa più negativo, portando ad una scarsa associazione dei lipoplessi con la cellula [233].

CONSERVAZIONE

Lo sviluppo e la produzione di carriers per il gene delivery in vivo deve rispettare un certo numero di requisiti, inclusa la possibilità che siano conservati senza che venga persa la loro stabilità biologica. Sono stati fatti vari studi su questo problema, che hanno portato alle seguenti conclusioni.

L'attività biologica dei lipoplessi è sensibilmente ridotta in seguito ad agitazione e il congelamento lento è più dannoso di quello rapido [259]. Si sono potuti ottenere lipoplessi biologicamente ancora attivi dopo un congelamento superiore ad un anno aggiungendo sorbitolo al 5% [260].

La liofilizzazione deve essere fatta con un lioprotettore: a questo scopo i disaccaridi sono più adatti dei monosaccaridi [261].

La temperatura di conservazione influenza fortemente l'efficienza trasfettiva. La conservazione dei lipoplessi a 25 o a 4°C per un giorno fa perdere il 70% dell'attività trasfettiva (probabilmente per la precipitazione dei lipoplessi) [262, 263], mentre la conservazione a -20°C, indipendentemente dal tempo di conservazione, determina una diminuzione del 50% [238, 242]. I migliori risultati si sono ottenuti con una conservazione a -80°C fino a 20 giorni, che non ha dato una diminuzione della trasfezione [264].

L'INTERAZIONE CON LA CELLULA E LA TRASFEZIONE

Gli eventi principali del processo trasfettivo sono: l'endocitosi dei lipoplessi, la loro uscita dall'endosoma, la liberazione del materiale genetico nel citoplasma e la sua migrazione verso il nucleo, il suo ingresso nel nucleo e la sua espressione. La figura 13 illustra queste diverse fasi.

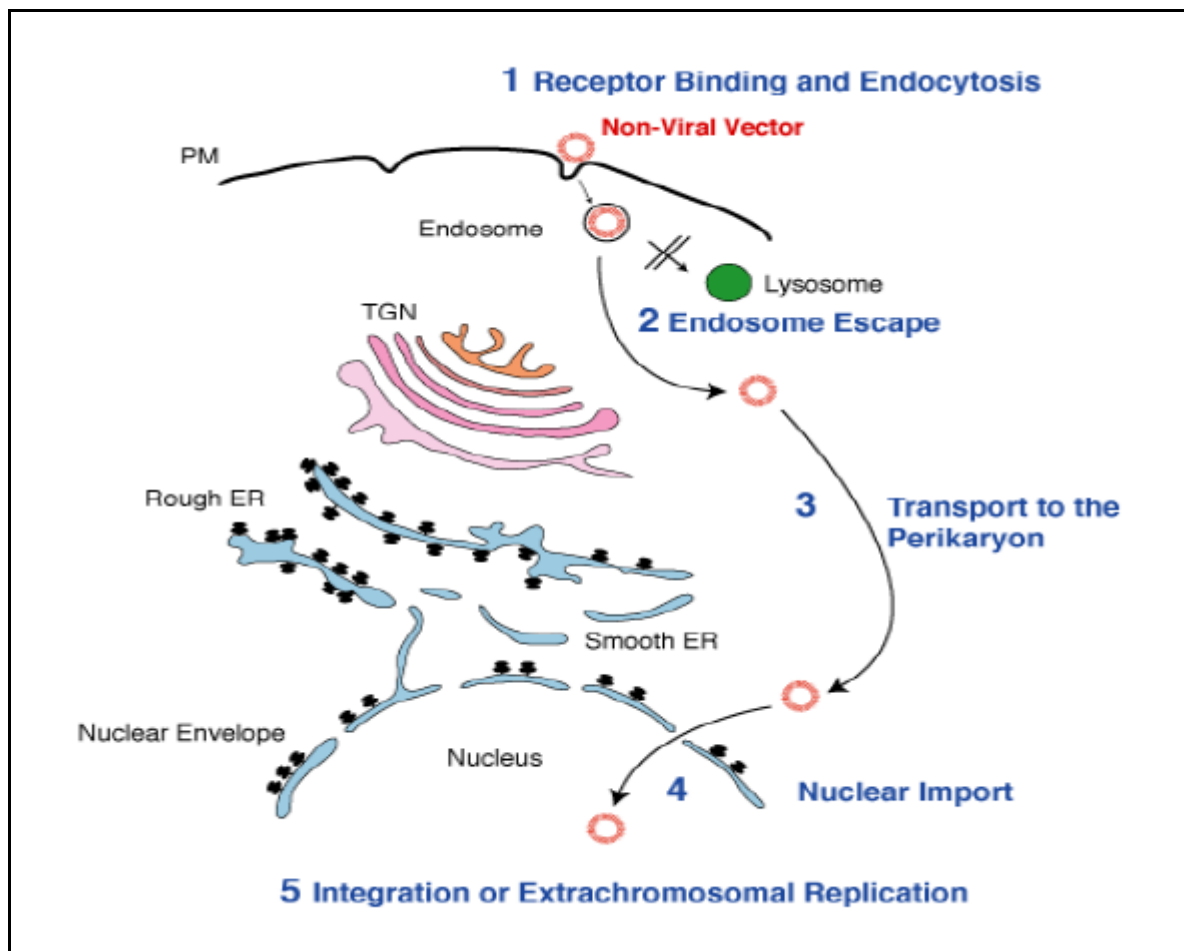


Fig. 13. I momenti principali della trasfezione.

ENDOCITOSI DEI LIPOPLESSI

L'evento iniziale del processo trasfettivo è l'interazione tra lipoplesso e superficie cellulare. Questo processo è guidato da interazioni elettrostatiche, a meno che il lipoplesso non contenga ligandi per un target specifico, riconosciuti specificamente da un recettore sulla superficie cellulare. Si possono prendere precauzioni per eliminare le

interazioni non-specifiche sulla superficie cellulare, come ad esempio la coniugazione con PEG (polietilenglicole), descritta a p. 67, che conferisce proprietà “stealth” al complesso [254, 265-269]. Nell’interazione con i lipoplessi sono state chiamate in causa glicoproteine anioniche [270]: le linee cellulari prive di glicoproteine mostrano un’efficienza di trasfezione 80 volte più bassa delle cellule normali [271]. La distribuzione variabile delle glicoproteine può spiegare la trasfezione variabile tra diversi tipi di cellule [272].

La fase dei lipoplessi non è rilevante per l’internalizzazione, in quanto lipoplessi lamellari sono internalizzati con la stessa efficienza di quelli che adottano una fase H_{II} [228]. Anzi, la struttura lamellare favorisce la protezione del DNA ed è, da questo punto di vista, vantaggiosa.

La quantità dei lipoplessi associati alle cellule non è correlata con l’efficienza di trasfezione.

Come rivelato dalle microscopie elettronica e a fluorescenza, dopo incubazione con cellule in coltura, il lipoplesso può essere rilevato in vescicole intracellulari immediatamente al di sotto della membrana cellulare [273, 274], suggerendo che il lipoplesso entri nelle cellule attraverso l’endocitosi. Le cellule eucariotiche possiedono vari meccanismi endocitici e questo processo può coinvolgere l’endocitosi mediata dalla clatrina che genera cavità rivestite o l’internalizzazione endocitica indipendente dalla clatrina, che include la fagocitosi, la macropinocitosi e l’endocitosi mediata dalle caveole [275-277]. Il contributo relativo di ogni singolo meccanismo nell’internalizzazione del lipoplesso è stato ancora poco definito [278-280]. Ad eccezione dell’uptake in cellule specializzate (come macrofagi, monociti e neutrofili), la fagocitosi si può verosimilmente escludere per l’ingresso del lipoplesso nelle cellule normali. Recentemente, è stato descritto l’uptake di liposomi modificati con octaarginina via macropinocitosi [281], ma si conosce ancora poco dell’importanza relativa di questo meccanismo.

L’endocitosi clatrina-dipendente è stata dimostrata per diversi sistemi di lipidi cationici e per vari tipi di cellule. Un’inibizione della trasfezione è stata infatti vista in seguito a trattamento delle cellule con inibitori specifici del meccanismo mediato dalla clatrina come la clorpromazina [282, 283], ma una prova più convincente è stata la sotto-espressione, in cellule mutanti, di Eps15, una proteina necessaria per la formazione delle cavità rivestite, che ha portato ad una inibizione effettiva dell’internalizzazione del lipoplesso e quindi dell’efficienza di trasfezione [282].

Inoltre, la filippina III, un inibitore specifico dell'endocitosi mediata dalle caveole, ha diminuito la trasfezione solo leggermente (10-20%) [282], suggerendo che nel caso specifico (trasfezione di cellule COS7 con lipoplessi SAINT-2/DOPE) l'ingresso via caveole non era il meccanismo principale.

Un fattore importante nel determinare la natura del meccanismo endocitico di ingresso è la dimensione dei lipoplessi. L'effetto di vari inibitori e della deplezione di colesterolo sull'internalizzazione di particelle fluorescenti di varie dimensioni da parte di cellule B16 non fagocitiche si è visto dipendere dalle dimensioni delle particelle [284]. Le particelle di dimensioni fino a 250 nm sono internalizzate preferibilmente e quasi esclusivamente con un'endocitosi attraverso le cavità rivestite dalla clatrina, mentre le particelle di 500 nm sfruttano l'endocitosi via caveole. Tuttavia, mentre i poliplessi di dimensioni superiori ai 500 nm possono essere internalizzati con le caveole [283], non ci sono dati sul fatto che questo meccanismo operi nel caso dei lipoplessi di dimensioni analoghe.

Per rendere l'uptake endocitico dei lipoplessi più cellula-specifico, si sono attaccati al lipide cationico o al lipoplesso piccoli ligandi per la superficie cellulare [285]. La presenza di ligandi specifici induce un'endocitosi mediata dal recettore. Questa strategia è perseguita per superare gli effetti limitanti dell'endocitosi, ma anche per dare più specificità alla trasfezione. I nostri tensioattivi glucocationici sfruttano proprio questo stratagemma: hanno legato un gruppo glucopiranosile con lo scopo di interagire con specifici recettori cellulari per i carboidrati.

INTERAZIONE DEI LIPOPLESSI CON LA MEMBRANA ENDOSOMIALE E RILASCIO DEL LIPOPLESSO NEL CITOPLASMA

Normalmente gli endosomi rimangono vescicole per tutta la loro esistenza. Le vescicole nel percorso endosomiale maturano nel tempo in sotto-organelli con forme e composizione superficiale diverse che portano a vari esiti, come il riciclo sulla superficie o la fusione con il reticolo endoplasmico o la fusione con i lisosomi che degradano il carico endosomiale. Ciascuno di questi passaggi è strettamente regolato e le proprietà molecolari del carico determinano il destino di queste vescicole [286]. Gli endosomi che portano i lipoplessi dovrebbero destabilizzarsi e rilasciare il lipoplesso prima della fusione con i lisosomi. Diversi studi hanno riportato efficienze di trasfezione più elevate in presenza di cloroquina o bafilomicina, agenti che

neutralizzano il lisosoma [270, 287]. La necessità di dover sfuggire alla degradazione lisosomiale determina un tempo limite per la fuga del lipoplesso dall'endosoma verso il citoplasma.

Un punto fondamentale della trasfezione è il rilascio del DNA dal lipoplesso nel citoplasma. Siccome la stabilità del lipoplesso è basata su interazioni elettrostatiche, l'indebolimento di queste interazioni potrebbe rilasciare il DNA dal complesso. Szoka ha ipotizzato che le interazioni elettrostatiche tra i lipidi cationici del lipoplesso e i fosfolipidi anionici della membrana endosomiale possano facilitare la dissociazione simultanea del DNA dal lipoplesso e la distruzione della membrana endosomiale [288]. L'interazione lipide-lipide potrebbe essere ulteriormente aumentata dal flip-flop dei lipidi, portando a una serie di effetti a cascata [188]. Questa proposta del gruppo di Szoka è stata ampiamente investigata con varie metodologie [289-291]. Due prove possono avallare questa tesi. In base a misure di fluorescenza, si è concluso che la combinazione di appaiamento ionico e interazioni idrofobiche tra gli anfifili cationici ed anionici è più forte delle forze elettrostatiche coinvolte nella complessazione tra lipide cationico e DNA [292]. È stato inoltre dimostrato da esperimenti in vivo che i lipidi cationici ed anionici, nonostante formino fasi lamellari da soli, quando combinati insieme formano fasi esagonali inverse [196, 293] che disgregano le membrane [294].

Dallo studio dei lipoplessi contenenti colipidi sono emerse prove stringenti sulla destabilizzazione degli endosomi e il rilascio di DNA. Come già anticipato a p. 34-37, il ruolo del DOPE nell'aumentare la trasfezione è legato principalmente alla sua abilità di formare aggregati ad alta curvatura negativa, di fase H_{II} [188, 289, 295]. Questa fase H_{II} formata dal DOPE conferisce instabilità colloidale che porta al rilascio del DNA [296]. Da studi di SAXS e fluorescenza è emerso che la facilità di rilascio del DNA è decrescente in base alla fase che vari lipidi e colipidi formano nel lipoplesso. L'ordine di facilità di rilascio delle diverse fasi è: micellare = cubica > esagonale > cubica a bilayer > lamellare scomposta > lamellare ordinata [196].

L'escape endosomiale è sufficiente per rilasciare dal lipoplesso il DNA libero? Studi in vitro sulla riorganizzazione del lipoplesso in presenza di liposomi anionici indicano che, benché accessibile alla degradazione da parte delle nucleasi, il DNA può non essere ancora completamente libero [297].

Poiché la maturazione endosomiale provoca una caduta nel pH interno a 5-5.5, sono stati fatti tentativi per incorporare nei lipidi cationici gruppi che si protonassero a questo pH, come ad esempio l'istidina [298-300], e che provocassero la rottura della membrana

endosomiale. I gruppi istidinici alterano il bilancio osmotico causando l'influsso di anioni all'interno dell'endosoma [301, 302] e provocandone in tal modo la lisi osmotica. Un'altra strategia prevede l'uso di lipidi cationici la cui struttura sia instabile a pH inferiore a 6.5 [303]. I legami sensibili all'ambiente acido più frequentemente inseriti nei lipidi cationici sono stati il vinil etere, il chetale e l'ortoestere.

STATUS CITOPLASMATICO DEL DNA PLASMIDICO

Appena dopo l'escape endosomiale, il DNA, che può essere o libero o ancora legato al carrier, attraversa il citoplasma per raggiungere il nucleo, luogo dove avviene la trasfezione. Si sono condotti esperimenti di microiniezione nel nucleo rispettivamente con DNA libero e complessato: quest'ultimo, a differenza del primo, non ha portato alla trasfezione [197]. Se ancora non è dissociato dal suo carrier, il DNA si deve dissociare sia per la localizzazione nucleare che per la trascrizione. L'emivita del DNA libero nel citoplasma è approssimativamente di 1 o 2 ore ed è indipendente dal numero di copie di plasmide o dalla loro conformazione [304, 305]. Un'emivita così breve del DNA nel citoplasma può contribuire significativamente a basse efficienze di trasfezione.

L'emivita del DNA complessato con liposomi cationici è molto più lunga di quella del DNA libero. Si è misurata la velocità di diffusione del DNA libero nel citoplasma: è risultata molto più bassa di quelle delle particelle di destrano di dimensioni corrispondenti. La diffusione più lenta è probabilmente dovuta alle interazioni del DNA con il contenuto citoplasmico [306]. Una diffusione più veloce e una protezione dalle deossiribonucleasi presenti nel citoplasma potrebbero contribuire positivamente alla trasfezione globale. Nel citoplasma sono infatti presenti numerose endonucleasi e esonucleasi [307]. Studi condotti con DNA plasmidico all'interno del citosol di cellule HeLa indicano che la degradazione del DNA è dipendente dai cationi divalenti, dalla temperatura ed è distinta per le DNasi I e II [308].

Per aumentare la dissociazione del lipide cationico dal DNA nel citoplasma, è stata sfruttata la natura riduttiva del citoplasma stesso: legami disolfuro all'interno del lipide cationico vengono ridotti, destabilizzando così il lipoplezzo [309].

INGRESSO NEL NUCLEO

Nella trasfezione con lipidi cationici, l'ultima barriera per l'espressione transgenica è la membrana nucleare, visto che il DNA, per essere trascritto, deve trovarsi necessariamente nel nucleo.

I nuclear pore complex (NPC) sono proteine che formano un canale acquoso attraverso la membrana nucleare e consentono il trasporto di piccole molecole (inferiori a 40 kDa di massa molecolare) per diffusione passiva [310]. Molecole più grandi sono riconosciute da specifiche sequenze amminoacidiche e trasportate attivamente dalle importine attraverso l'NPC. L'ingresso nel nucleo del DNA plasmidico non può avvenire per diffusione passiva in quanto le dimensioni del DNA (generalmente del peso di 2-10 MDa) sono superiori a quelle del poro nucleare. Il raggio del poro nucleare è di 9 nm quando è impegnato nel trasporto passivo e 25 nm quando è in atto la traslocazione attiva [311, 312]. È stato chiaramente stabilito che il DNA plasmidico iniettato nel citoplasma avrebbe un'efficienza di espressione di 0.1-0.001%, mentre lo stesso plasmide iniettato direttamente nel nucleo mostra il 100% di espressione [313, 314]. Gli oligonucleotidi inferiori a 100 bp entrano nel nucleo per diffusione passiva e il loro ingresso è indipendente da concentrazione, temperatura e livelli di ATP. Non è ancora chiaro in che quantità il DNA è associato al lipide quando raggiunge la regione perinucleare o quando si localizza nel nucleo.

L'importanza della barriera nucleare nella trasfezione è stata ulteriormente confermata quando l'efficienza di trasfezione si è vista essere dipendente dal ciclo cellulare [315, 316]. Le cellule trasfettate nella fase mitotica hanno dato trasfezioni più elevate rispetto a cellule in fase G o S. Inoltre, in cellule differenziate come le cellule nervose, la trasfezione mediata dai lipidi è bassa. La dipendenza dal ciclo cellulare della trasfezione lipidica è stata confermata bloccando le cellule con rimozione del siero, trattamenti con adipicolina e osservazioni al microscopio di popolazioni cellulari non sincronizzate [270, 287]. Da questi esperimenti è emerso che la dissoluzione della membrana nucleare dipendente dal ciclo cellulare abbatta temporaneamente l'ostacolo, pone il DNA plasmidico nel nucleo e favorisce alte espressioni transgeniche.

Poiché l'ingresso nucleare del plasmide è mediato dalle proteine e dipendente dall'energia, sono state impiegate varie strategie per trarre vantaggio da queste caratteristiche. La nuclear localization sequence (NLS), un corto peptide ricco in amminoacidi cationici, possiede l'abilità di traslocare le molecole nel nucleo quando è legato a qualsiasi macromolecola, sfruttando il trasporto mediato dall'importina. Questo

è stato confermato dalla localizzazione nucleare in cellule permeabilizzate da un detergente o dalla microiniezione di DNA nel citoplasma [317]. L'associazione di NLS con DNA plasmidico è stata ottenuta con l'associazione al DNA di proteine nucleari o attaccando gli NLS [318] al DNA plasmidico sia covalentemente che non-covalentemente [319]. Le formulazioni contenenti NLS, attaccati sia ai lipidi che al DNA, hanno aumentato la trasfezione.

Un'altra strategia interessante utilizza l'incorporazione nel plasmide di sequenze di DNA note come DNA targeting sequences (DTS). Ad esempio, l'incorporazione di una sequenza enhancer di 72 bp da SV40 [310] ha reso il plasmide nucleofilo. Questa sequenza ha consentito al plasmide di legarsi a vari fattori di trascrizione. Il legame del plasmide ai fattori di trascrizione dotati delle loro NLS ha facilitato l'ingresso nel nucleo sia in cellule in divisione che non.

Benché le strategie che impiegano NLS siano promettenti, è ancora poco chiaro come le sequenze NLS siano accessibili alle importine, in quanto queste sequenze sono caratterizzate da un eccesso di amminoacidi cationici che possono legarsi elettrostaticamente al DNA [320, 321].

RELAZIONI STRUTTURA-ATTIVITA'

Tenendo come riferimento di base la descrizione delle modificazioni della testa polare, la porzione del lipide cationico che sembra avere l'impatto maggiore sulle proprietà chimico-fisiche e sul comportamento biologico dei lipoplessi, saranno anche trattate le modificazioni di linker e porzioni idrofobiche.

LIPIDI SALI D'AMMONIO QUATERNARIO

La più vecchia e ampia classe di lipidi cationici fu inaugurata da Felgner [322], che introdusse il DOTMA. Coformulato col DOPE è stato il primo sistema di gene delivery non-virale (LipofectinTM). La struttura del DOTMA (1) comprende uno ione trimetilammonio come testa polare e due catene lipofile (oleoiliche) come porzione idrofoba. Questa struttura, che è rimasta uno standard nel campo, è stata implementata dallo stesso gruppo [323] introducendo una porzione variabile idrossialchilica sull'ammina quaternaria, che può formare legami idrogeno e interazioni elettrostatiche con differenti regioni del DNA. Lo scopo finale era una migliore compattazione del DNA, che può essere tradotta in un migliore profilo di trasfezione.

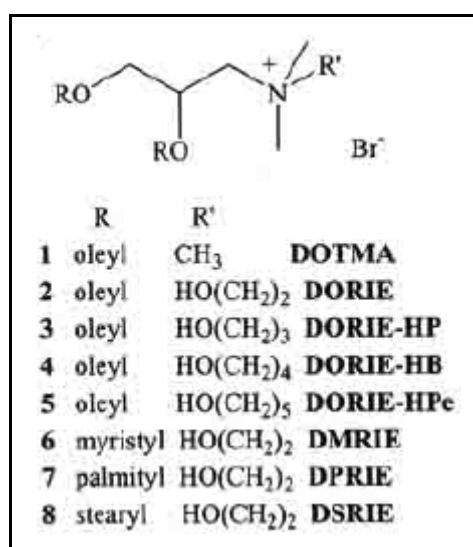


Fig. 14

I composti **2-5** sono stati sintetizzati con lunghezze diverse della catena della porzione idrossialchilica. Il composto più attivo è risultato essere il DORIE (**2**), che reca un gruppo idrossietilenico, che è stato successivamente modificato al livello della coda idrofoba per dare i lipidi **6-8**. Studi di struttura attività hanno mostrato che l'efficacia di trasfezione (testati in vitro su cellule COS-7) è stata massima per il composto dimiristoilico DMRIE (**6**) ed è diminuita per i derivati dioleoilico, dipalmitoilico, e distearilico **2, 7 e 8**.

Un limite associato all'uso di lipidi con funzionalità eterea è la loro elevata persistenza nell'organismo, che porta ad un accumulo tissutale e ad un'elevata citotossicità. Al fine di ottenere agenti biodegradabili con ridotta tossicità in vivo, Leventis e Silvius [324] hanno cambiato i linker eteri tra il backbone e le code idrofobe con linker esterei, sintetizzando il DOTAP (**9**).

Il loro approccio è stato esteso da altri gruppi, generando analoghi del DOTAP (**10-13**) [325] e congeneri (**14-16**) [326].

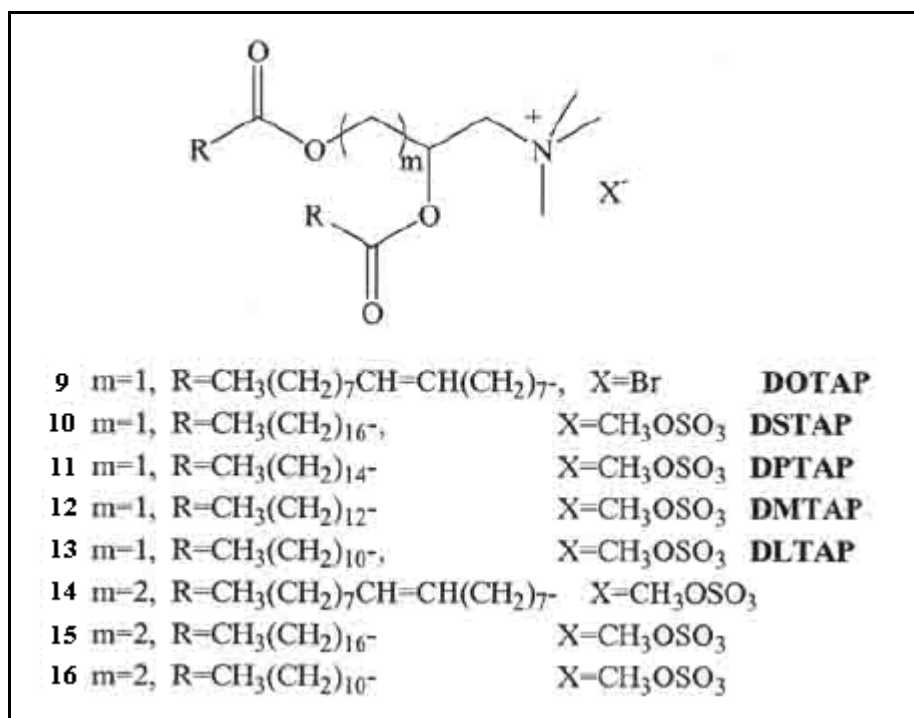


Fig. 15

Recentemente, Bennett [327] ha condotto un altro studio sulla SAR per una serie di lipidi cationici diesterei. Due serie di composti **17a-i** e **18a-i** sono stati sintetizzati per testare l'effetto di diversi parametri della testa polare (ingombro sterico, idrofilicità) e della struttura della coda sulle caratteristiche chimico-fisiche (soprattutto l'idratazione della superficie lipidica) e il loro impatto sull'attività di trasfezione in vivo, determinata dall'instillazione diretta intra-tracheale dei lipoplessi in topi BALB/c. Lo studio ha rivelato che i lipidi cationici che facilitano sia l'idratazione del dominio polare e la destabilizzazione del dominio idrofobo hanno mostrato i livelli di trasfezione più alti. Così, come regola generale, i derivati oleoilici **17a-i**, coformulati col DOPE in quantità equimolari, sono risultati più efficienti dei loro analoghi miristoilici **18a-i** nelle stesse condizioni.

Si è anche trovato che un ingombro sterico della testa polare (**17-18a, b, c, f, g**) ha aumentato l'idratazione della testa polare e di conseguenza la repulsione tra gli elementi polari dell'anfilo, con diminuzione degli effetti biologici.

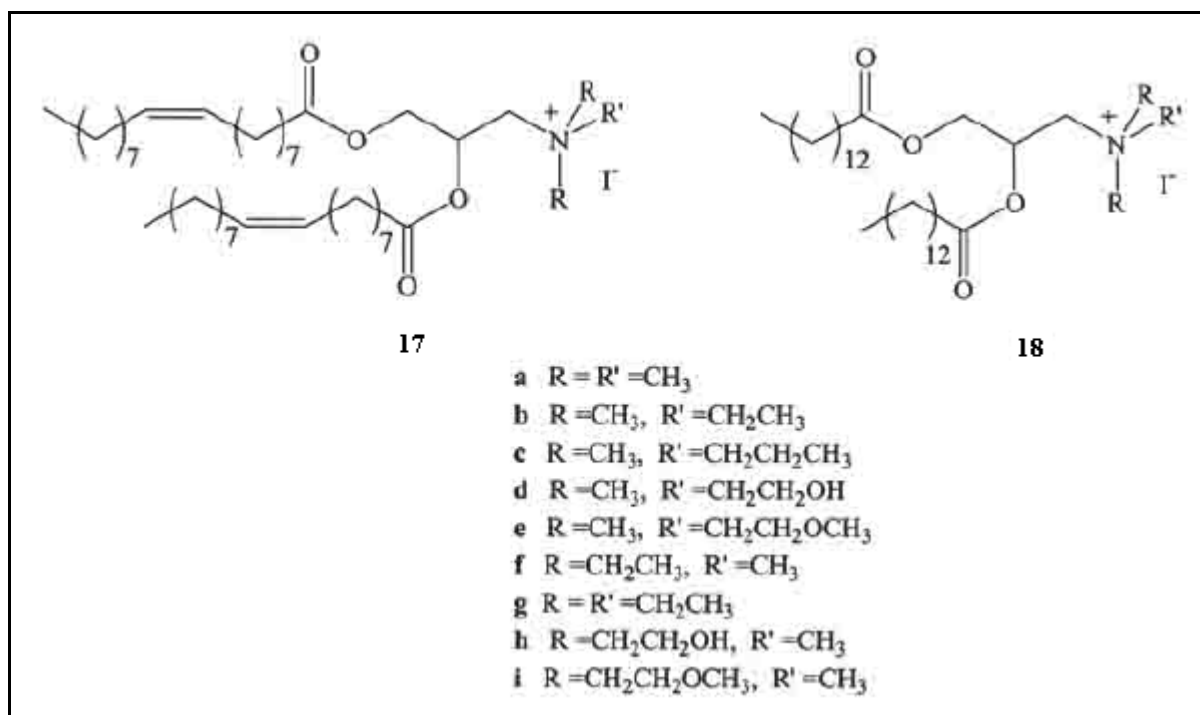


Fig. 16

Modificazioni sistematiche strutturali sono state condotte anche sulla porzione idrofobica. Pinnaduwege [328] ha usato i tensioattivi cationici DTAB (**19**), TTAB (**20**),

CTAB (**21**) (da noi usati per ottenere maggiori informazioni sul legame idrofobico) per il trasferimento genico, ma questi anfifili cationici a singola catena sono risultati tossici, anche se la loro coformulazione col DOPE ha ridotto la tossicità globale. Altri detergenti cationici con diverse strutture sono stati sintetizzati e testati [329-331], ma la loro efficienza di trasfezione è stata generalmente inferiore ai congeneri a doppia catena [332].

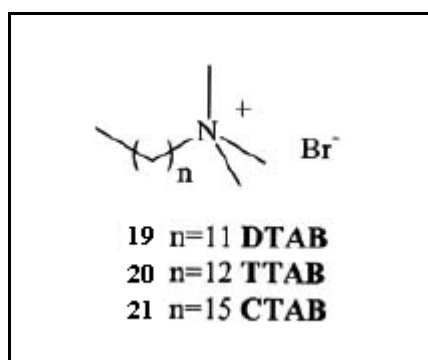


Fig. 17

Con un approccio correlato, il gruppo di Chaudhuri [331] ha investigato gli effetti dell'introduzione di un gruppo idrossietilico sulla testa polare di questa classe di lipidi cationici usando i nuovi lipidi **22-26**. Gli esperimenti di trasfezione condotti su cellule COS-1 hanno rivelato che il composto più attivo era il DHDEAB (**22**). Questo composto, contenente due gruppi idrossietilenici sulla testa polare, è stato 2-3 volte più attivo di LipofectamineTM quando coformulato col colesterolo in rapporto molare 1:1.

È degno di nota il fatto che HDEAB (**23**), che possiede solo una catena idrofobica, è totalmente privo di attività biologica, a riprova del fatto che sono necessarie sia interazioni polari che non-polari per ottenere la stabilità del lipoplesso e, di conseguenza, alti profili di trasfezione [333]. È stata testata anche l'influenza del dominio idrofobico con la sintesi di DOMHAC (**25a**) e DOHEMAB (**26a**) e di due serie di analoghi (**25b-f**, **26b-f**) [334]. I saggi di trasfezione, condotti su linee cellulari COS-1 e NIH3T3 con colesterolo 1:1 hanno rivelato che i composti **25d-f** e **26d,e** sono totalmente privi di attività.

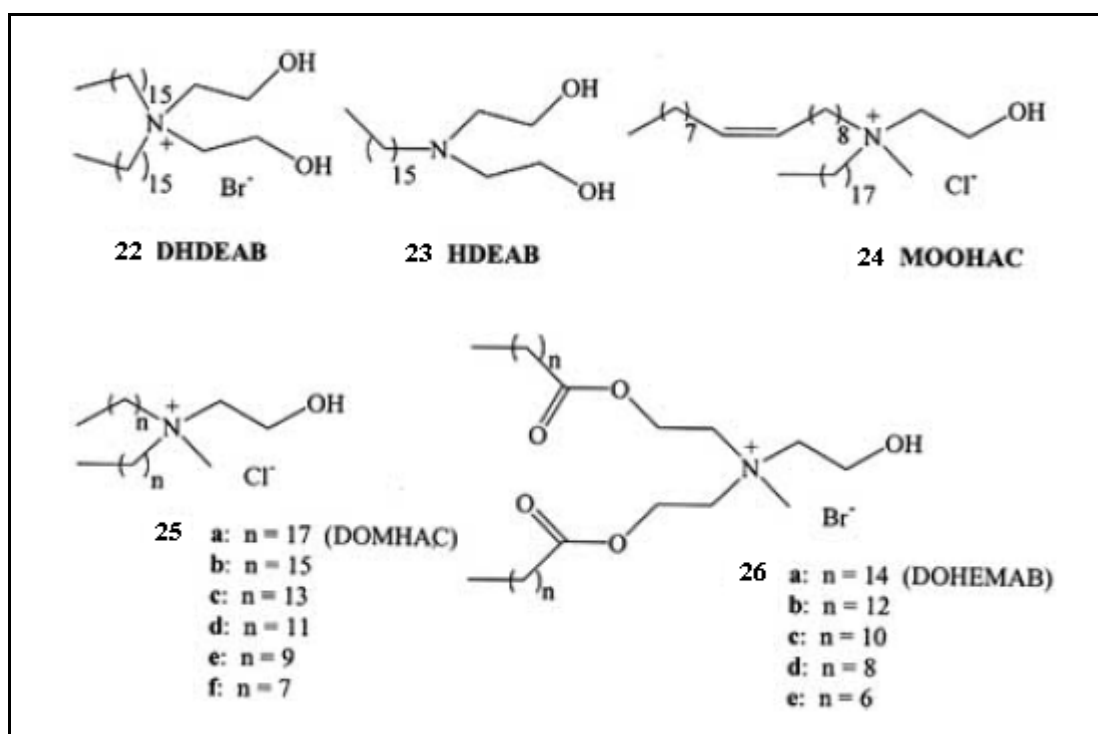


Fig. 18

Questo conferma i risultati di altri studi, secondo cui è richiesta una catena idrofobica di almeno 12-14 atomi per l'attività trasfettiva, aspetto di cui abbiamo tenuto conto nella scelta dei nostri tensioattivi. I migliori risultati sono stati ottenuti con il derivato miristilico **25c** e il miristoilico **26b**, che hanno attività trasfettiva superiore alla LipofectamineTM. Riguardo alla biodisponibilità, gli esteri **26** sono stati trovati essere meno citotossici rispetto al derivato dialchilico **25**, osservando anche che la citotossicità aumenta bruscamente quando la porzione idrofobica si accorcia a meno di 12 atomi di carbonio. Questo è probabilmente causato dall'azione litica di questi composti, simile a quella dei detergenti [334].

Quando due tensioattivi cationici vengono legati a livello della testa cationica per mezzo di uno spacer, si ottiene una nuova classe di molecole anfifiliche: i tensioattivi gemini, descritti più in dettaglio a p. 82-85 e dei quali abbiamo studiato la tipologia con due teste piridiniche.

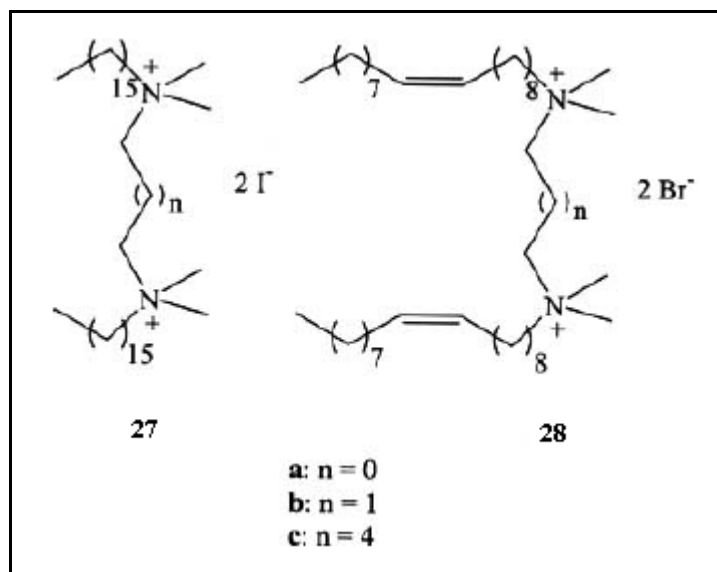


Fig. 19

Due serie di composti **27a-c** e **28a-c** sono stati sintetizzati e testati sulle cellule BHK. Questi tensioattivi cationici erano generalmente più attivi senza DOPE. In tutti i casi, si è trovato che la presenza di siero riduceva sensibilmente, se non addirittura completamente, l'efficienza trasfettiva di questi reagenti. Tra i derivati saturi, il composto più attivo è stato **27c**; **27a** e **27b** sono 3-4 volte meno efficaci, anche al variare dei rapporti lipide/DNA. L'attività biologica dei derivati oleoilici **28** è risultata più uniforme, con profili simili per **28b** e **28c**, mentre **28a** era leggermente meno attivo[335, 336].

Una classe molto efficace di lipidi cationici utilizza una porzione idrofobica colesterolica [332, 333, 337-339]. Usata per la prima volta da Leventis e Silvius [324] nella struttura dei lipidi biocompatibili ChoTB (**29**) e ChoSC (**30**), questa caratteristica è diventata rapidamente uno standard dopo l'introduzione di DC-Chol (**31**) da parte del gruppo di Huang [340]. L'ammina terziaria, protonata a pH fisiologico, dà meno effetti tossici rispetto ai composti di ammonio quaternario a causa di una ridotta interazione con la protein chinasi C [341].

Un'altra importante caratteristica nella struttura di questo tipo di anfifili è la natura del linker tra la testa cationica e la porzione colesterolica. Al fine di testare l'impatto di questo linker, Ghosh [342] ha sintetizzato i composti **32-34**, recanti uno spacer estereo o etero e li ha testati, assieme al composto **35**, [343] su linee cellulari COS-7: non si è osservato nessun miglioramento sostituendo il gruppo uretanico con uno estereo. Al

contrario, la sostituzione di un gruppo uretanico con uno etero ha portato ad un aumento di 6 volte della trasfezione, effetto simile a quello della LipofectamineTM nelle stesse condizioni.

Due parametri sono importanti nel considerare il contributo del linker: l'effetto elettronico del linker sulla testa polare e la sua stabilità intrinseca. Un gruppo fortemente elettronattrattore per effetto induttivo ha diverse conseguenze sull'efficienza di trasfezione, a seconda della struttura della testa polare. Per i composti cationici questo effetto diminuisce la densità elettronica sulla testa polare aumentando la carica netta positiva e quindi le interazioni DNA-lipide, la stabilità del lipoplesso, e l'efficienza di trasfezione. Questo è confermato dai risultati sperimentali: i composti con linker carbonato sono più attivi di quelli con linker esterei (**40**>**37**, **41**>**38**), in quanto il gruppo carbonato ha un effetto elettronattrattore più intenso del gruppo estereo. Si ha un'eccezione quando si confrontano linker eteri ed esteri.

Gli esteri dovrebbero agire meglio degli eteri secondo questa teoria. Tuttavia, la stabilità intrinseca dello spacer è l'opposto e il bilancio totale è, come visto in precedenza, a favore del gruppo etero, che conferisce anche una maggiore stabilità in presenza di siero. Inoltre, la biocompatibilità dei due linker è diversa: quella esterea è più elevata. I composti **36-47** non hanno mostrato effetti citotossici collaterali. Un buon compromesso può essere l'uso di un linker amidico, che ad un forte effetto elettronattrattore unisce una buona stabilità e biocompatibilità [337].

Per i composti pro-cationici (protonati a pH fisiologico) **35**, **36**, **39**, **42-46**, la minore densità elettronica sull'atomo di azoto (dovuta all'effetto induttivo elettronattrattore dello spacer) abbassa la capacità della testa polare di protonarsi: più grande è l'effetto elettronattrattore, più bassa è l'attività di trasfezione. Infatti, i composti **36**, **44** e **46** mostrano attività di trasfezione molto basse, comportamento che può essere collegato al forte effetto elettron-accettore dei linker acetilico o succinilico. L'abbassamento di questo effetto, usando un linker amidico al posto di uno estereo, porta ad un aumento di 4 volte dell'efficienza di trasfezione (**43**>**42**, **45**>**44**).

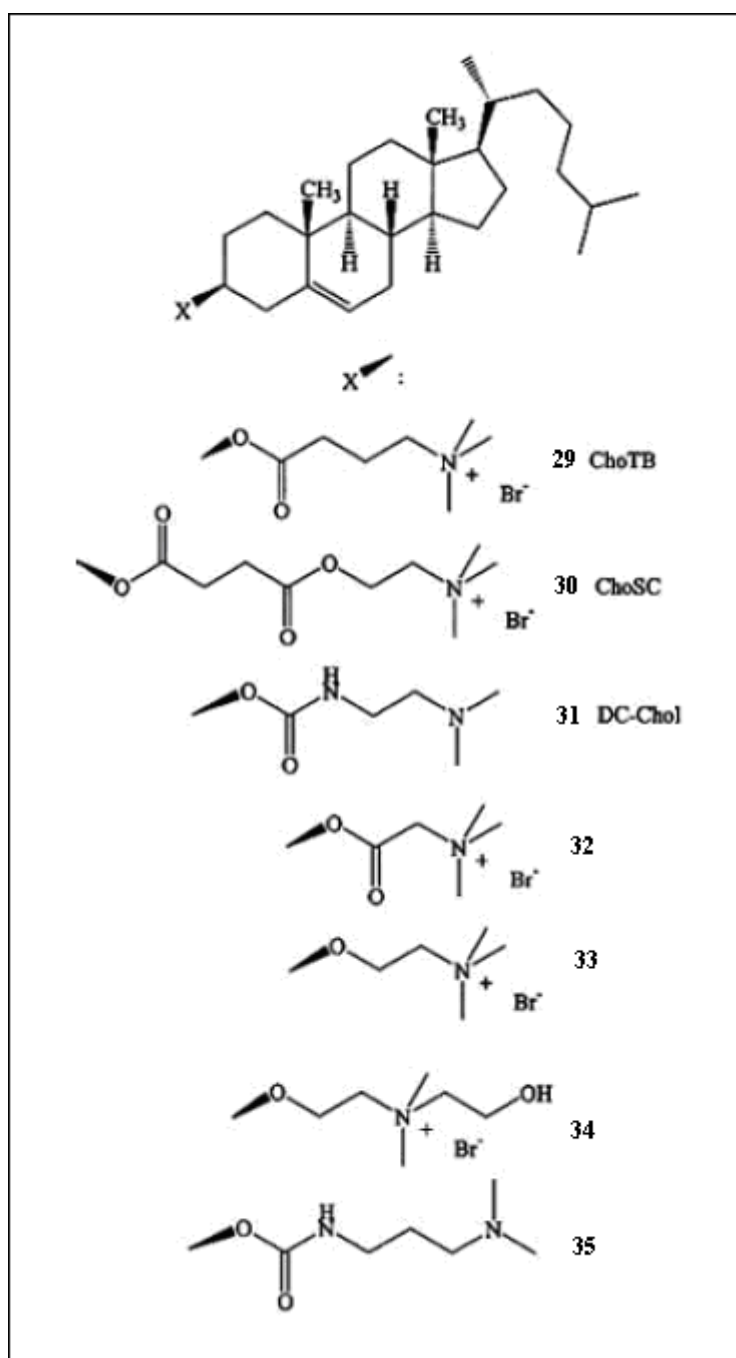


Fig. 20

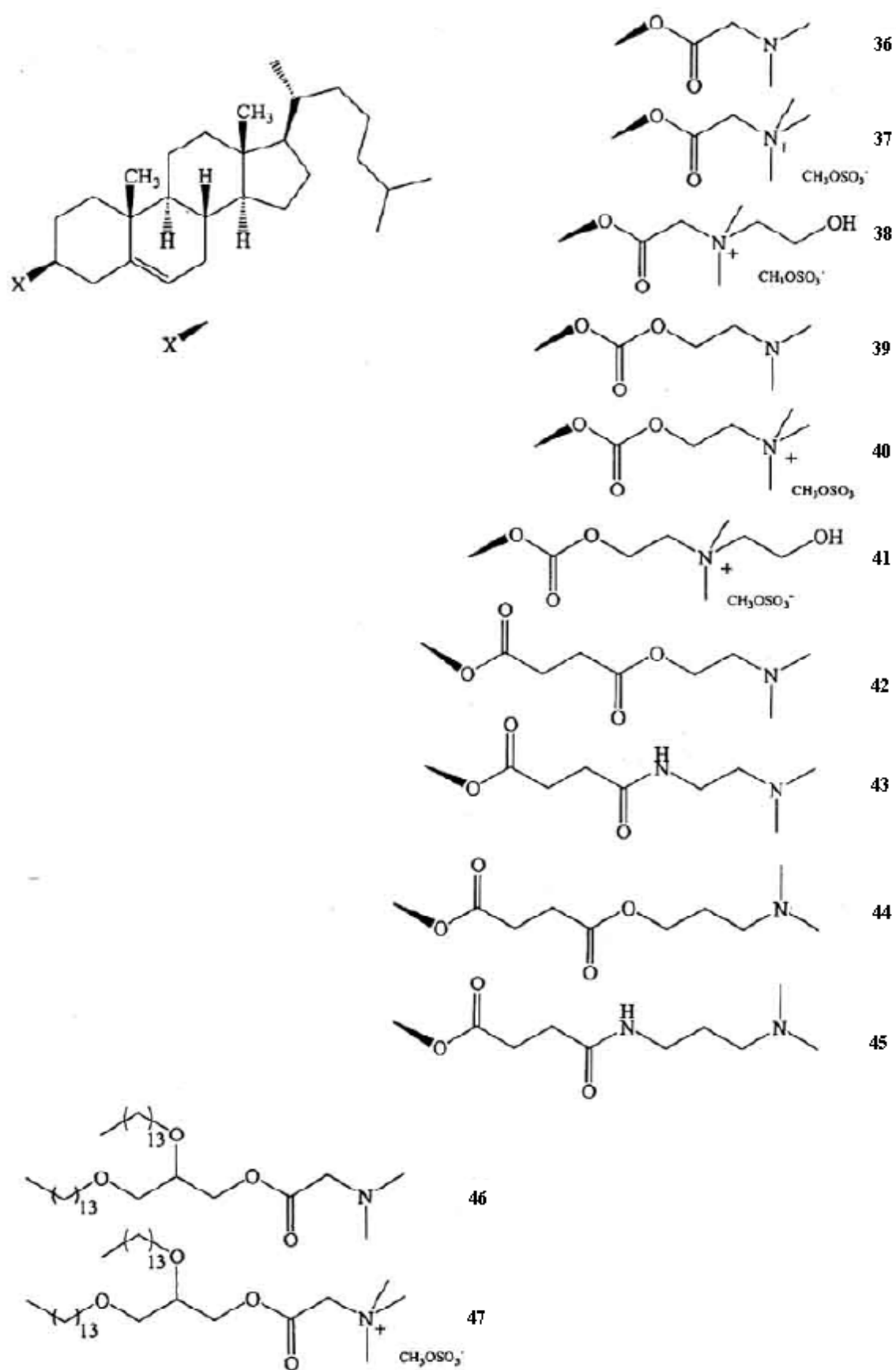


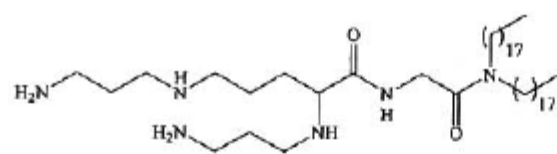
Fig. 21

LIPOPOLIAMINE

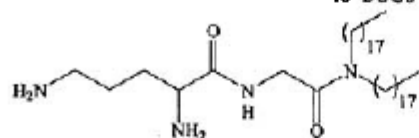
Seguendo l'osservazione che le poliamine naturali come la spermina e la spermidina erano in grado di compattare efficacemente il DNA, e che il complesso aveva una dimensione nel range degli aggregati lipidici, Behr [344] ha introdotto le lipopoliamine come una nuova classe di molecole che interagiscono con il DNA. Attaccando una porzione idrofobica alle molecole di spermina per mezzo di uno spacer glicilico, ha sintetizzato il DOGS (**48**), il primo vettore di trasfezione recante una porzione poliaminica [345]. Questo lavoro iniziale è stato seguito da altri sviluppi [332, 337, 339].

Le lipopoliamine sono composti pro-cationici in grado di compattare il DNA più efficientemente dei lipidi di ammonio quaternario [332, 337, 339]. A causa della loro struttura e del loro meccanismo d'azione, esse non richiedono un lipide helper, e mostrano in tal modo bassi livelli di tossicità.

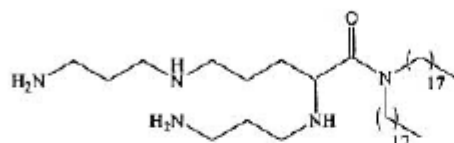
Seguendo lo stesso design usato per il DOGS (**48**), il gruppo di Behr ha espanso la gamma di questi agenti trasfettivi, usando diverse teste polari, spacers o catene idrofobiche [330]. I composti **49-52** sono esempi rappresentativi. Recentemente, Byk [346], usando una tecnica di sintesi su fase solida [347], ha condotto uno studio di SAR sistematico per definire l'impatto di ciascun elemento strutturale dei congeneri del DOGS sull'efficienza di trasfezione. Il primo set di composti **53-56**, ha rivelato che la miglior configurazione della testa polare era lineare: quando testato sulle cellule HeLa, il **56** è stato 5-10 volte più attivo dei composti con teste ramificate (**53**), globulari (**54**), o a forma di T (**55**). L'influenza del linker è stata testata rimpiazzando lo spacer acetilico di **56** con uno butirrico o inserendo un'altra unità glicilica o amminoesanoilica tra la porzione idrofobica ed il linker acetilico. Non sono stati osservati significativi miglioramenti nella trasfezione, così che il composto **56** è stato mantenuto come riferimento nel successivo studio sull'impatto dell'ancora lipidica sull'attività biologica. Sono state introdotte catene lipofile con un numero di atomi di carbonio compreso tra 12 e 18, ottenendo i composti **57-59**. I saggi di trasfezione hanno mostrato che, come atteso, la porzione idrofobica ha un effetto fondamentale: accorciando la catena alifatica da 18 a 12 atomi di carbonio, si genera una brusca diminuzione dell'attività biologica parallelamente ad un aumento di tossicità.



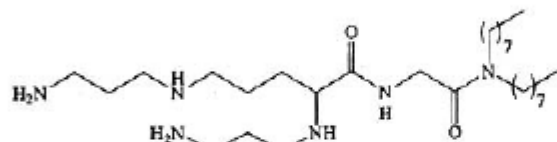
48 DOGS



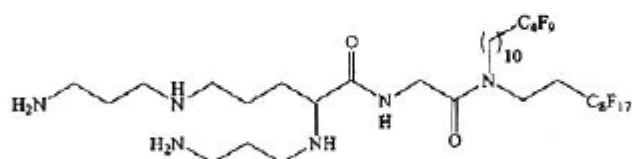
49



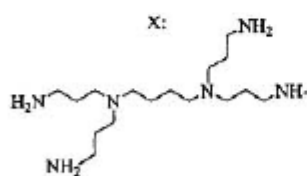
50



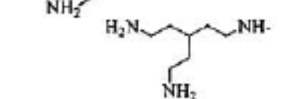
51



52



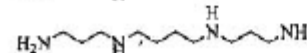
53



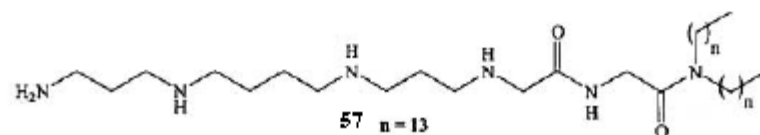
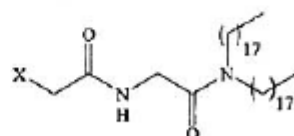
54



55



56



57 n = 13

58 n = 12

59 n = 11

Fig. 22

L'uso della porzione colesterolica come ancora idrofobica nelle lipopoliamine è iniziata con l'introduzione di DC-Chol (**31**) da parte del gruppo di Huang [340]. Con questa testa polare pro-cationica protonata a pH fisiologico e con il linker carbammico, DC-Chol collega le due principali classi di agenti trasfettivi – lipidi di sali d'ammonio quaternario e lipopoliamine.

Sostituendo la porzione N,N-dimetiletilendiaminica con la spermina, Lee [348] ha ottenuto la poliamina colesterolica **60** (lipide 67) a forma di T, risultata essere un centinaio di volte più efficiente dei lipidi cationici usati precedentemente quando testata in vivo per il trasferimento del cDNA del CFTR della fibrosi cistica.

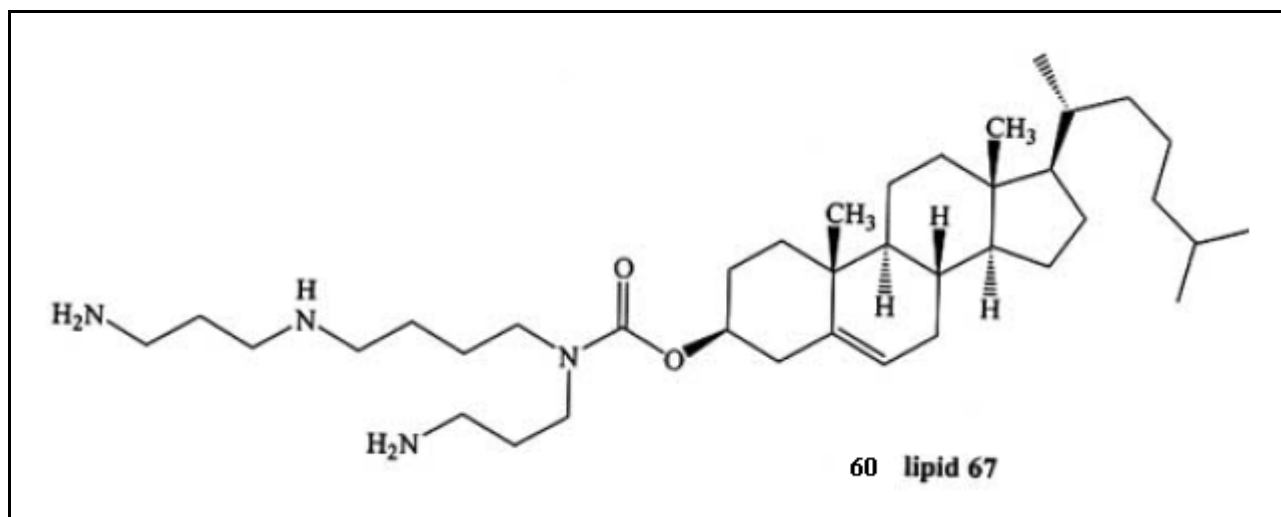
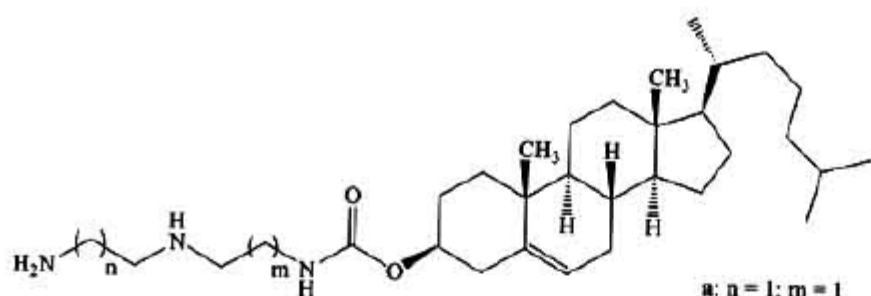


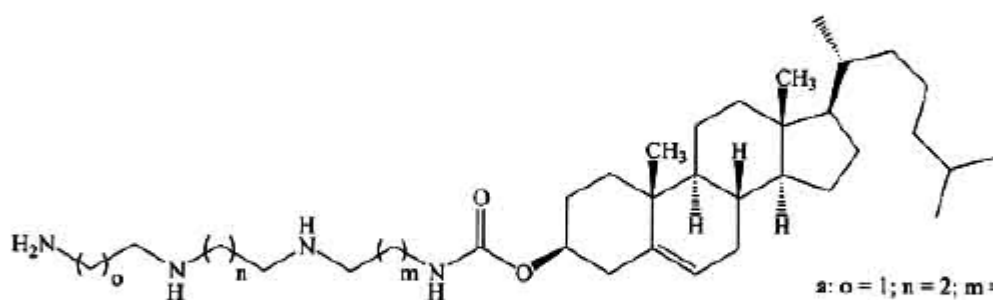
Fig. 23

Più recentemente, il gruppo di Miller ha sintetizzato vettori DC-Chol di seconda generazione [349]: le triamine **61a-f**, le tetramine **62a-f**, le pentamine **63a-c**. Quando coformulate col DOPE in rapporti 1:1 o 1:2, **61e**, **62a** e **63b** hanno mostrato alti livelli di trasfezione in vitro (fino a 4 volte di più dello standard DC-Chol /DOPE) su linee cellulari CFT.



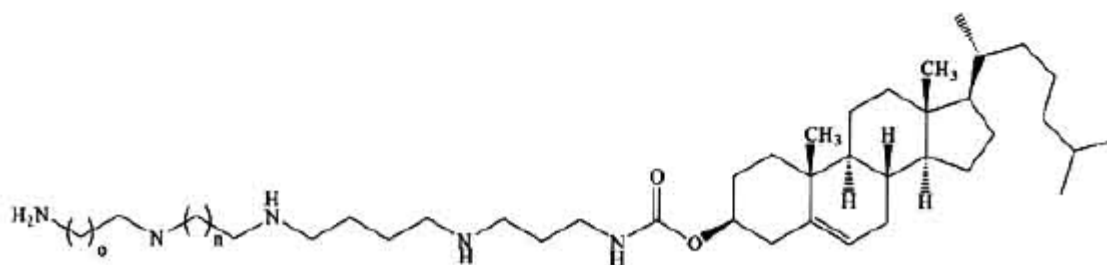
61

- a: $n = 1; m = 1$
- b: $n = 2; m = 1$
- c: $n = 3; m = 1$
- d: $n = 1; m = 2$
- e: $n = 2; m = 2$
- f: $n = 3; m = 2$



62

- a: $o = 1; n = 2; m = 1$
- b: $o = 2; n = 1; m = 1$
- c: $o = 2; n = 3; m = 1$
- d: $o = 1; n = 2; m = 2$
- e: $o = 2; n = 2; m = 2$
- f: $o = 2; n = 3; m = 2$



63

- a: $o = 1; n = 2$
- b: $o = 2; n = 2$
- c: $o = 2; n = 3$

Fig. 24

LIPIDI CATIONICI CON PORZIONI DI AMMONIO QUATERNARIO E POLIAMINICHE

Le due principali classi di agenti trasfettivi – lipidi di sali d’ammonio quaternario e lipopoliamine – mostrano diversi profili di trasfezione a causa delle loro particolarità strutturali, che forniscono approcci peculiari alle barriere del delivery associate al processo di trasfezione. Con la speranza di ottenere un effetto sinergico, queste caratteristiche strutturali sono state combinate a dare lipidi cationici di tipo misto [337, 339]. Il primo rappresentante di questa classe è stato il DOSPA (**64**), coformulato col DOPE nel sistema LipofectamineTM [350]. Sebbene stabile e molto efficiente sia in vitro [351] che in vivo [352], il suo impiego clinico è stato ostacolato a causa di una tossicità relativamente elevata. Di conseguenza, lo stesso gruppo di ricerca [353] ha testato un altro approccio, basato sulla buona efficienza di trasfezione ottenuta col DMRIE (**6**). Essi hanno rimpiazzato l’idrossile del DMRIE con uno amminico, sperando che questo avrebbe mantenuto o aumentato l’abilità del vettore di stabilire legami idrogeno col DNA, aumentato la carica netta positiva del lipide e consentito interazioni bidentate tra l’azoto quaternario, l’ammina primaria e le strutture polianioniche dell’acido nucleico. Il risultante β AE-DMRIE (**65**) ha esibito efficienze di trasfezione maggiori del DMRIE in varie linee cellulari. Inoltre, questi risultati biologici sono stati ottenuti senza colipide, suggerendo un diverso meccanismo d’azione, simile a quello delle lipopoliamine. Questa ipotesi è stata supportata da immagini AFM, che hanno rivelato diversi tipi di lipoplessi per β AE-DMRIE rispetto al DMRIE [353].

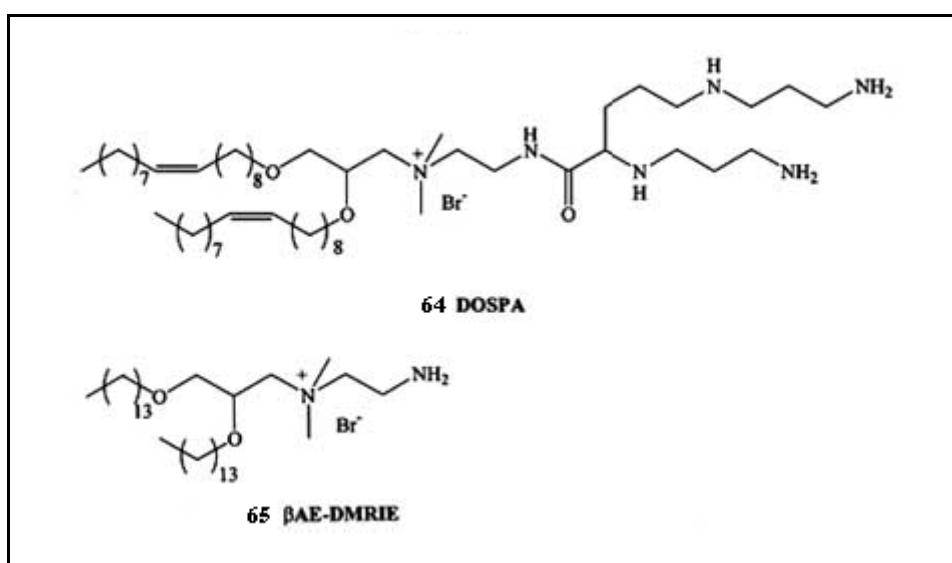


Fig. 25

Ottimizzazioni successive hanno generato GAP-DLRIE (**66**) [354]. Benché queste strutture siano molto simili, le caratteristiche chimico-fisiche e biologiche cambiano drasticamente, dimostrando interazioni diverse lipide-lipide e lipide-DNA se confrontati con β AE-DMRIE. Infatti, contrariamente ad **65**, GAP-DLRIE ha mostrato la miglior efficienza di trasfezione se coformulato con il DOPE in rapporto 3:1 per esperimenti in vitro su cellule CFT1 e in rapporto equimolare per test in vivo (somministrazione intratracheale/intranasale in topi BALB/c). Bisogna notare che GAP-DLRIE ha dimostrato di agire in vivo almeno 10 volte più efficientemente di altri metodi classici di trasfezione disponibili, incluso DOTMA, DOTAP, DMRIE, DDAB, DC-Chol o i congeneri della classe del DOSPA (il secondo più efficiente). Inoltre, esperimenti di trasfezione con dosi ripetute, hanno indicato che si può raggiungere un'espressione di 2-3 settimane, senza danni da parte della risposta immune [354].

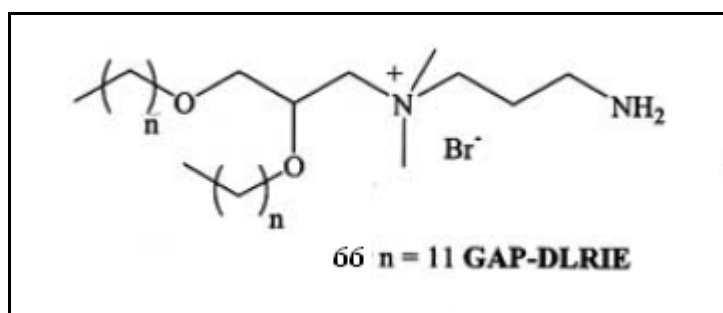


Fig. 26

LIPIDI SALI DI AMIDINIO E GUANIDINIO

Un'alternativa per ottenere vettori di trasfezione con una testa polare costantemente carica positivamente è quella di usare gruppi amidinici o guanidinici invece di gruppi ammonio quaternario. Il gruppo guanidinico presenta caratteristiche interessanti: rispetto al gruppo amminico rimane protonato in un più ampio intervallo di pH (pK_a di 13.5); stabilisce forti legami idrogeno con gli anioni fosfato, fatto che si può tradurre con una maggiore forza di legame al DNA; è anche in grado di sviluppare legami idrogeno con le basi nucleiche, specialmente guanina; appare in varie sostanze naturali e la sua biocompatibilità è ottima [355]. I primi tentativi sono stati fatti da Ruyschaert [356], che ha introdotto diC₁₄amidina (**67**) e dal gruppo di Lehn che ha proposto due derivati del colesterolo: BGSC (**68**) e BGTC (**69**) [355]. Si trovò che BGTC era molto efficiente nel trasfettare molte linee cellulari (con risultati simili o leggermente superiori

a quelli del DOGS (**48**)) quando usato con un colipide in soluzione micellare. Analoghi risultati soddisfacenti sono stati ottenuti con BGSC e BGTC quando coformulati col DOPE in rapporto 3:2. Ulteriori indagini in vivo [357], per mezzo di instillazione intratecale di liposomi BGTC/DOPE in topi Swiss OF1 o via aerosol [358], hanno confermato il potenziale di questo tipo di lipidi cationici per la terapia genica del polmone.

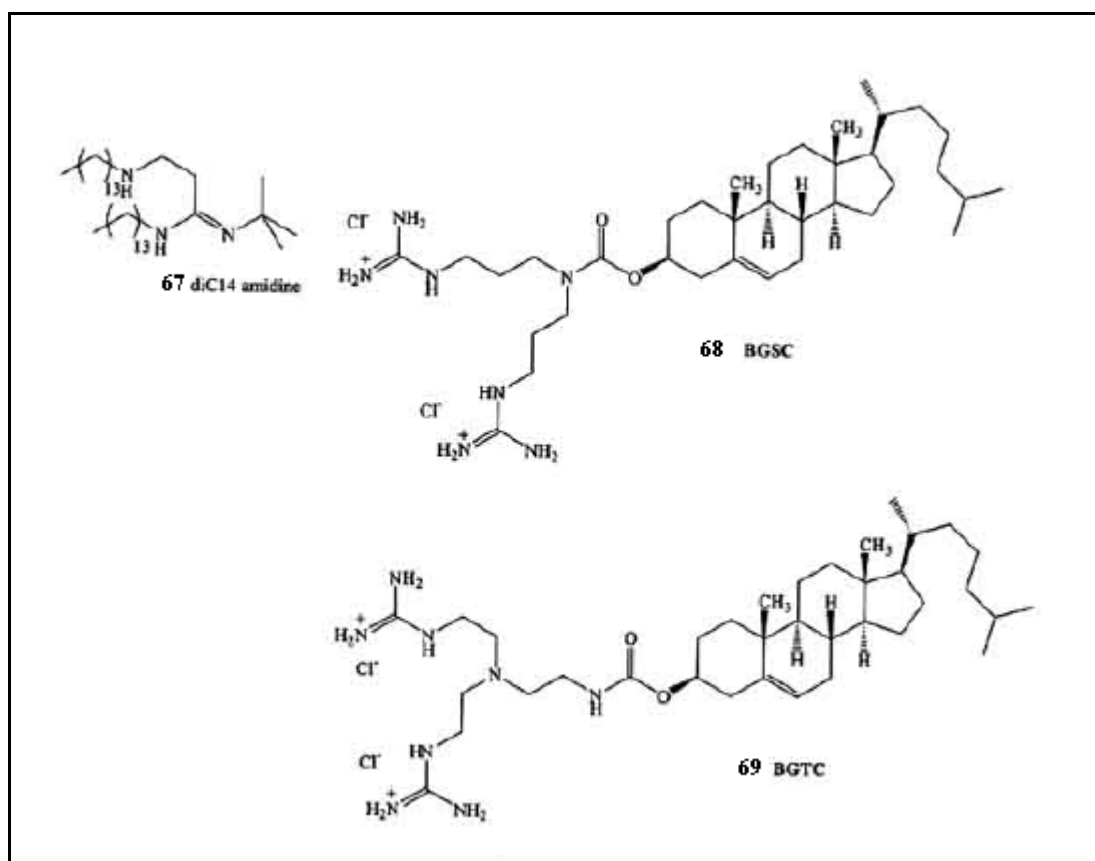


Fig. 27

Più recentemente, Patel [359] ha riportato un'efficiente trasfezione genica con il tensioattivo bisguanilato BGDA (**70**), contenente una coda idrofobica diinica. Questa nuova porzione idrofobica ci si aspettava conferisse un alto grado di fluidità e di destabilizzazione della membrana cellulare a causa delle sue particolarità strutturali con due estremità cariche posizionate lontane l'una dall'altra. BGDA è risultato efficiente del trasfettare cellule HeLa quando coformulato col DOPE in rapporto 3:4, anche in presenza di siero. Tuttavia, anche in questo caso si sono incontrati i problemi citotossici associati agli anfifili simili ai detergenti.

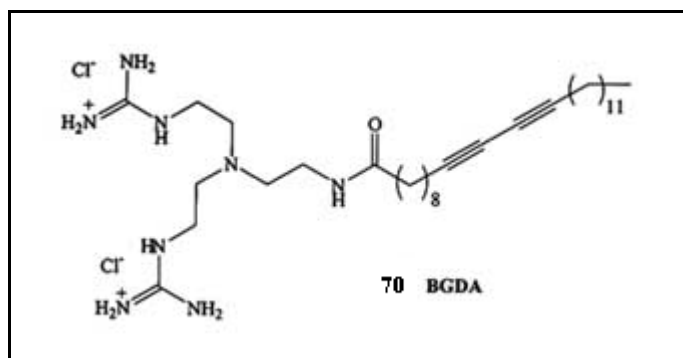


Fig. 28

Per ottenere lipidi cationici biocompatibili, Heyes [360] ha sintetizzato una serie di lipidi cationi peptidilici recanti un gruppo guanidilico derivato dall'arginina (**71**), oltre ad analoghi della lisina (**72**), dell'istidina (**73**) e del triptofano (**74**). I risultati dei saggi di trasfezione su cellule V79 e HT29 indicano che, in questi casi, lipidi più corti hanno una migliore performance di quelli più lunghi.

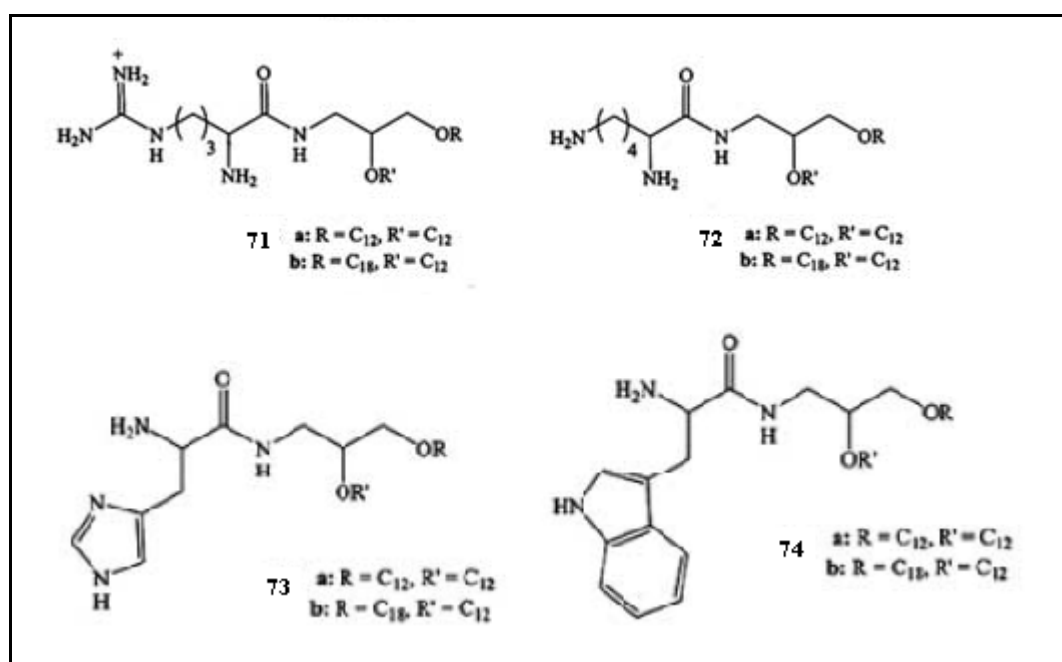


Fig. 29

LIPIDI CATIONICI ETEROCICLICI

L'analogia con sali d'ammonio quaternario rivela la possibilità di ottenere lipidi cationici eterociclici con buona attività biologica e ottima biocompatibilità. Inoltre, gli eterocicli aromatici carichi positivamente hanno anelli planari con carica delocalizzata, cosa che può avere un grande impatto sulle proprietà chimico-fisiche come l'idratazione del lipide e l'assemblaggio supramolecolare [327, 361].

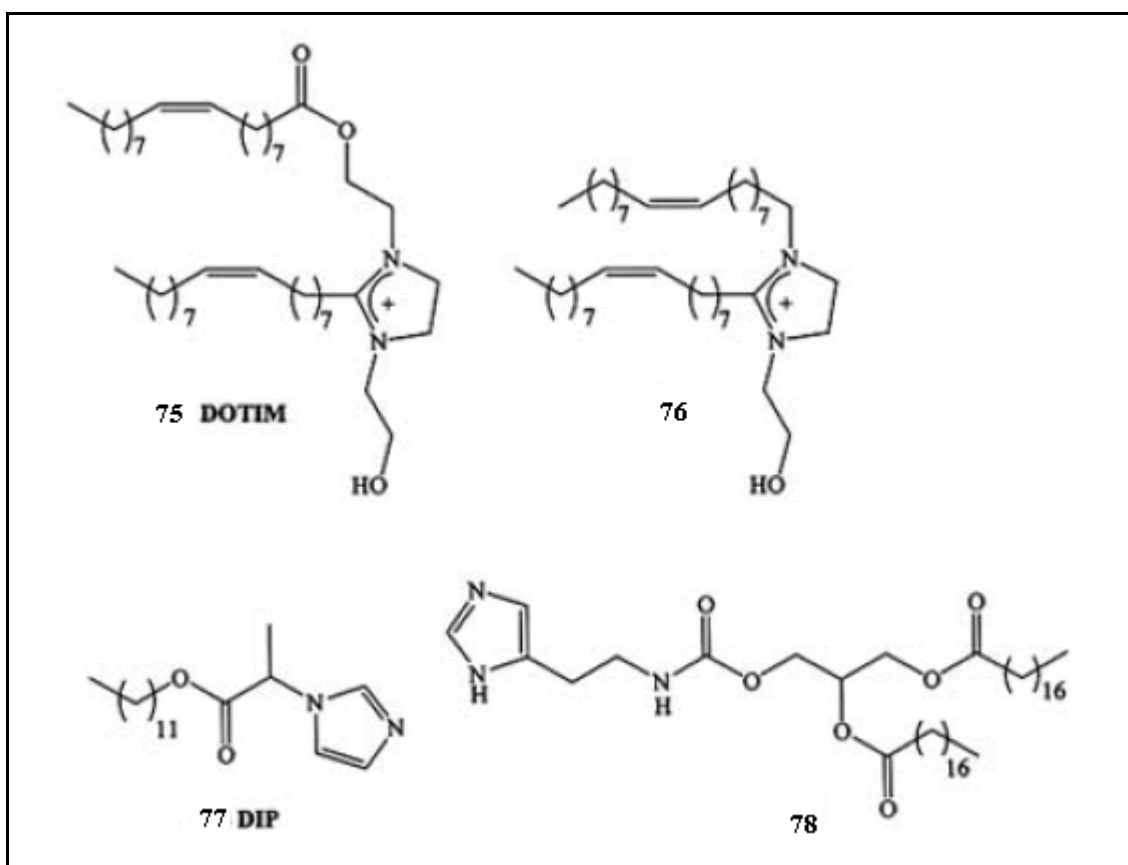


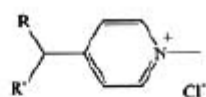
Fig. 30

Solodin [362] ha introdotto i lipidi cationici di tipo imidazolico sintetizzando il DOTIM (75) e derivati. Ulteriori sviluppi furono proposti dalla Megabios Corporation, che lanciò un programma per ottenere lipidi a base imidazolica con bassa tossicità [363]. Il più promettente è sembrato essere il composto **76**, che ha mantenuto l'attività trasfettiva del DOTIM (75) quando coformulato col colesterolo e col DLPE (dilauroilfosfatidiletanolamina). Un derivato imidazolico protonato a pH fisiologico, il DIP (77), è stato disegnato [364] per aumentare selettivamente il rilascio di DNA incapsulato quando usato come colipide in esperimenti di trasfezione mediata da

liposomi. Questo approccio si basava sull'idea di mimare tensioattivi biodegradabili sensibili al pH, che possiedono linker facilmente scindibili (soprattutto esterei). Più recentemente, l'Alza Corporation [365] ha impiegato con successo il derivato gliceril-imidazolico **78** per la trasfezione in vitro di linee cellulari 2E9 di tumore polmonare umano.

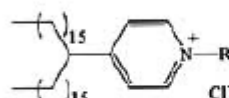
Engberts, Hoekstra, Meekel ed i loro collaboratori hanno sintetizzato e testato per il gene delivery una grande varietà di tensioattivi anfifilici piridinici del tipo **79-84** [366]. I migliori risultati biologici sono stati ottenuti con i composti N-metil piridinio **79** [367]. I risultati sperimentali mostrano che l'aumentare nella lunghezza della catena idrofobica da 12 a 18 atomi di carbonio genera una curva a campana per l'attività trasfettiva, con un picco per il derivato miristilico, in accordo con altri studi [323, 334]. Quando doppi o tripli legami sono stati inseriti nella struttura della porzione idrofobica (**79e-k**), si è potuto ottenere un ulteriore aumento, a riprova di quanto già scoperto [323, 327, 359, 368]. Il composto più attivo della serie, il derivato dioleoilico **79g**, è stato trovato essere 6 volte più attivo di LipofectinTM. Questo effetto diminuisce della metà quando si passa all'isomero *trans* **79h** o ai congeneri acetilenici come **79k** [367]. È degno di nota il fatto che la citotossicità è bassa: questi anfifili piridinici mostrano scarsi o nessun effetto tossico nei confronti delle cellule esaminate, caratteristica che ci ha spinto ad utilizzare anfifili cationici simili.

È stato anche studiato l'effetto della modificazione della testa polare sull'efficienza di trasfezione. Un aumento della lunghezza della catena N-alchilica da 1 a 5 atomi di carbonio (da **79c** a **80a-c**) si è trovata essere influente, con il massimo dell'attività biologica a 3 atomi di carbonio. Tuttavia l'effetto è stato di bassa entità se confrontato con l'influenza della porzione idrofobica. L'introduzione di un gruppo addizionale carico positivamente sembra avere un effetto molto negativo sull'efficienza di trasfezione. Un effetto simile è stato ottenuto nel caso del composto **83**, in cui l'orientazione del gruppo piridinico è invertita. I tensioattivi gemini **84** hanno dato performance simili o inferiori rispetto al monomero.



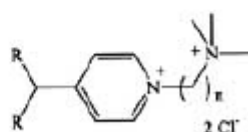
79

R	R'
a: C ₁₂ H ₂₅	C ₁₂ H ₂₅
b: C ₁₄ H ₂₉	C ₁₄ H ₂₉
c: C ₁₆ H ₃₃	C ₁₆ H ₃₃
d: C ₁₈ H ₃₇	C ₁₈ H ₃₇
e: C ₁₈ H ₃₇	C ₁₈ H ₃₅
f: C ₁₈ H ₃₅ (85% cis)	C ₁₈ H ₃₅ (85% cis)
g: C ₁₈ H ₃₅ (100% cis)	C ₁₈ H ₃₅ (100% cis)
h: C ₁₈ H ₃₅ (100% trans)	C ₁₈ H ₃₅ (100% trans)
i: C ₁₆ H ₂₉ (8-yne)	C ₁₆ H ₂₉ (8-yne)
j: C ₁₆ H ₂₉ (9-yne)	C ₁₆ H ₂₉ (9-yne)
k: C ₁₈ H ₃₃ (9-yne)	C ₁₈ H ₃₃ (9-yne)



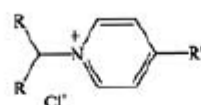
80

a: R = CH ₃ CH ₂ CH ₂
b: R = CH ₃ (CH ₂) ₂ CH ₂
c: R = CH ₃ (CH ₂) ₃ CH ₂



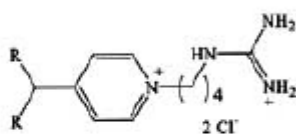
81

a: R = C ₁₆ , n=3
b: R = C ₁₆ , n=4
c: R = C ₁₆ , n=5
d: R = C ₁₈ , n=4

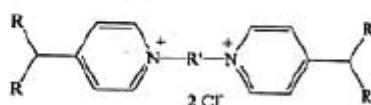


83

R	R'
a: C ₁₆ H ₃₃	H
b: C ₁₆ H ₃₃	CH ₃
c: C ₁₈ H ₃₇	H
d: C ₁₈ H ₃₇	CH ₃



82



84

a: R = C ₁₆ H ₃₃	R' = CH ₂ CH ₂ CH ₂
b: R = C ₁₆ H ₃₃	R' = CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₂
c: R = C ₁₈ H ₃₇	R' = CH ₂ (CH ₂) ₃ CH ₂
d: R = C ₁₈ H ₃₇	R' = CH ₂ (CH ₂) ₄ CH ₂

Fig. 31

ASPETTI FARMACOCINETICI

BIODISTRIBUZIONE

In tutti gli studi sulla somministrazione intravenosa di complessi lipide/DNA, l'espressione genica è apparsa in tutti gli organi principali, inclusi cuore, polmone, fegato, milza e rene [208, 211, 369-372]. Il polmone è sempre l'organo con il più alto livello di espressione genica e le sue cellule endoteliali sono il principale tipo di cellule trasfettato.

Dopo 10 minuti dalla somministrazione, meno del 2% dei lipoplessi rimangono nel sangue. Il periodo di tempo critico che occorre al DNA per entrare nelle cellule polmonari è di 60 minuti dopo somministrazione sistemica [373]. Dopo questo primo passaggio di *uptake* nei polmoni, il fegato rimane l'organo principale per l'eliminazione poiché i lipoplessi si ridistribuiscono dai polmoni al fegato dopo 60 minuti dall'iniezione [374]. Nonostante la maggior parte dei lipoplessi siano ritrovati nel fegato, molte delle particelle entrano nelle cellule di Kupffer piuttosto che negli epatociti.

L'INTERAZIONE CON IL SIERO RIDUCE LA BIODISPONIBILITA'

Le barriere sistemiche sono i fattori che ostacolano il trasporto specifico dei vettori di trasfezione agli organi malati in seguito a somministrazione sistemica. Talvolta la progettazione di lipoplessi efficienti per la somministrazione sistemica deve fronteggiare il delivery di geni terapeutici a cellule target lontane. Partendo dal sito di iniezione fino a raggiungere la cellula bersaglio, i lipoplessi devono confrontarsi con l'ambiente delle barriere biologiche, inclusi i componenti del sistema circolatorio come proteine sieriche, elementi cellulari, eritrociti, piastrine, ma anche DNAsi endogene, antigeni e sistema del complemento. L'instabilità dei complessi lipide/DNA iniettati nei fluidi biologici, contenenti proteine sieriche e alte concentrazioni saline, è il problema principale nel delivery sistemico. Come sappiamo, nel preparare i lipoplessi è usato un eccesso di lipide cationico così che la carica positiva globale possa assicurare un efficiente uptake cellulare endocitico per mezzo delle superfici cellulari cariche negativamente. Sfortunatamente, questo eccesso di cariche positive dei lipoplessi favorisce anche le loro interazioni elettrostatiche non-specifiche con le proteine

albuminiche idrofobiche del siero cariche negativamente e con componenti cellulari come lipoproteine a bassa densità, macroglobuline, fibrinogeno, eparina e innumerevoli altre molecole sistemiche cariche negativamente [258, 375-380]. Si formano grossi aggregati che sono intrappolati nei capillari endoteliali dei polmoni o eliminati dal sistema reticolo endoteliale (RES).

Questo “effetto di primo passaggio” si origina quindi per la deposizione dei lipoplessi aggregati ai componenti del siero all'interno della microvascolatura polmonare, il primo letto capillare che i lipoplessi incontrano dopo la somministrazione intravenosa.

Una tale destabilizzazione sistemica dovrebbe, in linea di principio, essere trattabile con una somministrazione locoregionale di lipoplessi. Tuttavia, la somministrazione locale direttamente ai siti malati non è fattibile per il targeting a siti remoti o inaccessibili. Da qui il bisogno di sistemi liposomiali target-specifici in grado di oltrepassare le barriere sistemiche.

Sono state elaborate varie strategie per superare questo problema; le tre principali sono descritte di seguito.

Yang e Huang [376] hanno studiato il ruolo del rapporto di carica del liposoma DC-Chol/DNA nell'inibizione della transfezione da parte del siero. Hanno trovato che l'effetto inibitorio del siero può essere evitato aumentando il rapporto di carica liposoma cationico/DNA. Una spiegazione possibile è che, per un più alto rapporto di carica, l'effetto di neutralizzazione del siero è saturato dai lipidi in eccesso, consentendo a qualche complesso cationico liposoma-DNA di legarsi alla superficie cellulare. In un altro studio, gli stessi autori hanno segnalato che la sensibilità al siero del complesso cationico liposoma-DNA può anche essere inibita prolungando il periodo di incubazione del complesso [380], probabilmente perché il complesso lipide-DNA subisce nel tempo un processo di maturazione che lo ha reso totalmente resistente al siero.

Solitamente, il DOPE è utilizzato come lipide helper nella composizione del liposoma cationico. Crook [381] ha incluso il colesterolo anziché il DOPE nei liposomi di DOTAP e ottenuto livelli significativi di transfezione in vitro a concentrazioni di siero inferiori all'80%. Questi autori hanno suggerito che l'inclusione di colesterolo nella membrana potesse generare uno stato cristallino altamente ordinato, in grado di aumentare la stabilità dei complessi se esposti al siero. Smyth Templeton [208] e Liu [375] hanno segnalato una buona protezione del DNA e un delivery efficace nel tessuto

usando lipoplessi a base di DOTAP e colesterolo, dopo somministrazione sistemica nel topo. In uno studio più recente di Li [379], è stata stabilita una correlazione fra la velocità di disintegrazione dei vettori lipidici esposti al siero e la loro efficienza di trasfezione in vivo nel polmone. I vettori contenenti DOPE come lipide helper sono stati caratterizzati da un'alta velocità di disintegrazione, con conseguente bassa ritenzione nel polmone e scarsa efficienza di trasfezione. Al contrario, i vettori contenenti colesterolo hanno avuto una velocità di disintegrazione più bassa ed un'alta efficienza di trasfezione nelle cellule polmonari in vivo.

La strategia più promettente è quella di coniugare i lipidi con il polietilenglicole (PEG) per ridurre le interazioni con le proteine sieriche. La stessa strategia è stata usata per ridurre la risposta immunitaria tentando di evitare l'uptake dei lipoplessi opsonizzati con le proteine sieriche da parte dei macrofagi (si veda a p. 71). Si pensa che il PEG, idrofilo e incapace di interagire sia con il DNA che con i lipidi cationici, fornisca tempi di circolazione più lunghi dei lipoplessi nel sangue minimizzando il legame tra i componenti del sangue e i lipoplessi. Sfortunatamente, l'inclusione di lipidi PEGilati ingombranti causa un'inibizione dose dipendente nell'attività trasfettiva. Per questo motivo una diversa lunghezza delle catene idrocarburiche nei derivati lipidici PEGilati è stata usata per modulare il tempo di associazione di questi lipidi nei lipoplessi. L'obiettivo di questa strategia è di usare il PEG come una copertura per i lipoplessi prima che essi raggiungano le cellule target. Una volta arrivati alle cellule target, il lipide PEGilato si stacca e libera il lipoplesso attivo [382]. Szoka ha mostrato che lo scudo di PEG dei lipoplessi si può staccare usando un linker acido-sensibile attraverso cui il PEG può essere rimosso quando il lipoplesso è all'interno del compartimento endocitico [383]. Infatti, a pH neutro questo rivestimento stabilizza i lipoplessi impedendo la loro aggregazione in cluster, che sarebbe un ostacolo per l'applicazione in vivo, e/o l'interazione con le proteine sieriche che favorirebbe una rapida eliminazione da parte dei macrofagi. Una volta nel compartimento endosomiale, in presenza di un ambiente leggermente acido, il PEG subirà un cleavage e sarà rilasciato, consentendo così la destabilizzazione dei lipoplessi, necessaria per la disgregazione della membrana endosomiale e i concomitanti dissociazione e rilascio del plasmide [384].

IMPORTANZA DELLE DIMENSIONI DEI LIPOPLESSI

Per quanto riguarda le dimensioni dei lipoplessi, le particelle piccole (diametri inferiori a 500 nm, solitamente al di sotto dei 150 nm) penetrano più facilmente nei siti infiammati e nei tumori solidi poiché la vascolarizzazione e le giunzioni endoteliali sono più facili da attraversare e questo permette loro di uscire più facilmente dal circolo.

Un ruolo importante viene svolto non solo dalle cellule, ma anche dallo spazio extracellulare, cioè dalla matrice costituita da vari polisaccaridi e proteine che formano il *network* sulla superficie cellulare [385]. Anche in questo caso, più la particella è piccola, più è in grado di diffondere e raggiungere la superficie cellulare.

SOMMINISTRAZIONE INTRAVENOSA E NELLE VIE RESPIRATORIE

Sfruttando il fatto che si depositano in grande quantità nei capillari polmonari, i lipoplessi sono stati usati per il gene delivery in vivo nel polmone con somministrazione intravenosa [208, 211, 386] e nelle vie respiratorie [387, 389].

Per la somministrazione nelle vie respiratorie sono stati utilizzati lipoplessi a base di DC-Chol e DOPE, ma anche formati da colesterolo, in cui questo gruppo è legato al gruppo poliaminico con un legame carbamoilico. Per questa via di somministrazione sono stati trovati molti fattori limitanti [390, 391]. Un fattore critico è che le cellule endoteliali delle vie aeree superiori sono coperte da uno strato di muco viscoso e carico negativamente che spesso intrappola e neutralizza le cariche superficiali dei lipoplessi. In pazienti affetti da fibrosi cistica, le cellule epiteliali sono ulteriormente coperte da uno spesso strato di sputum che contiene DNA genomico rilasciato dalle cellule morte e dai batteri. Nelle vie respiratorie inferiori, lo strato di tensioattivo arricchito con vari fosfolipidi e proteine tensioattive si ritiene inibisca l'attività trasfettiva dei lipoplessi. Inoltre, le cellule epiteliali ben differenziate delle vie respiratorie superiori sono meno attive nell'uptake dei lipoplessi rispetto a quelle delle vie respiratorie inferiori. Un'adeguata schematura delle cariche superficiali dei lipoplessi per ridurre l'interazione non-specifica proteina/mucina, l'inclusione di un ligando di target per aumentare il legame specifico e la sostituzione di una porzione dei lipidi cationici con un peptide attivo sulla membrana e meno tossico sembrano essere passaggi utili per risolvere questi problemi.

Il trasferimento genico in vivo con somministrazione intravenosa sistemica di lipoplessi trasfetta principalmente le cellule endoteliali della vascolatura polmonare

[211]. Un largo eccesso di lipidi cationici è necessario per un trasferimento genico ottimale [211]. Il colesterolo si è rivelato essere, in vivo, un miglior colipide per la trasfezione sistemica rispetto al DOPE. Infatti quest'ultimo sembra staccarsi troppo facilmente in presenza dei componenti del sangue [211, 379, 392], mentre il colesterolo sembra stabilizzare la struttura del lipoplesso nel sangue. Inoltre, è stato mostrato che si possono trasfettare efficientemente le cellule dell'endotelio polmonare iniettando dapprima liposomi cationici privi di DNA e subito dopo una soluzione di DNA nudo [393], il che suggerisce che varie strutture di lipoplessi che sembrano essere importanti per la trasfezione di cellule in colture cellulari non sono critiche per la trasfezione con iniezione intravenosa. L'espressione di un gene reporter nelle cellule polmonari trasfettate si instaura rapidamente e raggiunge il suo livello massimo tra le 8 e le 16 ore dopo la trasfezione, dopo di che declina rapidamente. Il declino non è solo dovuto alla degradazione del DNA: una seconda trasfezione eseguita una settimana dopo non ha dato un'espressione significativa [211], suggerendo che è verosimile che le cellule inizialmente trasfettate diventino resistenti allo stesso tipo di trasfezione attraverso un meccanismo regolatorio negativo.

TOSSICITA'

Nonostante i lipidi cationici abbiano una tossicità nemmeno paragonabile a quella dei vettori virali, qualche risvolto tossico è tuttavia riscontrabile.

RISPOSTA IMMUNITARIA

La somministrazione sistemica di lipoplessi induce una rapida attivazione del sistema immunitario innato: le cellule di Kupfer, i macrofagi del fegato, sono responsabili dell'uptake dei lipoplessi e della produzione di citochine proinfiammatorie, come il tumor necrosis factor α (TNF- α), interferon- γ e le interleuchine 6 e 12 [394]. Vari studi hanno dimostrato che l'infiammazione non solo causa tossicità sistemica, ma riduce anche la durata dell'espressione genica [394].

Parte della risposta infiammatoria è legata alle sequenze non-metilate CpG (umCpG) trovate nei plasmidi di origine batterica. umCpG è un potente immunostimolante che innesca il rilascio di citochine proinfiammatorie [395, 396] in modo dose-dipendente [397]. Una precisa sequenza è stata identificata come altamente stimolatoria (GACGTT). I lipidi cationici nel lipoplesso sono in grado di incrementare l'effetto di umCpG. Inoltre, i motivi CpG presenti nei plasmidi sono agonisti del recettore 9 endosomiale, che induce una risposta immune ad ampio spettro.

Le strategie per ridurre la tossicità infiammatoria possono essere suddivise in tre gruppi: 1) eliminare nel DNA plasmidico i motivi CpG immunostimolanti attraverso una mutagenesi sito-specifica; 2) diminuire le interazioni del lipoplesso con le cellule immunitarie, ad esempio riducendo l'uptake da parte delle cellule di Kupfer attraverso l'uso di un ligando target o con l'iniezione sequenziale dei vettori e del DNA; 3) sopprimere la risposta immune ai lipoplessi usando agenti immunosoppressori somministrati assieme ai lipoplessi stessi (Safeplex) [398].

Un altro fattore correlato agli effetti collaterali della trasfezione è l'attivazione del complemento [399] e l'adsorbimento sulla superficie dei lipoplessi delle proteine sieriche che, a loro volta, agiscono come opsonine e innescano l'uptake delle particelle opsonizzate da parte dei macrofagi e di altre cellule immunitarie. Per risolvere questo problema sono state considerate varie strategie. Per esempio, coprire la superficie dei lipoplessi con polimeri inerti potrebbe, in linea di principio, ridurre l'adsorbimento delle

proteine e la loro affinità con le cellule immunitarie e minimizzare così le risposte tossiche. A questo scopo lipidi coniugati con il polietilenglicole (PEG) sono stati incorporati nei lipoplessi per ridurre drasticamente le interazioni non-specifiche dei lipoplessi con i componenti del sangue [382, 400, 401], strategia già descritta a p. 67.

Inoltre, si può ridurre la tossicità dei lipidi cationici inserendo lipidi più biodegradabili [309, 402, 403]. I lipidi cationici che sono carichi solo a pH leggermente acido ma non a pH neutro [302] o quelli i cui gruppi carichi possono essere eliminati dopo la formazione del lipoplesso [309] possono essere una soluzione potenziale per gli attuali problemi di tossicità.

RELAZIONI STRUTTURA-TOSSICITA' DEI LIPIDI CATIONICI

Sono state riportate reazioni infiammatorie acute in animali trattati con lipoplessi somministrati nelle vie respiratorie o per iniezione intravenosa. Ad esempio, studi tossicologici dettagliati su una delle formulazioni Genzyme Lipid, GL-67/DOPE, hanno rivelato che il lipide cationico contribuisce significativamente alla tossicità osservata [404, 405]. I sintomi includono ipotensione polmonare acuta, induzione di citochine infiammatorie, infiltrazione tissutale dei neutrofili nel polmone, ridotta conta leucocitaria, e, in certi casi, lesioni tissutali nel fegato e nella milza [406]. Nell'uomo, in soggetti che hanno ricevuto liposomi o lipoplessi aerosolizzati a base di GL-67, sono state notate reazioni infiammatorie avverse in vario grado, inclusi sintomi influenzali con febbre e infiammazione delle vie respiratorie [404].

Sono stati fatti studi volti a correlare la tossicità con le modifiche delle diverse porzioni che compongono i lipidi cationici.

Testa idrofila. Gli effetti citotossici sono associati alla natura cationica del vettore, determinata principalmente dalla sua testa polare. I lipidi cationici possono diventare citotossici interagendo con enzimi critici come la PKC. Molti derivati del colesterolo contenenti teste polari con atomi di azoto terziario o quaternario possono inibire l'attività della protein chinasi C (PKC). Gli anfifili con ammonio quaternario sono più tossici delle loro controparti amminiche terziarie [407]. Una soluzione recente per aggirare questi problemi è quella di delocalizzare la carica positiva della testa cationica su un anello eterociclico. I lipidi cationici eterociclici con ioni imidazolio o piridinio

come teste polari [307, 362, 366, 408] hanno mostrato una maggiore efficienza di trasfezione e una minore tossicità se confrontati con i classici sistemi di trasfezione [409]. Questo è uno dei motivi che ci ha spinto allo studio dei tensioattivi gemini dipiridinici.

Ad esempio, il 2Oc (Fig. 32), un tipo di lipide piridinico, ha trasfettato varie linee cellulari tumorali con un'efficienza simile o più elevata del DOTAP ma con più bassa citotossicità [410]. Anche il gruppo guanidinio ha reso vari lipidi più sicuri per l'uso in vivo rispetto alla controparte amminica [411].

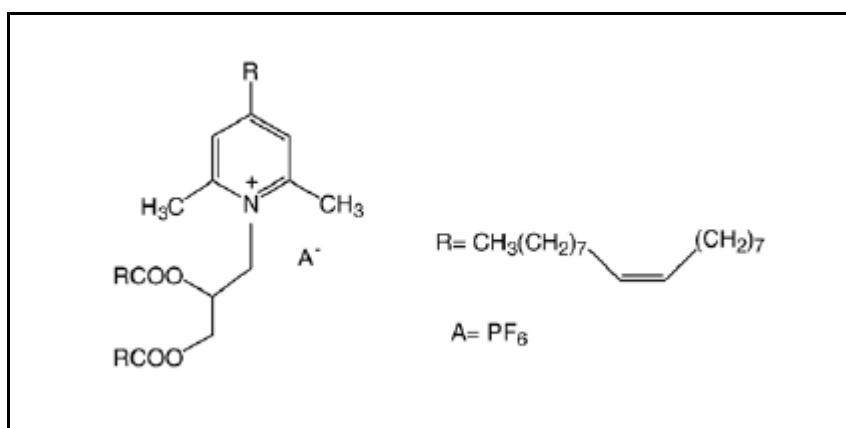


Fig. 32

Catene idrofobiche. Sono due le tipologie principali di porzioni idrofobiche: le catene alifatiche e le strutture derivate dal colesterolo. Di solito, per le catene alifatiche, lipidi con una sola catena sono più tossici e meno efficienti delle controparti a doppia catena. Pinnaduwa [328] ha riportato che il cetil trimetilammonio bromuro (CTAB) (Fig. 17 (21) p. 48) era più tossico e meno efficiente del DOTMA (Fig. 14 (1) p. 45). Tuttavia Tang e Huges [412] hanno dimostrato che il 6-laurossiesil ornitinato (LHON) (Fig. 33) con una catena era più efficiente e meno tossico del DOTAP (Fig. 15 (9) p. 46). Questo dimostra che non possiamo scartare completamente la possibilità dei lipidi cationici a singola catena per la terapia genica.

Qualche lipide, come i derivati del colesterolo, sono inibitori della PKC, il che può essere associato alla loro tossicità. Gli anfifili cationici che contengono strutture steroidee sono risultati essere inibitori più potenti della PKC rispetto agli analoghi a catena lineare, e quindi anche più tossici [407].

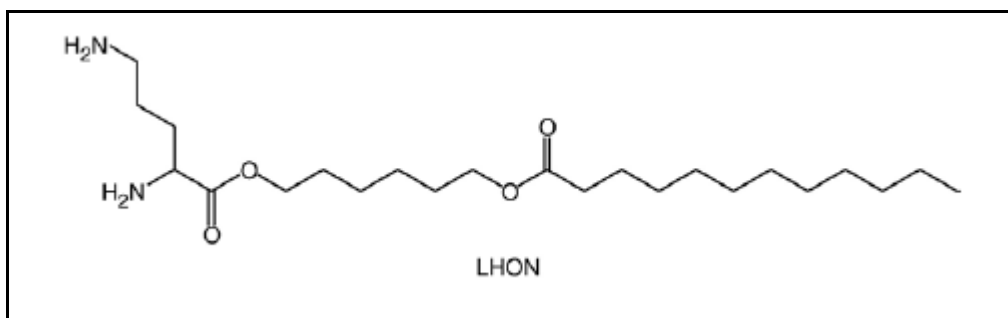


Fig. 33

Linker. La maggior parte dei legami linker sono eteri, esteri o ammidi. Sebbene composti con linker eteri trasfettino con più efficienza, sono troppo stabili per essere biodegradati, e questo causa tossicità. I lipidi cationici con legami esterei come il DOTAP sono più biodegradabili ed associati ad una minore citotossicità nelle colture cellulari [324, 413-415], ma purtroppo sono inclini alla decomposizione nel sistema circolatorio.

Negli ultimi anni sono stati sviluppati lipidi con linker carbammato con tossicità più bassa [416-420], sfruttando la loro idrolisi acido-catalizzata (quando il pH degli endosomi si abbassa) per la liberazione del DNA. Questi lipidi possono essere rapidamente degradati in piccole molecole non tossiche per la cellula.

APPLICAZIONI TERAPEUTICHE

CONSIDERAZIONI GENERALI

Ogni malattia che presenta una componente genetica può diventare un candidato per la terapia genica.

Tra le malattie genetiche, i disordini monogenici sono causati da un difetto di un singolo gene e quindi sono candidati ideali per il trattamento con la terapia genica. I disordini monogenici comprendono circa 4000 malattie note che includono la deficienza dell'adenosina deaminasi (ADA), la fibrosi cistica, la distrofia muscolari di Deuchenne, l'emofilia, la fenilchetonuria e l'ipercolesterolemia familiare [421].

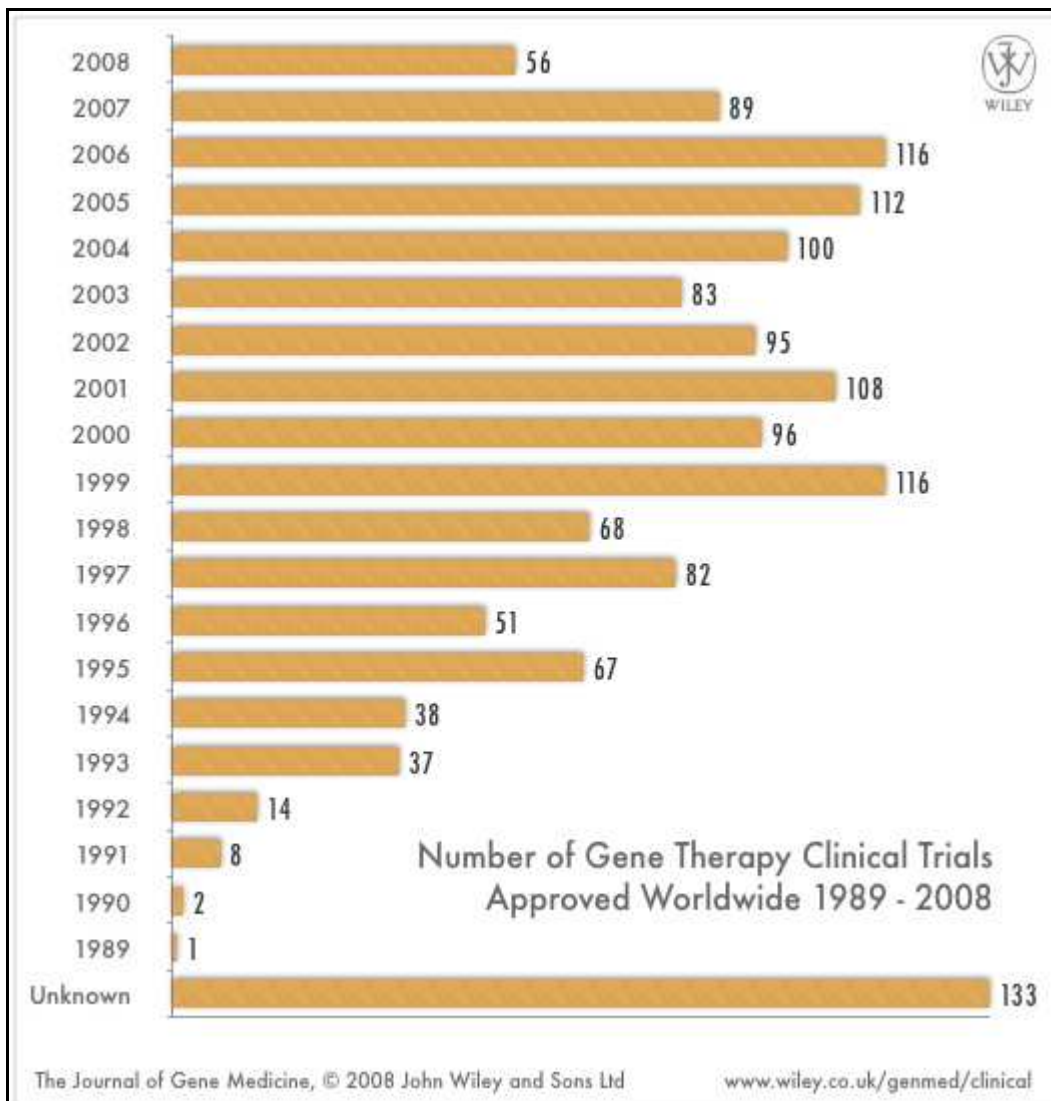


Fig. 34. Numero di clinical trials di terapia genica approvati nel mondo tra il 1989 e il 2008 [4].

I disordini multifattoriali, invece, implicano il coinvolgimento di geni multipli o di una combinazione di fattori genetici ed ambientali. Data la complessità di tali disordini, l'utilizzo di protocolli di terapia genica per la loro cura deve ancora essere approfonditamente studiato.

Da diversi anni sono disponibili dati pre-clinici e clinici sul gene delivery mediato da lipidi cationici: questi dati hanno suscitato un senso di ottimismo tra i ricercatori. Nel 1993, Zhu è riuscito per la prima volta ad ottenere nel topo, seppur con bassa efficienza di trasfezione, un'espressione transgenica in vivo dopo la somministrazione intravenosa di un plasmide di espressione di citomegalovirus cloramfenicolo acetiltransferasi (CAT) complessato con DOTMA/DOPE [422]. Successivamente, in base a vari studi, i fattori che aumentano l'efficienza di trasfezione in vivo dei liposomi cationici sono risultati: elevata carica totale del lipoplesso [245, 352, 371, 375, 423], uso del colesterolo come colipide [208, 245, 362, 424], grandi dimensioni dei lipoplessi [245] e dose elevata di DNA plasmidico [376, 423, 425-427]. La condensazione del DNA con polimeri cationici biocompatibili prima del mescolamento con liposomi cationici è risultata rendere il DNA resistente alle attività delle DNAsi aumentare l'efficienza di trasfezione dei liposomi cationici in vivo [376, 423, 425-427].

I recenti sviluppi nel campo della terapia genica alimentano grandi speranze per il prossimo futuro. Quasi 1500 protocolli clinici, che coinvolgono migliaia di pazienti, si stanno svolgendo in tutto il mondo [4], con un aumento, dal 1999, del numero dei clinical trials approvati (Fig. 34). Circa un decimo di questi clinical trials viene condotto con lipoplessi (Fig. 1, p. 8). La maggior parte dei clinical trials è in fase I e solo il 3% è in fase III (Fig. 35).

CANCRO

I due terzi di tutti i clinical trials riguardano diverse forme di cancro [4] (Fig. 36). In riferimento al gene delivery mediato da lipoplessi, bisogna sottolineare che parecchi lipidi cationici hanno ricevuto l'approvazione per clinical trials, come ad esempio DC-Chol per il cancro ovarico e della mammella [428, 429] e per il melanoma [430] e DMRIE per il carcinoma delle cellule basali [431] e il melanoma metastatico [430].

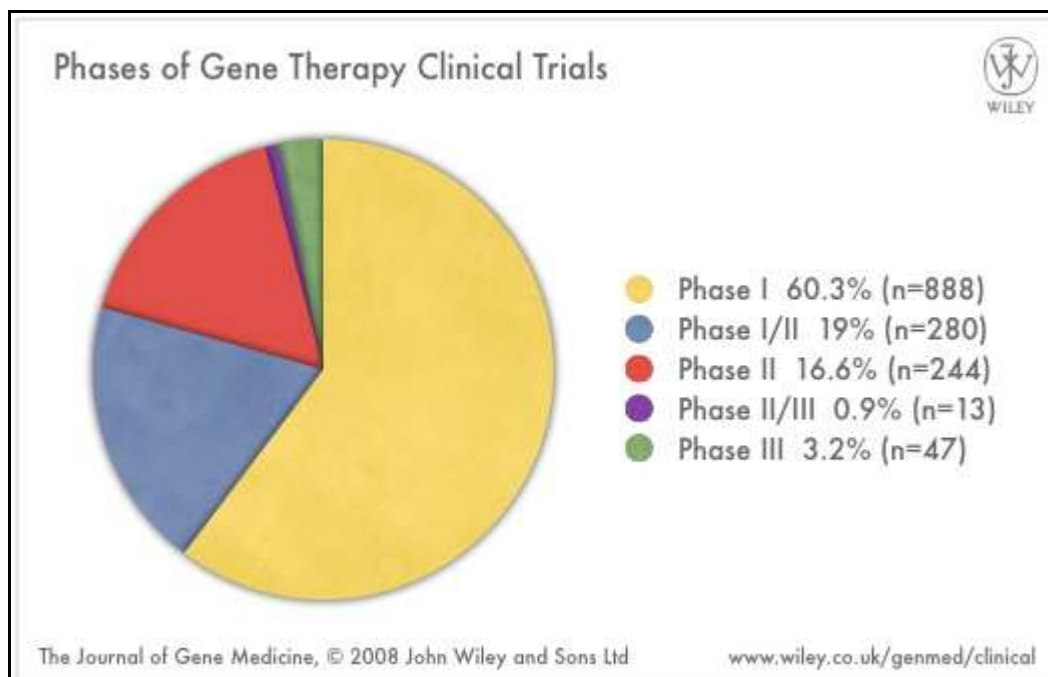


Fig. 35. Fasi dei clinical trials di terapia genica nel 2008 [4].

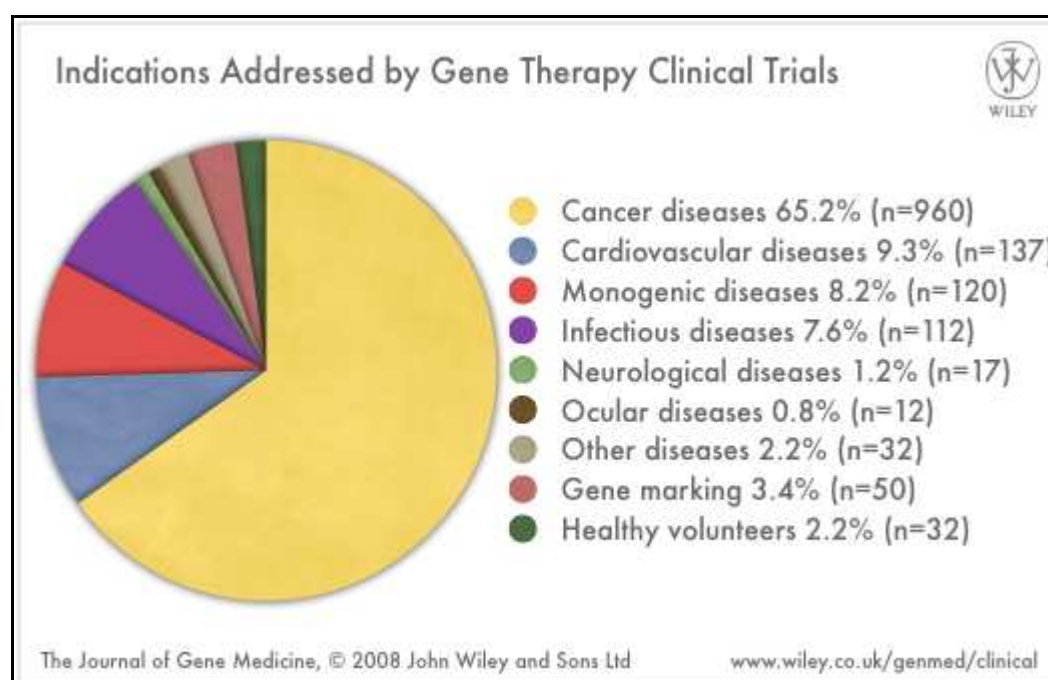


Fig. 36. Patologie per le quali sono condotte i clinical trials di terapia genica nel 2008 [4].

La terapia genica del cancro può essere fatta in tre modi: somministrando la copia corretta 1) di un gene oncosoppressore mutato; 2) di un gene codificante per un enzima che attiva un profarmaco anticancro; 3) di un gene che codifica per un antigene che scatena una risposta immune protettiva [432].

La somministrazione di un plasmide liposomiale che esprime un RNA antisenso mirato alla soppressione della produzione di proteina K-ras p21 specifica è stato usato per ridurre la crescita di tumori pancreatici nel topo [433]. Anche la somministrazione della formulazione liposomiale del gene IL-2 ha condotto ad una soppressione del tumore nella immunodeficienza severa combinata del topo [434]. Altri studi di questo genere in animali hanno mostrato buone risposte biologiche in vivo, come la diminuzione del tumore usando il gene codificante per IL-12 [435, 436] o il gene p53 induttore dell'apoptosi, ritenuto difettoso in certi tipi di cancro [437].

Somministrati topicamente, i complessi lipide cationico-DNA sono stati utilizzati per aumentare la regressione dei tumori della pelle [438] attraverso l'espressione locale di citochine (IL-12, IL-8, IL-1 β , IL-6 e IFN- γ) [439-441], fattori di crescita, o proteine estranee del complesso maggiore di istocompatibilità (HLA) [430, 442]. L'iniezione intratumorale di un gene liposomiale codificante per HLA-B7, al fine di generare una risposta immune in pazienti affetti da melanoma, è infatti risultata in una parziale risposta [443-445].

Esempi di trasferimento genico cellulo-specifico per la cura del cancro

Per trasferire geni in modo cellulo-specifico, sono stati progettati vari lipidi cationici contenenti ligandi recettore-specifici attaccati covalentemente alla testa polare. Ad esempio, gli epatociti sovraesprimono sulla superficie cellulare recettori ad alta affinità che possono legare asialoglicoproteine e successivamente internalizzarle nel citoplasma. Kawakami [446, 447] e Fumoto [448] sono riusciti ad inserire in vivo geni di trasfezione selettivi per gli epatociti usando liposomi cationici galattosilati Gal-C4-Chol. Analogamente, i recettori per il folato (FR) sono sovraespressi in molte cellule tumorali umane ed espressi a livello basale nei tessuti normali [449, 450]. In altre parole, FR è sia un eccellente marker tumorale che un recettore funzionale tumore-specifico. L'acido folico è un ligando ad alta affinità per FR ($K_d \sim 0.1\text{nM}$) e mantiene le sue caratteristiche di binding a FR quando è legato covalentemente a una grande varietà di molecole. Questa è la ragione per cui l'acido folico è stato ampiamente sfruttato per trasferire polinucleotidi, come oligonucleotidi antisense e plasmidi, alle cellule con FR. Ad esempio, sia Reddy [451] che Hofland [452] sono riusciti a sviluppare complessi di lipidi cationici coniugati al folato che hanno mostrato un'espressione trasgenica in vivo nei tumori murini.

La formazione e la differenziazione dei vasi sanguigni dai vasi pre-esistenti o dalle cellule endoteliali progenitrici è importante sia nell'organismo sano che in quello malato. Durante l'angiogenesi e il rimodellamento vascolare, le cellule endoteliali mostrano un'espressione aumentata di varie molecole di superficie che potenziano l'invasione della cellula e la proliferazione. Gli sforzi per influenzare la biologia dei vasi sanguigni attraverso il gene delivery sono stati ostacolati a causa della mancanza di vettori specifici per le cellule endoteliali. Una classe delle suddette molecole di superficie sono le integrine, fondamentali nella regolazione dell'angiogenesi. Sfruttando il fatto che le integrine sono poco espresse nell'endotelio quiescente ma sovraespresse nell'endotelio in proliferazione, Cheresh è riuscito a sviluppare un sistema di delivery molto efficace [453]. Questo autore ha dimostrato che una nanoparticella basata su lipidi cationici polimerizzati legata covalentemente ad un ligando per l'integrina $\alpha v \beta 3$ può essere sfruttata per trasferire geni selettivamente a vasi sanguigni angiogenici di tumori murini. L'iniezione sistemica di queste particelle coniugate ad un gene *Raf* mutante, che blocca la segnalazione endoteliale e l'angiogenesi in risposta a vari fattori di crescita, nel topo ha dato luogo all'apoptosi e alla successiva regressione del tumore primario e metastatico [453].

I recettori sigma sono proteine di membrana sovraespresse in certe neoplasie maligne, incluso il cancro alla mammella. Questi recettori hanno un'alta affinità per vari ligandi, come i neurolettici (tra cui l'aloiperidolo). Banerjee ha recentemente sviluppato un fosfolipide a base di polietilenglicole legato all'aloiperidolo che, in seguito all'incorporazione in liposomi cationici, ha mostrato un'espressione del gene reporter nelle cellule MCF-7 (cellule di tumore del seno con recettori sigma sovraespressi) di dieci volte superiore rispetto al sistema di controllo non-specifico [454]. Reddy e Banerjee hanno progettato anche un fosfolipide a base di polietilenglicole legato all'estradiolo altamente efficace che, dopo l'incorporazione in liposomi cationici, si lega e uccide molto efficacemente le cellule primarie del carcinoma della mammella (come le cellule MCF-7) con recettori per gli estrogeni sovraespressi, usando il gene anticancro p53 [455]. Ovviamente, se l'efficacia di questi sistemi di targeting per il cancro al seno rimanesse tale nei clinical trials, essi potrebbero diventare molto promettenti per la cura di questa patologia.

FIBROSI CISTICA

La fibrosi cistica (CF) è la seconda grande applicazione della terapia genica [4].

È una malattia monogenica ereditaria del trasporto ionico delle cellule epiteliali associata a patologie di molti organi come polmone, pancreas e fegato. È causata da una qualsiasi su oltre 1000 mutazioni di un gene da 230 kb sul cromosoma 7 che codifica per un polipeptide di 1480 amminoacidi, chiamato regolatore della conduttanza transmembrana della fibrosi cistica (CFTR), che funziona da canale dello ione cloro nelle membrane delle cellule epiteliali del polmone [456-458]. Le cellule epiteliali del polmone hanno geni CFTR mutanti, incapaci di esprimere la proteina CFTR funzionale: questo porta a difetti patologici di trasporto ionico nel polmone.

Dal 1989, anno in cui fu clonato il gene CF [459], la terapia genica è emersa come un'alternativa importante per il trattamento della malattia e ha raggiunto i clinical trials [456, 460-465]: in questi studi si è osservato un ripristino parziale del canale del cloro funzionante [466-469]. Siccome per trattare la CF sono sufficienti livelli molto bassi di CFTR [470], i lipoplessi sono stati usati con successo in parecchi esperimenti in vivo. Inoltre, quando somministrati sistematicamente con iniezioni intravenose, i complessi lipide cationico-DNA hanno mostrato una forte preferenza verso la trasfezione di tessuto polmonare negli animali da esperimento [348, 389, 470-472]. Le formulazioni includevano DC-Chol, [469, 473], lipide 67 [465, 471, 474, 475], DOTMA [471], DOTAP [471, 476], GAP-DLRIE [477] e glicilbetaina [478].

Purtroppo nel polmone del paziente affetto da fibrosi cistica l'uptake dei lipoplessi è comunque inibito dal muco e dallo sputum infetto [479].

POLMONE

Poiché l'iniezione intravenosa dei lipoplessi conduce all'espressione transgenica principalmente nel polmone, quest'organo è uno dei siti più estesamente studiati in terapia genica.

Per trattare malattie del polmone come l'enfisema familiare o altri stati infiammatori sono purtroppo richieste alte efficienze di trasfezione [470, 480]. Oltre alle malattie con una chiara origine genetica, anche le malattie acquisite del polmone e quelle con eziologie complesse possono essere trattate con terapia genica [470].

Studi recenti hanno dimostrato l'enorme potenziale terapeutico dell'uso del polmone come un fattore metabolico genetico per produrre e trasferire proteine nella circolazione

per il trattamento di malattie ereditarie non associate direttamente a patologie polmonari [348].

Assicurare il successo clinico dei liposomi cationici nella terapia genica non-virale per trattare patologie ereditarie polmonari e di altri organi, sia utilizzando nuovi lipidi cationici che migliorando le formulazioni di anfifili cationici noti e DNA [245, 354, 481], rimarrà quindi un obiettivo primario della terapia genica attuale.

SISTEMA NERVOSO CENTRALE

Un altro target importante per la terapia genica è il sistema nervoso centrale (SNC). Molti gravi scompensi o malattie del SNC sono resistenti alle convenzionali terapie con piccole molecole, ma sono candidati per la terapia genica. Tra di esse si possono annoverare: epilessia, malformazioni arteriovenose, morbo di Parkinson, tumori cerebrali, morbo di Alzheimer, morbo di Huntington, sindrome di Rett, morbo di Canavan, sclerosi laterale amiotrofica (ALS), ischemia, lesioni del midollo spinale [482-486]. Inoltre, i metodi virali non possono essere usati in trattamenti non-invasivi in quanto i virus non attraversano la barriera emato-encefalica [486]. Di conseguenza, la terapia genica basata sui liposomi è un'interessante alternativa [487, 488]. Per molte delle patologie elencate sopra, si sono ottenuti buoni risultati in questa direzione sia in vitro che in vivo (in modelli animali) usando lipidi cationici come DMRIE [489], DDAB [488], DC-Chol [490, 491], o DOSPA [492]: questo aumenta la probabilità di estendere la terapia all'uomo.

ALTRE PATOLOGIE

La terapia genica può anche essere applicata a malattie di cuore e arterie [493-498]. A pazienti è stato somministrato senza effetti avversi il fattore di crescita vascolare dell'endotelio (VEGF) [499] con lo scopo di prevenire l'ischemia miocardica ed esperimenti di trasfezione sono stati condotti sia in vitro che in vivo utilizzando lipoplessi a base di GAP-DLRIE [496, 498] o DOTMA [493, 494]. In questo caso, per aumentare l'efficienza di gene delivery, bisogna risolvere problemi legati all'aggregazione dei liposomi in seguito a somministrazione sistemica.

La vaccinazione a DNA è stata un altro terreno di applicazione della terapia genica. Qui l'iniezione intramuscolare di DNA nudo [500] ha dato origine ad una risposta

immune cellulare ed umorale e l'uso di lipidi cationici [501] e di microparticelle cationiche [502] ha aumentato questa risposta immune.

L'artrite è stata migliorata in un modello artritico murino con l'iniezione intraperitoneale del gene per IL-10, che ha diminuito l'infiammazione [503].

Per quanto riguarda la pelle, la somministrazione topica di liposomi cationici è l'unico metodo di delivery non-virale diretto che consente il trattamento di aree estese dell'epidermide, di malattie infiammatorie della pelle (con l'ulteriore beneficio di guarigione delle ferite) e la manipolazione genetica dei follicoli piliferi [438, 504].

Infine, si deve notare che recentemente la terapia genica con lipoplessi si è mostrata efficiente nel trattamento di disordini renali [505-507], muscolari [508], articolari [509] e visivi (instillazione di lipoplessi formulati in soluzione per uso oculare per la trasfezione delle cellule del ganglio retinico) [510, 511].

GEMINI: UNA NUOVA CLASSE DI TENSIOATTIVI PER GENE DELIVERY

Il termine gemini è stato introdotto per la prima volta da Menger [512] e indica una particolare classe di lipidi costituiti da due catene alchiliche e da due gruppi ionici connessi attraverso un gruppo spacer. Quest'ultimo può essere idrofobico (alifatico o aromatico) o idrofilico (poliestere), corto (due gruppi metilenici) o lungo (fino a 20 gruppi metilenici), rigido o flessibile. La struttura generale dei tensioattivi gemini è rappresentata in figura 37.

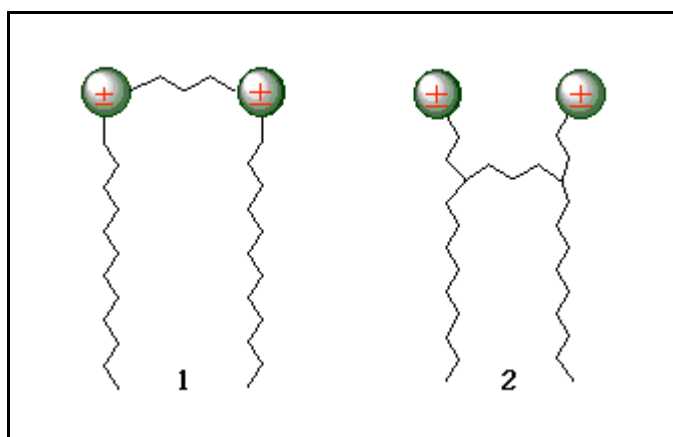


Fig. 37. Lo spacer dei gemini può legarsi o direttamente alle teste polari (1) oppure in diversi punti della catena alchilica (2).

Lo spacer può essere legato direttamente (Fig. 37 (1)) ai due gruppi polari uguali, ognuno dei quali è a sua volta legato ad una catena alchilica l'una identica all'altra oppure lo spacer può trovarsi a metà (Fig. 37 (2)) o verso la fine della catena alchilica, ottenendo così i cosiddetti tensioattivi bolaformi.

Il primo gemini che compare nella letteratura scientifica risale al 1971 ad opera di Bunton [513], ma la varietà sintetizzata fino ai giorni nostri è veramente vasta ed include tensioattivi anionici, cationici, zwitterionici e non ionici con tutti i tipi di spacer.

Diverse sono le ragioni che spiegano il grande interesse suscitato attorno a questa particolare classe di tensioattivi:

- 1) Sono caratterizzati da cmc che sono di uno o due ordini di grandezza più basse di quelle dei corrispondenti monomeri; inoltre, in generale, si può dire che mentre i gemini danno luogo ad aggregati di tipo allungato, i monomeri formano micelle sferiche.
- 2) Sono più efficienti dei corrispondenti monomeri nel ridurre la tensione superficiale dell'acqua.
- 3) Le soluzioni acquose di alcuni tensioattivi a corto spaziatore possiedono un'elevata viscosità anche a concentrazioni relativamente basse.
- 4) Aumentano la bagnabilità, promuovono l'emulsione di oli in acqua, aumentano la dispersione dei solidi e possiedono un'alta capacità di stabilizzare la schiuma.
- 5) Alcuni gemini possono essere prodotti con costi ragionevoli facilitandone quindi l'utilizzo anche in campo industriale e agricolo.
- 6) Numerosi articoli sottolineano l'importanza dei gemini nelle scienze biologiche. Alcuni di essi presentano proprietà antimicrobiche, sono adatti al contatto con la pelle grazie ai loro bassi valori di cmc e sono sicuri dal punto di vista ecologico e del controllo ambientale. I composti con spacer molto lunghi sono in grado di formare dei ponti tra doppi strati, posizionando una testa su di un lato e una sull'altro [514]; le strutture di questi gemini sono una reminiscenza di quelle dei lipidi isolati da archeobatteri termofili in grado di resistere a condizioni estreme di temperatura. Infine, ci sono gemini appositamente progettati e sintetizzati per essere utilizzati come vettori non-virali in gene delivery [515].

Le loro potenziali applicazioni sono davvero innumerevoli, per esempio l'utilizzo nel recupero degli inquinanti, nell'intrappolamento e rilascio dei farmaci e nella preparazione di materiali ad elevata porosità.

Più recentemente, è stato dimostrato come alcuni tensioattivi gemini cationici siano in grado di favorire la veicolazione del DNA all'interno delle cellule con una bassa tossicità. Infatti, sia da soli che associati ai lipidi helper, hanno dimostrato efficienze di trasfezione comparabili o di poco inferiori a quelle dei reagenti di trasfezione disponibili commercialmente.

La loro bassa cmc permette loro non solo di associarsi più rapidamente in soluzione acquosa, ma anche di legarsi al DNA con un'efficienza più alta (rispetto al monomero), creando delle concentrazioni locali maggiori attorno alle macromolecole cariche negativamente. Inoltre, la presenza di due cariche positive consentirebbe loro di legarsi al DNA più facilmente ed a concentrazioni più basse.

La loro versatilità è attribuibile alla possibilità di variare non soltanto la lunghezza e la natura delle catene idrofobiche (lunghezza della catena, grado di saturazione e simmetria o asimmetria) e della testa polare, ma anche dello spacer. Quest'ultimo svolge un ruolo fondamentale, dimostrato dal fatto che il cambiamento della sua natura idrofobica/idrofila può avere effetti drammatici sulle proprietà chimico-fisiche, probabilmente a causa del cambiamento nell'organizzazione delle micelle.

La compattazione del DNA da parte dei tensioattivi gemini è stata esaminata da diversi autori. In generale è stato evidenziato come i risultati migliori si ottengano con spacer corti o lunghi, mentre quelli con spaziatori intermedi (circa $s = 5-10$) sono meno efficienti. Inoltre, è stata dimostrata l'importanza della distanza tra gli atomi d'azoto eventualmente presenti nella struttura (influenzata dalla lunghezza e dalla struttura dello spacer), poiché essa influenza la loro interazione con i gruppi fosfato del DNA.

Per quanto riguarda la trasfezione in vitro, in Fig. 38 sono riportati i dati relativi a differenti tipi di vettori non virali, basati appunto su tensioattivi gemini. Il confronto è però complicato da diversi fattori come differenti linee cellulari, la scelta dello standard interno e dalle diverse tecniche utilizzate per la determinazione dell'efficienza di trasfezione.

Sistema	Linea cellulare	Metodo di valutazione	Efficienza relativa all'agente di riferimento ^a	In vivo	Riferimento
Strutture base					
Bis-C12BEC/DOPE (1:2) plasmide pEGFP-C1 (+/-=5)	RD-4	Fluorescenza	1.5(GP)	ND ^b	[50] del rif.[3]
16-3-16/DOPE (1:1.5) pGTmCMV IFN-GFP (+/-=10)	PAM212	ELISA	0.6(LP)	Si	[25] del rif.[3]
12-3-12/DOPE (1:1.5) plasmide pMASLA Luc (+/-=10)	COS-7	Luminescenza	0.1(LP)	Si	[60] del rif.[3]
Strutture sostituite					
12-7NH-12/DOPE (1:1.5) plasmide pMASLA Luc (+/-=10)	COS-7	Luminescenza	1(LP)	ND	[60] del rif.[3]
Bis- <i>n</i> , <i>n</i> -(oleil-1'-deossiglucitilamino)- esano/plasmide pGL-3 (2:1)	CHO-K1	Luminescenza	2.7(LP)	ND	[64] del rif.[3]
C14(Com)2/pCMV Luc (N/P=3-5)	3T3 HeLa BNL CL2	Luminescenza	0.1-0.5(PEI) (dati non riportati)	ND	[21] del rif.[3]

^aGP-Geneporter, LP-Lipofectamine, PEI- Transfectam PEI ^bND-non dimostrato

Fig. 38. Efficienze di trasfezione relative di sistemi per il gene delivery basati su tensioattivi gemini.

Tra i vettori commerciali, LipofectamineTM e GenePorterTM hanno dimostrato di possedere un'efficienza comparabile mentre, rispetto all'agente commerciale Lipofectamine PlusTM, i gemini con spacer sostituito hanno uguale o più elevata efficacia. In particolare, l'incorporazione di un sostituito amminico nella struttura base del tensioattivo si è dimostrata una strategia positiva per il design di nuovi vettori. Ci si aspetta che, in relazione ai trend visti in precedenza, la trasfezione per i tensioattivi immuno-sostituiti (12-7NH-12) con code alchiliche più lunghe (e.g. esadeciliche o oleiliche) possa essere superiore a quella del Lipofectamine PlusTM. In generale, comunque, questi presentano una bassa tossicità se confrontata con quella dei monomeri e questo ovviamente favorisce un loro possibile utilizzo in vivo. Nonostante ciò, per il momento sono solo due gli studi riportati in letteratura in cui è stata dimostrata la trasfezione in vivo utilizzando tensioattivi gemini. Nel primo caso si tratta di un'applicazione topica contenente il gemini 16-3-16 e il plasmide pGTm CMV IFN-GFP, codificante per l'IFN- γ e la green fluorescent protein (GFP), pensata per la terapia genica dello scleroderma localizzato e utilizzata in animali normali, knockout e malati [516]. Nel secondo caso, sono stati utilizzati dei gemini a base di carboidrati aventi catene idrofobiche oleiliche, uno spacer etilenossio e/o un glucosio ridotto o un mannosio come teste polari [516].

MATERIALI

DODECILETILDIMETILAMMONIO BROMURO (DEDAB)

Il DEDAB è stato acquistato presso la Aldrich Chemical Company, con una purezza $\geq 99\%$ e utilizzato senza ulteriori purificazioni.

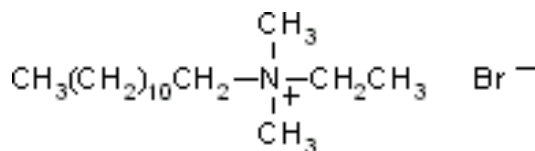


Fig. 39. Struttura del DEDAB

TENSIOATTIVI GEMINI DIPIRIDINICI

In questi tensioattivi due ioni piridinio costituiscono le due teste idrofile. All'atomo di azoto di ciascuna delle due teste idrofile è legata una catena idrofobica. Le due teste idrofile sono connesse tra di loro attraverso uno spacer. Variando il numero degli atomi di carbonio dello spacer (n) e delle catene idrofobiche e variando il controione sono stati ottenuti composti diversi.

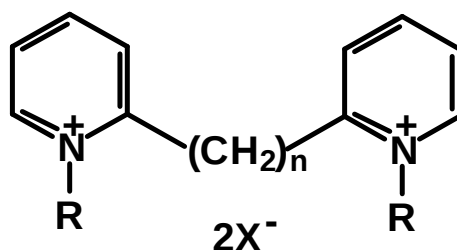


Fig. 40. Struttura dei tensioattivi gemini dipiridinici

$$n = 2, 3, 4, 8, 12$$

$$\text{R} = -\text{C}_{12}\text{H}_{25}, -\text{C}_{16}\text{H}_{33}$$

$$\text{X} = \text{Cl}^-, \text{CH}_3\text{SO}_3^-$$

I composti aventi come controione lo ione metansolfonato hanno una catena di 12 atomi di carbonio e uno spaziatore di 2, 3, 4, 8, o 12 metileni. La loro formula generale è 12-Py(2)-n-(2)Py-12 MS ed i loro nomi sono 1,1'-didodecil-2,2'-di-/tri-/tetra-/octa-/dodecametilenbispiridinio metansolfonato.

I composti aventi come controione lo ione cloruro hanno una catena di 12 o 16 atomi di carbonio e uno spaziatore di 3, 4, 8, o 12 metileni. La loro formula generale è, a seconda della lunghezza della catena, 12-Py(2)-n-(2)Py-12 Cl o 16-Py(2)-n-(2)Py-16 Cl, ed i loro nomi sono 1,1'-didodecil-2,2'-tri-/tetra-/octa-/dodecametilenbispiridinio cloruro o 1,1'-diesadecil-2,2'-tri-/tetra-/octa-/dodecametilenbispiridinio cloruro.

Queste serie di tensioattivi sono state sintetizzate presso il Dipartimento di Chimica Generale e Organica Applicata dell'Università di Torino.

TENSIOATTIVI GLUCOCATIONICI

Presso il dipartimento di Chimica ed Generale ed Organica Applicata dell'Università di Torino, sono stati sintetizzati vari tipi di tensioattivi con un azoto quaternario recante due metili, una catena alchilica di lunghezza variabile (con 8, 12 e 16 atomi di carbonio) e un glucoside. Nei composti (I) gli ossigeni glucosidici sono protetti con gruppi acetile, mentre nei composti (II) non sono protetti. Sono state studiate entrambe queste classi di tensioattivi glucocationici aventi come controione lo ione bromuro.

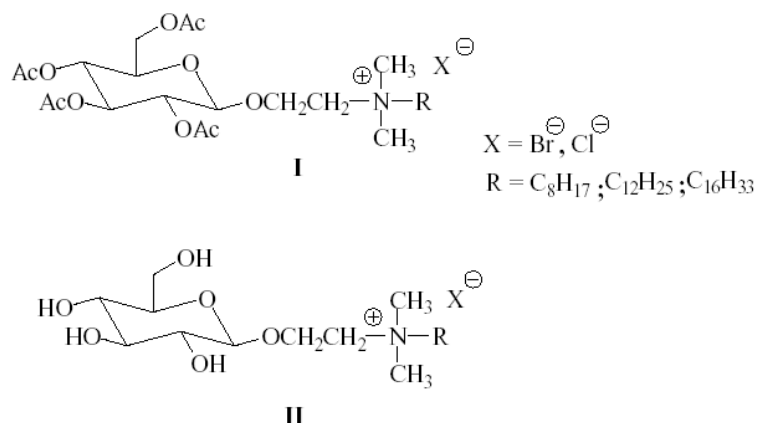


Fig. 41. Struttura dei tensioattivi glucocationici acetitati (I) e disacetitati (II)

I nomi di questi tensioattivi acetilati sono: N-[2-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)etil]-N,N-dimetil-N-octilammonio bromuro (C₈AGCB), il N-[2-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)etil]-N,N-dimetil-N-dodecilammonio bromuro (C₁₂AGCB), N-[2-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)etil]-N,N-dimetil-N-esadecilammonio bromuro (C₁₆AGCB)

I nomi di questi tensioattivi disacetilati sono: N-[2-β-D-glucopiranosil)etil]-N,N-dimetil-N-dodecilammonio bromuro (C₁₂DGCB) e N-[2-β-D-glucopiranosil)etil]-N,N-dimetil-N-esadecilammonio bromuro (C₁₆DGCB).

Il composto N-[2-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)etil]-N,N-dimetil-N-octilammonio bromuro (C₈ DGCB), la cui solubilità non era sufficientemente alta per ottenere la concentrazione micellare critica (cmc), non è stato studiato.

La purezza di questi tensioattivi è stata controllata attraverso NMR, analisi elementare e TLC su gel di silice (Merck) con eluente BAW (butanolo: acido acetico:acqua = 4:1:5 - fase organica).

TENSIOATTIVI ALCHILTRIMETILAMMONIO BROMURI

I quattro tensioattivi cationici esaminati hanno la seguente formula generale:

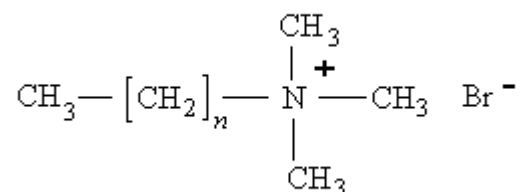


Fig. 42. Struttura dei tensioattivi alchiltrimetilammonio bromuri

con $n = 9, 11, 13, 15$ che corrispondono rispettivamente al decil-trimetil-ammonio bromuro (DeTAB), dodecil-trimetil-ammonio bromuro (DTAB), tetradecil-trimetil-ammonio bromuro (TTAB) e al esadecil-trimetil-ammonio bromuro (CTAB).

I composti DeTAB e CTAB sono stati ottenuti dalla Fluka con purezza rispettivamente, del 98% e 96%. Il composto DTAB dalla Aldrich Chemie con purezza del 99% e il composto TTAB dalla Sigma con purezza del 99%. Le sostanze non sono state ulteriormente purificate.

β -DICHETO ACIDI

I β -dicheto acidi studiati, sintetizzati presso il Dipartimento Farmaco-Chimico-Tossicologico dell' Università di Sassari, hanno le seguenti formule di struttura:

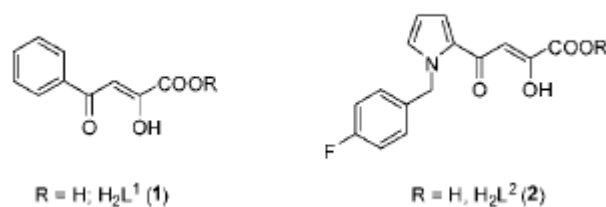


Fig. 43. Struttura dei β -dicheto acidi studiati

Questi composti sono l'acido (2Z)-2-idrossi-4-osso-4-fenilbut-2-enoico (H_2L^1 , **1**) e l'acido (2Z)-4-[1-(4-fluorobenzil)-1H-pirrol-2-il]-2-idrossi-4-ossobut-2-enoico (H_2L^2 , **2**).

METODI

MISURA DEI CALORI DI DILUIZIONE

Le entalpie di diluizione sono state misurate utilizzando un microcalorimetro Termometric TAM (flow mixing cell), dotato di un Nano Amplificatore 221, a 298 K. Il Termostato TAM (2277-011, da 5° a 90°C) è stabile fino a ± 0.1 mK. Le soluzioni sono state preparate per pesata usando acqua bollita e bidistillata preparata di fresco, conservata sotto azoto.

Le soluzioni preparate di fresco e portate alla temperatura sperimentale prima dell'iniezione con l'utilizzo di un bagno criotermostato Heto sono state diluite in una cella di misura mixing del microcalorimetro in rapporto 1:1 utilizzando acqua priva di CO₂. Le soluzioni e l'acqua sono iniettate per mezzo di una pompa peristaltica Gilson Miniplus 2 e i loro flussi sono misurati per pesata. La calibrazione elettrica è fatta prima e dopo ogni misura.

MISURA DELLA DENSITÀ E DELLA VELOCITÀ DEL SUONO

La densità e la velocità del suono delle soluzioni sono state misurate con un densimetro Paar DSA 5000 a tubo vibrante, che misura la densità (± 0.000001 g cm⁻³) e la velocità del suono (± 0.1 m sec⁻¹) con un'elevata accuratezza in ampi intervalli di viscosità e temperatura. La temperatura è controllata fino a $\pm 1 \cdot 10^{-3}$ K. Il densimetro è dotato di una cella di misura addizionale fatta di acciaio inossidabile e di un'alta risoluzione elettronica, cosicché la velocità del suono del campione può essere determinata accuratamente. Entrambe le celle di misura sono a temperatura controllata, tramite l'uso di un termometro interno e due termometri integrati al platino Pt 100. Lo strumento è stato calibrato prima di ogni serie di misure utilizzando acqua bidistillata degasata ($d_0 = 0.997043$ g cm⁻³, $u_0 = 1497$ m sec⁻¹ a 298 K) ed aria secca ($d = 0.001169$ g cm⁻³ a $P = 1$ bar).

CALORIMETRIA A SCANSIONE DIFFERENZIALE (DSC)

Gli studi DSC sono effettuati come descritto nei riferimenti [517-519]. Il comportamento dei tensioattivi in studio è analizzato in presenza di vescicole multilamellari (MLVs) di DPPC (dipalmitoil fosfatidilcolina), preparate utilizzando due metodi:

Metodo I: il DPPC è dissolto in cloroformio e le tracce residue sono rimosse con un flusso di azoto secco sotto pompa. Il film lipidico sulla parete del flask viene disperso aggiungendo le soluzioni acquose dei tensioattivi acetilati o disacetilati alle appropriate concentrazioni. Quindi si scuote intensamente a circa 60°C per 15 minuti in modo da ottenere una sospensione lattiginosa di liposomi. La concentrazione finale del lipide è di 25 mg/cm³. La sospensione lipidica viene caricata nella cella del campione del microcalorimetro DSC (Mettler Toledo Thermal Analysis System D.S.C 821^e).

Metodo II: il DPPC e un'appropriata quantità di tensioattivo acetilato o disacetilato vengono dissolti in cloroformio. Il cloroformio viene poi fatto evaporare per formare un film sottile della miscela sulla parete del flask. In seguito viene aggiunta acqua bidistillata e si procede come descritto sopra.

I cicli termici sono stati ripetuti per tre volte. L'errore sperimentale nella temperatura è di ± 0.2 °C.

SAGGI BIOLOGICI

Preparazione e conservazione del DNA

Il DNA plasmidico è stato purificato attraverso centrifugazione a gradiente di cesio cloruro. Una soluzione stock del plasmide 0.7 μ M in acqua milliQ (Millipore Corp., Burlington, MA) è stato conservato a -20°C. Il DNA plasmidico linearizzato (pEGFP-C1) è stato ottenuto tagliandolo con un enzima di restrizione EcoRI (Roche), in colonna (Genomed) e precipitato con alcol. Il pellet di plasmide linearizzato è stato lavato con etanolo al 70%, seccato all'aria e dissolto in H₂O distillata per ottenere una concentrazione finale di 1 μ g/ μ l.

EMSA (Electrophoresis Mobility Shift Assay)

Le reazioni di legame sono state eseguite in un volume finale di 14 μ l con 10 μ l di Tris/HCl 20 mM pH 8, 1 μ l di plasmide (1 μ g di pEGFP-C1) e 3 μ l delle soluzioni dei tensioattivi cationici in studio a diverse concentrazioni finali, comprese tra 25 e 200 μ M. La reazione di legame è lasciata avvenire a temperatura ambiente per 1 ora. Sono stati quindi aggiunti 5 μ l di glicerolo in H₂O 1 g/ml a ciascuna miscela e caricate su un gel di agarosio 1% di TA (40 mM Tris-Acetate). Il gel viene fatto correre per 2.5 ore in

un tampone di TA a 10 V/cm. Nelle soluzioni tampone non è stato messo EDTA poiché compete nella reazione con il DNA.

Culture cellulari

Le cellule umane del rabdomiosarcoma della linea RD-4, ottenute da David Derse, National Cancer Institute, Frederick, Maryland, sono state mantenute in monostrato usando un medium di crescita contenente 90% di DMEM, 10% di FBS, 2 mM di L-glutamina, 100 IU/ml di penicillina, 10 µg/ml di streptomicina. Quando le cellule hanno raggiunto il 70-90% di confluenza (ogni 3-5 giorni) sono state poste in un terreno di coltura fresco, e incubate a 37°C in atmosfera umidificata di 95% aria/5% CO₂

Saggio di trasfezione transiente

Le trasfezioni sono state eseguite in 6 pozzetti, quando le cellule erano confluenti all'80% (approssimativamente $3 \cdot 10^5$ cellule) nel giorno della trasfezione. Ad 1 ml di medium privo di siero sono stati aggiunti 3 µg di plasmide ed i tensioattivi in studio in modo da dare una concentrazione finale di 15 µM. la soluzione è stata mescolata rapidamente e poi incubata a temperatura ambiente per 20 minuti. Ogni miscela è stata aggiunta alle cellule dopo aver aspirato il medium di coltura. Le formulazioni dei lipoplessi sono state ottenute aggiungendo il DOPE alla miscela plasmide-tensioattivo a differenti rapporti molari tensioattivo:DOPE (1:1, 1:2 e 2:1), dove la concentrazione di tensioattivo è stata mantenuta di 15 µM. E' stato usato come controllo positivo il reagente di trasfezione lipidico neutro GenePORTER. La miscela e le cellule sono state incubate a 37°C in atmosfera umidificata di 95% aria / 5% CO₂ per 5 ore. Infine, 1 ml di medium contenente il 20% di FBS è stato addizionato in ogni pozzetto di trasfezione e poi incubato per 72 ore. Le cellule trasfettate sono state osservate con microscopia di fluorescenza per monitorare l'espressione di EGFP. Per ciascun pozzetto sono stati esaminati 5 campi casuali ed ogni esperimento è stato ripetuto tre volte. Le differenze statistiche tra i trattamenti sono state calcolate con il test di Student e l'analisi multifattoriale ANOVA.

Immagini AFM

È stato utilizzato un microscopio Nanoscope IIIA (Digital Instruments Inc. Santa Barbara, CA) operante in tapping mode. Le immagini 512×512 pixels sono state

ottenute con una scan size di 2 μm a una scan rate di 3-4 linee per secondo e sono state rielaborate attraverso il software Nanoscope.

PREPARAZIONE DELLA SOLUZIONE DI TENSIOATTIVO

Le soluzioni dei tensioattivi presi in esame sono state preparate partendo dal tensioattivo allo stato solido e portandolo in soluzione con acqua bidistillata e decarbonata, arrivando ad ottenere una soluzione 20 μM .

PREPARAZIONE DELLA SOLUZIONE DI DNA PLASMIDICO

TENSIOATTIVI GLUCOCATIONICI

Da una concentrazione iniziale di 300 nM, il DNA plasmidico è stato diluito con acqua bidistillata e decarbonata fino ad una concentrazione di 50 nM.

TENSIOATTIVI GEMINI

La concentrazione iniziale è sempre di 300 nM, ma in questo caso si diluisce fino ad arrivare ad una concentrazione di 100 nM.

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

TENSIOATTIVI GLUCOCATIONICI

DNA plasmidico: partendo dalla concentrazione di 50 nM si diluisce il DNA plasmidico con il buffer di deposizione (4 mM Hepes, 10 mM NaCl, 2 mM MgCl_2 , pH = 7.4) a una concentrazione finale di 0.5 nM. Si depositano 20 μl di questa soluzione sulla superficie della mica e si lascia in deposizione per 1 minuto. Il campione viene successivamente lavato con acqua bidistillata e decarbonata e asciugato con un flusso di azoto.

DNA plasmidico + tensioattivo: si prelevano 2 μl di DNA (50 nM), si aggiungono 178 μl di buffer di deposizione e in ultimo si aggiungono 20 μl di tensioattivo (20 μM), e si lascia in incubazione per 5 minuti, dopodiché si depositano 20 μl di questa soluzione sulla superficie della mica e si procede come sopra.

DNA plasmidico + tensioattivo + DOPE: si prelevano 2 μl di DNA (50 nM), si aggiungono 160 μl di buffer di deposizione e 18 μl di DOPE (45 μM). Si lascia incubare per 5 minuti, poi si opera come descritto sopra.

TENSIOATTIVI GEMINI:

DNA plasmidico: partendo dalla concentrazione di 100 nM, questa volta si diluisce con il buffer di deposizione a una concentrazione di 1 nM e si procede come sopra.

DNA plasmidico + tensioattivo: in questo caso sono stati presi in considerazione tre rapporti di concentrazione DNA:tensioattivo diversi. Nel rapporto 1:1000 si prelevano 2 μl di DNA (100 nM), si aggiungono 188 μl di buffer di deposizione e in ultimo si aggiungono 10 μl di tensioattivo (20 μM) e si opera come descritto in precedenza. Negli altri rapporti si mantiene fissa la quantità di DNA (2 μl), ma nel rapporto 1:3000 si aggiungono 168 μl di buffer e 30 μl di tensioattivo (che rimane sempre 20 μM) e nel rapporto 1:6000 138 μl di buffer e 60 μl di tensioattivo.

DNA plasmidico + tensioattivo + DOPE: anche in questo caso sono stati presi in considerazione più rapporti DNA:tensioattivo, mantenendo invece costante il rapporto DOPE:tensioattivo di 1:2. Nel rapporto 1:1000 si prelevano 2 μl di DNA (100 nM), si aggiungono 184 μl di buffer di deposizione, 10 μl di tensioattivo (20 μM) e 4 μl di DOPE (100 μM). Si lascia incubare per 5 minuti, poi si opera come descritto in precedenza. Nel caso del rapporto 1:3000 ai 2 μl di DNA (100 nM) si aggiungono 30 μl di tensioattivo (20 μM) e 12 μl di DOPE (100 μM). Infine, per il rapporto 1:6000: 2 μl di DNA (100 nM), 60 μl di tensioattivo (20 μM) e 24 μl di DOPE (100 μM).

Il DOPE è stato disciolto in acqua ed etanolo, la percentuale di quest'ultimo nella soluzione finale con il plasmide è stata mantenuta sempre al di sotto del 2% (circa 1%) in modo da non danneggiare in alcun modo il DNA.

MISURE DI CONDUCTIBILITA'

Le misure sono state effettuate con un conduttimetro CRISON MICRO CM2202 in una cella di vetro da 20 cm^3 con una costante di cella di 0.943 cm^{-1} [520]. Lo strumento provvede automaticamente a passare dalla scala dei $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ o $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ a seconda del range di resistenza della soluzione. La cella in vetro è mantenuta a temperatura costante dall'acqua circolante nella camicia esterna e proveniente da un termostato CRIOTERM190 ISCO GTR 190. La soluzione all'interno della cella viene mescolata da un magnete

Le soluzioni sono state preparate utilizzando acqua bidistillata e decarbonata. Le misure sono state condotte in atmosfera di azoto. La cella è stata accuratamente pulita prima di introdurre una nuova soluzione.

MISURE DI TENSIONE SUPERFICIALE

La tensione superficiale è stata misurata utilizzando un tensiometro digitale Lauda (TE1C/3). Le misure sono state effettuate a $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$ utilizzando un anello Du Noüy (in lega Pt/Ir (80/20), circonferenza: 60 ± 0.2 mm, diametro del filo 0.4 mm, peso: 1.6 g). La temperatura del campione è controllata a $\pm 0.1^\circ\text{C}$ con un bagno termostato ad acqua circolante (ISCO GTR 2000 IIX). I dati sono stati corretti in accordo con il metodo di Zuidema e Waters. Lo strumento è stato calibrato con acqua deionizzata e bidistillata ogni volta che è stata fatta la misura, poiché i tensioattivi gemini dicationici si adsorbono sulla superficie del vetro caricata negativamente; tutta la vetreria è stata accuratamente immersa nelle soluzioni da misurare e le soluzioni fresche sono state fatte riposare per alcune ore prima di misurare la tensione superficiale. Sono state effettuate un set di misure ad intervalli di 15 minuti fino a non osservare più alcun cambiamento. La deviazione standard delle misure è inferiore a 0.15 mN/m.

MISURE POTENZIOMETRICHE

Le costanti di equilibrio per le reazioni di protonazione e complessazione sono state determinate attraverso misure potenziometriche, condotte in una soluzione metanolo/acqua 9:1 (v/v) ad una forza ionica di KCl 0.1 M e a $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$, nel range di pH 2.5-11, sotto N_2 . La temperatura è stata controllata a $\pm 0.1^\circ\text{C}$ con l'uso di un bagno ad acqua circolante termostata (ISCO GTR 2000 IIX). Adeguate quantità della soluzione di ligando, preparate per pesata, sono state titolate con KOH standard (metanolo/acqua = 9:1 (v/v), $I = 0.1$ M KCl) con e senza ioni metallici. Durante tutta la misura è stata applicata un'agitazione magnetica a velocità costante. In tutte le misure sono stati usati metanolo bollito da poco ed acqua bidistillata, mantenuti sotto N_2 . La procedura sperimentale per la determinazione di costanti di equilibrio accurate in questo solvente è stata descritta in dettaglio nel rif. [521]. Le costanti di protonazione dei ligandi sono state ottenute titolando 20-50 mL di campione per ciascun ligando (da $5 \cdot 10^{-3}$ a $7 \cdot 10^{-3}$ M). Per le costanti di formazione del complesso, le titolazioni sono state condotte con diversi rapporti ligando/metallo (da 1 fino a 4). Per ciascun sistema sono state eseguite almeno due misure (circa 80 punti sperimentali ciascuna). Le titolazioni potenziometriche sono state condotte per mezzo di un apparato completamente automatizzato, dotato di un voltmetro digitale Crison GLP 21-22 (risoluzione 0.1 mV)

e di una buretta automatica Metrohm Dosimat 655 da 5 mL, entrambi controllati da un nostro software, scritto in BASIC, funzionante su un computer IBM.

La catena elettroica (elettrodo a vetro Crison 5250 ed elettrodo a calomelano Radiometer 401 con KCl 0.1 M in metanolo/acqua 9:1 (v/v)) è stata calibrata in termini di $[H^+]$ per mezzo di una titolazione acido forte – base forte, con il metodo di Gran [522], consentendo la determinazione del potenziale standard di elettrodo, E^0 (373.7 ± 0.1 mV) e del prodotto ionico dell'acqua, K_w ($pK_w = 14.38 \pm 0.01$) nelle condizioni sperimentali usate.

Il software HYPERQUAD [523] è stato utilizzato per valutare le costanti di protonazione e complessazione dai dati di fem.

ELABORAZIONE DEI DATI

ENTALPIE MOLARI APPARENTI E PARZIALI

I dati sperimentali sono stati espressi in termini di quantità molari apparenti e parziali del soluto, come abituale in termodinamica delle soluzioni, assumendo la diluizione infinita come stato di riferimento. Le quantità molari apparenti e parziali sono state ottenute dai dati sperimentali usando metodi descritti in dettaglio nei rif. [524-528].

Per chiarezza, si ricorda che, con riferimento allo stato di diluizione infinita, l'entalpia molare di diluizione, ΔH_d , è data dalla equazione:

$$\Delta H_d = L_{\phi,f} - L_{\phi,i} \quad (1)$$

dove L_{ϕ} è l'entalpia relativa molare apparente e gli indici f e i indicano le concentrazioni finali (dopo la diluizione) e iniziali (prima della diluizione), rispettivamente.

Per i tensioattivi ionici, nella regione premicellare, l'entalpia relativa molare apparente può essere espressa per mezzo di una polinomiale di $m^{1/2}$, fermando lo sviluppo in serie al terzo termine si ottiene:

$$L_{\phi} = A_L m^{1/2} + B_L m + C_L m^{3/2} \quad (2)$$

dove A_L è la pendenza limite di Debye-Huckel per le entalpie relative e tiene conto delle interazioni elettrostatiche soluto-soluto a lungo raggio. I parametri B_L e C_L sono ottenuti dai punti sperimentali nella regione premicellare da una curva di fitting dei minimi quadrati.

Nella regione micellare le entalpie molari apparenti sono state valutate per mezzo dell'eq. 1 e, quando è necessario un valore di L_{ϕ} vs m non misurato sperimentalmente, per mezzo dell'interpolazione grafica.

Le entalpie molari parziali L_2 sono state determinate disegnando la miglior curva per le entalpie molari apparenti vs. m e quindi dal calcolo delle quantità molari parziali come $\Delta(mL_{\phi})/\Delta m$ interpolato dai punti ad intervalli regolari.

Le capacità termiche isobariche molari parziali e apparenti vs m sono state ottenute da:

$$C_{\phi} = [L_{\phi}(313 \text{ K}) - L_{\phi}(298 \text{ K})]/15 \quad (3)$$

assumendo che le capacità termiche siano costanti nel range di temperatura sperimentale.

VOLUMI MOLARI E COMPRESSIBILITÀ ADIABATICHE

I volumi molari apparenti, V_ϕ , e le compressibilità isoentropica, $K_{s,\phi}$, sono stati calcolati per mezzo delle seguenti equazioni [529-532]:

$$V_\phi = M/d - 10^3(d-d_0)/mdd_0 \quad (4)$$

$$K_{s,\phi} = M\beta_s/d - 10^3(\beta_{s,0}d - \beta_s d_0)/mdd_0 \quad (5)$$

dove d è la densità di una soluzione di molalità m , M è il peso molecolare del tensioattivo, d_0 è la densità del solvente. $\beta_{s,0}$ e β_s sono i coefficienti di compressibilità adiabatica del solvente e del soluto, rispettivamente. Quest'ultimo è calcolato a partire dalla velocità del suono, u , e dai dati di densità:

$$\beta_s = 100/(u^2 d) \quad (6)$$

VARIAZIONE DELLE PROPRIETÀ TERMODINAMICHE E VOLUMETRICHE ALLA MICELLIZZAZIONE

Al fine di estrarre dall'andamento delle proprietà termodinamiche e volumetriche in funzione della concentrazione la variazione subita da tali proprietà per effetto della formazione delle micelle, occorre assumere un modello fisico per il processo di micellizzazione: il più semplice è un modello di transizione di pseudofase in cui la transizione da monomero a pseudofase aggregata è considerata una transizione di fase che avviene all'equilibrio. In questo modello, si assume che, alla cmc, le proprietà molari parziali presentino una discontinuità dovuta alla formazione di micelle (pseudofase). Usando un modello di questo tipo, si possono ricavare i parametri di micellizzazione per estrapolazione grafica alla cmc degli andamenti delle proprietà molari parziali prima e dopo la cmc.

L'equazione usata è:

$$X_\phi = X_{\phi,M} - (cmc - \Delta X_{\phi,m}) (1/m) \quad (7)$$

dove X sta per la proprietà studiata. Conoscendo i valori della cmc, i valori di $X_{\phi,M}$, la proprietà in fase micellare, e $\Delta X_{\phi,m}$, la variazione della proprietà alla micellizzazione, possono essere ottenuti con il metodo dei minimi quadrati.

I valori alla cmc, $X_{\phi,cmc}$, possono essere ottenuti nel modo seguente

$$X_{\phi,cmc} = X_{\phi,M} - \Delta X_{\phi,m} \quad (8)$$

CONDUCIBILITA'

Dalle curve di titolazione, la cmc è stata ottenuta dall'ascissa del punto di intersezione delle linee rette ottenute dall'interpolazione dei punti prima e dopo la cmc. Il valore di α , il grado di dissociazione del controione, è ottenuto dal rapporto tra le pendenze delle linee rette prima e dopo la cmc. Il grado di legame del controione, β , è ottenuto dalla relazione

$$\beta = (1 - \alpha) \quad (9)$$

Poichè l'interpolazione grafica può essere imprecisa, soprattutto quando le curve si arrotondano in prossimità della cmc, abbiamo calcolato la cmc utilizzando la metodologia proposta da Carpena [533]. Essa propone di calcolare direttamente l'equazione dell'integrale della sigmoide, integrale che dovrebbe corrispondere alla curva dei dati sperimentali. A questo scopo è stato elaborato un apposito software.

Si ottiene quindi l'equazione:

$$F(x) = F(0) + A_1 x + \Delta x(A_2 - A_1) \ln [(1 + \exp(x - x_0)/\Delta x)/(1 + \exp(-x_0)/\Delta x)] \quad (10)$$

I parametri A_1 and A_2 rappresentano, rispettivamente, i valori asintotici per piccoli e grandi valori di x (la concentrazione) e x_0 rappresenta il punto centrale della sigmoide, cioè la cmc e Δx rappresenta l'ampiezza della sigmoide, cioè della transizione. Per ottenere i valori dei parametri che compaiono nell'equazione (10) attraverso un fitting non lineare dei dati sperimentali, abbiamo costruito dapprima il vettore dei parametri $A(1)$, eseguendo le seguenti sostituzioni:

$$A(1) = A_1$$

$$\begin{aligned}
A(2) &= \Delta x (A_2 - A_1) \\
A(3) &= \exp(-x_0 / \Delta x) \\
A(4) &= \Delta x
\end{aligned} \tag{11}$$

L'equazione (10) si trasforma in

$$y = A(1) x + A(2) \ln \{ [1 + A(3) \exp(x/A(4))] / [1 + A(3)] \} \tag{12}$$

dove $y = \kappa - \kappa_w$ (con κ_w = conducibilità dell'acqua) e $x = m$ (molarità). I parametri sono stati ottenuti da una procedura che utilizza miglior fitting iterativo per la ricerca di valori che minimizzano la somma delle deviazioni standard tra i dati osservati e calcolati. Come algoritmo di minimizzazione, abbiamo usato il metodo *steepest descent* dove, ad ogni ciclo di affinamento, la procedura di ricerca per il minimo della sommatoria delle deviazioni viene fatta per ogni parametro. I dati di input sono il numero totale di punti sperimentali, le coppie di valori x (molarità) e y (conducibilità), i parametri E (fattore di convergenza) ed $E1$ (grandezza iniziale dello step) ed i valori iniziali dei parametri da ottimizzare, ottenuti dai dati sperimentali elaborati col metodo lineare descritto in precedenza.

Una volta ottenuto il vettore $A(1)$ i parametri ottimizzati sono calcolati attraverso le equazioni

$$\begin{aligned}
A_1 &= A(1) \\
A_2 &= A(2) / A(4) + A(1) \\
cmc &= - [\ln(A(3))] A(4) \\
\Delta x &= A(4) \\
\beta &= 1 - [A(2)/A(1)]
\end{aligned} \tag{13}$$

TENSIONE SUPERFICIALE

Il logaritmo della concentrazione micellare critica (cmc) è stato ottenuto come l'ascissa del punto di intersezione delle due porzioni lineari del grafico γ vs $\log C$, prima e dopo la cmc. La pendenza della porzione lineare di ogni curva sotto la cmc è stata determinata col metodo dei minimi quadrati.

In questi diagrammi, l'assenza di un minimo nella regione oltre la concentrazione micellare critica (regione post-cmc) indica la mancanza o, tutt'al più, la lieve presenza nei composti di impurezze attive sulla tensione superficiale.

La concentrazione eccesso superficiale $\Gamma_{\max}$ [mol cm⁻²], e l'area per molecola all'interfaccia $A_{\min}$ [Å²] all'interfaccia acqua/aria sono state calcolate usando l'isoterma di adsorbimento di Gibbs [534-535].

$$\Gamma_{\max} = (1/2.303nRT) \cdot (-\delta\gamma/\delta\log C)_T \quad (14)$$

$$A_{\min} = 10^{16} / N \Gamma_{\max} \quad (15)$$

dove $(-\delta\gamma/\delta\log C)_T$ è la pendenza del grafico a temperatura T costante, γ è in dyn/cm, $R=8.314 \cdot 10^7$ ergs mol⁻¹ K⁻¹ (costante dei gas), N è il numero di Avogadro ed n è una costante che equivale al numero di specie che si originano in soluzione per dissociazione del tensioattivo e la cui concentrazione varia alla superficie cambiando la concentrazione di tensioattivo nella fase bulk (C). Per tensioattivi non ionici $n=1$, per tensioattivi ionici univalenti (ed anche per i tensioattivi gemini da noi analizzati, costituiti da una testa cationica di natura piridinica ed un controione cloruro) si utilizza generalmente il valore $n=2$, per tensioattivi bolaformi e di bis-ammonio quaternario si dovrebbe utilizzare il valore $n=3$.

$\Gamma_{\max}$ (concentrazione eccesso superficiale) è la massima concentrazione di specie adsorbite alla cmc.

$A_{\min}$ (area per molecola all'interfaccia) è la minima area che una molecola dovrebbe occupare nello strato aria/acqua in condizioni di saturazione superficiale alla cmc.

C_{20} è la concentrazione molare del tensioattivo richiesta per ridurre la tensione superficiale del solvente di 20 dyn/cm [536]. Questo parametro misura quindi l'efficienza di adsorbimento del tensioattivo sulla superficie. Nel nostro caso, poiché la γ del solvente è pari a 72.00 dyn/cm, basterà sostituire nell'equazione della retta a pendenza negativa un valore di $y = 52.00$ dyn/cm e ricavare la $x = \log C_{20}$, da cui $C_{20} = 10^x$.

pC_{20} equivale al logaritmo negativo in base dieci della C_{20} .

γ_{CMC} è la tensione superficiale (espressa in dyn/cm) che si raggiunge alla cmc.

cmc/C_{20} è un parametro che confronta la tendenza del tensioattivo a formare micelle con la tendenza ad adsorbirsi alla superficie. Un elevato valore di cmc/C_{20} indica che il tensioattivo ha una maggiore tendenza ad adsorbirsi all'interfaccia aria/acqua rispetto alla tendenza a formare micelle. Un incremento di questo rapporto indica che la micellizzazione è più inibita dell'adsorbimento o che l'adsorbimento è più facilitato della micellizzazione, mentre un decremento indica l'inverso.

RISULTATI

DEDAB

Misure termodinamiche e volumetriche

I calori di diluizione e le entalpie molari apparenti e parziali del DEDAB a 298 K e a 313 K, ottenuti per mezzo delle eq. 1 e 2, sono elencati nelle Tab. 1 e 2. I relativi grafici, anche in confronto con il DTAB, sono riportati nelle Fig. 44 e 45.

Nella Tab. 3 sono riportati i valori delle capacità termiche molari apparenti e parziali del DEDAB. In Fig. 46 è rappresentato l'andamento delle capacità termiche molari apparenti del DEDAB e del DTAB in funzione della concentrazione.

I dati di densità e i volumi molari apparenti, sono elencati nella Tab. 4, mentre i dati di velocità del suono, coefficienti di compressibilità adiabatica e compressibilità isoentropica, sono riportati nella Tab. 5. I grafici dei volumi molari apparenti e delle compressibilità isoentropiche, in cui sono anche presenti le curve relative al DTAB, sono riportati nelle Fig. 47 e 48.

TABELLA 1

Molalità (m), entalpie di diluizione (ΔH_d), entalpie molari apparenti (L_ϕ), e parziali (L_2), del tensioattivo DEDAB, in acqua a 298 K.

m_i (mol kg ⁻¹)	m_f (mol kg ⁻¹)	ΔH_d (J mol ⁻¹)	$L_{\phi,i}$ (J mol ⁻¹)	$L_{\phi,f}$ (J mol ⁻¹)	$L_{2,i}$ (J mol ⁻¹)	$L_{2,f}$ (J mol ⁻¹)
0.00646	0.00322	-115.18	277	166	493	282
0.00745	0.00372	-131.06	310	184	558	315
0.00845	0.00417	-139.88	343	199	623	344
0.00945	0.00457	-158.67	376	213	689	371
0.01190	0.00602	-191.64	458	262	854	464
0.01243	0.00633	-205.46	475	273	889	485
0.01392	0.00709	-226.36	525	298	930	540
0.01462	0.00731	-247.26	549	305	940	555
0.01540	0.00768	-255.60	575	318	930	585
0.01639	0.00825	-248.32	585	337	900	600
0.01739	0.00870	-238.76	590	352	750	650
0.01988	0.01003	-190.04	585	395	505	725
0.02285	0.01153	-112.64	558	445	360	845
0.02585	0.01287	-32.34	522	490	260	900
0.02980	0.01485	69.09	487	556	145	940
0.03677	0.01831	181.05	404	585	10	650
0.04967	0.02468	269.39	281	550	-235	270
0.05962	0.02979	314.84	172	487	-395	145
0.07458	0.03709	365.70	34	400	-580	8
0.09945	0.05011	407.85	-129	279	-820	-240
0.12919	0.06285	486.42	-341	145	-1080	-440
0.15937	0.07699	525.64	-506	20	-1270	-610
0.19875	0.09574	561.08	-671	-110	-1490	-780
0.24831	0.11911	598.57	-887	-288	-1740	-1010
0.29804	0.14004	628.83	-1034	-405	-1950	-1150
0.34780	0.16349	651.25	-1181	-530	-2050	-1280
0.39773	0.18700	670.68	-1301	-630	-2130	-1415

TABELLA 2

Molalità (m), entalpie di diluizione (ΔH_d), entalpie molari apparenti (L_ϕ), e parziali (L_2), del tensioattivo DEDAB, in acqua a 313 K.

m_i (mol kg ⁻¹)	m_f (mol kg ⁻¹)	ΔH_d (J mol ⁻¹)	$L_{\phi,i}$ (J mol ⁻¹)	$L_{\phi,f}$ (J mol ⁻¹)	$L_{2,i}$ (J mol ⁻¹)	$L_{2,f}$ (J mol ⁻¹)
0.00599	0.00294	-98.20	235	139	429	231
0.00646	0.00324	-99.86	251	148	463	249
0.00698	0.00351	-102.20	268	157	501	266
0.00795	0.00396	-144.80	301	171	574	294
0.00895	0.00447	-142.38	335	187	652	327
0.00938	0.00469	-206.06	406	200	790	340
0.01093	0.00547	-207.22	417	210	850	385
0.01192	0.00600	-216.05	451	235	725	430
0.01292	0.00666	-201.95	461	260	545	475
0.01391	0.00705	-198.43	470	272	100	500
0.01987	0.00982	1074.16	-664	410	-5540	940
0.02484	0.01252	2466.18	-2011	455	-6340	620
0.02981	0.01457	3177.97	-2717	460	-6740	-700
0.04968	0.02474	2553.35	-4543	-1990	-7440	-6325
0.06954	0.03472	2008.76	-5278	-3270	-7730	-7000
0.09933	0.04942	1589.24	-6109	-4520	-8000	-7440
0.11986	0.05717	1586.80	-6436	-4850	-8095	-7560
0.13986	0.06708	1381.02	-6656	-5205	-8160	-7695
0.18478	0.08800	1189.22	-7019	-5830	-8355	-7900
0.24966	0.11458	1096.60	-7461	-6365	-8650	-8075
0.29012	0.13420	1034.37	-7624	-6590	-8775	-8145
0.34787	0.17011	934.08	-7854	-6920	-8900	-8240
0.39950	0.18344	977.30	-7987	-7010	-9025	-8350
0.44941	0.20182	978.73	-8118	-7140	-9240	-8415
0.49926	0.22705	964.40	-8274	-7310	-9300	-8530

TABELLA 3

Capacità termiche molari apparenti ($C_{p,\phi}$) e parziali ($C_{p,2}$) del DEDAB in acqua in funzione della molalità (m).

M (mol kg ⁻¹)	$C_{p,\phi}$ (J K ⁻¹ mol ⁻¹)	$C_{p,2}$ (J K ⁻¹ mol ⁻¹)
0.00322	-1.2	-2.8
0.00372	-0.9	-2.7
0.00417	-1.3	-2.6
0.00457	-1.2	-2.7
0.00602	-1.8	-2.3
0.00633	-1.9	-2.3
0.00646	-1.8	-2.2
0.00709	-1.5	-2.0
0.00731	-1.7	-2.3
0.00745	-1.7	-2.2
0.00768	-1.8	-2.3
0.00825	-2.1	-0.3
0.00845	-2.2	-0.9
0.00870	-2.1	-1.3
0.00945	-0.1	8.7
0.01003	2.3	12.7
0.01153	0.0	-4.0
0.01190	-0.5	-7.9
0.01243	-1.3	-16.6
0.01287	-2.0	-22.7
0.01392	-3.3	-55.3
0.01462	-6.6	-112.7
0.01485	-7.8	-136.0
0.01540	-13.3	-232.0
0.01639	-22.7	-286.7
0.01739	-37.0	-336.7
0.01831	-53.3	-378.0
0.01988	-83.4	-403.0
0.02285	-144.2	-430.0
0.02468	-167.3	-438.7
0.02585	-179.5	-446.7
0.02979	-213.5	-458.7
0.02980	-213.5	-458.7
0.03677	-259.9	-473.3
0.03709	-261.7	-473.9
0.04967	-321.4	-480.3
0.05011	-321.9	-480.7
0.05962	-341.1	-480.3
0.06285	-347.0	-480.0
0.07458	-365.0	-480.7
0.07699	-368.7	-480.0

0.09574	-395.3	-479.0
0.09945	-399.1	-478.7
0.11911	-414.8	-472.3
0.12919	-413.2	-470.3
0.14004	-415.7	-467.3
0.15937	-422.0	-465.0
0.16349	-422.7	-465.3
0.18700	-427.3	-463.0
0.19875	-430.3	-460.7
0.24831	-442.9	-460.0
0.29804	-442.4	-456.7
0.34780	-444.9	-456.7
0.39773	-446.0	-459.0

FIGURA 44

Entalpie relative molari apparenti (pallini gialli a 298 K e quadrati verdi a 313 K) ed entalpie relative molari parziali (pallini azzurri a 298 K e quadrati viola a 313 K) del tensioattivo DEDAB in funzione della concentrazione m .

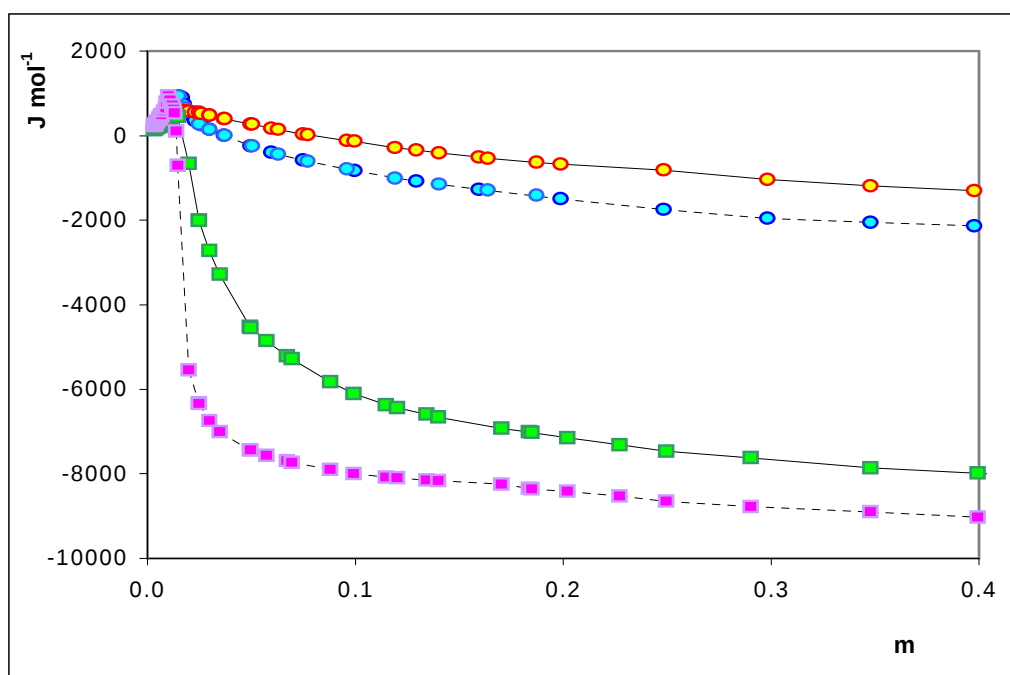


FIGURA 45

Entalpie relative molari apparenti (pallini azzurri DEDAB e triangoli verde chiaro DTAB) e entalpie relative molari parziali (pallini blu DEDAB e triangoli verde scuro DTAB) dal rif. [537] in funzione della concentrazione m a 298 K.

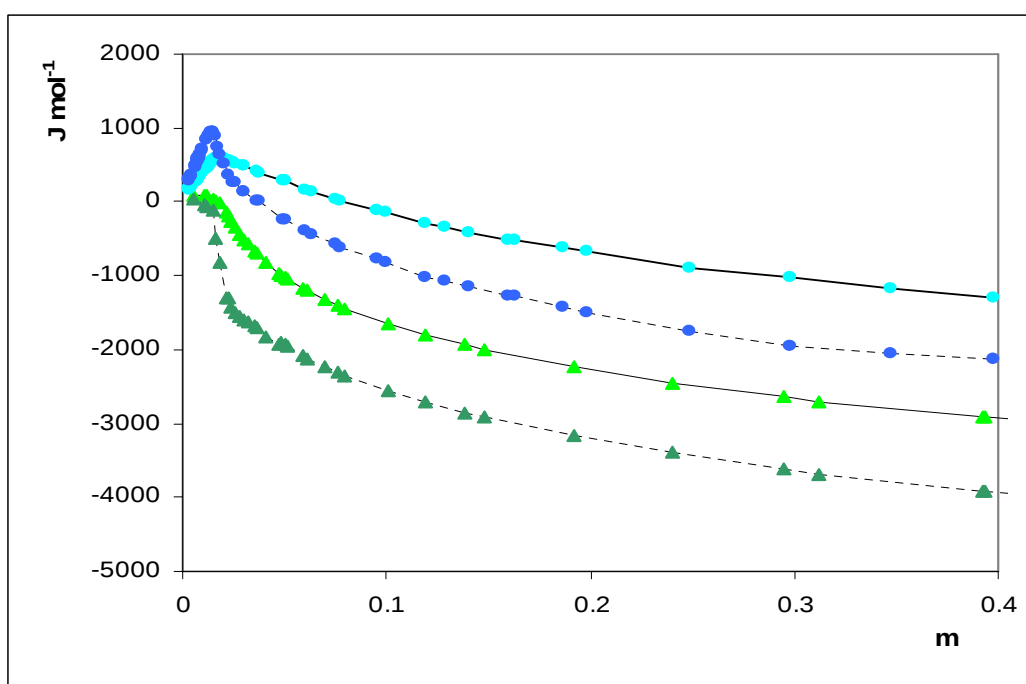


FIGURA 46

Capacità termiche relative molari apparenti del DEDAB (pallini rossi) e del DTAB (triangoli arancioni) del rif.[537] in funzione della concentrazione m a 298 k.

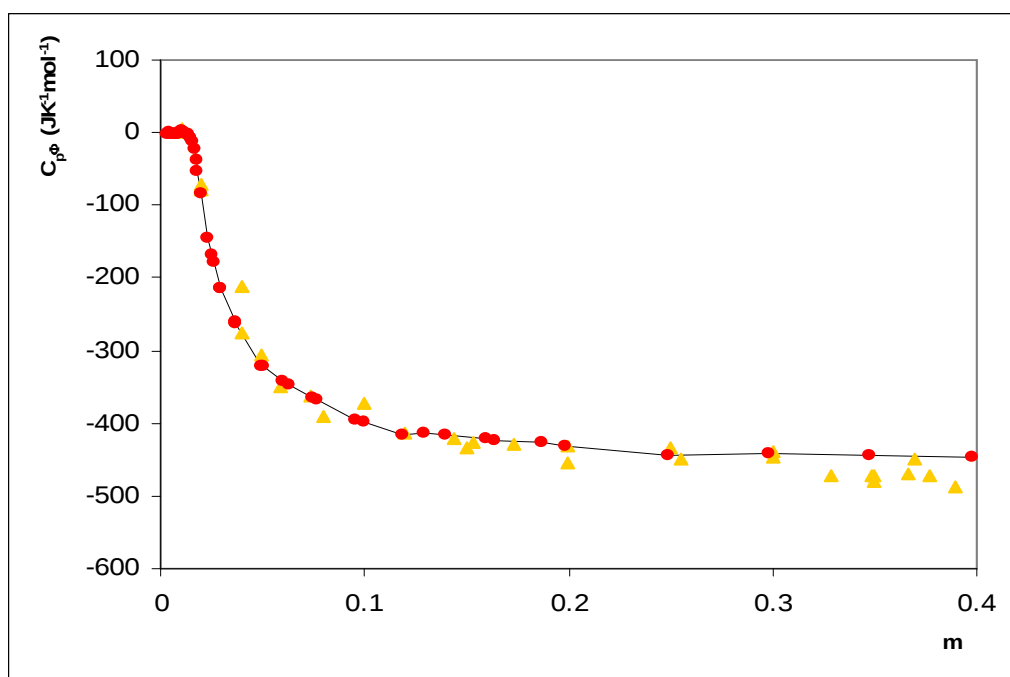


TABELLA 4

Densità (d), volume molare apparente (V_Φ) in funzione della molalità (m), del tensioattivo DEDAB, in acqua a 298 K.

m (mol kg ⁻¹)	D (g cm ³)	V_Φ (cm ³ mol ⁻¹)
0.00600	0.997164	302.51
0.00500	0.997143	302.59
0.01250	0.997299	302.58
0.01501	0.997347	302.80
0.02000	0.997408	305.02
0.02482	0.997474	305.76
0.03007	0.997544	306.52
0.03974	0.997670	307.27
0.05960	0.997937	307.97
0.07949	0.998198	308.36
0.09931	0.998461	308.53
0.14909	0.999098	308.84
0.15013	0.999126	308.75
0.16888	0.999346	308.91
0.19878	0.999725	308.94
0.24848	1.000333	309.00
0.25035	1.000362	308.98
0.29812	1.000934	309.00
0.50084	1.003200	309.06

TABELLA 5

Velocità del suono (U), coefficiente di compressibilità adiabatica (β_s), compressibilità isoentropica ($K_{s,\phi}$) in funzione della molalità (m), del tensioattivo DEDAB, in acqua a 298 K.

m (mol kg ⁻¹)	U (m s ⁻¹)	$10^5 \beta_s$ (bar ⁻¹)	$K_{s,\phi}$ (cm ³ bar ⁻¹ mol ⁻¹)
0.00700	1498.78	4.4642	-0.003040
0.00800	1499.03	4.4627	-0.002952
0.01000	1499.53	4.4595	-0.002863
0.01250	1500.10	4.4559	-0.002359
0.01501	1500.40	4.4539	-0.001043
0.01800	1500.52	4.4530	0.000889
0.02000	1500.46	4.4533	0.002136
0.03007	1500.68	4.4514	0.005391
0.04003	1500.89	4.4494	0.006989
0.04003	1501.05	4.4484	0.006824
0.05005	1501.09	4.4477	0.007987
0.06000	1501.32	4.4457	0.008600
0.06005	1501.44	4.4449	0.008516
0.07008	1501.49	4.4441	0.009111
0.08004	1501.74	4.4420	0.009427
0.09011	1501.91	4.4405	0.009734
0.10003	1502.18	4.4383	0.009910
0.10004	1502.32	4.4372	0.009807
0.15013	1503.49	4.4273	0.010417
0.15013	1503.25	4.4291	0.010528
0.20005	1504.42	4.4195	0.010806
0.25035	1505.59	4.4099	0.010969
0.30045	1506.94	4.3991	0.011009
0.30084	1507.05	4.3984	0.011002
0.35068	1508.09	4.3900	0.011103
0.40055	1509.22	4.3810	0.011157
0.45041	1510.31	4.3723	0.011202
0.50084	1511.43	4.3635	0.011234

FIGURA 47

Volume molare apparente (V_ϕ) del DEDAB (pallini viola) e del DTAB (triangoli rosa) dal rif.[530] in funzione della molalità m a 298 K. contiene anche i risultati derivati dal fit dei dati sperimentali con l'eq. 7 (—).

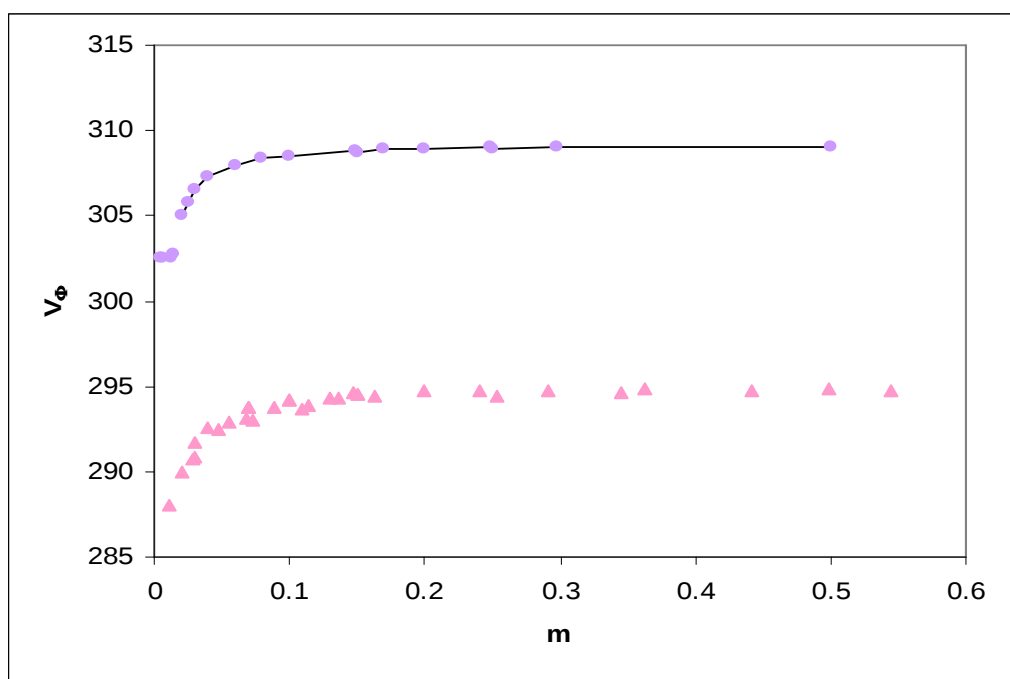
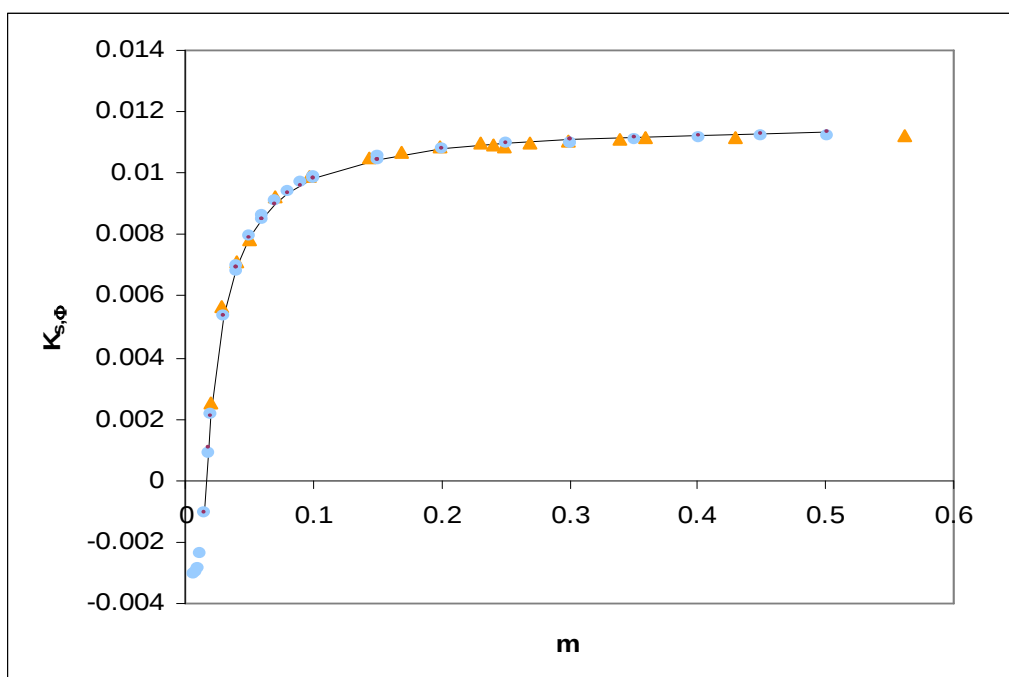


FIGURA 48

Compressibilità isoentropiche molari apparenti del DEDAB (pallini azzurri) e del DTAB (triangoli arancioni) dal rif.[530] in funzione della concentrazione m a 298 K. contiene anche i risultati del fit dei dati sperimentali con l'eq.7 (—).



TENSIOATTIVI GLUCOCATIONICI ACETILATI

Misure termodinamiche e volumetriche

I calori di diluizione e le entalpie molari apparenti e parziali di C_8AGCB , $C_{12}AGCB$, e $C_{16}AGCB$ sono elencati nelle Tab. 6-8. I relativi grafici sono riportati nelle Fig. 49-51.

I dati di densità e i volumi molari apparenti, sono elencati nelle Tab. 9, 11, 13, mentre i dati di velocità del suono, coefficienti di compressibilità adiabatica e compressibilità isoentropica, sono riportati nelle Tab. 10, 12, 14. I grafici dei volumi molari apparenti sono riportati nelle Fig. 52, 54, 56, mentre quelli delle compressibilità isoentropiche sono riportati nelle Fig. 53, 55, 57.

Nella sezione Discussione, nelle Fig 94, 95, 97, 98 sono riportati rispettivamente i confronti delle entalpie molari apparenti, delle entalpie molari parziali dei volumi molari apparenti e delle compressibilità isoentropiche tra questi tre composti. In Fig. 96 è riportato il confronto delle entalpie molari apparenti tra $C_{12}AGCB$, DEDAB e DTAB.

TABELLA 6

Molalità (m), entalpie di diluizione (ΔH_d), entalpie molari apparenti (L_ϕ), e parziali (L_2), del tensioattivo C₈AGCB, in acqua a 298 K.

m_i (mol kg ⁻¹)	m_f (mol kg ⁻¹)	ΔH_d (J mol ⁻¹)	$L_{\Phi,i}$ (J mol ⁻¹)	$L_{\Phi,f}$ (J mol ⁻¹)	$L_{2,i}$ (J mol ⁻¹)	$L_{2,f}$ (J mol ⁻¹)
0.00501	0.00247	-14.65	133	93	205	139
0.00600	0.00305	-22.82	147	103	228	155
0.00700	0.00354	-49.21	160	111	252	168
0.00801	0.00409	-55.32	173	120	275	182
0.00996	0.00489	-64.24	198	132	320	202
0.02000	0.00986	-74.47	319	196	563	317
0.02497	0.01234	-149.73	380	226	696	375
0.02800	0.01380	-187.29	419	244	782	409
0.02901	0.01430	-188.80	433	250	811	421
0.04002	0.01965	-275.95	583	315	1153	554
0.04993	0.02480	-360.45	729	378	1495	692
0.05964	0.02964	-459.40	883	441	1862	829
0.07014	0.03520	-560.43	1062	515	2291	998
0.07986	0.03976	-659.94	1237	579	2716	1144
0.09023	0.04395	-771.97	1434	639	2920	1285
0.09989	0.04893	-848.94	1581	714	3100	1459
0.14727	0.07125	-992.68	2074	1081	3370	2290
0.16850	0.07926	-1013.48	2219	1205	3340	2420
0.19851	0.09452	-838.34	2357	1519	3110	3020
0.29699	0.13958	-444.37	2444	2000	2330	3360
0.38938	0.17861	-164.18	2434	2270	2200	3300
0.50117	0.22618	87.76	2332	2420	2080	2750
0.60161	0.25425	246.01	2214	2460	1970	2510
0.70488	0.30261	549.13	2060	2450	1890	2310

FIGURA 49

Entalpie relative molari apparenti (pallini blu) ed entalpie relative molari parziali (triangoli azzurri) del tensioattivo C₈AGCB in funzione della concentrazione di tensioattivo.

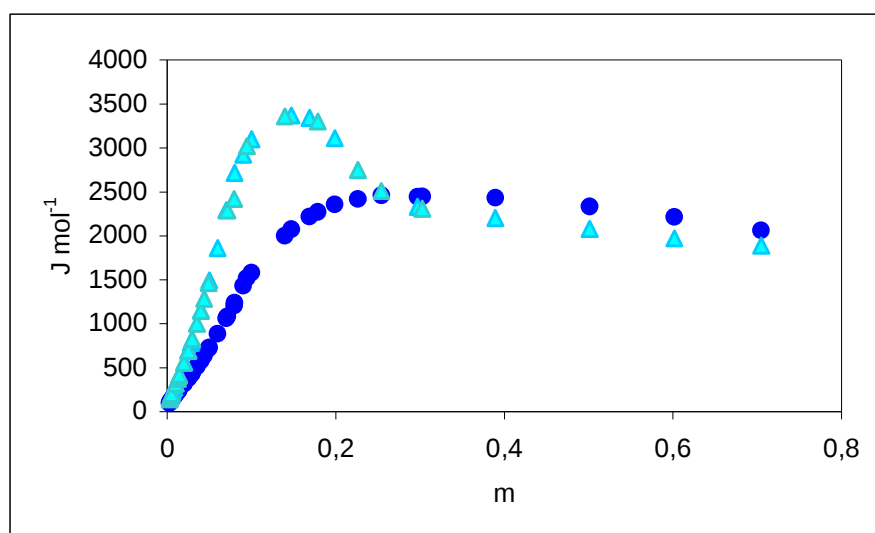


TABELLA 7

Molalità (m), entalpie di diluizione (ΔH_d), entalpie molari apparenti (L_ϕ), e parziali (L_2), del tensioattivo C₁₂AGCB, in acqua a 298 K.

m_i (mol kg ⁻¹)	m_f (mol kg ⁻¹)	ΔH_d (J mol ⁻¹)	$L_{\Phi,i}$ (J mol ⁻¹)	$L_{\Phi,f}$ (J mol ⁻¹)	$L_{2,i}$ (J mol ⁻¹)	$L_{2,f}$ (J mol ⁻¹)
0.00088	0.00046	-30.30	37	18	90	80
0.00196	0.00099	-68.64	138	44	385	110
0.00295	0.00149	-225.93	286	86	797	284
0.00393	0.00200	-324.84	476	143	1319	397
0.00491	0.00243	-322.43	524	202	660	563
0.00589	0.00301	-223.14	520	297	-170	828
0.00785	0.00392	126.48	348	475	-640	1314
0.00884	0.00446	349.69	247	596	-720	1050
0.00982	0.00498	313.06	247	560	-825	670
0.01277	0.00652	552.26	102	450	-1070	-380
0.01374	0.00692	630.39	-221	410	-1170	-455
0.01962	0.00979	679.65	-550	130	-1550	-860
0.02455	0.01231	748.91	-819	-70	-1760	-1060
0.02945	0.01459	683.32	-973	-290	-1950	-1215
0.03434	0.01718	761.89	-1121	-359	-2100	-1405
0.03924	0.01961	746.44	-1230	-484	-2230	-1550
0.07861	0.03876	741.23	-1931	-1190	-2890	-2215
0.09816	0.04790	746.02	-2156	-1410	-3080	-2465
0.14736	0.07095	759.95	-2570	-1810	-3540	-2805
0.19665	0.09322	762.68	-2833	-2070	-3945	-3030
0.29490	0.13834	830.52	-3301	-2470	-4545	-3450
0.34348	0.15645	858.27	-3458	-2600	-4720	-3605

FIGURA 50

Entalpie relative molari apparenti (pallini rossi) ed entalpie relative molari parziali (triangoli gialli) del tensioattivo C₁₂AGCB in funzione della concentrazione di tensioattivo.

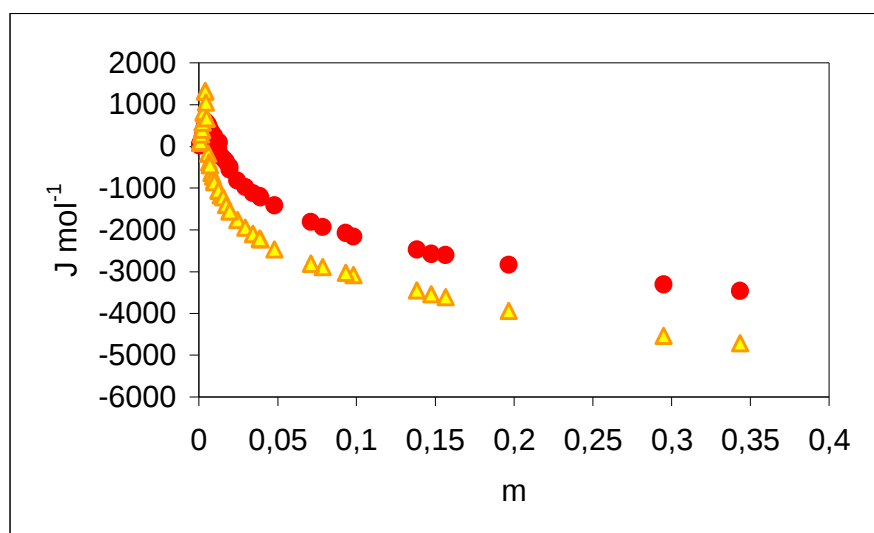


TABELLA 8

Molalità (m), entalpie di diluizione (ΔH_d), entalpie molari apparenti (L_ϕ), e parziali (L_2), del tensioattivo C₁₆AGCB, in acqua a 298 K.

m_i (mol kg ⁻¹)	m_f (mol kg ⁻¹)	ΔH_d (J mol ⁻¹)	$L_{\phi,i}$ (J mol ⁻¹)	$L_{\phi,f}$ (J mol ⁻¹)	$L_{2,i}$ (J mol ⁻¹)	$L_{2,f}$ (J mol ⁻¹)
0.00060	0.00029	2741.61	-2936	50	-2682	34
0.00070	0.00033	2336.13	-3081	-729	-2691	-355
0.00080	0.00038	2245.83	-3131	-1532	-3002	-756
0.00090	0.00043	2206.90	-3206	-2373	-3383	-1176
0.00100	0.00046	1894.68	-3281	-2882	-3328	-1434
0.00125	0.00058	1850.51	-3341	-2931	-4348	-2497
0.00150	0.00069	1773.28	-3551	-3071	-4463	-2690
0.00201	0.00094	1485.16	-3731	-3231	-4875	-3390
0.00301	0.00151	1247.94	-4001	-3561	-5738	-4490
0.00501	0.00252	885.01	-4431	-3901	-6175	-5290
0.00700	0.00347	857.27	-4781	-4101	-6647	-5790
0.00800	0.00400	767.50	-4981	-4231	-6758	-5990
0.01002	0.00501	717.08	-5481	-4441	-6907	-6190
0.01804	0.00915	742.90	-5881	-5131	-7583	-6840
0.03009	0.01497	657.94	-6381	-5641	-7998	-7340
0.04990	0.02478	598.60	-6881	-6231	-8439	-7840
0.07506	0.03667	576.54	-7031	-6581	-8713	-8140
0.09992	0.04850	559.32	-7281	-6861	-8949	-8390
0.15047	0.06985	558.91	-7431	-7031	-9199	-8640
0.20080	0.09571	366.98	-7451	-7231	-9327	-8990

FIGURA 51

Entalpie relative molari apparenti (pallini verde chiaro) ed entalpie relative molari parziali (triangoli verde scuro) del tensioattivo C₁₆AGCB in funzione della concentrazione di tensioattivo.

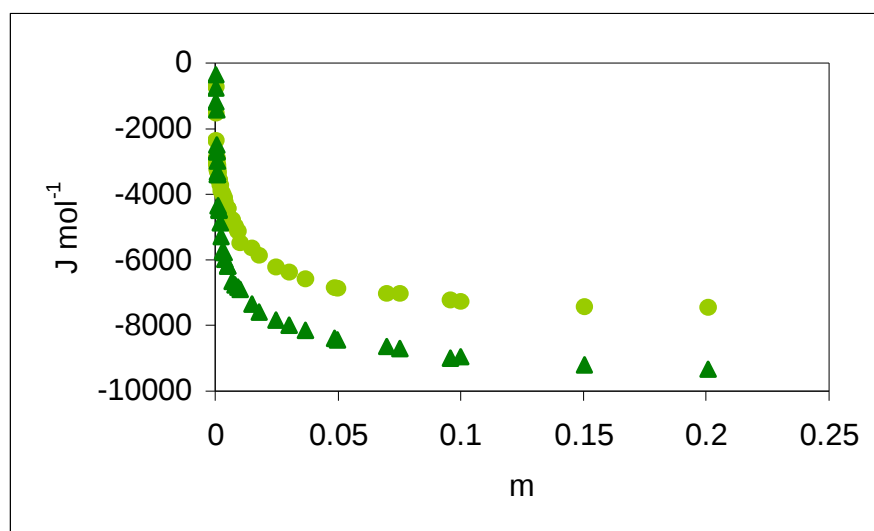


TABELLA 9

Densità (d), volume molare apparente (V_Φ) in funzione della molalità (m), del tensioattivo C₈AGCB, in acqua a 298 K.

m (mol kg ⁻¹)	d (g cm ⁻³)	V_Φ (cm ³ mol ⁻¹)
0.00125	0.997199	488.83
0.02001	0.999513	488.95
0.03502	1.001325	489.23
0.05002	1.003100	489.56
0.06499	1.004811	490.32
0.07504	1.005934	490.80
0.08505	1.007024	491.40
0.10007	1.008684	491.81
0.15011	1.013920	492.92
0.25036	1.023800	493.61
0.29699	1.028098	493.80
0.38938	1.036239	493.70
0.50117	1.045245	493.75
0.60161	1.049755	493.81
0.70488	1.059597	494.00

TABELLA 10

Velocità del suono (U), coefficiente di compressibilità adiabatica (β_s), compressibilità isoentropiche ($K_{s,\phi}$) in funzione della molalità (m), del tensioattivo C₈AGCB, in acqua a 298 K.

m (mol kg ⁻¹)	U (m s ⁻¹)	$10^5 \beta_s$ (bar ⁻¹)	$K_{s,\phi}$ (cm ³ bar ⁻¹ mol ⁻¹)
0.01001	1498.87	4.4589	0.004223
0.02001	1500.71	4.4424	0.004736
0.03502	1503.34	4.4189	0.005162
0.05002	1505.78	4.3968	0.005578
0.06499	1507.92	4.3768	0.006139
0.07504	1509.22	4.3644	0.006481
0.08505	1510.39	4.3527	0.006818
0.10007	1511.86	4.3373	0.007412
0.15011	1515.49	4.2943	0.009018
0.20003	1517.96	4.2596	0.010178
0.25001	1519.91	4.2295	0.011033
0.29990	1521.62	4.2017	0.011638
0.35039	1523.17	4.1760	0.012271
0.40035	1524.64	4.1515	0.012475
0.44513	1525.60	4.1341	0.012489

FIGURA 52

Volume molare apparente (V_ϕ) del tensioattivo C_8AGCB in funzione della molalità (m).

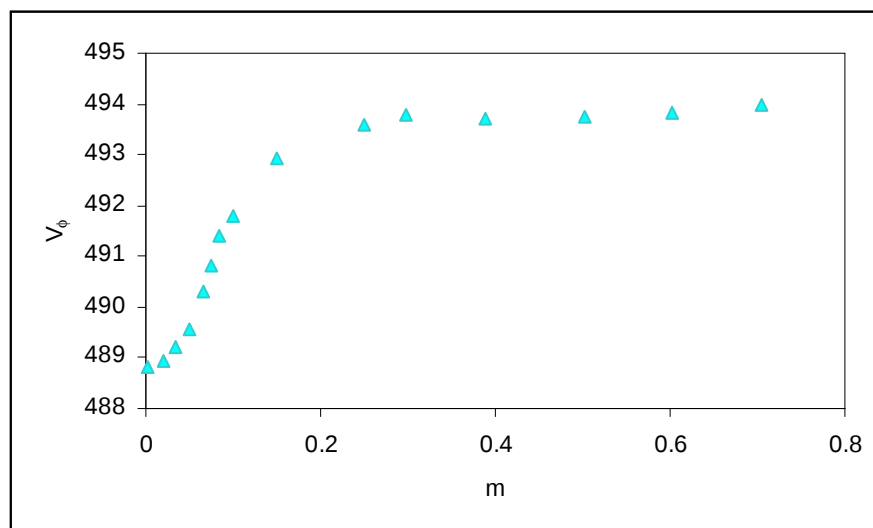


FIGURA 53

Compressibilità isoentropiche ($K_{S,\phi}$) del tensioattivo C_8AGCB in funzione della molalità (m).

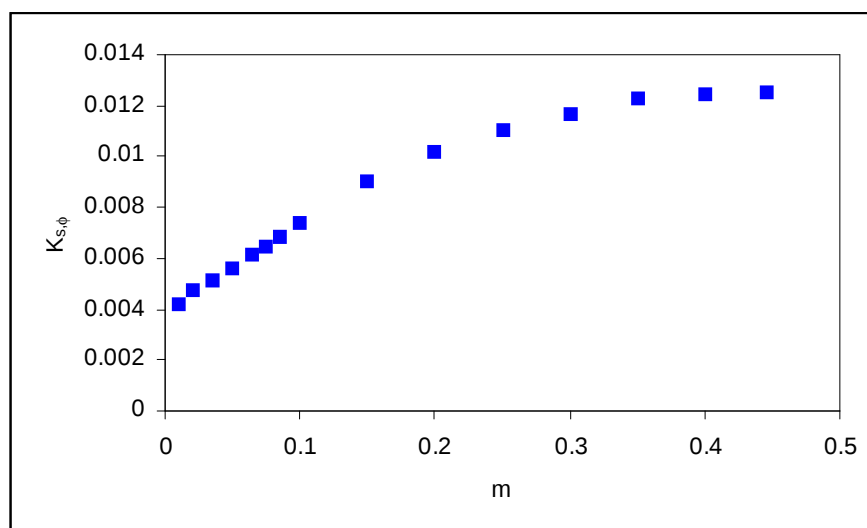


TABELLA 11

Densità (d), volume molare apparente (V_Φ) in funzione della molalità (m), del tensioattivo C₁₂AGCB, in acqua a 298 K.

m (mol kg ⁻¹)	d (g cm ⁻³)	V_Φ (cm ³ mol ⁻¹)
0.20042	1.015641	566.72
0.15011	1.011430	566.50
0.10004	1.006970	565.90
0.08999	1.005975	565.72
0.07998	1.005056	565.31
0.07001	1.004106	565.16
0.06001	1.003145	564.88
0.05002	1.002175	564.50
0.05002	1.002179	564.44
0.04048	1.001231	564.20
0.03001	1.000198	563.40
0.02001	0.999179	562.30
0.01001	0.998164	560.30
0.00899	0.998024	560.14
0.00799	0.997916	560.05
0.00701	0.997808	560.10
0.00600	0.997697	560.22

TABELLA 12

Velocità del suono (U), coefficiente di compressibilità adiabatica (β_s), compressibilità isoentropiche ($K_{s,\phi}$) in funzione della molalità (m), del tensioattivo C₁₂AGCB, in acqua a 298 K.

m (mol kg ⁻¹)	U (m s ⁻¹)	$10^5 \beta_s$ (bar ⁻¹)	$K_{s,\phi}$ (cm ³ bar ⁻¹ mol ⁻¹)
0.00100	1497.34	4.4731	-0.009841
0.00200	1497.59	4.4711	-0.002593
0.00300	1497.82	4.4692	0.000140
0.00400	1497.99	4.4677	0.002577
0.00500	1498.10	4.4665	0.004709
0.00600	1498.13	4.4658	0.006914
0.00701	1498.15	4.4652	0.008634
0.00799	1498.17	4.4646	0.009896
0.00899	1498.18	4.4641	0.010970
0.01001	1498.19	4.4634	0.012114
0.02001	1498.27	4.4584	0.015903
0.03001	1498.46	4.4527	0.017072
0.04048	1498.63	4.4471	0.017770
0.05002	1498.76	4.4421	0.018180
0.05002	1498.77	4.4421	0.018138
0.06001	1498.92	4.4369	0.018439
0.07001	1499.07	4.4318	0.018634
0.07998	1499.21	4.4267	0.018782
0.08999	1499.36	4.4218	0.018918
0.10004	1499.49	4.4167	0.018963
0.10018	1499.65	4.4172	0.019166
0.15011	1500.18	4.3932	0.019297
0.20042	1500.82	4.3712	0.019503

FIGURA 54

Volume molare apparente (V_ϕ) del tensioattivo $C_{12}AGCB$ in funzione della molalità (m).

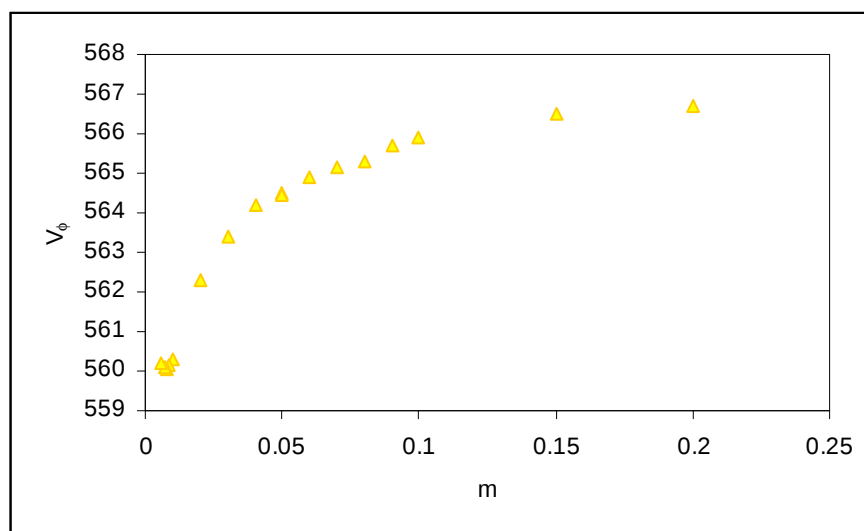


FIGURA 55

Compressibilità isoentropiche ($K_{S,\phi}$) del tensioattivo $C_{12}AGCB$ in funzione della molalità (m).

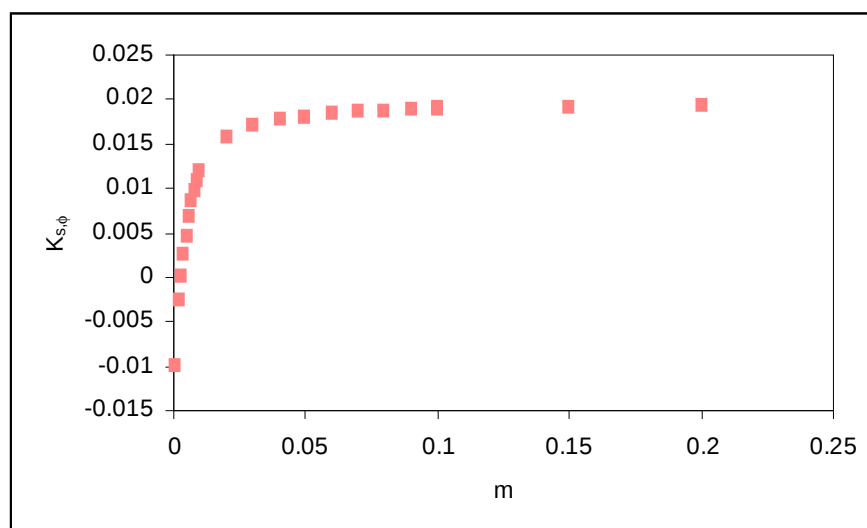


TABELLA 13

Densità (d), volume molare apparente (V_Φ) in funzione della molalità (m), del tensioattivo C₁₆AGCB, in acqua a 298 K.

m (mol kg ⁻¹)	d (g cm ⁻³)	V_Φ (cm ³ mol ⁻¹)
0.01002	0.998003	629.93
0.01804	0.998731	631.76
0.03009	0.999786	633.47
0.04990	1.001501	634.22
0.07501	1.003600	634.80
0.09992	1.005635	634.94
0.15047	1.009595	635.01
0.20080	1.013306	635.09

TABELLA 14

Velocità del suono (U), coefficiente di compressibilità adiabatrica (β_s) e compressibilità isoentropiche ($K_{s,\phi}$) in funzione della molalità (m), del tensioattivo C₁₆AGCB, in acqua a 298 K.

m (mol kg ⁻¹)	U (m s ⁻¹)	$10^5 \beta_s$ (bar ⁻¹)	$K_{s,\phi}$ (cm ³ bar ⁻¹ mol ⁻¹)
0.00600	1497.29	4.4724	0.023859
0.00700	1497.30	4.4721	0.024363
0.00800	1497.35	4.4716	0.024461
0.00900	1497.35	4.4714	0.024841
0.01001	1497.41	4.4708	0.024750
0.02001	1497.65	4.4672	0.025664
0.03001	1497.87	4.4637	0.026026
0.04001	1498.08	4.4604	0.026225
0.05004	1498.29	4.4571	0.026349
0.06004	1498.51	4.4538	0.026419
0.07001	1498.69	4.4507	0.026501
0.08003	1498.85	4.4479	0.026582
0.09003	1499.01	4.4450	0.026639
0.10006	1499.18	4.4421	0.026682
0.15016	1500.06	4.4279	0.026788
0.19992	1500.84	4.4150	0.026872
0.25000	1501.62	4.4025	0.026911
0.30039	1502.34	4.3910	0.026952

FIGURA 56

Volume molare apparente (V_ϕ) del tensioattivo $C_{16}AGCB$ in funzione della molalità (m).

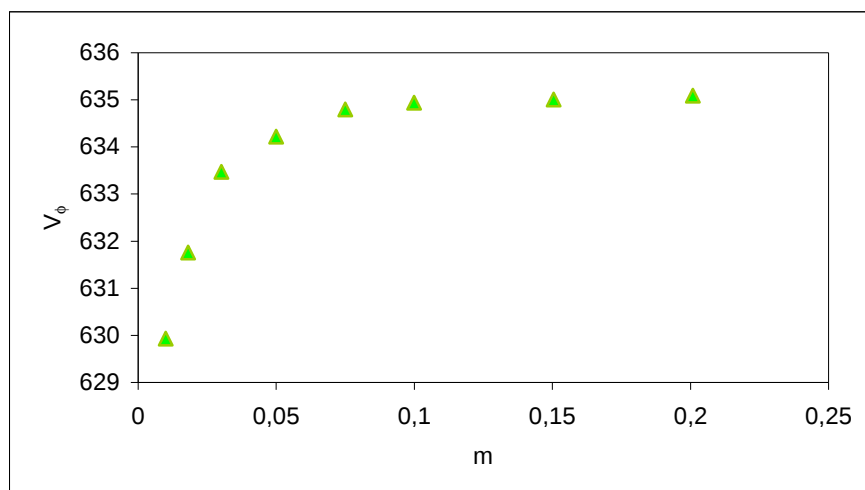
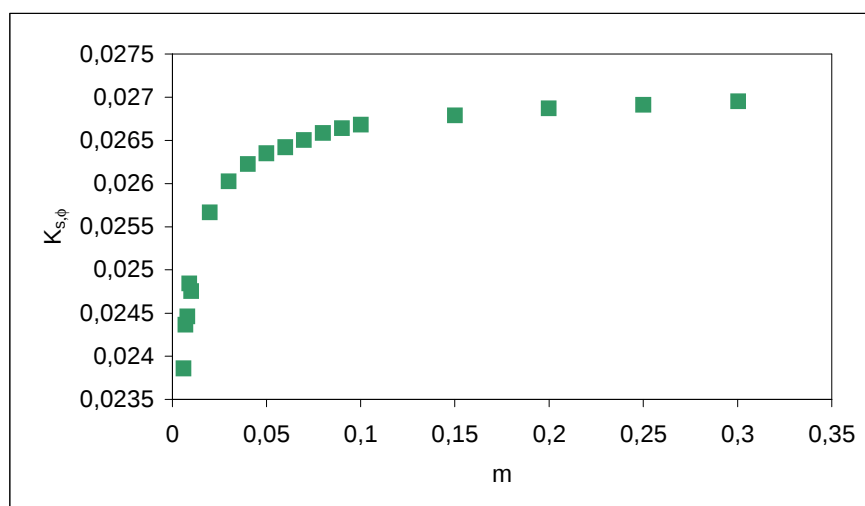


FIGURA 57

Compressibilità isoentropiche ($K_{S,\phi}$) del tensioattivo $C_{16}AGCB$ in funzione della molalità (m).



TENSIOATTIVI GLUCOCATIONICI DISACETILATI

Misure termodinamiche e volumetriche

I calori di diluizione e le entalpie molari apparenti e parziali di $C_{12}DGCB$, e $C_{16}DGCB$ sono elencati nelle Tab. 15 e 16. I relativi grafici sono riportati nelle Fig. 58 e 59.

I dati di densità e i volumi molari apparenti, sono elencati nelle Tab. 17 e 19, mentre i dati di velocità del suono, coefficienti di compressibilità adiabatica e compressibilità isoentropica, sono riportati nelle Tab. 18 e 20. I grafici dei volumi molari apparenti sono riportati nelle Fig. 60 e 62, mentre quelli delle compressibilità isoentropiche sono riportati nelle Fig. 61 e 63.

Nella sezione Discussione, nelle Fig 99, 102, 103 sono riportati i confronti delle entalpie molari apparenti e parziali, dei volumi molari apparenti e delle compressibilità isoentropiche tra questi due composti. In Fig. 100 è riportato il confronto delle entalpie molari apparenti tra $C_{12}DGCB$, $C_{12}AGCB$, DEDAB e DTAB. In Fig. 101 è riportato il confronto delle entalpie molari apparenti tra i due tensioattivi con catena a 12 atomi di carbonio ($C_{12}DGCB$ e $C_{12}AGCB$) e i due con catena a 16 atomi di carbonio ($C_{16}DGCB$ e $C_{16}AGCB$). In Fig. 104 è riportato il confronto delle compressibilità isoentropiche tra $C_{12}DGCB$, $C_{16}AGCB$ e DEDAB.

TABELLA 15

Molalità (m), entalpie di diluizione (ΔH_d), entalpie molari apparenti (L_ϕ), e parziali (L_2), del tensioattivo C₁₂DGCB, in acqua a 298 K.

m_i (mol kg ⁻¹)	m_f (mol kg ⁻¹)	ΔH_d (J mol ⁻¹)	$L_{\phi,i}$ (J mol ⁻¹)	$L_{\phi,f}$ (J mol ⁻¹)	$L_{2,i}$ (J mol ⁻¹)	$L_{2,f}$ (J mol ⁻¹)
0.00200	0.00100	-9.0	89	61	139	9
0.00301	0.00148	-44.4	113	75	182	116
0.00401	0.00199	-57.6	135	89	223	138
0.00501	0.00249	-54.6	157	101	266	160
0.00600	0.00299	-55.2	179	112	309	181
0.00702	0.00337	-60.9	201	121	354	197
0.00809	0.00387	-122.8	224	132	404	217
0.00910	0.00437	-121.1	247	143	453	238
0.01002	0.00491	-90.3	268	155	498	261
0.01505	0.00740	-134.8	344	209	580	360
0.02004	0.01030	-130.7	405	274	380	500
0.03008	0.01498	72.4	268	340	-180	580
0.04005	0.02002	305.9	100	400	-540	380
0.05014	0.02421	406.9	-60	375	-830	100
0.06024	0.02965	449.4	-190	290	-1030	-160
0.07021	0.03495	481.6	-292	190	-1180	-360
0.08025	0.03860	477.0	-362	115	-1300	-490
0.09027	0.04464	472.6	-463	10	-1460	-670
0.10036	0.04984	489.0	-530	-60	-1500	-830
0.15066	0.07444	491.9	-811	-320	-1790	-1240
0.20250	0.09820	563.5	-1084	-520	-2030	-1490
0.30078	0.13791	611.9	-1362	-750	-2360	-1750

FIGURA 58

Entalpie relative molari apparenti (pallini rossi) ed entalpie relative molari parziali (pallini arancioni) del tensioattivo C₁₂DGCB in funzione della concentrazione m , a 298 K.

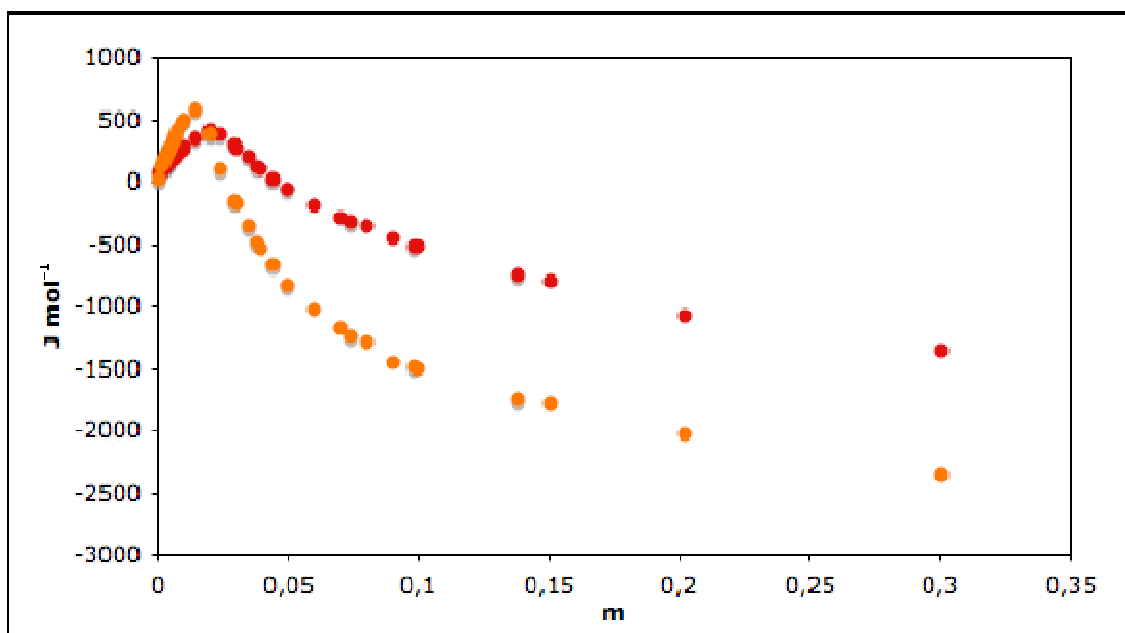


TABELLA 16

Molalità (m), entalpie di diluizione (ΔH_d), entalpie molari apparenti (L_ϕ), e parziali (L_2), del tensioattivo C₁₆DGCB, in acqua a 298 K.

m_i (mol kg ⁻¹)	m_f (mol kg ⁻¹)	ΔH_d (J mol ⁻¹)	$L_{\phi,i}$ (J mol ⁻¹)	$L_{\phi,f}$ (J mol ⁻¹)	$L_{2,i}$ (J mol ⁻¹)	$L_{2,f}$ (J mol ⁻¹)
0.00050	0.00025	-367.2	893	504	1400	940
0.00050	0.00025	-382.2	894	506	1400	940
0.00060	0.00029	-450.4	1034	572	1700	1000
0.00060	0.00030	-483.3	1035	590	1700	1000
0.00090	0.00046	-584.4	1407	828	2550	1350
0.00101	0.00051	-608.6	1521	904	2590	1400
0.00150	0.00076	285.2	952	1238	-500	2150
0.00150	0.00076	290.9	954	1245	-500	2150
0.00201	0.00099	1088.4	920	1508	-3050	2590
0.00251	0.00123	1897.8	-418	1480	-4000	1700
0.00301	0.00155	1970.6	-1021	950	-4150	-1000
0.00401	0.00201	2150.9	-1801	350	-4350	-3000
0.00500	0.00250	1799.0	-2399	-600	-4490	-4000
0.00601	0.00293	1590.7	-2770	-1180	-4610	-4130
0.00702	0.00350	1450.7	-3001	-1550	-4700	-4250
0.00903	0.00448	1268.8	-3419	-2150	-4840	-4420
0.01002	0.00497	1081.1	-3506	-2425	-4900	-4490
0.01508	0.00748	902.1	-4042	-3140	-5115	-4740
0.03006	0.01473	580.6	-4591	-4010	-5260	-5105
0.04017	0.01975	425.2	-4685	-4260	-5260	-5220
0.07034	0.03439	247.7	-4908	-4660	-5275	-5260
0.08048	0.03927	219.2	-4919	-4700	-5280	-5260
0.09030	0.04526	199.8	-4955	-4755	-5300	-5265
0.10033	0.04995	188.5	-4973	-4785	-5310	-5270
0.15057	0.07441	215.0	-5135	-4920	-5390	-5280
0.20083	0.10287	249.0	-5239	-4990	-5470	-5310

FIGURA 59

Entalpie relative molari apparenti (rombi verde scuro) ed entalpie relative molari parziali (rombi verde chiaro) del tensioattivo C₁₆DGCB in funzione della concentrazione m , a 298 K.

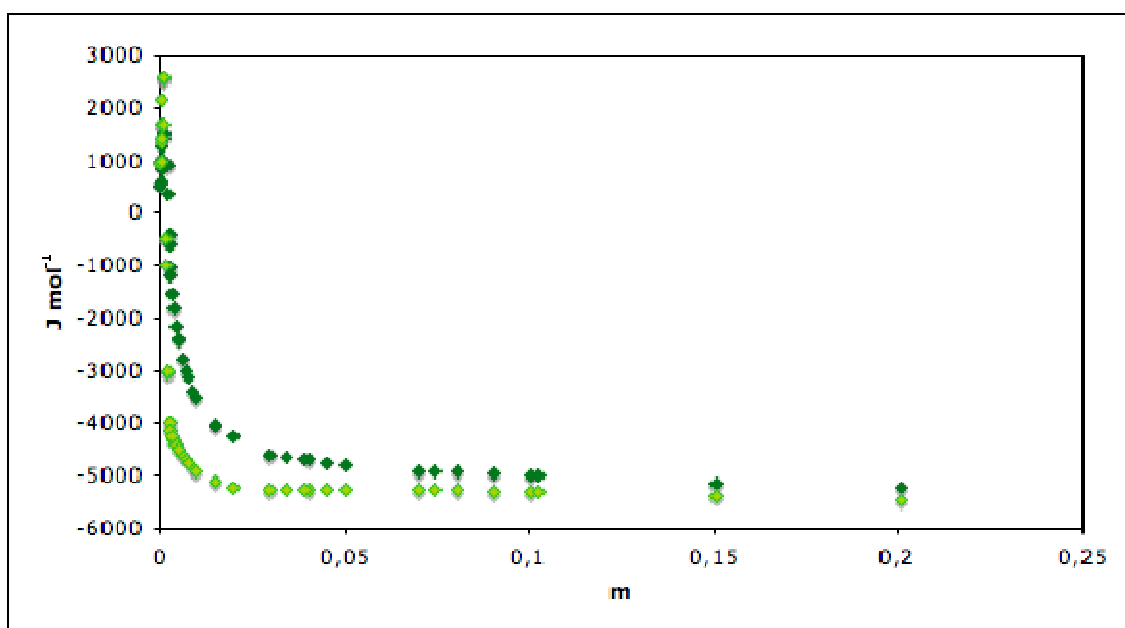


TABELLA 17

Densità (d), volume molare apparente (V_Φ) in funzione della molalità (m), del tensioattivo C₁₂AGCB, in acqua a 298 K.

m (mol kg ⁻¹)	d (g cm ⁻³)	V_Φ (cm ³ mol ⁻¹)
0.00803	0.997835	402.57
0.00902	0.997936	402.12
0.02004	0.999014	402.27
0.03008	0.999883	404.86
0.04005	1.000852	405.77
0.05014	1.001710	406.47
0.06024	1.002616	406.67
0.07021	1.003494	406.93
0.08025	1.004368	407.19
0.09027	1.005239	407.32
0.10036	1.006102	407.49
0.15066	1.010311	407.98
0.20250	1.014325	408.06
0.30078	1.021964	408.44

TABELLA 18

Velocità del suono (U), coefficiente di compressibilità adiabatica (β_s), compressibilità isoentropiche ($K_{s,\phi}$) in funzione della molalità (m), del tensioattivo C₁₂DGCB, in acqua a 298 K.

m (mol kg ⁻¹)	U (m s ⁻¹)	$10^5 \beta_s$ (bar ⁻¹)	$K_{s,\phi}$ (cm ³ bar ⁻¹ mol ⁻¹)
0.00902	1499.48	4.4566	-0.003634
0.01001	1499.72	4.4548	-0.003561
0.01502	1500.99	4.4450	-0.003110
0.02002	1502.16	4.4358	-0.002535
0.02002	1502.25	4.4356	-0.002523
0.02513	1502.77	4.4301	-0.000662
0.03003	1503.10	4.4262	0.001057
0.03004	1503.36	4.4250	0.000803
0.03511	1503.45	4.4220	0.002274
0.04004	1504.06	4.4170	0.003099
0.05011	1504.72	4.4093	0.004563
0.06018	1505.19	4.4026	0.005667
0.07017	1505.69	4.3959	0.006431
0.08033	1506.22	4.3889	0.006997
0.09009	1506.76	4.3821	0.007403
0.10010	1507.20	4.3758	0.007787
0.12040	1508.54	4.3605	0.008149
0.13999	1509.64	4.3473	0.008525
0.15993	1510.76	4.3339	0.008791
0.18112	1511.98	4.3201	0.009040
0.20053	1512.98	4.3085	0.009283

FIGURA 60

Volume molare apparente (V_ϕ) del tensioattivo $C_{12}DGCB$ in funzione della molalità (m).

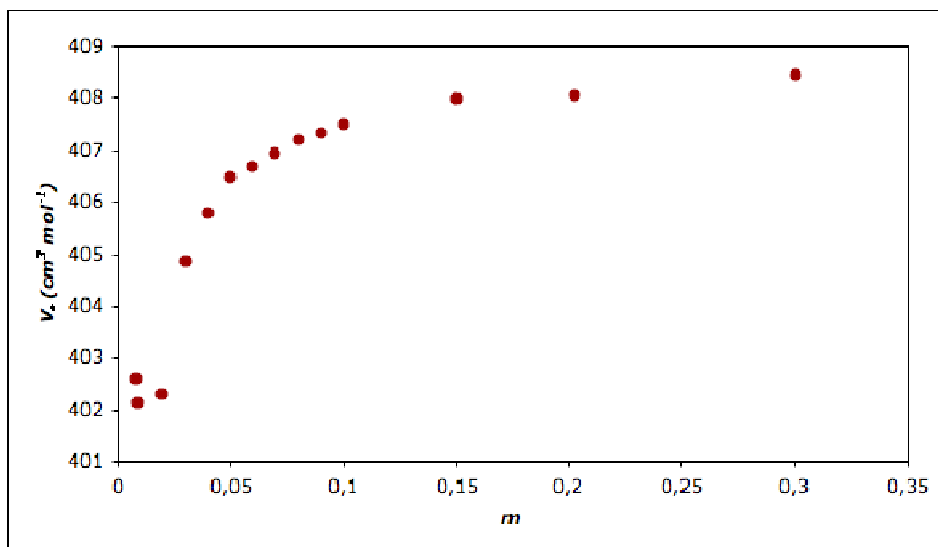


FIGURA 61

Compressibilità isoentropiche ($K_{s,\phi}$) del tensioattivo $C_{12}DGCB$ in funzione della molalità (m).

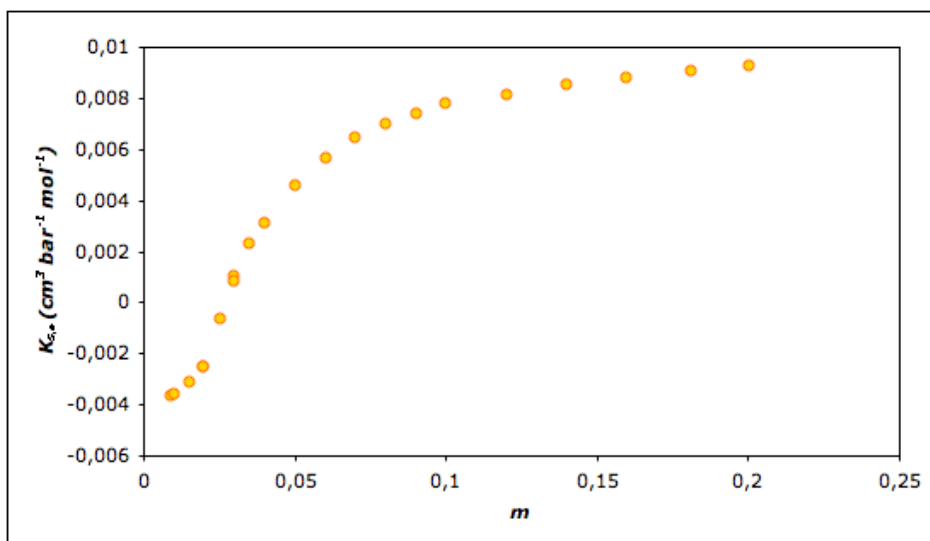


TABELLA 19

Densità (d), volume molare apparente (V_Φ) in funzione della molalità (m), del tensioattivo C₁₆DGCB, in acqua a 298 K.

m (mol kg ⁻¹)	d (g cm ⁻³)	V_Φ (cm ³ mol ⁻¹)
0.00200	0.997236	460.69
0.00401	0.997416	463.83
0.00501	0.997505	464.61
0.00601	0.997595	465.06
0.00702	0.997687	465.20
0.00802	0.997776	465.58
0.00900	0.997864	465.81
0.01002	0.997956	465.88
0.02003	0.998855	466.30
0.03004	0.999746	466.40
0.04008	1.000626	466.60
0.05016	1.001501	466.71
0.06013	1.002359	466.79
0.07011	1.003212	466.82
0.08084	1.004124	466.81

TABELLA 20

Velocità del suono (U), coefficiente di compressibilità adiabatica (β_s), compressibilità isoentropiche ($K_{s,\phi}$) in funzione della molalità (m), del tensioattivo C₁₆DGCB, in acqua a 298 K.

m (mol kg ⁻¹)	U (m s ⁻¹)	$10^5 \beta_s$ (bar ⁻¹)	$K_{s,\phi}$ (cm ³ bar ⁻¹ mol ⁻¹)
0.00090	1497.36	4.4730	-0.009970
0.00100	1497.34	4.4730	-0.011167
0.00200	1497.48	4.4718	-0.001427
0.00301	1497.51	4.4712	0.004231
0.00401	1497.51	4.4708	0.007216
0.00501	1497.60	4.4699	0.008569
0.00601	1497.64	4.4692	0.009545
0.00702	1497.68	4.4686	0.010235
0.00802	1497.74	4.4678	0.010620
0.00900	1497.80	4.4671	0.010903
0.01002	1497.86	4.4663	0.011120
0.02003	1498.36	4.4592	0.012375
0.02306	1498.56	4.4568	0.012605
0.03004	1498.93	4.4519	0.012719
0.03018	1498.96	4.4516	0.012757
0.04002	1499.46	4.4448	0.013010
0.04008	1499.44	4.4450	0.013011
0.05005	1499.88	4.4385	0.013301
0.05016	1499.82	4.4388	0.013299
0.06013	1500.40	4.4316	0.013291
0.07011	1500.94	4.4246	0.013312
0.08084	1501.45	4.4176	0.013397

FIGURA 62

Volume molare apparente (V_ϕ) del tensioattivo C₁₆DGCB in funzione della molalità (m).

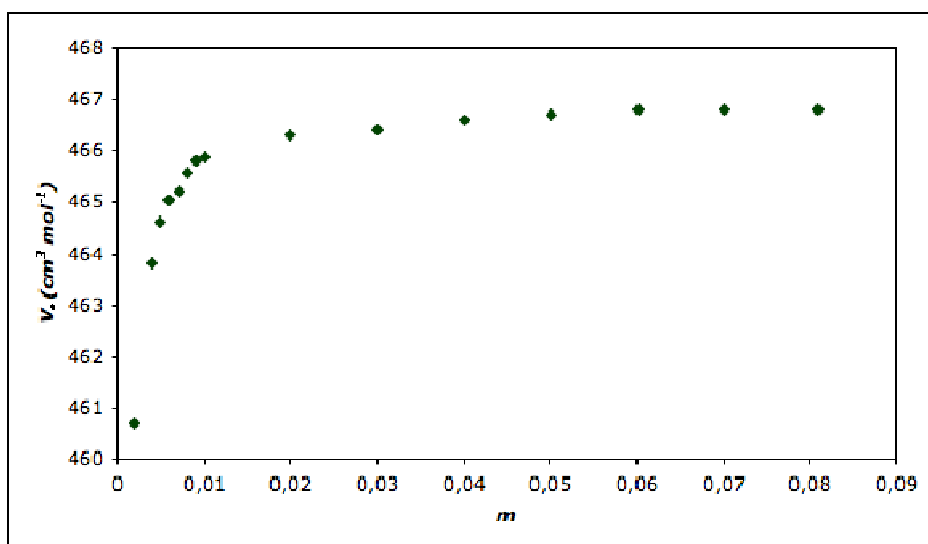
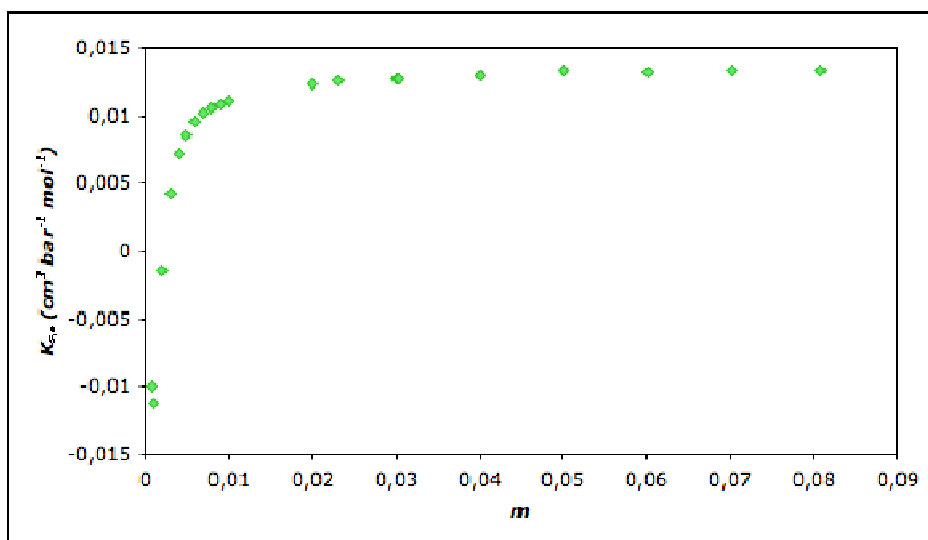


FIGURA 63

Compressibilità isoentropiche ($K_{s,\phi}$) del tensioattivo C₁₆DGCB in funzione della molalità (m).



TENSIOATTIVI GLUCOCATIONICI ACETILATI E DISACETILATI

Misure DSC, saggi biologici e immagini AFM

In Tab. 21 sono indicate le temperature di pretransizione e le temperature di transizione di fase da gel a cristallo liquido per le MLVs formate da $C_{16}AGCB/DPPC$ e $C_{16}DGCB/DPPC$.

Queste temperature sono evidenti dalle curve calorimetriche al DSC in Fig. 65 e dai grafici delle temperature della transizione di fase da gel a cristallo liquido in funzione dei rapporti molar $C_{16}AGCB/DPPC$ e $C_{16}DGCB/DPPC$ riportati in Fig. 64.

Per quanto riguarda i saggi biologici, in Fig. 66 sono riportati i saggi EMSA di complessazione dei composti C_8AGDC , $C_{12}AGDC$, $C_{16}AGDC$, $C_{12}DGDC$ e $C_{16}DGDC$ con il plasmide circolare pEGFP-C1.

In Fig. 67 è riportato il saggio di trasfezione transiente dei composti C_8AGDC , $C_{12}AGDC$, $C_{16}AGDC$, $C_{12}DGDC$ e $C_{16}DGDC$ utilizzati da soli e con il DOPE a differenti rapporti molar.

In Fig 68 sono riprodotte le immagini AFM del DNA plasmidico incubato con il $C_{16}AGCB$, con il $C_{16}DGCB$ e con il $C_{16}AGCB:DOPE$ 1:2.

TABELLA 21

Temperature di pretransizione (T_p) e temperature di transizione di fase (T_m , T_m^I , e T_m^{II}) da gel a cristallo liquido.

Metodo I					Metodo II		
		T _m [°C]	T _p [°C]	ΔH _m [kJ/mol]	T _m [°C]	T _p [°C]	ΔH _m [kJ/mol]
DPPC		41.6	35.2	34.6	41.6	35.2	34.6
n _{C16DGCB} /n _{DPPC}	0.003	41.3	34.5	20.1	41.0	34.4	27.9
	0.006	41.0	33.7	23.6	40.4	34.2	33.2
	0.01	40.7	32.4	26.4	40.0	31.6	29.1
	0.03	40.2	31.7	28.4	39.0	29.4	28.5
	0.06	39.3	-	32.2	37.4	-	33.9
	0.1	38.5	-	30.4	36.6	-	26.7
n _{C16AGCB} /n _{DPPC}	0.003	41.5	-	24.6	40.9	-	30.7
	0.006	41.4	-	32.4	40.9	-	28.5
	0.01	41.2	-	35.0	40.8	-	28.5
	0.03	39.6 41.2	-	40.6	40.1	-	32.3
	0.06	38.3 41.0	-	38.9	38.9	-	28.9
	0.1	38.2 41.6	-	33.7	38.5	-	39.9

$n_{C16DGCB}/n_{DPPC}$ è il rapporto molare tra C16DGCB e DPPC

$n_{C16AGCB}/n_{DPPC}$ è il rapporto molare tra C16AGCB e DPPC

FIGURA 64

Temperature (T_m , T_m^I , e T_m^{II}) della transizione di fase da gel a cristallo liquido in funzione dei rapporti molari $C_{16}AGCB/DPPC$ (rombi) e $C_{16}DGCB/DPPC$ (asterischi) per entrambi i metodi.

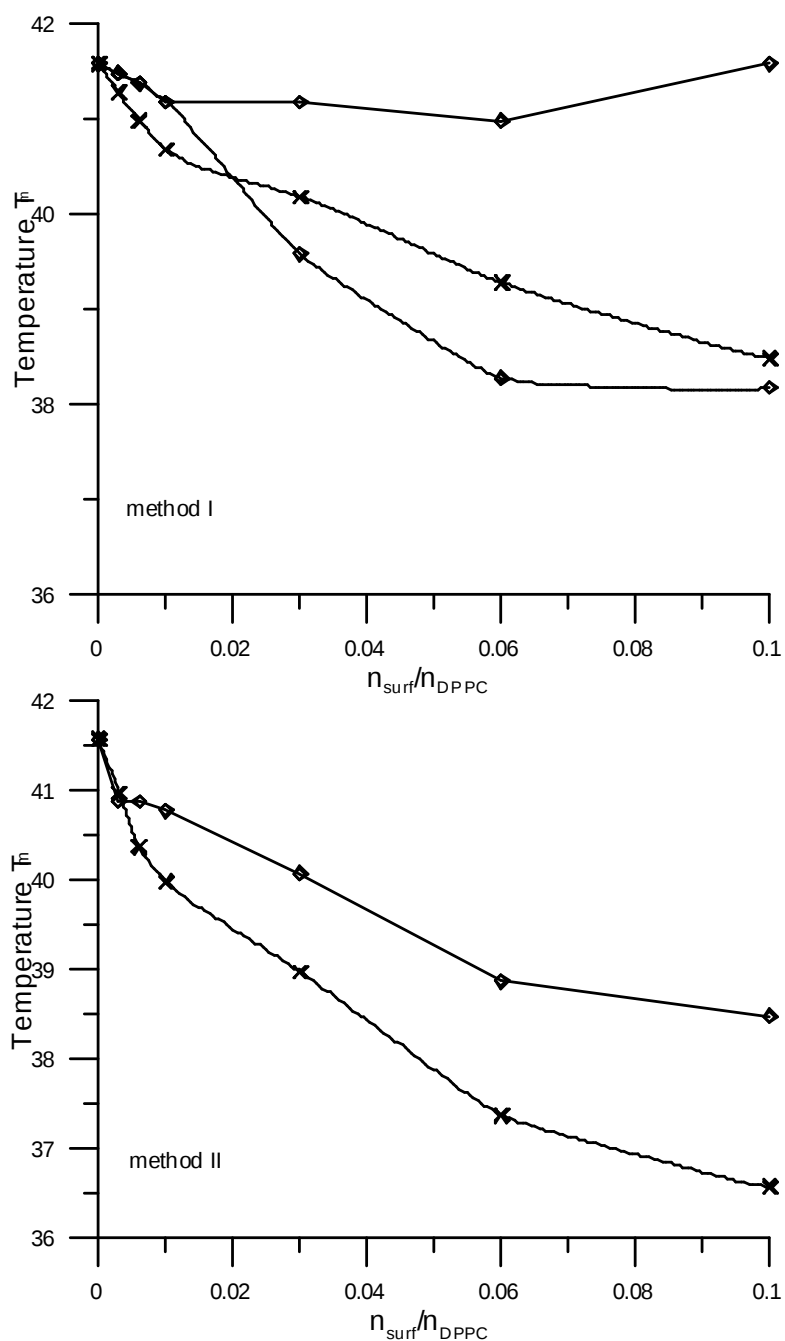


FIGURA 65

Curve calorimetriche al DSC delle MLVs in presenza di rapporti molari crescenti di $C_{16}DGCB$ e $C_{16}AGCB$ per entrambi i metodi. Le curve sono state normalizzate rispetto alla quantità di DPPC.

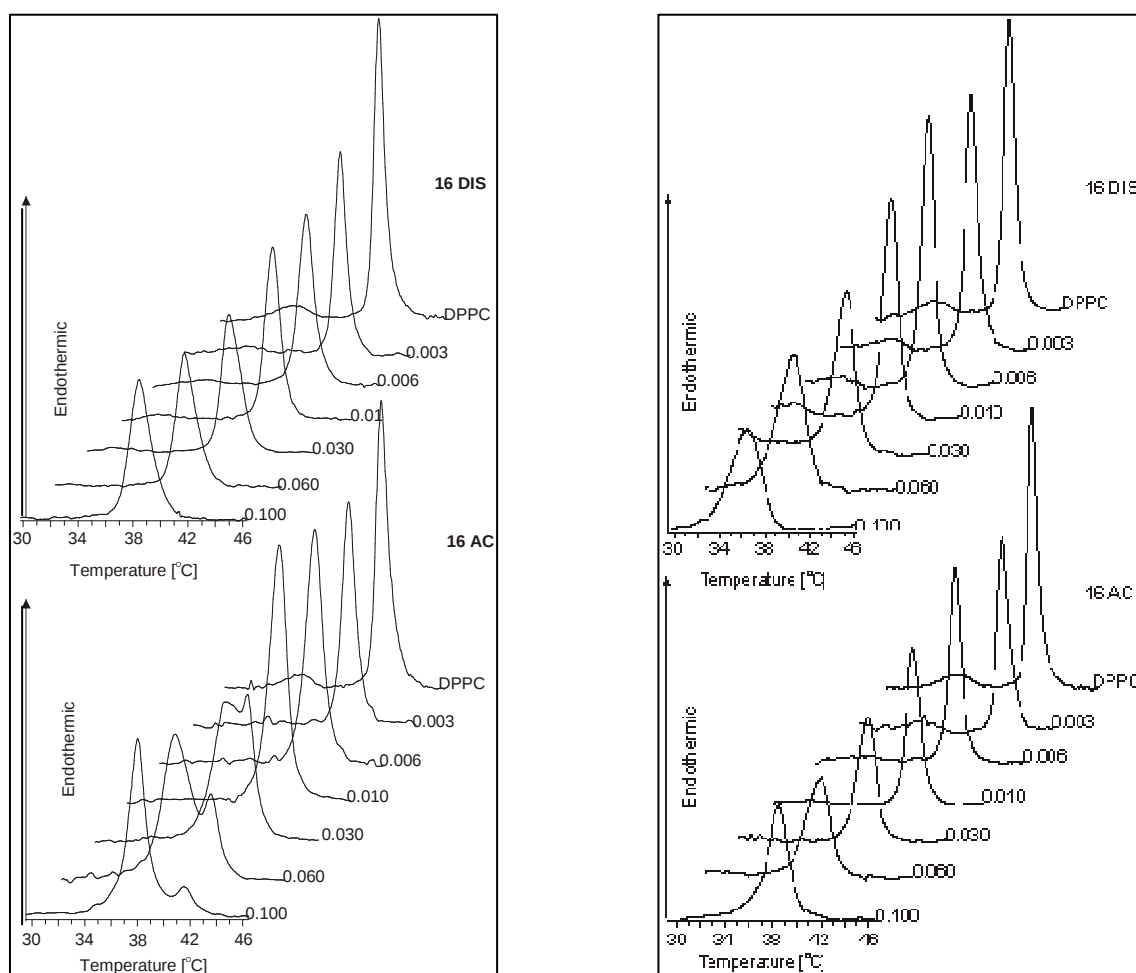


FIGURA 66

Saggio EMSA: complessazione dei composti C₈AGDC, C₁₂AGDC, C₁₆AGDC, C₁₂DGDC e C₁₆DGDC con il plasmide circolare pEGFP-C1. Come controllo negativo è stato utilizzato il plasmide da solo.

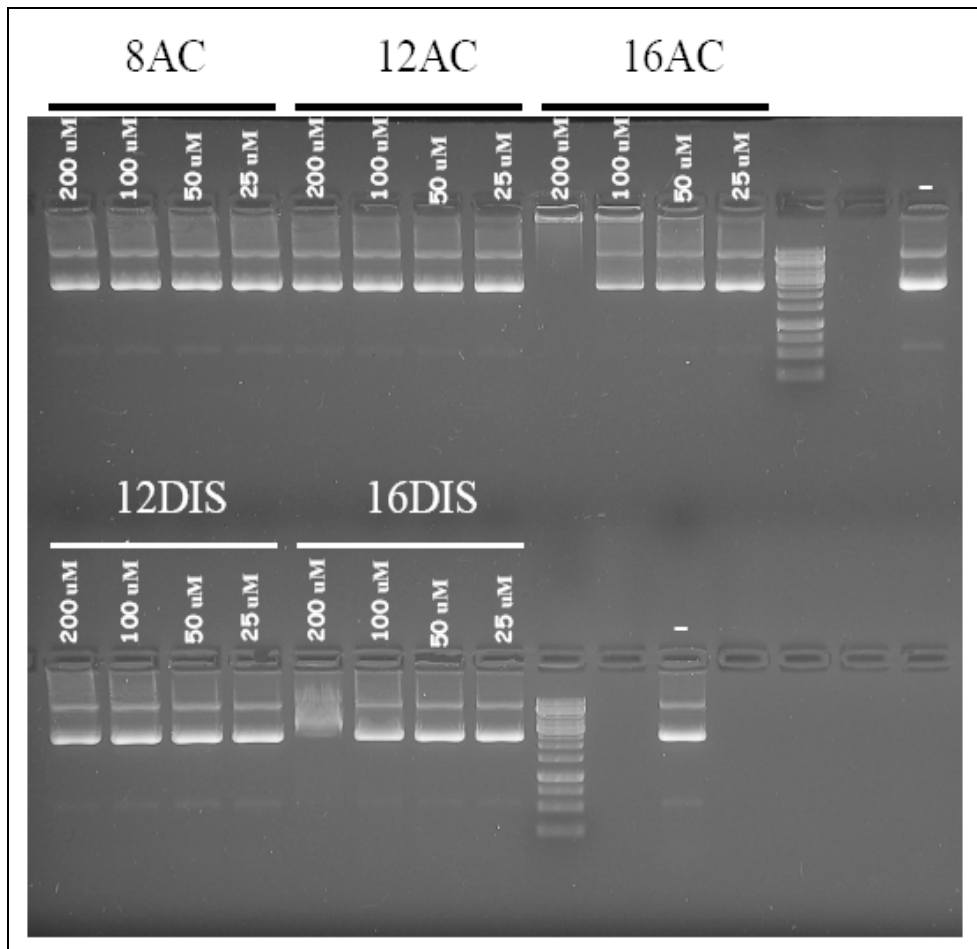


FIGURA 67

Andamenti in grafico dei risultati del saggio di trasfezione transiente dei composti C₈AGDC, C₁₂AGDC, C₁₆AGDC, C₁₂DGDC e C₁₆DGDC utilizzati da soli e con il DOPE a differenti rapporti molari. Come controlli positivi sono stati utilizzati il DOPE da solo e l'agente trasfettante commerciale GenePORTER

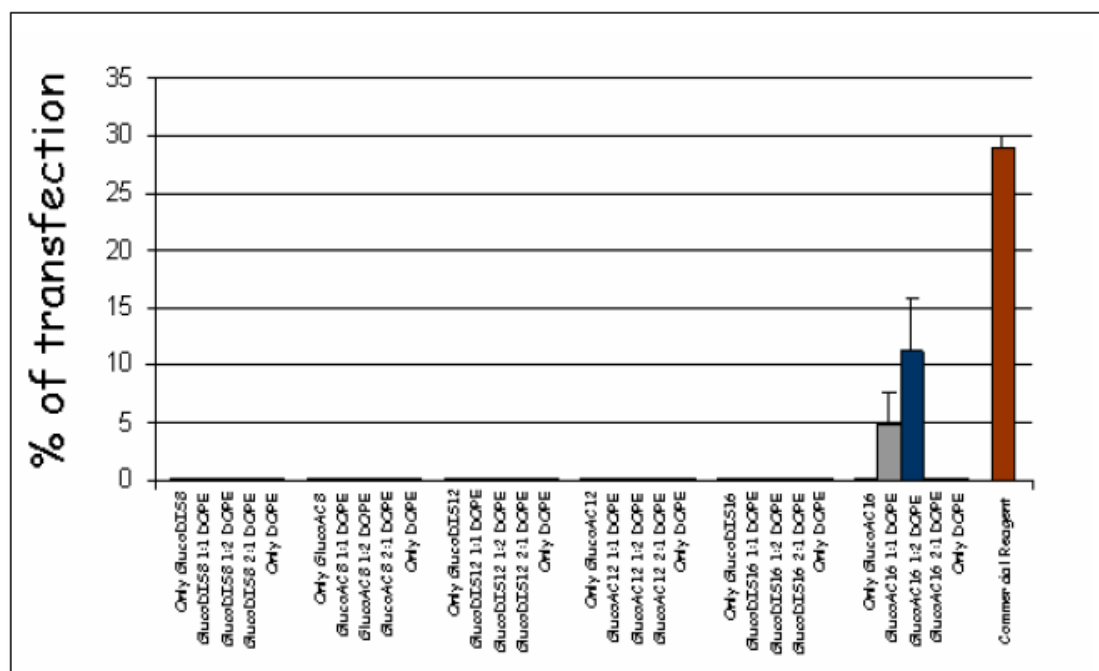
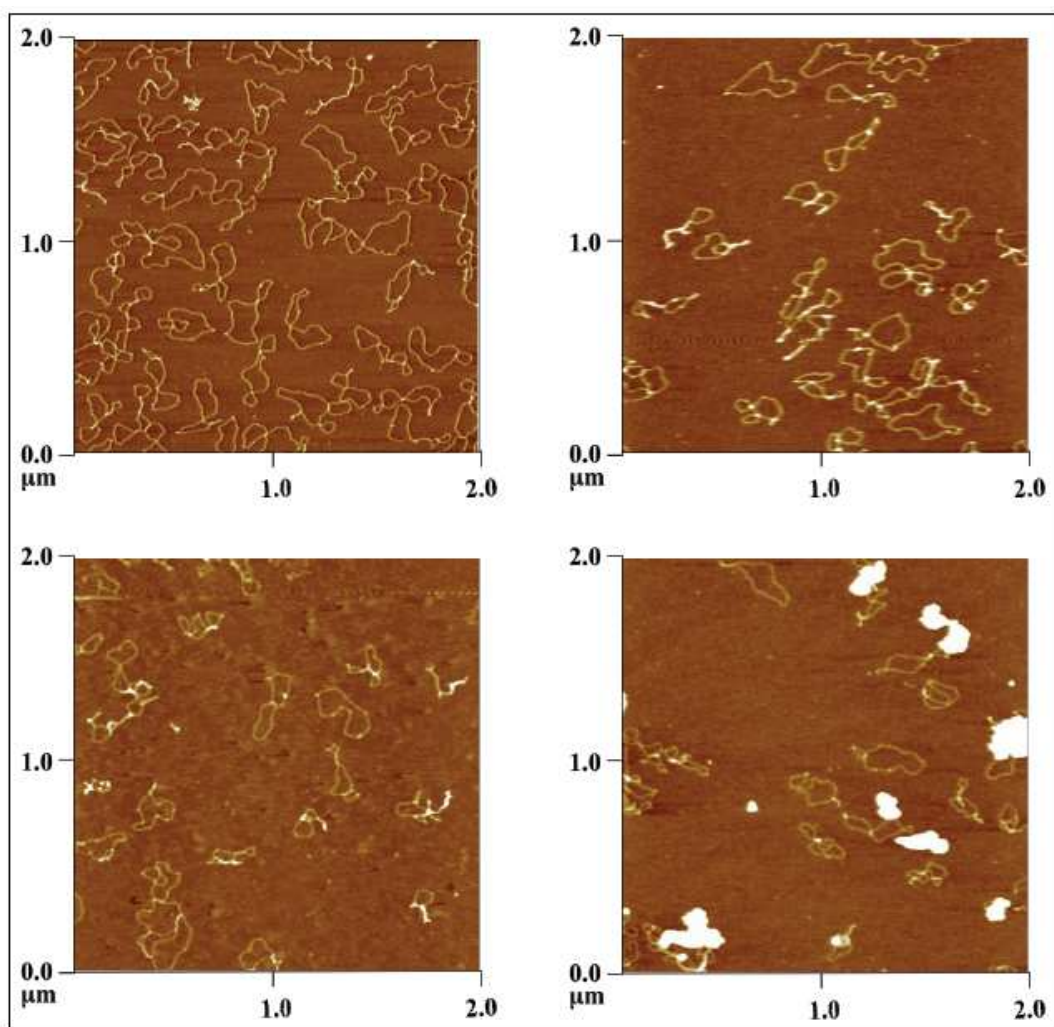


FIGURA 68

Immagini AFM del plasmide incubato con i tensioattivi C_{16} AGCB e C_{16} DGCB. In alto a sinistra (a) plasmide pEGFP C1 0.5 nM da solo. In alto a destra (b) plasmide incubato con il C_{16} AGCB 2 nM. In basso a sinistra (c) plasmide incubato con il C_{16} DGCB 2 nM. In basso a destra (d) plasmide incubato con il C_{16} AGCB (DNA/tensioattivo 1:4000) e il DOPE 4 nM (tensioattivo/DOPE 1:2).



TENSIOATTIVI GEMINI DIPIRIDINICI

Misure termodinamiche, saggi biologici e immagini AFM

I calori di diluizione e le entalpie molari apparenti e parziali di 12-Py(2)-n-(2)Py-12 MS ($n = 2, 3, 4, 8, 12$) sono elencati nelle Tab. 22-26. I relativi grafici sono riportati nelle Fig. 69-73.

I calori di diluizione e le entalpie molari apparenti e parziali di 12-Py(2)-n-(2)Py-12 Cl ($n = 3, 4, 8, 12$) sono elencati nelle Tab. 27-30. I relativi grafici sono riportati nelle Fig. 74-77.

In Fig. 78 sono riportati i saggi EMSA che mostrano l'interazione tra i tensioattivi 16-Py(2)-n-(2)Py-16 Cl ($n = 3, 4, 8, 12$) con il plasmide pEGFP-C1.

In Fig 79 è riportato il saggio di trasfezione transiente dei tensioattivi 16-Py(2)-n-(2)Py-16 Cl ($n = 3, 4, 8, 12$) in presenza o meno di DOPE.

Nelle Fig. 80-83 sono riportate le immagini AFM del DNA plasmidico incubato con 12-Py(2)-n-(2)Py-12 Cl ($n = 3, 4, 8, 12$) a concentrazioni crescenti di tensioattivo.

Nelle Fig. 84-87 sono riportate le immagini AFM del DNA plasmidico incubato con 12-Py(2)-n-(2)Py-12 Cl ($n = 3, 4, 8, 12$) e il DOPE in rapporto tensioattivo:DOPE a concentrazioni crescenti di tensioattivo.

In Fig. 88 sono riportate le immagini AFM del DNA plasmidico incubato con 16-Py(2)-n-(2)Py-16 Cl ($n = 4, 8, 12$) ad una concentrazione di questi tensioattivi pari a 3 μM .

Nella sezione Discussione, nelle Fig 105-107 sono riportati i confronti delle entalpie molari apparenti e parziali dei 12-Py(2)-n-(2)Py-12 MS ($n = 2, 3, 4, 8, 12$). Nelle Fig.109 e 110 sono riportati i confronti delle entalpie molari apparenti e parziali dei 12-Py(2)-n-(2)Py-12 Cl ($n = 3, 4, 8, 12$) Nella Fig.111 sono riportati i confronti delle entalpie molari apparenti dei 12-Py(2)-n-(2)Py-12 MS ($n = 2, 3, 4, 8, 12$) e dei 12-Py(2)-n-(2)Py-12 Cl ($n = 3, 4, 8, 12$). I grafici delle tensioni superficiali dei 12-Py(2)-n-(2)Py-12 MS ($n = 2, 3, 4, 8, 12$) e dei 16-Py(2)-n-(2)Py-16 Cl ($n = 3, 4, 8, 12$) sono riportati rispettivamente nelle Fig.112 e 114.

TABELLA 22

Molalità (m), entalpie di diluizione (ΔH_d), entalpie molari apparenti (L_ϕ) e parziali (L_2), del tensioattivo 12-Py(2)-2-(2)Py-12 MS, in acqua a 298 K.

m_i (mol kg ⁻¹)	m_f (mol kg ⁻¹)	ΔH_d (J mol ⁻¹)	$\phi_{L,i}$ (J mol ⁻¹)	$\phi_{L,f}$ (J mol ⁻¹)	$L_{2,i}$ (J mol ⁻¹)	$L_{2,f}$ (J mol ⁻¹)
0.00100	0.00052	-352	371	19	1353	257
0.00151	0.00078	-808	987	179	3126	772
0.00201	0.00104	-1308	1719	411	4040	1472
0.00230	0.00115	-1643	2172	529	3985	1816
0.00251	0.00125	-1632	2277	645	3885	2153
0.00271	0.00141	-1481	2330	849	2220	2736
0.00301	0.00156	-1241	2300	1059	1850	3329
0.00351	0.00184	-720	2215	1495	1450	4550
0.00402	0.00209	-215	2110	1900	1200	4025
0.00451	0.00226	108	1910	2020	910	4005
0.00507	0.00262	543	1750	2285	630	3850
0.00803	0.00395	799	1290	2120	30	1235
0.01505	0.00779	792	530	1320	-450	80
0.01976	0.01007	773	250	990	-715	-270
0.04054	0.02059	621	-395	220	-1215	-730
0.05027	0.02567	594	-595	0	-1425	-880
0.06016	0.03029	607	-755	-145	-1590	-1000
0.07048	0.03537	592	-870	-285	-1745	-1110
0.08043	0.04101	579	-990	-410	-1850	-1230
0.09058	0.04610	587	-1105	-530	-1925	-1340
0.10040	0.05065	586	-1185	-600	-2020	-1430
0.15509	0.07529	610	-1550	-940	-2115	-1800

FIGURA 69

Entalpie relative molari apparenti (rombi arancioni) ed entalpie relative molari parziali (pallini gialli) del tensioattivo 12-Py(2)-2-(2)Py-12 MS in funzione della concentrazione m , a 298 K.

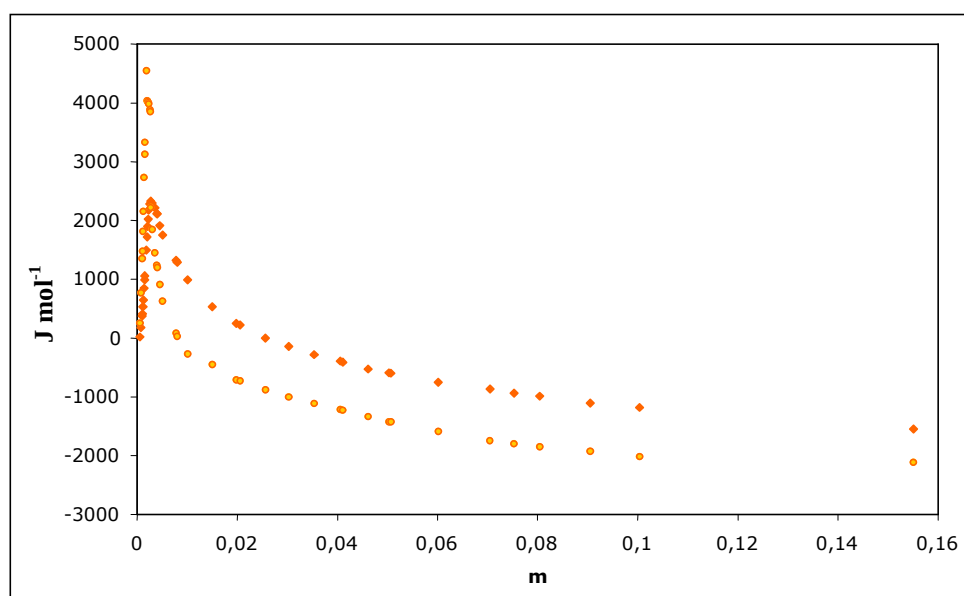


TABELLA 23

Molalità (m), entalpie di diluizione (ΔH_d), entalpie molari apparenti (L_ϕ) e parziali (L_2), del tensioattivo 12-Py(2)-3-(2)Py-12 MS, in acqua a 298 K.

m_i (mol kg ⁻¹)	m_f (mol kg ⁻¹)	ΔH_d (J mol ⁻¹)	$\phi_{L,i}$ (J mol ⁻¹)	$\phi_{L,f}$ (J mol ⁻¹)	$L_{2,i}$ (J mol ⁻¹)	$L_{2,f}$ (J mol ⁻¹)
0.00050	0.00024	-204	395	137	980	329
0.00060	0.00028	-383	518	170	1290	412
0.00070	0.00033	-440	652	215	1629	526
0.00080	0.00039	-505	797	274	1994	675
0.00100	0.00050	-758	1115	380	2797	980
0.00150	0.00072	-1365	2059	681	5177	1700
0.00200	0.00095	-1090	2122	1032	860	2588
0.00301	0.00193	472	1648	2120	-300	1160
0.00401	0.00193	1147	973	2120	-825	1160
0.00451	0.00211	1297	818	2115	-1050	620
0.00602	0.00282	1523	338	1860	-1540	-200
0.00652	0.00308	1536	84	1620	-1685	-300
0.00752	0.00349	1550	-270	1280	-1925	-580
0.00802	0.00378	1529	-450	1080	-2025	-740
0.01003	0.00471	1441	-681	760	-2380	-1115
0.01203	0.00568	1337	-917	420	-2620	-1425
0.01403	0.00646	1316	-1280	70	-2820	-1680
0.01994	0.00946	1081	-1770	-660	-3160	-2300
0.02506	0.01182	1002	-2080	-1110	-3280	-2605
0.02808	0.01284	960	-2180	-1200	-3350	-2720
0.03511	0.01637	900	-2420	-1520	-3510	-3010
0.04010	0.01907	850	-2570	-1720	-3625	-3130
0.05013	0.02358	820	-2840	-2020	-3830	-3240
0.06013	0.02802	800	-2990	-2170	-4020	-3350
0.07017	0.03308	760	-3140	-2380	-4120	-3475
0.08024	0.03761	766	-3286	-2520	-4200	-3575
0.10027	0.04689	740	-3520	-2780	-4375	-3775
0.20055	0.09239	685	-4115	-3440	-4820	-4280

FIGURA 70

Entalpie relative molari apparenti (rombi blu) ed entalpie relative molari parziali (pallini azzurri) del tensioattivo 12-Py(2)-3-(2)Py-12 MS in funzione della concentrazione m , a 298 K.

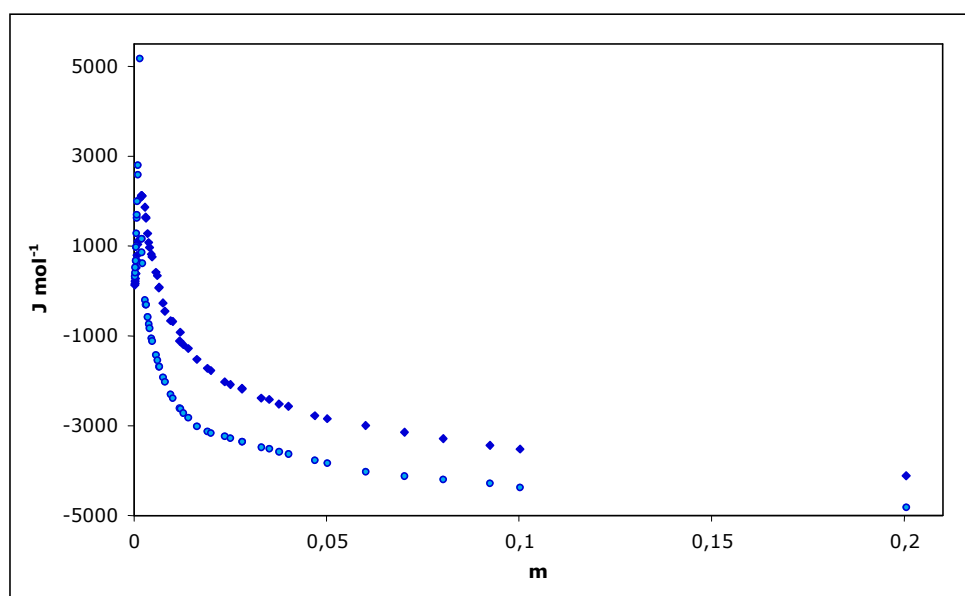


TABELLA 24

Molalità (m), entalpie di diluizione (ΔH_d), entalpie molari apparenti (L_ϕ) e parziali (L_2), del tensioattivo 12-Py(2)-4-(2)Py-12 MS, in acqua a 298 K.

m_i (mol kg ⁻¹)	m_f (mol kg ⁻¹)	ΔH_d (J mol ⁻¹)	$\phi_{L,i}$ (J mol ⁻¹)	$\phi_{L,f}$ (J mol ⁻¹)	$L_{2,i}$ (J mol ⁻¹)	$L_{2,f}$ (J mol ⁻¹)
0.00050	0.00025	-322	477	153	1243	399
0.00078	0.00039	-570	949	314	2461	818
0.00080	0.00040	-681	1012	330	2625	858
0.00090	0.00044	-754	1216	388	3149	1011
0.00100	0.00051	-996	1444	485	3735	1261
0.00140	0.00072	-1455	2299	844	4300	2400
0.00151	0.00076	-1392	2330	938	4100	2450
0.00201	0.00100	-1118	2546	1427	2200	3700
0.00302	0.00144	379	1961	2340	290	4290
0.00401	0.00204	899	1641	2540	-190	2200
0.00451	0.00223	1034	1456	2490	-360	1700
0.00503	0.00249	1179	1221	2400	-490	800
0.00601	0.00294	1293	767	2060	-740	360
0.00697	0.00340	1291	529	1820	-910	60
0.00802	0.00398	1232	370	1600	-1080	-170
0.00903	0.00437	1222	268	1490	-1220	-300
0.01002	0.00483	1208	93	1300	-1320	-440
0.02008	0.00964	888	-708	180	-1890	-1280
0.02381	0.01171	828	-928	-100	-1960	-1500
0.03020	0.01492	744	-1143	-400	-2030	-1690
0.06023	0.02956	589	-1729	-1140	-2400	-2030
0.08028	0.03868	575	-1924	-1350	-2620	-2150
0.10048	0.04754	579	-2118	-1544	-2800	-2270
0.20047	0.08970	588	-2608	-2020	-3280	-2710

FIGURA 71

Entalpie relative molari apparenti (rombi rosso scuro) ed entalpie relative molari parziali (pallini rosso chiaro) del tensioattivo 12-Py(2)-4-(2)Py-12 MS in funzione della concentrazione m , a 298 K.

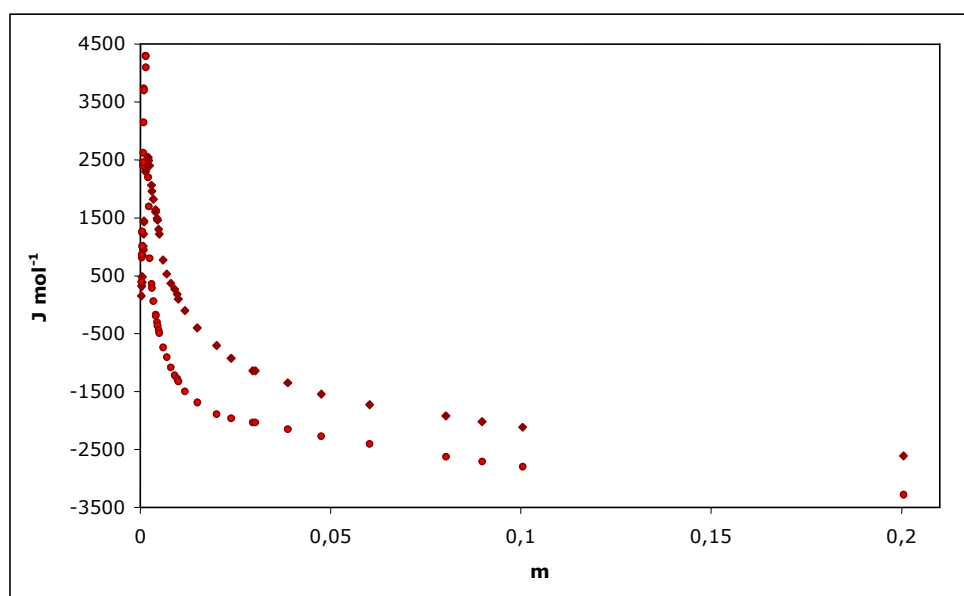


TABELLA 25

Molalità (m), entalpie di diluizione (ΔH_d), entalpie molari apparenti (L_ϕ) e parziali (L_2), del tensioattivo 12-Py(2)-8-(2)Py-12 MS in acqua a 298 K.

m_i (mol kg ⁻¹)	m_f (mol kg ⁻¹)	ΔH_d (J mol ⁻¹)	$\phi_{L,i}$ (J mol ⁻¹)	$\phi_{L,f}$ (J mol ⁻¹)	$L_{2,i}$ (J mol ⁻¹)	$L_{2,f}$ (J mol ⁻¹)
0.00009	0.00005	-120	-300	-569	340	-731
0.00010	0.00005	-189	-200	-572	528	-725
0.00015	0.00007	-874	270	-573	850	-363
0.00020	0.00010	-957	547	-250	950	375
0.00030	0.00015	-430	721	250	150	800
0.00040	0.00020	92	418	510	-1200	900
0.00050	0.00024	647	-47	600	-2200	700
0.00060	0.00029	1080	-380	700	-2900	200
0.00070	0.00034	1662	-1112	550	-3350	-250
0.00080	0.00038	2181	-1681	500	-3900	-750
0.00090	0.00043	2502	-2322	180	-4350	-1500
0.00100	0.00048	2438	-2468	-30	-4800	-2000
0.00200	0.00095	2827	-5077	-2250	-6800	-4600
0.00300	0.00144	2445	-6045	-3650	-7900	-6000
0.00401	0.00191	2061	-6960	-4900	-8300	-6700
0.00501	0.00238	1908	-7308	-5400	-8590	-7350
0.00602	0.00287	1712	-7442	-5730	-8760	-7800
0.00701	0.00333	1545	-7724	-6180	-9000	-8050
0.00901	0.00429	1334	-8383	-7050	-9350	-8420
0.01003	0.00500	1175	-8476	-7300	-9470	-8570
0.02002	0.00998	789	-9259	-8470	-10180	-9460
0.04007	0.01908	688	-9903	-9215	-10780	-10120
0.05010	0.02411	628	-10050	-9420	-10920	-10360
0.06006	0.02838	621	-10190	-9570	-11055	-10505
0.07029	0.03366	596	-10326	-9730	-11190	-10650
0.15128	0.06997	595	-10905	-10310	-11670	-11182
0.20460	0.09383	614	-11224	-10610	-11750	-11440

FIGURA 72

Entalpie relative molari apparenti (rombi verde scuro) ed entalpie relative molari parziali (pallini verde chiaro) del tensioattivo 12-Py(2)-8-(2)Py-12 MS in funzione della concentrazione m , a 298 K.

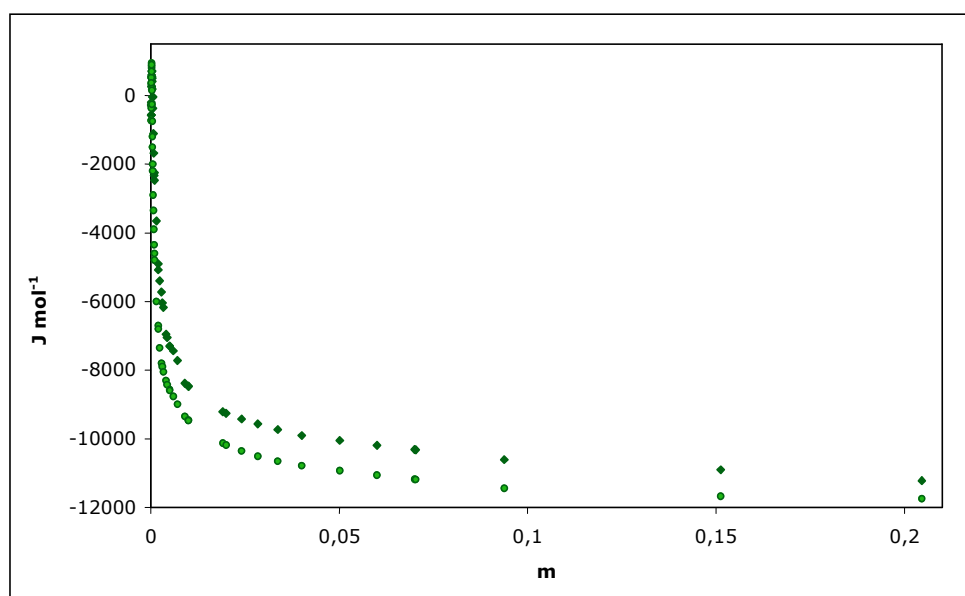


TABELLA 26

Molalità (m), entalpie di diluizione (ΔH_d), entalpie molari apparenti (L_ϕ) e parziali (L_2), del tensioattivo 12-Py(2)-12-(2)Py-12 MS, in acqua a 298 K.

m_i (mol kg ⁻¹)	m_f (mol kg ⁻¹)	ΔH_d (J mol ⁻¹)	$\phi_{L,i}$ (J mol ⁻¹)	$\phi_{L,f}$ (J mol ⁻¹)	$L_{2,i}$ (J mol ⁻¹)	$L_{2,f}$ (J mol ⁻¹)
0.00020	0.00010	2941	-5870	-2929	-10300	-5810
0.00030	0.00015	2960	-7960	-5000	-11100	-8752
0.00040	0.00020	2715	-8595	-5880	-11900	-10100
0.00050	0.00025	2500	-9410	-6910	-12300	-10700
0.00060	0.00029	2591	-10541	-7950	-12700	-10900
0.00070	0.00034	2619	-10919	-8300	-12800	-11800
0.00080	0.00039	2255	-10955	-8700	-12900	-11850
0.00085	0.00042	2393	-11193	-8800	-12950	-11950
0.00090	0.00044	2351	-11251	-8900	-13000	-12250
0.00100	0.00049	2570	-11970	-9400	-13300	-12280
0.00150	0.00072	1585	-12500	-10920	-13550	-12840
0.00200	0.00097	1904	-13244	-11340	-13900	-13250
0.00303	0.00147	1300	-13700	-12400	-14450	-13500
0.00400	0.00194	1284	-14284	-13000	-14800	-13850
0.00501	0.00248	1100	-14572	-13500	-15100	-14200
0.00601	0.00297	1070	-14760	-13690	-15500	-14430
0.00701	0.00347	940	-14940	-14000	-15700	-14600
0.00801	0.00393	960	-15160	-14200	-15900	-14790
0.00901	0.00451	883	-15280	-14400	-16050	-15000
0.00984	0.00493	880	-15440	-14560	-16150	-15080
0.02003	0.01006	666	-16126	-15460	-16980	-16170
0.04006	0.01983	569	-16659	-16090	-17550	-16880
0.06008	0.02852	562	-16987	-16425	-17770	-17380
0.08015	0.03778	555	-17180	-16625	-17900	-17530
0.15052	0.06705	557	-17627	-17070	-18380	-17820
0.21076	0.09155	583	-17863	-17280	-18760	-17970

FIGURA 73

Entalpie relative molari apparenti (rombi viola) ed entalpie relative molari parziali (pallini ciclamino) del tensioattivo 12-Py(2)-12-(2)Py-12 MS in funzione della concentrazione m , a 298 K.

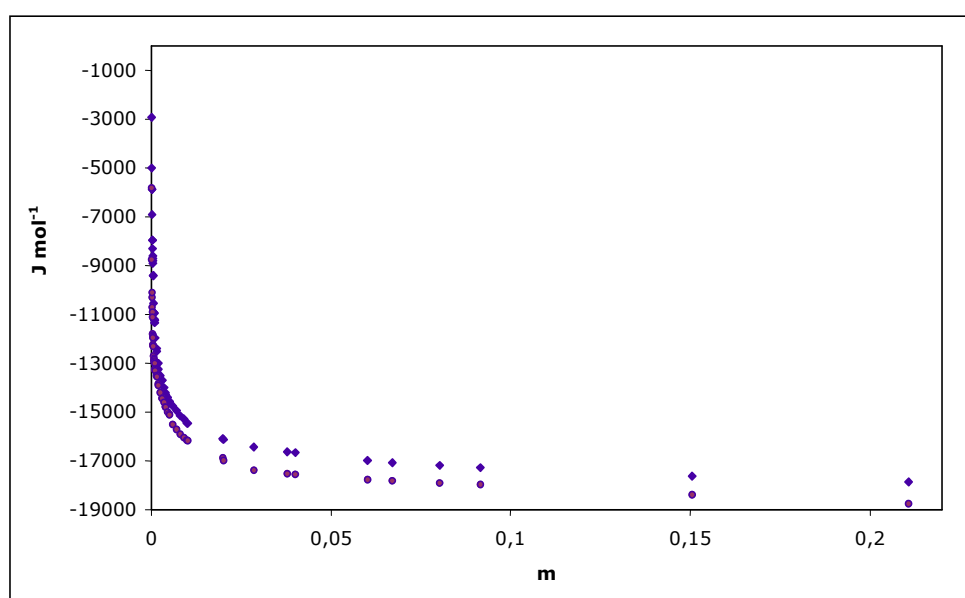


TABELLA 27

Molalità (m), entalpie di diluizione (ΔH_d), entalpie molari apparenti (L_ϕ) e parziali (L_2), del tensioattivo 12-Py(2)-3-(2)Py-12 Cl, in acqua a 298 K.

m_i (mol kg ⁻¹)	m_f (mol kg ⁻¹)	ΔH_d (J mol ⁻¹)	$\phi_{L,i}$ (J mol ⁻¹)	$\phi_{L,f}$ (J mol ⁻¹)	$L_{2,i}$ (J mol ⁻¹)	$L_{2,f}$ (J mol ⁻¹)
0.00060	0.00029	-361	749	397	1392	749
0.00070	0.00034	-400	855	457	1580	860
0.00082	0.00040	-449	977	515	1739	968
0.00090	0.00043	-488	1055	562	1930	1053
0.00100	0.00050	-520	1151	640	2093	1196
0.00120	0.00058	-568	1307	739	1595	1373
0.00160	0.00080	0	957	957	-1500	1759
0.00180	0.00087	321	705	1026	-2700	1879
0.00200	0.00096	650	464	1113	-3875	2029
0.00251	0.00121	1952	-652	1300	-5170	1570
0.00301	0.00141	2679	-1559	1120	-5995	1335
0.00401	0.00193	3220	-2670	550	-6845	-3625
0.00601	0.00297	2940	-4435	-1495	-7610	-5960
0.00701	0.00340	2820	-4845	-2025	-7805	-6410
0.00902	0.00442	2325	-5425	-3100	-8125	-7065
0.01002	0.00489	2105	-5650	-3545	-8260	-7275
0.01503	0.00735	1782	-6742	-4960	-8660	-7880
0.02004	0.00978	1620	-7225	-5605	-9075	-8235
0.02506	0.01231	1475	-7645	-6170	-9415	-8435
0.03006	0.01460	1383	-8033	-6650	-9650	-8625
0.03508	0.01689	1294	-8254	-6960	-9845	-8835
0.04008	0.01963	1235	-8440	-7205	-10030	-9045
0.05010	0.02394	1187	-8757	-7570	-10330	-9350
0.06013	0.02904	1123	-9093	-7960	-10550	-9605
0.10024	0.04816	1059	-9764	-8705	-11080	-10280
0.20040	0.09169	1002	-10577	-9685	-11660	-10940
0.30020	0.13516	951	-10961	-10150	-12125	-11310

FIGURA 74

Entalpie relative molari apparenti (triangoli azzurri) ed entalpie relative molari parziali (quadrati blu) del tensioattivo 12-Py(2)-3-(2)Py-12 Cl in funzione della concentrazione m , a 298 K.

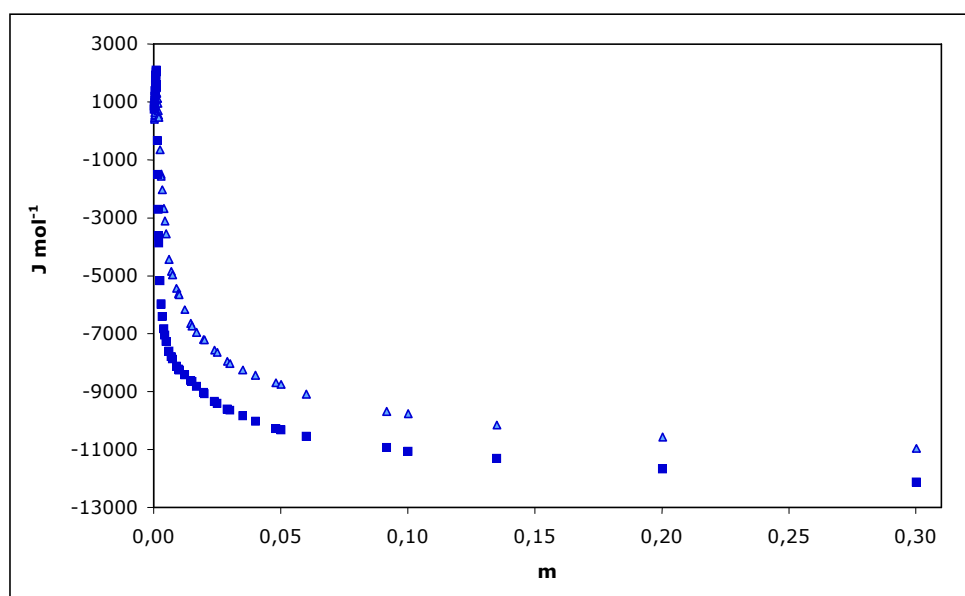


TABELLA 28

Molalità (m), entalpie di diluizione (ΔH_d), entalpie molari apparenti (L_ϕ) e parziali (L_2), del tensioattivo 12-Py(2)-4-(2)Py-12 Cl, in acqua a 298 K.

m_i (mol kg ⁻¹)	m_f (mol kg ⁻¹)	ΔH_d (J mol ⁻¹)	$\phi_{L,i}$ (J mol ⁻¹)	$\phi_{L,f}$ (J mol ⁻¹)	$L_{2,i}$ (J mol ⁻¹)	$L_{2,f}$ (J mol ⁻¹)
0.00060	0.00030	-394	446	55	1465	299
0.00070	0.00035	-521	625	98	1975	437
0.00080	0.00040	-682	833	153	2559	607
0.00090	0.00045	-937	1150	213	2555	786
0.00100	0.00050	-754	1037	282	2550	990
0.00201	0.00099	866	179	1045	2200	2552
0.00301	0.00149	1962	-1332	630	1200	2450
0.00501	0.00248	2223	-2623	-400	-600	1600
0.00802	0.00397	1851	-3871	-2020	-3100	200
0.02005	0.00993	1397	-5657	-4260	-6500	-4100
0.03364	0.01661	1136	-6467	-5330	-7830	-5800
0.06621	0.03250	999	-7400	-6400	-8755	-7670
0.09268	0.04510	982	-7862	-6880	-9225	-8220
0.13280	0.06157	978	-8278	-7300	-9560	-8655
0.26546	0.11837	970	-9155	-8185	-10400	-9480

FIGURA 75

Entalpie relative molari apparenti (triangoli rossi) ed entalpie relative molari parziali (quadrati rosso scuro) del tensioattivo 12-Py(2)-4-(2)Py-12 Cl in funzione della concentrazione m , a 298 K.

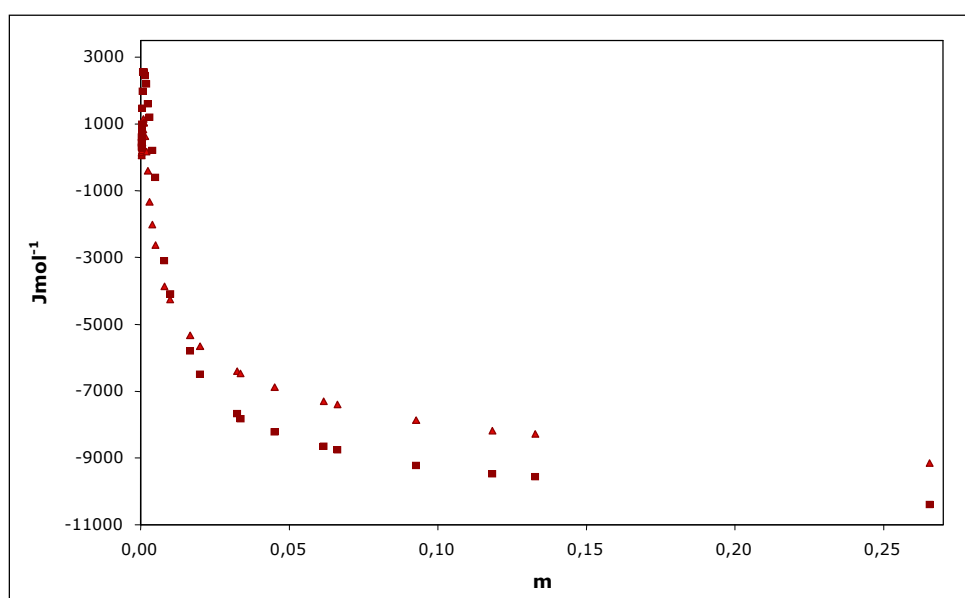


TABELLA 29

Molalità (m), entalpie di diluizione (ΔH_d), entalpie molari apparenti (L_ϕ) e parziali (L_2), del tensioattivo 12-Py(2)-8-(2)Py-12 Cl, in acqua a 298 K.

m_i (mol kg ⁻¹)	m_f (mol kg ⁻¹)	ΔH_d (J mol ⁻¹)	$\phi_{L,i}$ (J mol ⁻¹)	$\phi_{L,f}$ (J mol ⁻¹)	$L_{2,i}$ (J mol ⁻¹)	$L_{2,f}$ (J mol ⁻¹)
0.00090	0.00046	2835	-5800	-2964	-11420	-5929
0.00100	0.00051	3513	-6600	-3087	-11990	-6573
0.00150	0.00072	3460	-8150	-4690	-12350	-9640
0.00170	0.00085	3253	-8653	-5400	-12470	-11030
0.00200	0.00098	3100	-9500	-6400	-12660	-11890
0.00301	0.00146	2670	-10750	-8080	-13225	-12320
0.00401	0.00199	2023	-11503	-9480	-13640	-12655
0.00501	0.00243	1758	-11958	-10200	-13960	-12915
0.00802	0.00385	1250	-12655	-11405	-14485	-13585
0.01003	0.00485	1165	-13055	-11890	-14790	-13915
0.02006	0.00974	860	-13775	-12915	-15200	-14760
0.03009	0.01425	827	-14307	-13480	-15415	-14975
0.05014	0.02350	759	-14754	-13995	-15910	-15305
0.10083	0.04876	653	-15393	-14740	-16440	-15885
0.15049	0.07036	630	-15700	-15070	-16800	-16130

FIGURA 76

Entalpie relative molari apparenti (triangoli verde chiaro) ed entalpie relative molari parziali (quadrati verde scuro) del tensioattivo 12-Py(2)-8-(2)Py-12 Cl in funzione della concentrazione m , a 298 K.

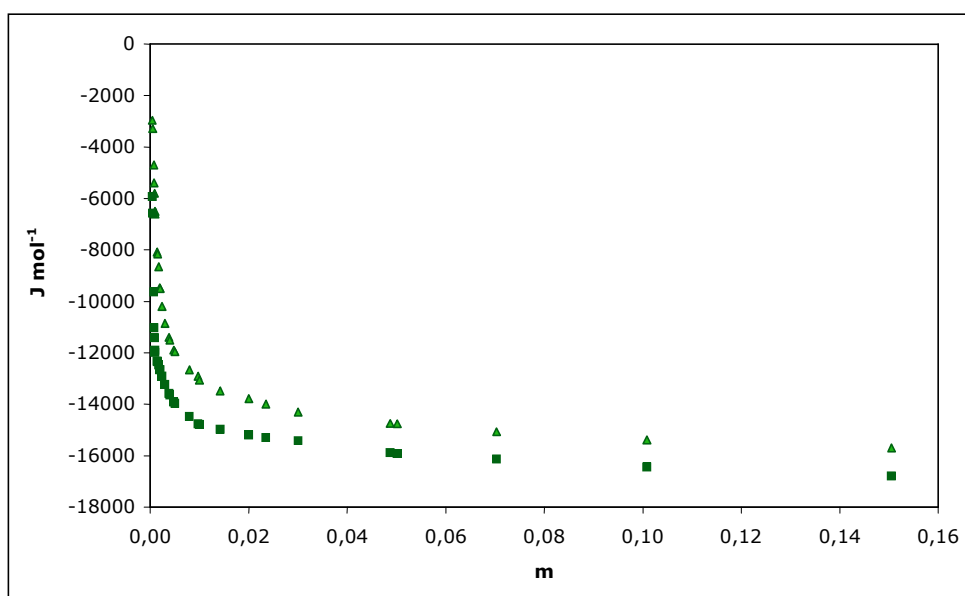


TABELLA 30

Molalità (m), entalpie di diluizione (ΔH_d), entalpie molari apparenti (L_ϕ) e parziali (L_2), del tensioattivo 12-Py(2)-12-(2)Py-12 Cl, in acqua a 298 K.

m_i (mol kg ⁻¹)	m_f (mol kg ⁻¹)	ΔH_d (J mol ⁻¹)	$\phi_{L,i}$ (J mol ⁻¹)	$\phi_{L,f}$ (J mol ⁻¹)	$L_{2,i}$ (J mol ⁻¹)	$L_{2,f}$ (J mol ⁻¹)
0.00010	0.00005	2674	-5339	-2665	-10170	-5339
0.00020	0.00010	2810	-8149	-5339	-12300	-10170
0.00030	0.00013	3071	-10015	-6944	-13975	-10915
0.00040	0.00019	3156	-11201	-8045	-15575	-12195
0.00050	0.00024	3200	-12100	-8900	-16940	-13060
0.00060	0.00029	3280	-13080	-9800	-17790	-13810
0.00070	0.00035	3332	-14047	-10715	-18435	-14965
0.00080	0.00040	3360	-14561	-11201	-18960	-15575
0.00090	0.00045	3380	-15045	-11665	-19450	-16320
0.00100	0.00049	3391	-15401	-12010	-19815	-16820
0.00200	0.00099	2998	-18363	-15365	-21430	-19780
0.00300	0.00148	2451	-19333	-16882	-21865	-20570
0.00402	0.00199	1880	-20210	-18330	-22230	-21425
0.00600	0.00296	1590	-20910	-19320	-22710	-21855
0.00701	0.00351	1340	-21190	-19850	-22890	-22060
0.00801	0.00395	1220	-21412	-20192	-23050	-22210
0.00901	0.00445	1180	-21625	-20445	-23190	-22350
0.01002	0.00490	1090	-21651	-20561	-23320	-22470
0.02004	0.00988	805	-22453	-21648	-23895	-23210
0.03007	0.01467	757	-22786	-22029	-24105	-23670
0.04007	0.01939	714	-23104	-22390	-24285	-23850
0.05513	0.02653	670	-23310	-22640	-24505	-24025
0.07515	0.03608	560	-23510	-22950	-24640	-24195
0.09017	0.04288	474	-23645	-23171	-24740	-24315
0.10036	0.04788	428	-23670	-23242	-24820	-24415
0.20043	0.09145	305	-23955	-23650	-24980	-24755

FIGURA 77

Entalpie relative molari apparenti (triangoli violetti) ed entalpie relative molari parziali (quadrati viola) del tensioattivo 12-Py(2)-12-(2)Py-12 Cl in funzione della concentrazione m , a 298 K.

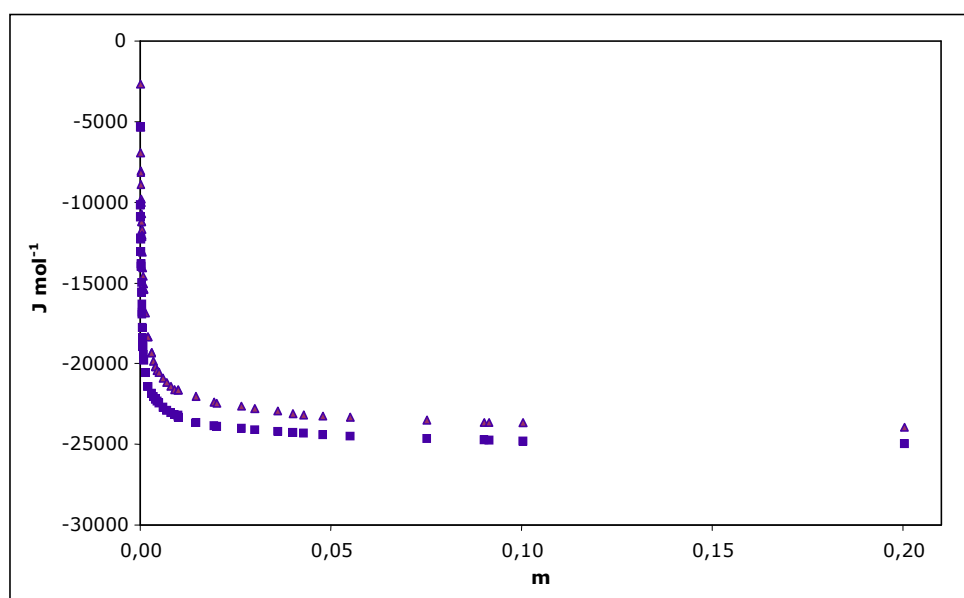


FIGURA 78

Saggio EMSA che mostra l'interazione tra i tensioattivi 16-(2)Py-n-Py(2)-16 Cl (n = 3, 4, 8, 12) con il plasmide pEGFP-C1 al variare della loro concentrazione. Come controllo negativo è stato utilizzato il plasmide da solo.

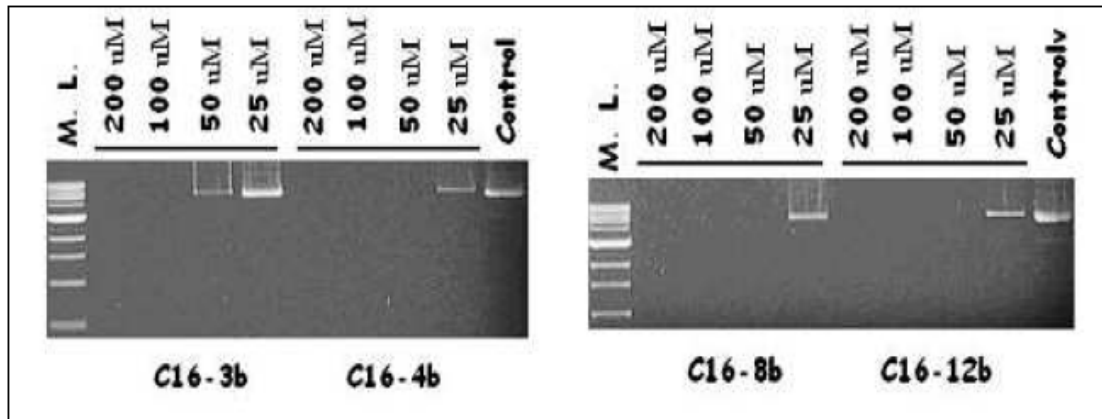


FIGURA 79

Risultati del saggio di trasfezione transiente su cellule RD-4 con i tensioattivi 16-(2)Py-n-Py(2)-16 Cl (n = 3, 4, 8, 12) in presenza o meno di DOPE. Come controllo positivo è stato utilizzato il reagente di trasfezione commerciale GenePorter.

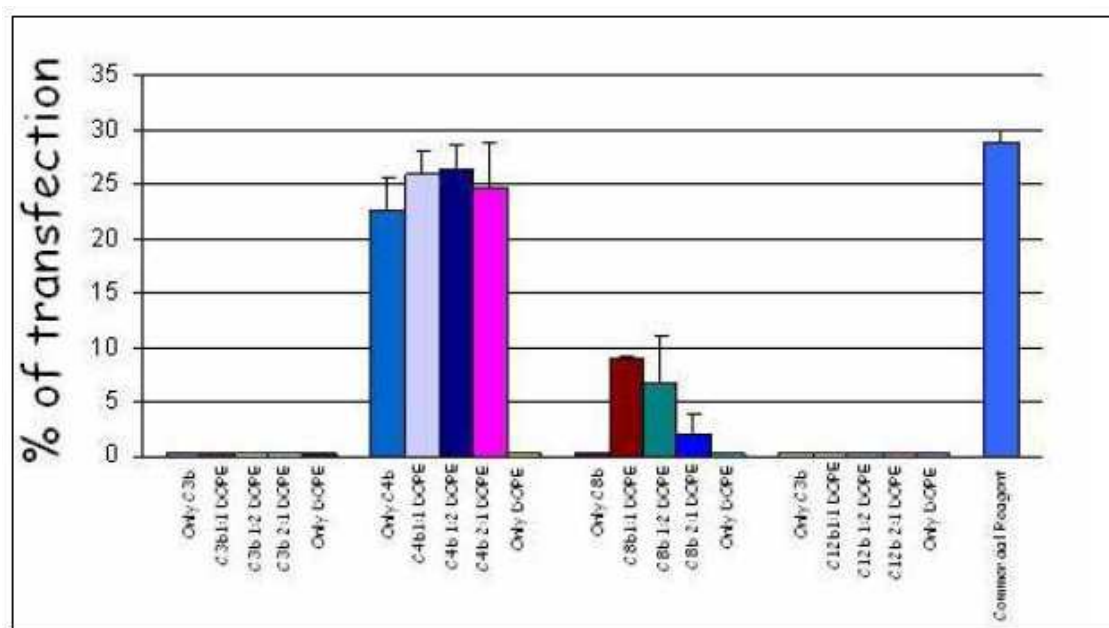


FIGURA 80

Immagini AFM del plasmide incubato con il tensioattivo 12-Py(2)-3-(2)Py-12 Cl. (a) Plasmide pEGFP C1 1 nM da solo. (b) Plasmide incubato con il 12-Py(2)-3-(2)Py-12 Cl 1 μ M. (c) Plasmide incubato con il 12-Py(2)-3-(2)Py-12 Cl 3 μ M. (d) Plasmide incubato con il 12-Py(2)-3-(2)Py-12 Cl 6 μ M.

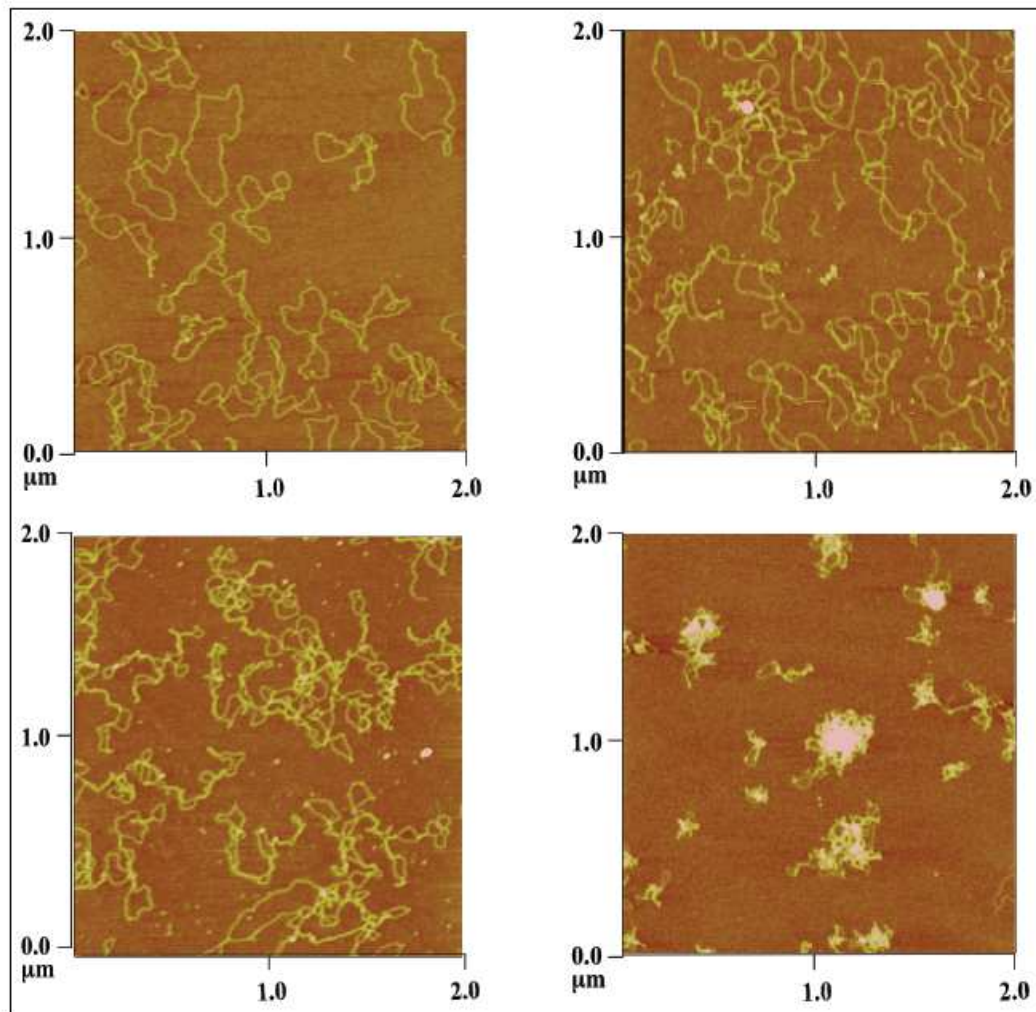


FIGURA 81

Immagini AFM del plasmide incubato con il tensioattivo 12-Py(2)-4-(2)Py-12 Cl. (a) Plasmide pEGFP C1 1 nM da solo. (b) Plasmide incubato con il 12-Py(2)-4-(2)Py-12 Cl 1 μ M. (c) Plasmide incubato con il 12-Py(2)-4-(2)Py-12 Cl 3 μ M. (d) Plasmide incubato con il 12-Py(2)-4-(2)Py-12 Cl 6 μ M.

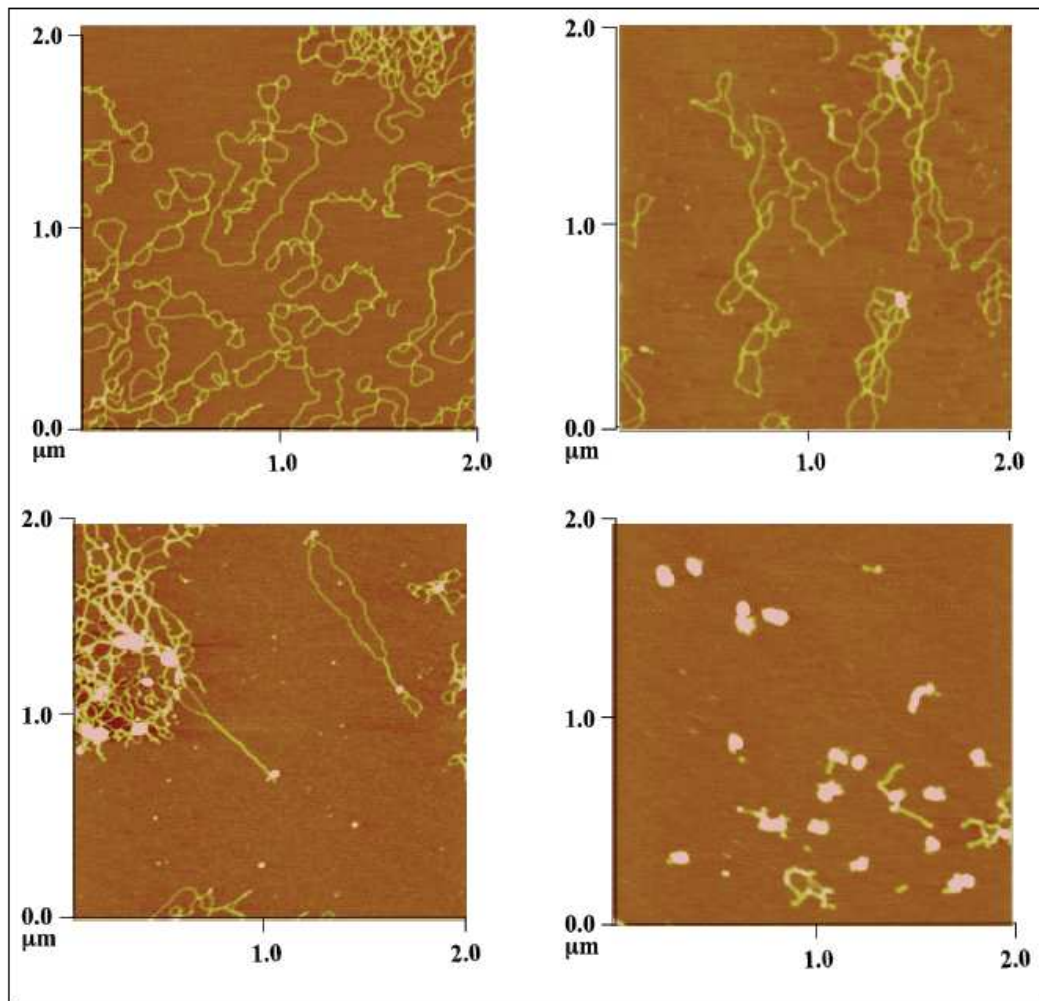


FIGURA 82

Immagini AFM del plasmide incubato con il tensioattivo 12-Py(2)-8-(2)Py-12 Cl. (a) Plasmide pEGFP C1 1 nM da solo. (b) Plasmide incubato con il 12-Py(2)-8-(2)Py-12 Cl 1 μ M. (c) Plasmide incubato con il 12-Py(2)-8-(2)Py-12 Cl 3 μ M. (d) Plasmide incubato con il 12-Py(2)-8-(2)Py-12 Cl 6 μ M.

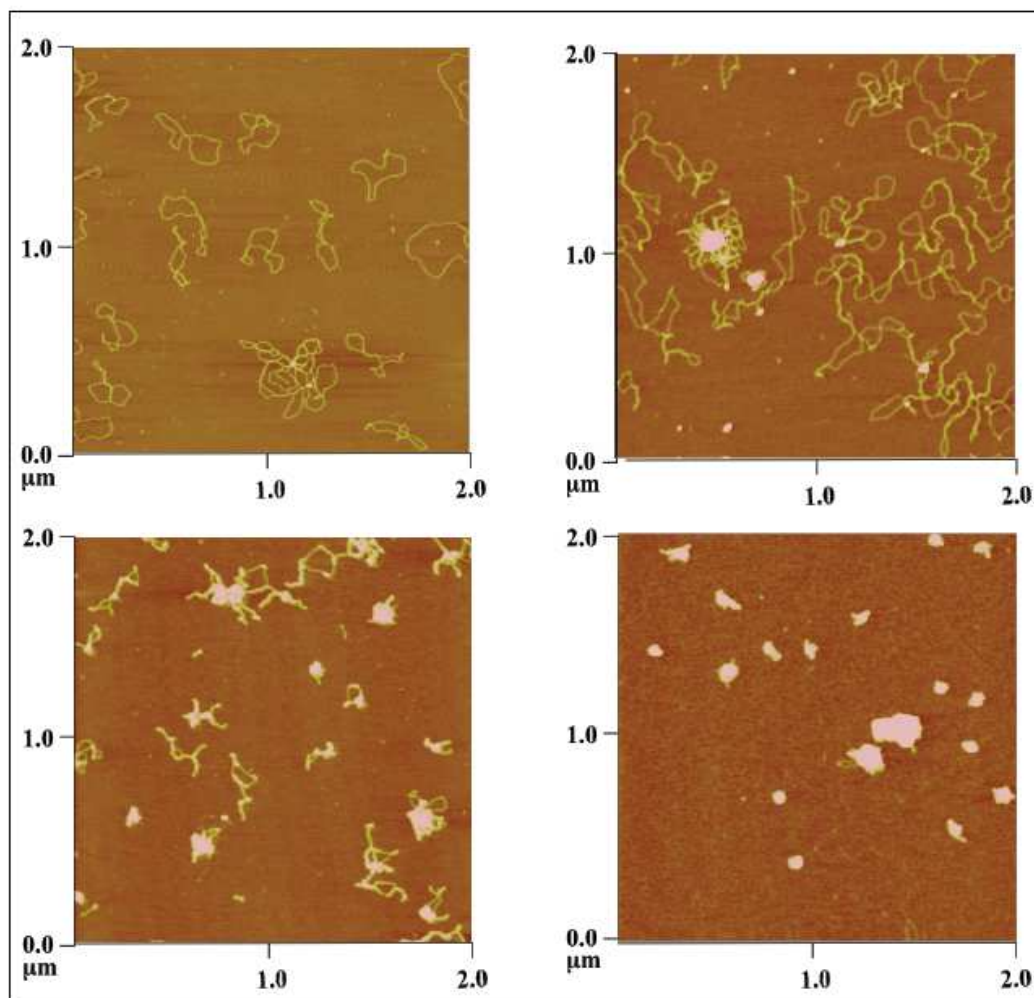


FIGURA 83

Immagini AFM del plasmide incubato con il tensioattivo 12-Py(2)-12-(2)Py-12 Cl. (a) Plasmide pEGFP C1 1 nM da solo. (b) Plasmide incubato con il 12-Py(2)-12-(2)Py-12 Cl 1 μ M. (c) Plasmide incubato con il 12-Py(2)-12-(2)Py-12 Cl 3 μ M. (d) Plasmide incubato con il 12-Py(2)-12-(2)Py-12 Cl 6 μ M.

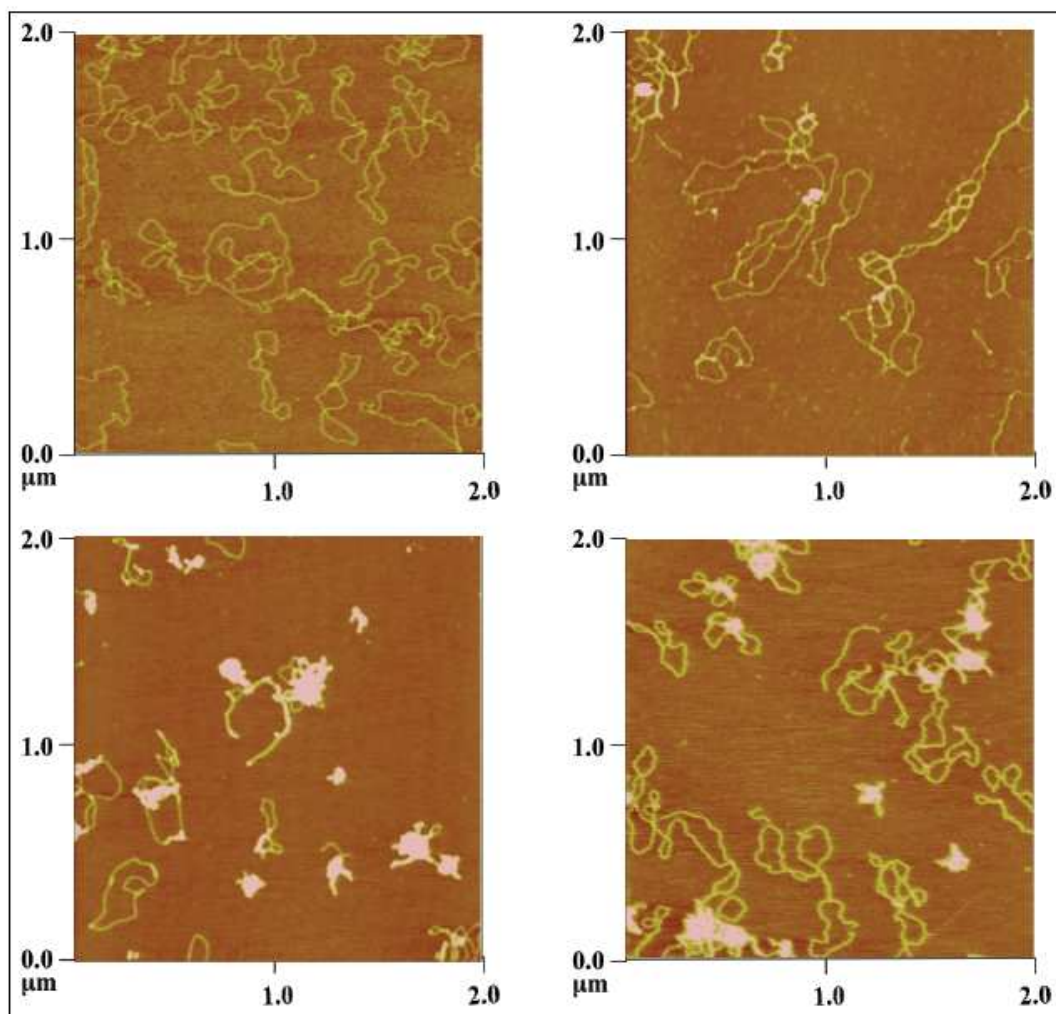


FIGURA 84

Immagini AFM del plasmide incubato con il tensioattivo 12-Py(2)-3-(2)Py-12 Cl. e il DOPE in rapporto lipide/DOPE 1:2 (a) Plasmide pEGFP C1 1 nM da solo. (b) Plasmide incubato con il 12-Py(2)-3-(2)Py-12 Cl 1 μ M (c) Plasmide incubato con il 12-Py(2)-3-(2)Py-12 Cl 3 μ M. (d) Plasmide incubato con il 12-Py(2)-3-(2)Py-12 Cl 6 μ M.

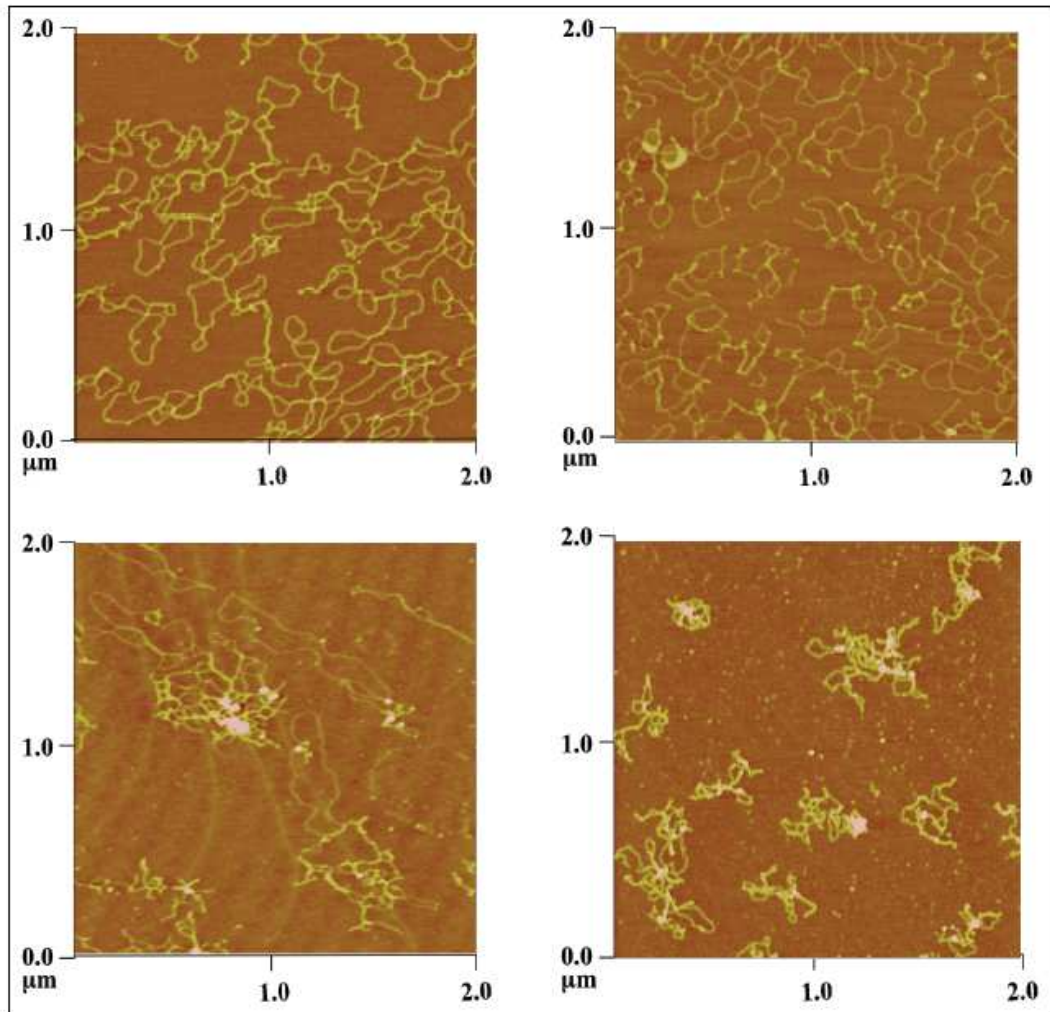


FIGURA 85

Immagini AFM del plasmide incubato con il tensioattivo 12-Py(2)-4-(2)Py-12 Cl. e il DOPE in rapporto lipide/DOPE 1:2 (a) Plasmide pEGFP C1 1 nM da solo. (b) Plasmide incubato con il 12-Py(2)-4-(2)Py-12 Cl 1 μ M (c) Plasmide incubato con il 12-Py(2)-4-(2)Py-12 Cl 3 μ M. (d) Plasmide incubato con il 12-Py(2)-4-(2)Py-12 Cl 6 μ M.

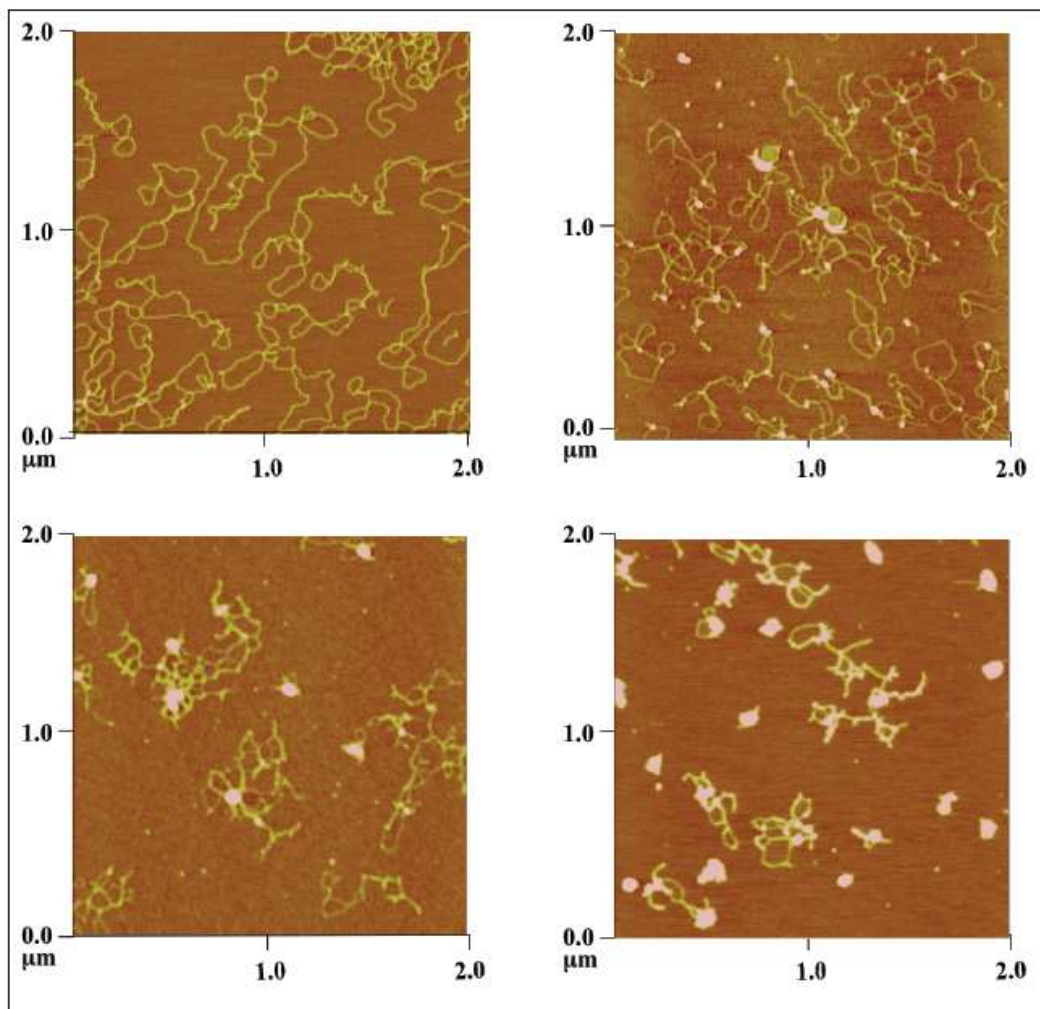


FIGURA 86

Immagini AFM del plasmide incubato con il tensioattivo 12-Py(2)-8-(2)Py-12 Cl. e il DOPE in rapporto lipide/DOPE 1:2 (a) Plasmide pEGFP C1 1 nM da solo. (b) Plasmide incubato con il 12-Py(2)-8-(2)Py-12 Cl 1 μ M. (c) Plasmide incubato con il 12-Py(2)-8-(2)Py-12 Cl 3 μ M. (d) Plasmide incubato con il 12-Py(2)-8-(2)Py-12 Cl 6 μ M.

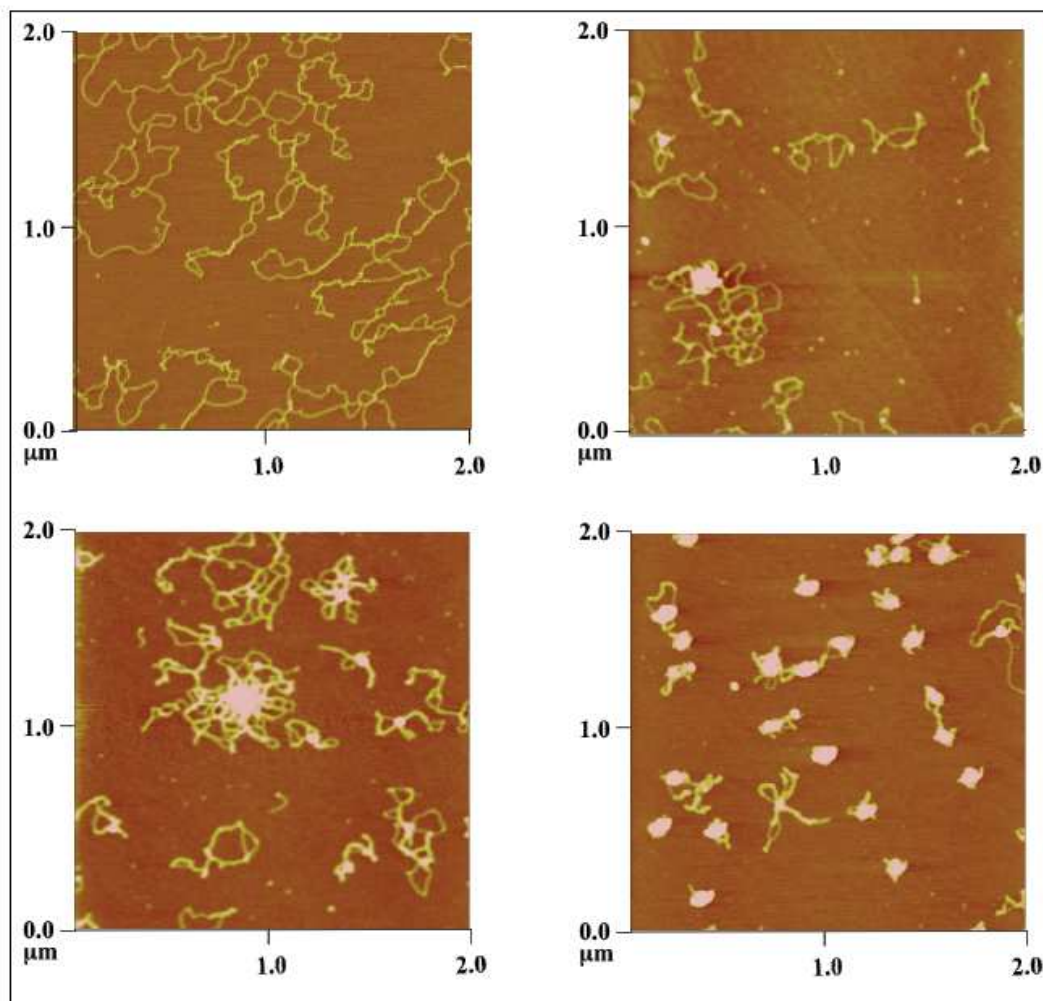


FIGURA 87

Immagini AFM del plasmide incubato con il tensioattivo 12-Py(2)-12-(2)Py-12 Cl. e il DOPE in rapporto lipide/DOPE 1:2 (a) Plasmide pEGFP C1 1 nM da solo. (b) Plasmide incubato con il 12-Py(2)-12-(2)Py-12 Cl 1 μ M (c) Plasmide incubato con il 12-Py(2)-12-(2)Py-12 Cl 3 μ M. (d) Plasmide incubato con il 12-Py(2)-12-(2)Py-12 Cl 6 μ M.

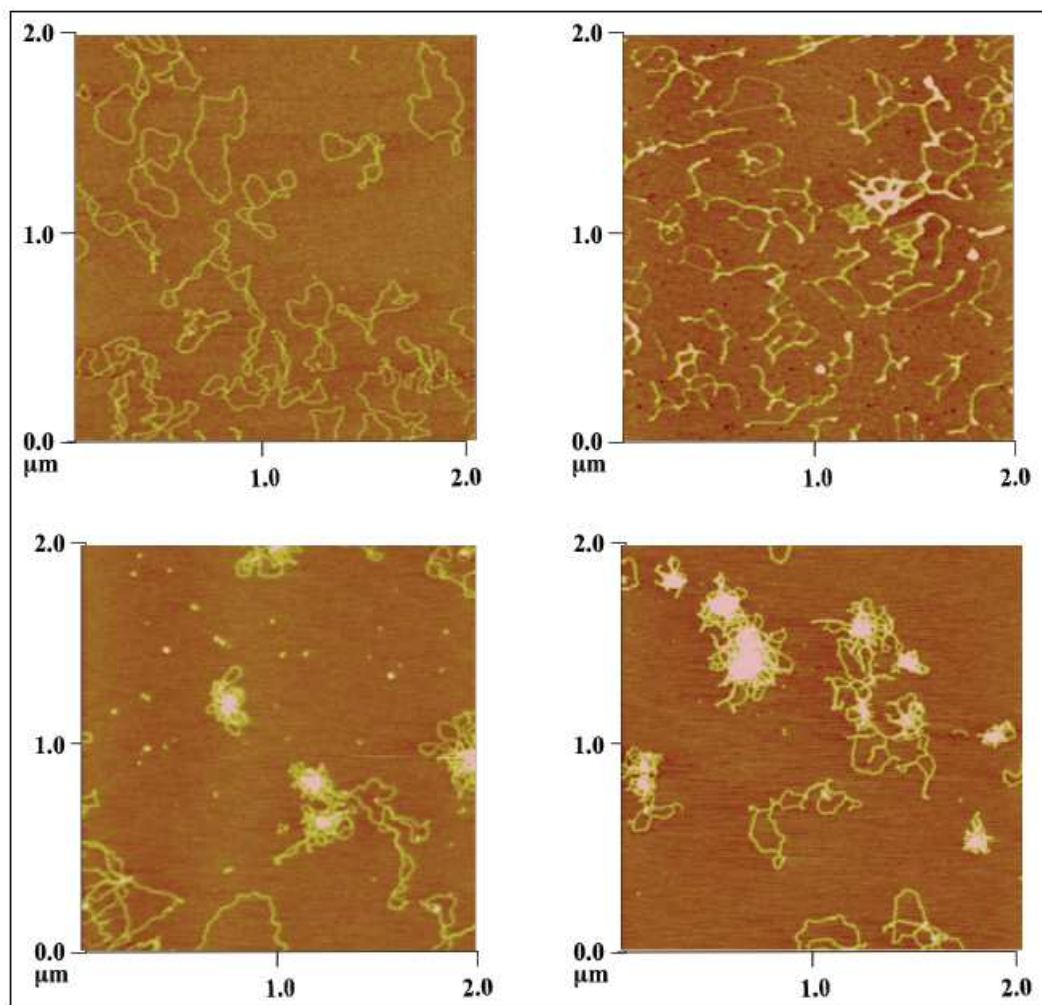
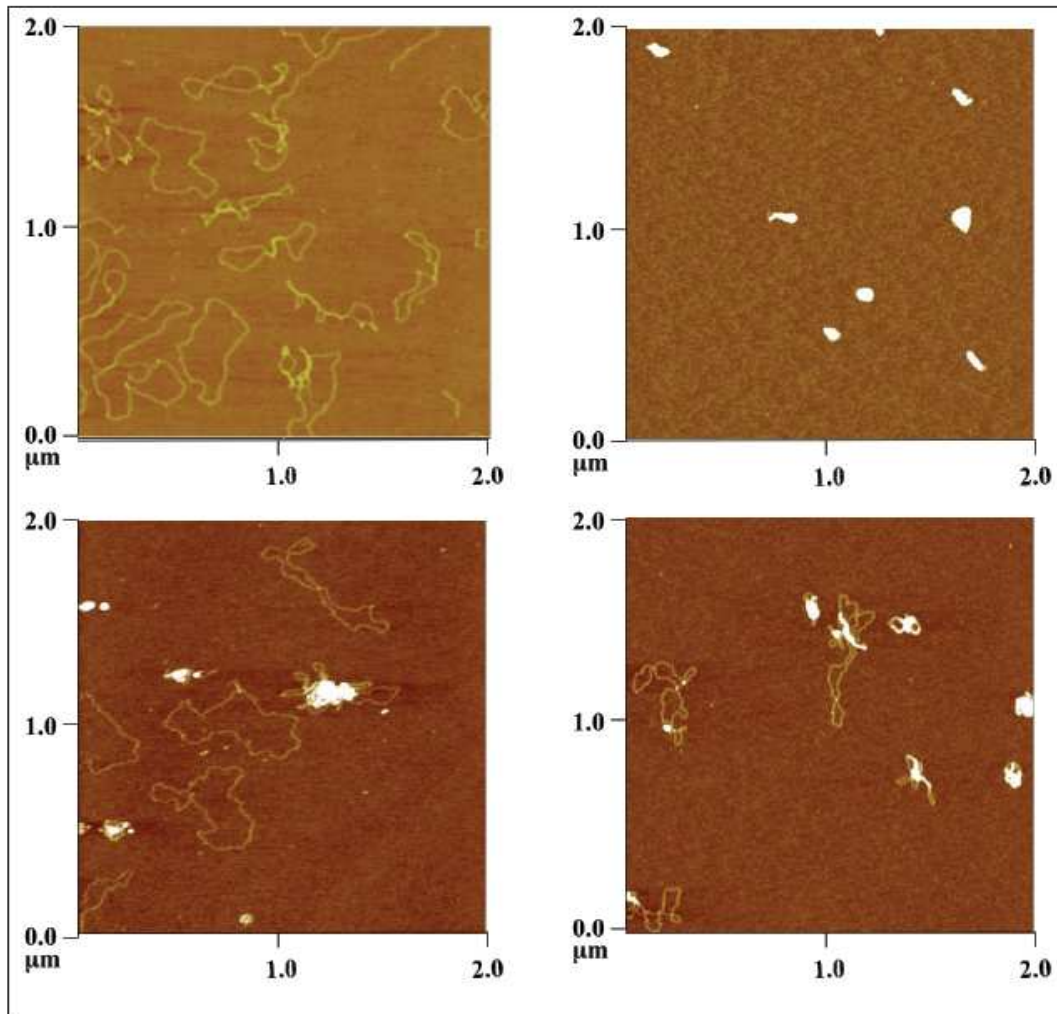


FIGURA 88

Immagini AFM del plasmide incubato con i tensioattivi 16-Py(2)-n-(2)Py-16 Cl (a) Plasmide pEGFP C1 1 nM da solo. (b) Plasmide incubato con il 16-Py(2)-4-(2)Py-16 Cl 3 μ M. (c) Plasmide incubato con il 16-Py(2)-8-(2)Py-16 Cl 3 μ M. (d) Plasmide incubato con il 16-Py(2)-12-(2)Py-16 Cl 3 μ M.



TENSIOATTIVI ALCHILTRIMETILAMMONIO BROMURI

Misure di conducibilità

Nelle Tab.31-34 sono elencati i valori di conducibilità rispettivamente dei tensioattivi DeTAB, DTAB, TTAB, CTAB in acqua in funzione della molarità, a diverse temperature. I relativi grafici sono riportati nelle Fig. 89-92.

In Tab. 35 sono indicate funzioni termodinamiche calcolate per i tensioattivi in studio.

In Tab. 36 sono indicati i numeri di molecole d'acqua n_w calcolati dall'entalpia e dall'entropia (dalle pendenze di $\Delta H = f(T)$ e di $\Delta S = f(\ln T)$) in seguito alla formazione delle micelle per vari tensioattivi, tra cui i composti in studio.

TABELLA 31

Conducibilità (k) del tensioattivo DeTAB in acqua in funzione della molarità (M), a diverse temperature.

M (mol l ⁻¹)	k 15°C (μS cm ⁻¹)	k 25°C (μS cm ⁻¹)	M (mol l ⁻¹)	k 20°C (μS cm ⁻¹)	M (mol l ⁻¹)	k 30°C (μS cm ⁻¹)	k 40°C (μS cm ⁻¹)	k 50°C (μS cm ⁻¹)
0,00000	0,81	1,15	0,00000	1,08	0,00000	1,48	1,86	2,45
0,00182	112	141,1	0,00363	240	0,00183	234	342	488
0,00363	220	278	0,00722	471	0,00364	414	539	826
0,00543	328	410	0,01076	691	0,00544	574	739	1011
0,00722	432	539	0,01425	904	0,00723	739	936	1208
0,00900	533	664	0,01770	1115	0,00901	892	1124	1474
0,01076	630	786	0,02110	1312	0,01078	1054	1306	1661
0,01251	726	907	0,02446	1505	0,01254	1200	1483	1852
0,01426	822	1027	0,02778	1690	0,01428	1356	1655	2030
0,01599	915	1144	0,03106	1871	0,01601	1499	1830	2210
0,01770	1007	1259	0,03429	2040	0,01774	1650	2010	2390
0,01941	1099	1371	0,03749	2220	0,01945	1790	2180	2570
0,02111	1190	1482	0,04064	2390	0,02115	1930	2340	2740
0,02280	1277	1593	0,04376	2550	0,02284	2060	2510	3020
0,02447	1363	1700	0,04684	2710	0,02452	2200	2670	3190
0,02614	1445	1804	0,04988	2860	0,02618	2330	2830	3370
0,02779	1529	1908	0,05289	3020	0,02784	2460	2990	3580
0,02943	1611	2010	0,05585	3170	0,02949	2590	3140	3730
0,03107	1695	2110	0,05879	3320	0,03112	2720	3280	3900
0,03269	1778	2210	0,06169	3460	0,03275	2840	3430	4060
0,03430	1855	2300	0,06455	3600	0,03437	2970	3580	4210
0,03591	1931	2400	0,06738	3740	0,03597	3110	3730	4380
0,03750	2010	2500	0,07018	3870	0,03757	3230	3870	4540
0,03908	2080	2590	0,07295	4000	0,03915	3350	4030	4690
0,04065	2150	2690	0,07568	4100	0,04073	3460	4150	4860
0,04222	2230	2780	0,07838	4180	0,04230	3580	4290	5030
0,04377	2300	2870	0,08106	4240	0,04385	3740	4420	5210
0,04532	2370	2960	0,08370	4300	0,04540	3840	4560	5360
0,04685	2450	3050	0,08631	4350	0,04694	3950	4680	5510
0,04838	2510	3140	0,08889	4400	0,04847	4060	4820	5670
0,04989	2590	3230	0,09145	4450	0,04999	4190	4940	5840
0,05290	2710	3400	0,09397	4490	0,05300	4380	5160	6110
0,05587	2840	3550	0,09647	4540	0,05597	4570	5380	6360
0,05880	2970	3720	0,09894	4580	0,05891	4750	5610	6630
0,06170	3100	3860	0,10139	4610	0,06182	4940	5830	6900
0,06457	3220	4020	0,10381	4660	0,06469	5110	6030	7160
0,06740	3340	4170	0,10620	4700	0,06752	5290	6250	7500
0,07020	3460	4320	0,10856	4740	0,07033	5450	6450	7750
0,07297	3570	4460	0,11091	4780	0,07310	5610	6630	7970
0,07570	3660	4560	0,11322	4820	0,07584	5730	6770	8200

0,07841	3740	4660	0,11551	4850	0,07855	5830	6910	8400
0,08108	3790	4730	0,11778	4890	0,08123	5920	7030	8600
0,08372	3840	4790	0,12003	4930	0,08387	6000	7140	8780
0,08633	3880	4850	0,12225	4960	0,08649	6070	7250	8920
0,08892	3920	4900	0,12445	5000	0,08908	6140	7350	9120
0,09147	3970	4960	0,12662	5040	0,09164	6210	7450	9260
0,09400	4000	5010	0,12877	5070	0,09417	6270	7540	9360
0,09650	4040	5070	0,13091	5100	0,09668	6350	7620	9500
0,09897	4080	5120	0,13302	5140	0,09915	6410	7700	9620
0,10142	4100	5160	0,13510	5170	0,10160	6470	7790	9730
0,10383	4140	5210	0,13717	5200	0,10402	6540	7870	9850
0,10623	4180	5250			0,10642	6590	7950	9960
0,10859	4200	5300			0,10879	6660	8020	10100
0,11094	4240	5350			0,11114	6710	8100	10220
0,11325	4270	5390			0,11346	6780	8180	10300
0,11555	4310	5430			0,11576	6830	8260	10410
0,11781	4330	5470			0,11803	6890	8340	10550
0,12006	4360	5520			0,12028	6940	8410	10620

FIGURA 89

Conducibilità (k) del tensioattivo DeTAB in acqua in funzione della molarità (M), a diverse temperature (triangoli rosa 50°C, gialli 40°C, viola 30°C, verdi 25°C, arancione 20°C e azzurri 15°C) .

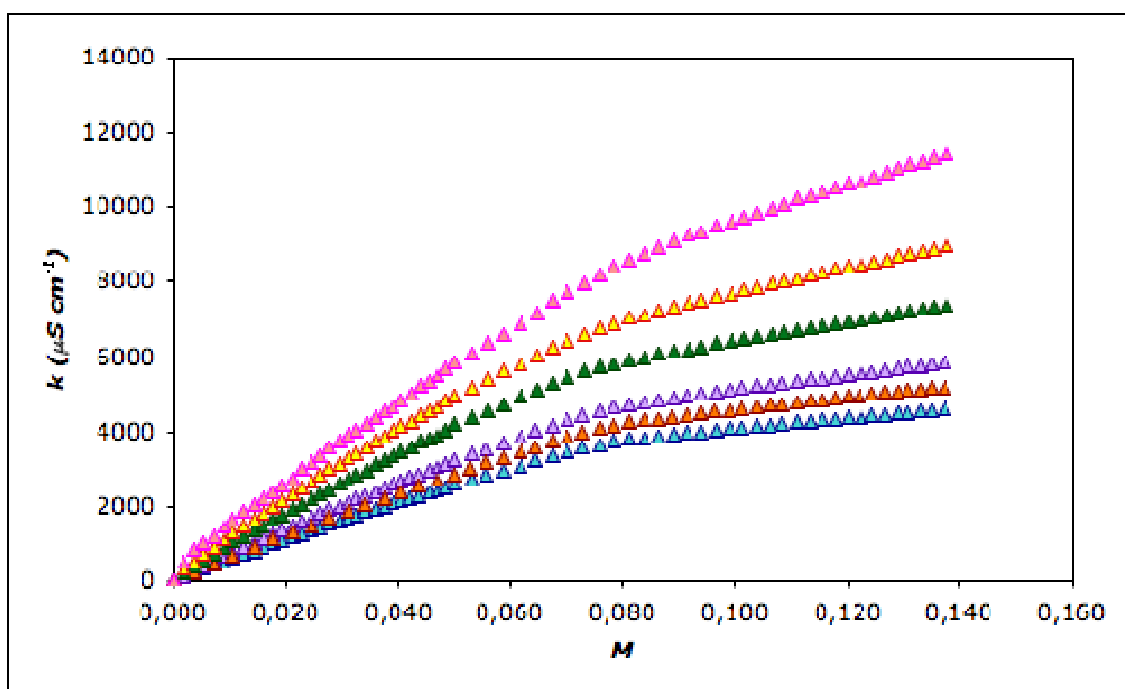


TABELLA 32

Conducibilità (k) del tensioattivo DTAB in acqua in funzione della molarità (M), a diverse temperature.

M (mol l ⁻¹)	k 15°C (μS cm ⁻¹)	k 25°C (μS cm ⁻¹)	k 30°C (μS cm ⁻¹)	k 50°C (μS cm ⁻¹)	M (mol l ⁻¹)	k 20°C (μS cm ⁻¹)	M (mol l ⁻¹)	k 40°C (μS cm ⁻¹)
0,00000	0,65	1,08	1,25	2,41	0,00000	0,89	0,00000	1,35
0,00066	67,2	76,2	88,2	186	0,00132	96,8	0,00066	73,8
0,00132	100,1	135,1	154,1	240	0,00263	188,1	0,00132	144,4
0,00198	143,8	193,5	218	313	0,00391	276	0,00198	213
0,00263	183,8	249	280	390	0,00519	363	0,00263	280
0,00328	224	304	342	469	0,00644	446	0,00327	343
0,00392	264	360	403	543	0,00768	528	0,00391	409
0,00456	308	416	466	613	0,00890	608	0,00455	475
0,00519	347	470	523	685	0,01011	687	0,00519	539
0,00582	384	523	584	755	0,01130	764	0,00582	603
0,00645	425	575	644	827	0,01248	838	0,00644	665
0,00707	462	626	703	899	0,01364	913	0,00706	727
0,00769	503	678	761	968	0,01479	984	0,00768	788
0,00831	538	728	818	1032	0,01592	1051	0,00829	846
0,00892	577	779	875	1103	0,01704	1089	0,00890	907
0,00952	612	827	931	1171	0,01815	1113	0,00951	966
0,01013	649	876	986	1238	0,01924	1133	0,01011	1024
0,01072	684	924	1041	1313	0,02032	1152	0,01071	1082
0,01132	724	971	1094	1376	0,02139	1169	0,01130	1139
0,01191	758	1019	1148	1442	0,02245	1187	0,01189	1196
0,01250	793	1067	1201	1506	0,02349	1203	0,01248	1251
0,01308	828	1113	1255	1577	0,02452	1220	0,01306	1307
0,01366	863	1160	1306	1648	0,02554	1237	0,01364	1362
0,01424	898	1205	1357	1716	0,02654	1252	0,01422	1417
0,01481	929	1249	1408	1790	0,02754	1268	0,01479	1469
0,01538	963	1292	1456	1865	0,02852	1284	0,01536	1523
0,01595	990	1328	1495	1958	0,02949	1299	0,01592	1574
0,01651	1010	1354	1524	2040	0,03046	1315	0,01649	1623
0,01707	1024	1373	1545	2120	0,03141	1330	0,01704	1663
0,01763	1034	1390	1565	2170	0,03235	1344	0,01760	1694
0,01818	1045	1405	1581	2220	0,03328	1360	0,01815	1719
0,01928	1063	1430	1612	2300	0,03419	1375	0,01924	1759
0,02036	1080	1454	1640	2360	0,03510	1388	0,02032	1795
0,02143	1095	1478	1666	2430	0,03600	1403	0,02139	1828
0,02248	1111	1500	1694	2510	0,03689	1417	0,02245	1860
0,02353	1125	1522	1720	2570	0,03777	1432	0,02349	1891
0,02456	1140	1545	1745	2630	0,03864	1445	0,02452	1920
0,02558	1154	1565	1770	2700	0,03950	1459	0,02554	1950
0,02659	1168	1586	1795	2750	0,04035	1473	0,02654	1978
0,02758	1184	1606	1820	2810	0,04120	1487	0,02754	2000

0,02857	1197	1626	1844	2860	0,04203	1501	0,02852	2020
0,02954	1212	1647	1868	2930	0,04286	1514	0,02950	2050
0,03051	1224	1667	1892	2970	0,04367	1527	0,03046	2080
0,03146	1238	1687	1915	3030	0,04448	1540	0,03141	2110
0,03240	1253	1708	1938	3080	0,04528	1553	0,03235	2130
0,03333	1267	1730	1961	3140	0,04607	1566	0,03328	2160
0,03425	1280	1746	1984	3180	0,04686	1579	0,03420	2180
0,03516	1293	1765	2000	3230	0,04763	1592	0,03511	2210
0,03606	1305	1783	2020	3280	0,04840	1607	0,03600	2240
0,03695	1319	1802	2040	3320	0,04916	1621	0,03689	2260
0,03783	1332	1821	2060	3370	0,04991	1630	0,03777	2290
0,03871	1344	1839	2080	3410			0,03864	2310
0,03957	1357	1857	2110	3450			0,03950	2340
0,04042	1371	1876	2130	3510			0,04036	2360
0,04127	1383	1895	2150	3550			0,04120	2380
0,04210	1395	1915	2160	3600			0,04203	2410
0,04293	1408	1933	2190	3630			0,04286	2440
0,04375	1420	1949	2210	3680			0,04368	2460
0,04456	1432	1965	2230	3720			0,04448	2480
0,04536	1444	1983	2250	3750			0,04528	2500
0,04615	1456	2000	2270	3790			0,04608	2520
0,04693	1469	2020	2290	3830			0,04686	2550
0,04771	1481	2040	2310	3860			0,04763	2580
0,04848	1491	2050	2330	3890			0,04840	2590
0,04924	1503	2060	2350	3940			0,04916	2610
0,05000	1515	2080	2380	3970			0,04992	2630

FIGURA 90

Conducibilità (k) del tensioattivo DTAB in acqua in funzione della molarità (M), a diverse temperature (rombi rosa 50°C, gialli 40°C, viola 30°C, verdi 25°C, arancione 20°C e azzurri 15°C) .

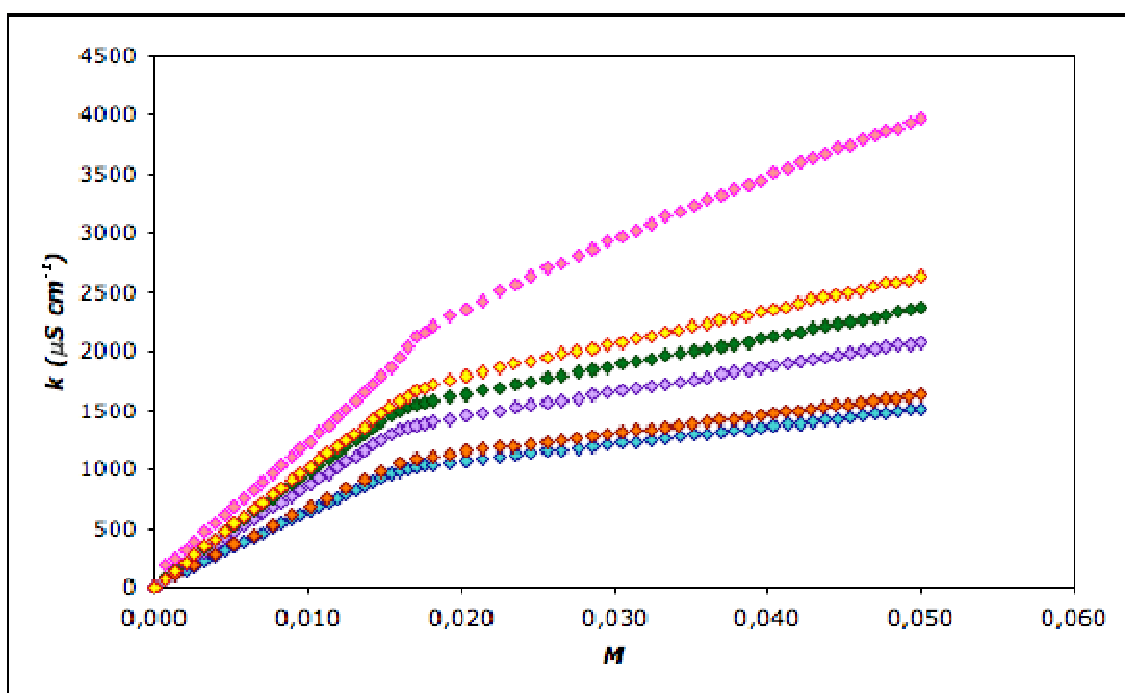


TABELLA 33

Conducibilità (k) del tensioattivo TTAB in acqua in funzione della molarità (M), a diverse temperature.

M (mol l ⁻¹)	k 15°C (μS cm ⁻¹)	k 20°C (μS cm ⁻¹)	k 25°C (μS cm ⁻¹)	k 30°C (μS cm ⁻¹)	k 40°C (μS cm ⁻¹)	k 50°C (μS cm ⁻¹)
0,00000	1,02	1,96	1,35	1,45	1,9	2,41
0,00017	15,3	17,78	20,5	24	25,4	37,9
0,00033	25	32	35,6	41,7	46	57,3
0,00049	36,6	45,9	51,3	58,9	66,6	81,4
0,00066	48,1	59,7	66,7	75,9	87,2	107,6
0,00082	59	73,4	82,1	92,8	107,7	130,7
0,00098	70,5	87,1	97,4	109,7	127,9	154,9
0,00114	81,6	100,6	112,5	126,2	147,7	178,9
0,00130	92,7	113,9	127,5	142,7	167,7	202
0,00145	103,6	127,4	142,3	159,1	187,2	225
0,00161	114,4	140,5	157,1	175,1	206	249
0,00177	125,1	153,4	171,7	190,6	224	273
0,00192	136	166,3	186	205	243	296
0,00207	146,4	179	198	221	263	319
0,00223	157,1	191,8	213	238	281	342
0,00238	167,1	204	227	252	301	364
0,00253	177,8	216	241	267	320	386
0,00268	189	227	254	282	338	408
0,00283	198,7	240	268	297	356	430
0,00297	208	252	282	312	374	453
0,00312	218	264	295	327	392	474
0,00327	227	276	309	342	411	496
0,00341	237	288	322	356	428	518
0,00355	246	299	335	371	446	539
0,00370	254	307	345	384	463	560
0,00384	258	312	350	394	481	581
0,00398	261	316	356	400	495	602
0,00412	264	319	360	405	507	622
0,00426	266	321	363	409	515	640
0,00440	268	324	367	414	521	656
0,00454	271	327	370	417	528	667
0,00481	275	332	376	425	538	685
0,00508	279	338	382	432	548	698
0,00535	283	343	388	438	557	711
0,00561	287	348	394	445	566	724
0,00587	291	353	399	451	575	736
0,00613	295	357	405	459	584	747
0,00638	299	362	411	465	592	758
0,00664	303	367	417	472	600	770
0,00688	306	372	422	477	609	781
0,00713	309	377	428	483	616	792

0,00737	313	380	432	488	624	802
0,00761	316	385	438	495	633	812
0,00785	320	390	443	500	640	823
0,00809	323	394	449	507	648	833
0,00832	327	398	454	512	656	843
0,00855	330	402	459	518	664	852
0,00878	333	407	465	524	671	862
0,00900	337	411	469	530	678	871
0,00922	340	415	474	535	685	881
0,00944	344	419	479	541	694	891
0,00966	347	424	484	546	700	901
0,00988	350	427	488	552	707	910
0,01009	354	431	492	557	714	918
0,01030	357	435	496	562	722	928
0,01051	360	439	501	567	729	937
0,01071	364	443	505	573	735	946
0,01092	367	448	511	577	741	955
0,01112	370	450	514	583	748	964
0,01132	373	454	519	589	754	973
0,01152	376	459	524	594	761	981
0,01171	379	461	527	598	767	990
0,01191	382	465	532	604	774	998
0,01210	385	469	537	608	780	1007
0,01229	388	472	540	613	787	1015
0,01248	391	476	545	618	793	1022

FIGURA 91

Conducibilità (k) del tensioattivo TTAB in acqua in funzione della molarità (M), a diverse temperature (pallini rosa 50°C, gialli 40°C, viola 30°C, verdi 25°C, arancione 20°C e azzurri 15°C) .

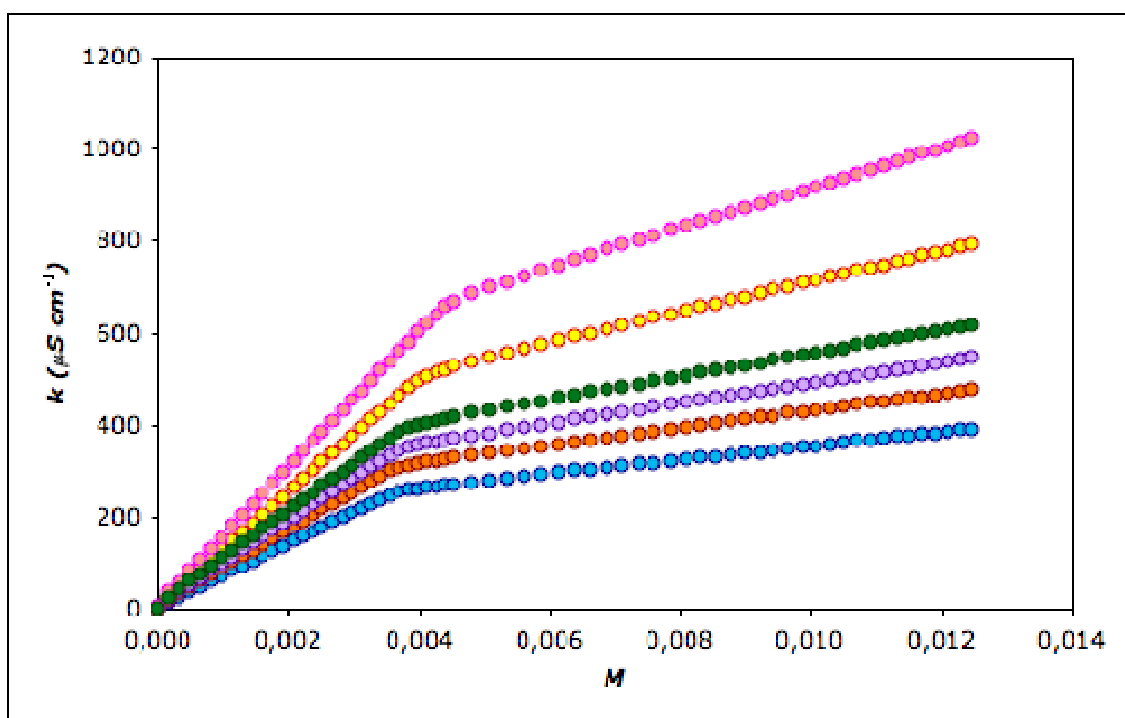


TABELLA 34

Conducibilità (k) del tensioattivo CTAB in acqua in funzione della molarità (M), a diverse temperature.

M (mol l ⁻¹)	k 15°C (μS cm ⁻¹)	k 20°C (μS cm ⁻¹)	k 25°C (μS cm ⁻¹)	k 30°C (μS cm ⁻¹)	k 40°C (μS cm ⁻¹)	k 50°C (μS cm ⁻¹)
0,00000	0,93	1,33	1,32	1,4	1,78	3,04
0,00002	1,88	2,84	2,97	3,26	4,06	5,87
0,00003	2,87	4,31	4,6	5	6,19	10,18
0,00005	3,86	5,83	6,15	6,72	8,31	12,46
0,00006	4,91	7,25	7,66	8,46	10,41	15,14
0,00008	5,89	8,62	9,23	10,19	12,55	17,66
0,00009	6,84	10,08	10,75	11,89	14,58	20,6
0,00011	7,85	11,48	12,26	13,56	16,64	22,9
0,00012	8,82	12,88	13,76	15,21	18,71	25,6
0,00014	9,81	14,25	15,24	16,88	20,8	28,2
0,00015	10,78	15,61	16,7	18,56	22,8	30,8
0,00017	11,79	16,93	18,18	20,2	24,8	33,4
0,00018	12,71	18,33	19,65	21,8	26,9	36,1
0,00020	13,62	19,63	21,2	23,5	28,9	38,6
0,00021	14,56	21	22,5	25,1	30,9	40,9
0,00023	15,47	22,3	24	26,7	32,8	43,8
0,00024	16,47	23,6	25,4	28,4	34,8	46,1
0,00026	17,39	24,9	26,9	29,8	36,7	48,9
0,00027	18,31	26,2	28,2	31,5	38,6	51,4
0,00029	19,21	27,4	29,6	33,1	40,6	54
0,00030	20,1	28,7	31	34,5	42,4	56,5
0,00031	21	29,9	32,4	36,2	44,3	59,1
0,00033	21,9	31,1	33,8	37,7	46,3	61,6
0,00034	22,7	32,4	35,1	39,2	48	64
0,00036	23,6	33,7	36,5	40,8	50	66,5
0,00037	24,5	34,9	37,8	42,3	51,8	69,2
0,00038	25,3	36,2	39,1	43,7	53,6	71,6
0,00040	26,2	37,4	40,5	45,2	55,5	74,3
0,00041	27,1	38,6	41,8	46,8	57,3	76,5
0,00042	28	39,8	43,2	48,2	59,1	79,1
0,00044	28,8	40,9	44,4	49,6	60,8	81,7
0,00046	30,4	43,2	47	52,6	64,4	86,6
0,00049	32	45,5	49,5	55,5	67,9	91,5
0,00051	33,6	47,7	52	58,3	71,4	96,5
0,00054	35,2	49,9	54,5	61,2	74,8	101,9
0,00056	36,8	52	56,9	63,8	78,1	107,6
0,00059	38,4	54,2	59,3	66,5	81,5	112,1
0,00061	40	56,3	61,6	69,2	84,8	116,7
0,00064	41,4	58,4	63,9	71,8	88,1	121,4
0,00066	42,9	60,5	66,3	74,5	91,3	125,8
0,00068	44,4	62,4	68,5	77,1	94,4	130,7

0,00071	45,8	64,5	70,8	79,6	97,6	135,4
0,00073	47,3	66,4	73	82,1	100,7	140,4
0,00075	48,7	68,3	75,2	84,5	103,7	145,8
0,00078	50,1	70,2	77,3	86,9	106,6	150,1
0,00080	51,5	72	79,4	89,2	109,6	154,1
0,00082	52,8	73,7	81,3	91,5	112,4	158,9
0,00084	53,8	75,2	83,3	93,8	115,4	163,2
0,00086	54,7	76,6	85,1	96,1	118	167,2
0,00089	55,3	77,8	86,7	98	120,9	171,8
0,00091	56	78,9	88,1	99,8	123,6	175,1
0,00093	56,6	79,9	89,2	101,5	126,1	178,3
0,00095	57,1	80,7	90,3	102,8	128,5	181,6
0,00097	57,5	81,3	91,2	104,1	130,9	184,7
0,00099	57,9	82	91,9	105,2	133	188,2
0,00101	58,3	82,6	92,7	106,2	135	190,3
0,00103	58,7	83,2	93,4	107,2	136,7	193,3
0,00105	59	83,7	94	108,1	138,4	195,6
0,00107	59,4	84,3	94,7	108,8	139,9	197,4
0,00109	59,7	84,7	95,2	109,5	141,1	199,4
0,00111	60	85,3	95,9	110,2	142,2	200
0,00113	60,3	85,7	96,3	110,9	143,3	201
0,00114	60,6	86,2	96,9	111,4	144,5	203
0,00116	60,9	86,7	97,4	112,2	145,3	204
0,00118	61,3	87,1	98	112,9	146,3	205
0,00120	61,6	87,5	98,5	113,7	147,1	207

FIGURA 92

Conducibilità (k) del tensioattivo CTAB in acqua in funzione della molarità (M), a diverse temperature (quadrantini rosa 50°C, gialli 40°C, viola 30°C, verdi 25°C, arancione 20°C e azzurri 15°C).

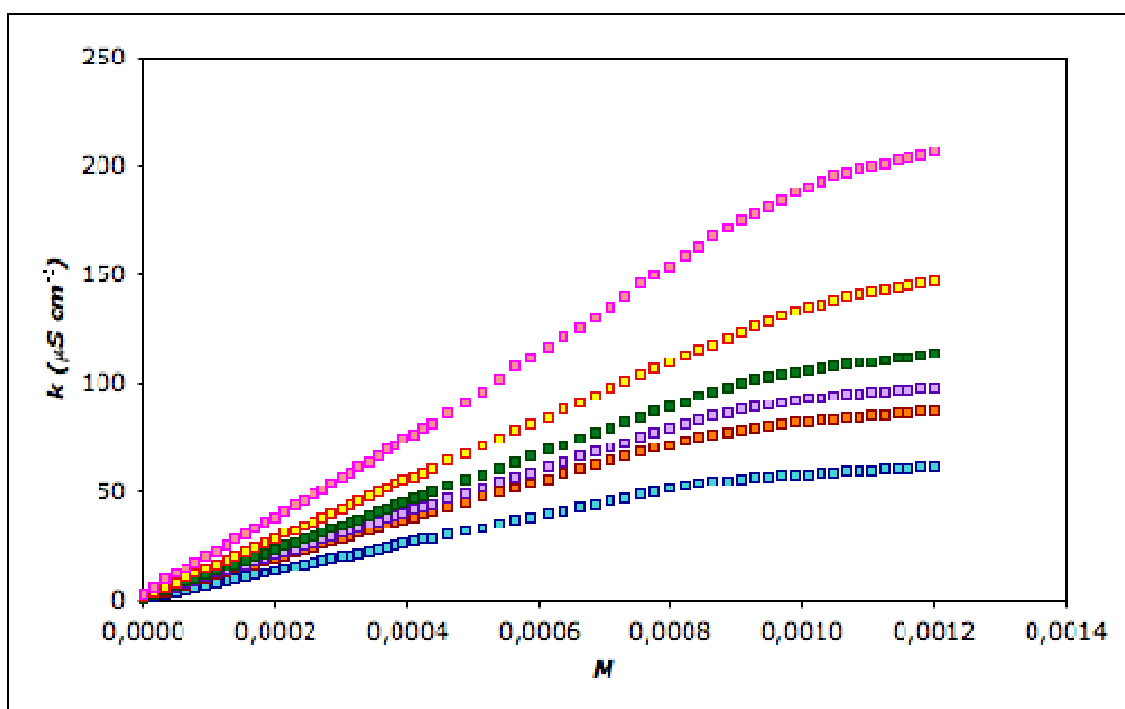


TABELLA 35

Funzioni termodinamiche calcolate per i tensioattivi cationici.

T/K	ΔH_{app}	ΔC_p	ΔG	ΔS_{app}	DeTAB
	$\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\text{J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\text{J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$	
288.16	0.10	-154.57	-6.48	22.85	
293.16	-0.66	-149.35	-6.59	20.24	$\Delta H_0 = 39.71$
298.16	-1.39	-144.38	-6.69	17.75	$\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
303.16	-2.10	-139.66	-6.77	15.39	$n_{w(H)} = -1.83$
308.16	-2.79	-135.16	-6.84	13.14	
313.16	-3.45	-130.88	-6.90	11.00	$\Delta S_0 = 804.30$
318.16	-4.10	-126.80	-6.95	8.96	$\text{J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$
323.16	-4.72	-122.90	-6.99	7.02	$n_{w(S)} = -1.83$
T/K	ΔH_{app}	ΔC_p	ΔG	ΔS_{app}	DTAB
	$\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\text{J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\text{J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$	
288.16	0.89	-219.29	-9.88	37.38	
293.16	-0.19	-211.87	-10.06	33.67	$\Delta H_0 = 57.07$
298.16	-1.23	-204.83	-10.22	30.14	$\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
303.16	-2.24	-198.13	-10.36	26.79	$n_{w(H)} = -2.59$
308.16	-3.21	-191.75	-10.49	23.60	
313.16	-4.16	-185.67	-10.60	20.57	$\Delta S_0 = 1146$
318.16	-5.07	-179.88	-10.69	17.67	$\text{J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$
323.16	-5.96	-174.36	-10.77	14.91	$n_{w(S)} = -2.60$
T/K	ΔH_{app}	ΔC_p	ΔG	ΔS_{app}	TTAB
	$\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\text{J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\text{J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$	
288.16	-0.03	-274.88	-13.43	46.50	
293.16	-1.38	-265.58	-13.65	41.86	$\Delta H_0 = 70.40$
298.16	-2.68	-256.75	-13.85	37.44	$\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
303.16	-3.95	-248.35	-14.02	33.24	$n_{w(H)} = -3.25$
308.16	-5.17	-240.36	-14.18	29.24	
313.16	-6.35	-232.74	-14.32	25.44	$\Delta S_0 = 1436$
318.16	-7.50	-225.48	-14.44	21.81	$\text{J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$
323.16	-8.61	-218.56	-14.54	18.34	$n_{w(S)} = -3.26$
T/K	ΔH_{app}	ΔC_p	ΔG	ΔS_{app}	CTAB
	$\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\text{J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\text{J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$	
288.16	0.48	-374.22	-16.88	60.26	
293.16	-1.36	-361.57	-17.17	53.93	$\Delta H_0 = 96.36$
298.16	-3.14	-349.54	-17.42	47.92	$\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
303.16	-4.86	-338.11	-17.65	42.20	$n_{w(H)} = -4.42$
308.16	-6.52	-327.22	-17.85	36.76	
313.16	-8.13	-316.86	-18.02	31.58	$\Delta S_0 = 1952$
318.16	-9.69	-306.98	-18.16	26.64	$\text{J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$
323.16	-11.20	-297.55	-18.28	21.92	$n_{w(S)} = -4.43$

TABELLA 36

Formazione delle micelle per ogni tipo di tensioattivo: il numero n_w è calcolato dall'entalpia e dall'entropia (*).

Composto	$n_{w(H)}$	$n_{w(S)}$	Ratio	ΔH_0 kJ·mol ⁻¹	ΔS_0 kJ·K ⁻¹ ·mol ⁻¹
DeTAB	-1.83	-1.83	1.00	39.7	0.80
DTAB	-2.59	-2.60	0.99	57.1	1.15
TTAB	-3.25	-3.26	0.99	70.4	1.44
CTAB	-4.42	-4.43	0.99	96.4	1.95
1-HDPB	-4.73			101.1	
SDS	-4.21	-4.16	1.01	106.1	1.88
CAF	-1.26	-1.27	0.99	14.3	0.51
3-nonylBS	-3.80	-3.60	1.06	85.3	1.57
5-decylBS	-3.35	-3.16	1.06	74.3	1.37
2-decylBS	-2.17	-2.18	0.99	44.6	0.91
1-octylBS	-1.29	-1.30	0.99	25.2	0.52
C8H17S	-3.47	-3.48	1.00	78.8	1.47
C10H21S	-3.65	-3.85	0.95	87.2	1.63
C12H25S	-3.99	-4.00	1.00	89.7	1.70
C14H29S	-4.26	-4.27	1.00	94.2	1.82
C12H MV	-5.56	-5.58	1.00	124.5	2.39
C12NMBr	-9.38	-9.41	1.00	207.0	4.01
C14NMBr	-2.45	-2.45	1.00	50.6	1.03
C16NMBr	-1.31	-1.31	1.00	22.9	0.54
C18NMBr	-2.70	-2.70	1.00	62.6	1.18

(*) $n_{w(H)}$ dalla pendenza di $\Delta H = f(T)$ e $n_{w(S)}$ dalla pendenza di $\Delta S = f(\ln T)$

Composto	Nome	Composto	Nome
DeTAB	C ₁₀ N(CH ₃) ₃ Br	DTAB	C ₁₂ N(CH ₃) ₃ Br
TTAB	C ₁₄ N(CH ₃) ₃ Br	CTAB	C ₁₆ N(CH ₃) ₃ Br
1-HDPB	Esadecilpiridinio bromuro	C10H21S	C ₁₀ H ₂₁ -solfonato
SDS	Sodio dodecil solfato	C12H25S	C ₁₂ H ₂₅ -solfonato
CAF	Caffeina (dimero)	C14H29S	C ₁₄ H ₂₉ -solfonato
3-nonylBS	3-nonilbenzensolfonato	C12H MV	(C ₁₂ H ₂₅) ₂ -metilviologeno
5-decylBS	5-decilbenzensolfonato	C12NMBr	C ₁₂ N(CH ₃) ₃ Br
2-decylBS	2-decilbenzensolfonato	C14NMBr	C ₁₄ N(CH ₃) ₃ Br
1-octylBS	1-octilbenzensolfonato	C16NMBr	C ₁₆ N(CH ₃) ₃ Br
C8H17S	C8H17-solfonato	C18NMBr	C ₁₈ N(CH ₃) ₃ Br

DISCUSSIONE

DEDAB

Proprietà Termodinamiche

Solo pochi dati sono stati pubblicati fino a questo momento sulla termodinamica della formazione di micelle per il DEDAB [216, 526, 538-543], derivanti soprattutto da misure di conducibilità specifica. Per quello che sappiamo, non sono disponibili misure dirette dei parametri termodinamici per il sistema DEDAB-acqua, mentre la conducibilità specifica è stata misurata in funzione della temperatura in un range tra 15-40°C [216, 538-541].

Sono stati così ottenuti la cmc e il grado di ionizzazione delle micelle, a partire dai quali, applicando un modello di azione di massa, sono state valutate le funzioni termodinamiche di micellizzazione.

Il *trend* della cmc in funzione della temperatura mostra il tipico andamento a forma di U dei processi idrofobici, con un minimo attorno alla temperatura ambiente [538]. A 298 K la cmc risulta essere 0.0140(4) mol kg⁻¹ e β , il grado di legame del controione, 0.072(2) [216, 541, 543] e a 313 K i valori della cmc e di β sono rispettivamente 0.0151 mol kg⁻¹ e 0.68, molto vicini a quelli accettati per il DTAB [544]. Questa piccola diminuzione nella cmc tra DEDAB e DTAB riflette l'aumento globale di idrofobicità della molecola.

Entalpie molari apparenti e parziali e capacità termiche

Il DEDAB è considerato nel rif. [529] come un tensioattivo asimmetrico a doppia catena con una seconda catena alchilica molto corta. Si vede come in questo caso l'energia libera di trasferimento dall'acqua alla micella per unità metilenica è significativamente piccola per tensioattivi asimmetrici a doppia catena con una catena alchilica più corta. In generale, per tensioattivi ionici le curve della entalpie molari apparenti e parziali in funzione della concentrazione, tendono a diventare orizzontali a concentrazioni sopra la cmc, dove sono quasi parallele.

Il confronto tra gli andamenti del DEDAB e del DTAB a 298 K (Fig. 45) mostra che, nonostante il più alto numero totale di atomi di carbonio, le curve del DEDAB giacciono al di sopra di quelle del DTAB. È possibile valutare il contributo di gruppo al valore di plateau del metilene quando viene aggiunto alla testa polare. Esso risulta essere circa +1.6 kJ mol⁻¹ gruppo⁻¹ per L_φ e di circa +1.75 kJ mol⁻¹ gruppo⁻¹ per L₂

L'effetto è molto simile a quello ottenuto accorciando la catena alchilica di un gruppo metilenico [525, 545]. La seconda catena, molto corta, presente sull'azoto che porta la carica positiva, permette sia una migliore delocalizzazione della carica, che un aumento nelle dimensioni della testa polare. In questo modo, le cariche sono maggiormente separate dalla superficie del DEDAB rispetto a quelle del DTAB. Questo è confermato dal valore del grado di legame del controione, più basso per il DEDAB rispetto al DTAB. In un lavoro precedente sono stati confrontati differenti tensioattivi dodecilici aventi lo stesso controione con lo scopo di razionalizzare l'effetto della testa polare sulle proprietà termodinamiche delle loro soluzioni [542]. Questo ha permesso di stabilire una sorta di scala termodinamica di delocalizzazione della carica per la testa polare. Più la carica è delocalizzata, più il comportamento è simile a quello di tensioattivi non ionici. L'abbassamento del valore di plateau delle curve delle entalpie molari apparenti e parziali in funzione della molalità in serie omologhe di tensioattivi è legata all'aumento di idrofobicità della catena alchilica e alla dimensione delle micelle. Invece, per la stessa catena alchilica e lo stesso controione il valore del plateau è strettamente correlato alla modulazione della densità di carica dovuta a effetti di risonanza e induttivi. Questi non giocano un ruolo importante per il valore della cmc (es. nell'energia libera di formazione delle micelle) - la cmc del DEDAB infatti è solo poco più bassa di quella del DTAB - nonostante influenzino fortemente le entalpie della soluzione e, di conseguenza, le entropie.

Gli andamenti delle entalpie molari apparenti e parziali in funzione della molalità (Fig. 44), sono molto sensibili alla temperatura e, come accade generalmente nei processi che coinvolgono l'effetto idrofobico, essi diminuiscono nella regione micellare con l'aumento della temperatura [546] (si veda la discussione sui processi di idratazione idrofoba).

Essendo, in generale, l'abbassamento delle curve entalpiche al di sotto della cmc abbastanza proporzionale alla temperatura, si può assumere che le capacità termiche siano costanti nel range di temperatura esaminato. Gli andamenti delle capacità termiche molari apparenti, sono stati ottenuti facendo la media dei rapporti $\Delta L_\phi/\Delta T$ a ogni concentrazione. In Fig. 46 la quantità $(C_{p,\phi} - C_{p,2}^\circ)$, dove $C_{p,2}^\circ$ è il valore di diluizione infinita in funzione di m , è riportata per il DEDAB e confrontata con quella del DTAB, dal rif. [537]. Gli andamenti sono ben paragonabili e quindi possiamo assumere che un gruppo metilenico alla testa polare ha un effetto minore sulle capacità termiche molari apparenti delle soluzioni.

Volumi e compressibilità

In Fig. 47 e 48 sono riportati gli andamenti dei volumi molari apparenti e delle compressibilità adiabatiche molari apparenti per il DEDAB e confrontate con quelle del DTAB [530]. I volumi del DEDAB sono più grandi di quelli del DTAB di circa $15 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$, sia a diluizione infinita che nella fase micellare, un valore in accordo con quello del gruppo metilenico nella catena alchilica [525]. Non è invece rilevabile dall'andamento dei volumi e delle compressibilità una transizione di fase in soluzione. Le compressibilità molari apparenti del DEDAB e del DTAB sono sovrapponibili (Fig. 48), indicando che l'addizione di un metilene alla testa polare non influenza la compressibilità del tensioattivo nella soluzione micellare.

La compressibilità totale di una soluzione dipende sia dalla compressibilità intrinseca del soluto che dalla compressibilità del solvente. È stato proposto che a diluizione infinita la compressibilità intrinseca dei sali di ammonio quaternario dia un contributo minore rispetto al cambiamento nella compressibilità dell'acqua, dovuto all'elettrostrizione e alla formazione di un guscio a più alta densità di acqua strutturata attorno alla catena alchilica (si veda la discussione sui processi di idratazione idrofoba). Quando si formano le micelle, la compressibilità della soluzione aumenta, soprattutto a causa della distruzione della cavità ospitante la porzione polare dei tensioattivi e allo spazio vuoto nella parte più interna delle micelle, mentre è stato dimostrato che le micelle rimangono idratate a livello dei due gruppi $-\text{CH}_2-$ nel caso del DTAC. Questo significa che un metilene, quando viene addizionato all'azoto quaternario del DEDAB, non modifica significativamente il suo stato di idratazione quando si formano le micelle, quindi il suo effetto sulla compressibilità totale della soluzione è trascurabile. Questo ci permette di spiegare perché le compressibilità molari apparenti del DEDAB e del DTAB abbiano lo stesso andamento. Al contrario, quando il $-\text{CH}_2-$ è addizionato alla catena idrofobica, il suo contributo di gruppo alla compressibilità molare è negativo ($-1.9 \times 10^{-4} \text{ cm}^3 \text{ bar}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ nel rif. [547], $-1.6 \times 10^{-4} \text{ cm}^3 \text{ bar}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ nel rif [548]) alla diluizione infinita. In fase micellare, il contributo del $-\text{CH}_2-$ diventa positivo: un valore di $1.5 \times 10^{-3} \text{ cm}^3 \text{ bar}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ è riportato nel riferimento [530] per il cambiamento nella compressibilità molare adiabatica alla micellizzazione per gli alchiltrimetilammonio bromuri.

Come si vede in Fig. 46, gli andamenti delle capacità termiche molari apparenti vs m sono le stesse: infatti, anch'esse sono in relazione al numero di molecole d'acqua coinvolte nei processi idrofobici in soluzione [549], e sono poco influenzate dalla

sostituzione di un gruppo metile con un etile sulla testa polare (si veda la discussione sui processi di idratazione idrofoba). Quindi, per riassumere, possiamo dire che questa sostituzione influenza le proprietà che sono derivate prime dell'energia libera, mentre non lo fa nel caso delle derivate seconde.

Cambiamento delle proprietà termodinamiche alla micellizzazione

Le variazioni nelle proprietà termodinamiche del DEDAB, riportate in letteratura, in seguito alla formazione di micelle, sono poche e contraddittorie. Il comportamento termodinamico del DEDAB è stato studiato da Metha [532] misurando la cmc in funzione della temperatura attraverso misure di conducibilità. I parametri termodinamici per la formazione delle micelle sono stati stimati applicando il modello di separazione di pseudo-fase carica ed ottenendo così un valore positivo di $\Delta H_m (+ 0.14 \text{ kJ mol}^{-1})$ a 298 K, cosicché la formazione delle micelle, a questa temperatura, è guidata dall'entropia. Gli stessi esperimenti sono stati fatti da Galàn [528], il quale ha trovato che il processo di micellizzazione è esotermico nell'intero range di temperature studiato. L'andamento a forma di U nel grafico cmc vs T suggerisce, al contrario, la presenza di un minimo nella curva di $\Delta G_m/T$ vs $1/T$: questo significa che nel range di temperature studiato deve esistere una temperatura alla quale ΔH_m scompare.

Abbiamo cercato di ricalcolare i parametri termodinamici per la formazione delle micelle (eq. 16-19) dai valori delle cmc e di α (il grado di dissociazione del controione) ottenuto dai grafici in fig. 2 del rif. [538], sia prendendo in considerazione il grado di legame del controione (eq.16), sia senza considerarlo (eq.17):

$$\Delta G_m = (1 + \beta) R T \ln \text{cmc} \quad (16)$$

$$\Delta G_m = R T \ln \text{cmc} \quad (17)$$

$$\Delta H_m = [\partial (\Delta G_m / T) / \partial (1 / T)]_p \quad (18)$$

$$\Delta S_m = (\Delta G_m - \Delta H_m) / T \quad (19)$$

Dall'applicazione del modello di transizione di pseudofase per ottenere la variazione di entalpia alla micellizzazione [524-528, 545], risulta che $\Delta H_m = -2.1 \text{ kJ mol}^{-1}$ a 298K e $\Delta H_m = -8.2 \text{ kJ mol}^{-1}$ a 313K. Il valore alla temperatura ambiente è in buon accordo con quello ottenuto dai dati nel rif. [538] a partire dall'eq 17.

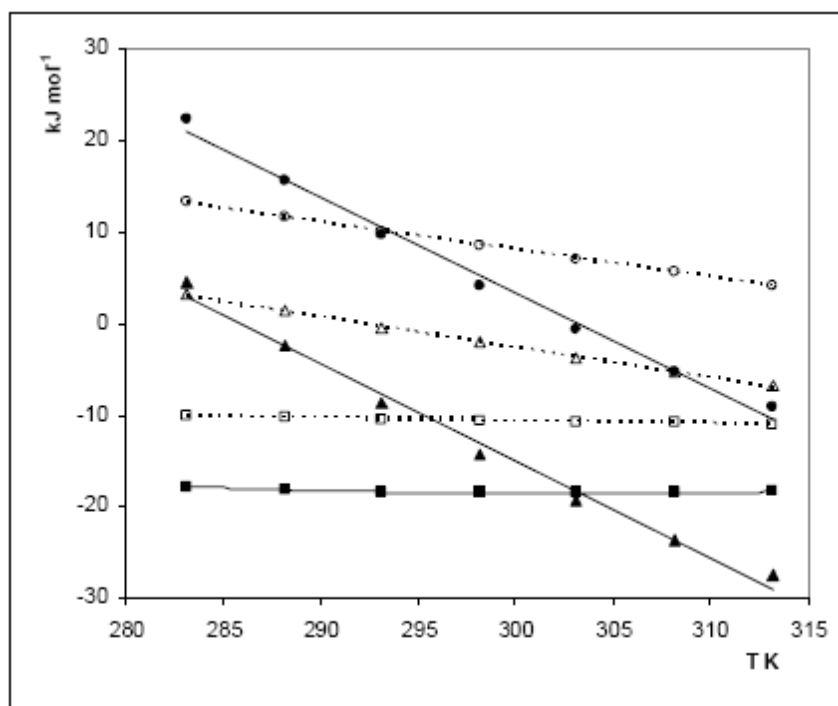


Fig. 93. Cambiamenti nell'energia libera, ΔG_m (quadrati), entalpia ΔH_m (triangoli) e entropia ΔS_m (pallini), alla formazione delle micelle per il DEDAB, ottenuti a partire dalla dipendenza delle cmc della T (dati provenienti da misure di conducibilità nel rif.[538]) con le eq. 16-19. I simboli pieni sono i valori ottenuti dall'eq. 11, i simboli vuoti dall'eq. 17.

La capacità termica di micellizzazione, $\Delta C_{p,m}$ risulta essere $-426 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$, un po' più piccola, in valore assoluto, di quella riportata nel rif. [550] per il DEDAB ($-471 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$, partendo dall'eq 17) e nel rif. [537] ($-500 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) per il DTAB, ma un po' più grande di quella ottenuta dalla dipendenza lineare di ΔH_m dalla T a partire dai dati in Fig. 93 ($-334 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$). È anche interessante confrontare il cambiamento di entalpia alla micellizzazione per il DEDAB e il DTAB. Sorprendentemente, considerando che il DTAB è uno dei tensioattivi cationici più popolari, in letteratura ci sono dati abbastanza contrastanti, i valori si aggirano tra -8 [544] e -1.5 kJ mol^{-1} [549] a 298 K. Moulik [551] ha determinato le proprietà delle soluzioni di alcuni tensioattivi cationici, incluso il DTAB, ottenendo $-1.77 \text{ kJ mol}^{-1}$ a 303 K, un valore recentemente fissato nel rif. [524]. A partire dalla dipendenza dei parametri micellari dalla temperatura, riportata nell'articolo di Mata [552], si può ottenere un valore di -2.7 kJ mol^{-1} a 298 K (ma con un valore assoluto poco attendibile di $\Delta C_{p,m}$), mentre un valore di $-2.18 \text{ kJ mol}^{-1}$ è stato proposto a partire dai dati calorimetrici nel rif. [549].

Il valore nel rif. [549] è stato ottenuto dai dati mostrati in Fig. 2 dello stesso riferimento e, a nostro avviso, è sottostimato. Se adottiamo lo stesso criterio utilizzato

per il DEDAB, si ottiene $\Delta H_m = -2.3 \text{ kJ mol}^{-1}$. In questo modo possiamo valutare il contributo del gruppo $-\text{CH}_2-$, quando viene addizionato alla testa polare degli alchiltrimetilammonio bromuri, che è di $+0.5 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ gruppo}^{-1}$ a 298 K, circa la metà dell'effetto dovuto alla rimozione dello stesso gruppo dalla catena alchilica [525, 549].

Le proprietà volumetriche, come i volumi e le compressibilità, riflettono l'interazione soluto-solvente. I loro cambiamenti alla micellizzazione sono primariamente dovuti al cambiamento di struttura delle molecole d'acqua coinvolte nell'effetto idrofobico [552] e ai cambiamenti nell'elettrostrizione della testa polare e del controione (si veda la discussione sui processi di idratazione idrofoba). Un notevole cambiamento di queste interazioni avviene quando inizia la formazione delle micelle. Con lo scopo di estrarre i parametri di micellizzazione, i volumi molari apparenti e le compressibilità in funzione di m sono stati analizzati assumendo un modello di transizione di pseudofase [524, 551], descritto nella sezione di "Elaborazione dei Dati". Nella Tab. 37 sono riportati i valori così ottenuti, insieme con i valori di $X_{\phi, \text{cmc}}$, cioè il valore alla cmc, calcolato a partire dall'eq. 8. Il buon accordo tra i dati sperimentali e quelli calcolati è mostrato in Fig 47 e 48, nelle quali la linea continua rappresenta la funzione calcolata. Il valore di $K_{S, \phi, \text{cmc}}$, cioè la compressibilità alla cmc, ottenuta dall'eq. 8 è negativa come atteso. I cambiamenti nel volume e nella compressibilità alla micellizzazione sono gli stessi sia per il DEDAB che per il DTAB, e ciò conferma che l'addizione di un gruppo $-\text{CH}_2-$ alla testa polare non influenza molto la sfera di idratazione della molecola sia come monomero che nelle micelle.

Lo studio di questo tensioattivo è presentato nella pubblicazione:

Fisicaro, Emilia; Biemmi, Mariano; Compari, Carlotta; Duce, Elenia; Peroni, Monica. *Thermodynamics of aqueous solutions of dodecyldimethylethylammonium bromide*, Journal of Colloid and Interface Science (2007), 305(2), 301-307.

TENSIOATTIVI GLUCOCATIONICI ACETILATI

Proprietà Termodinamiche

In letteratura sono riportati pochi composti che abbiano attività superficiale e contengano nella stessa molecola le porzioni cationica e glicosilica unite con legami covalenti [553-556]. Lattes e collaboratori [557-559] hanno sintetizzato e studiato composti gluco-cationici aventi diversi centri chirali e, in linea di principio, minore tossicità. Comunque, le strutture che essi hanno preparato differiscono da quelle qui riportate in quanto appartengono alla classe più ampia dei tensioattivi catanionici, ottenuti da due componenti, il primo dotato di una parte acida e l'altro di una parte basica, in rapporto 1:1. I sali così ottenuti hanno mostrato proprietà insolite e talvolta un'elevata attività biologica.

Sono state analizzate le proprietà termodinamiche delle soluzioni acquose di C_8AGCB , $C_{12}AGCB$ e $C_{16}AGCB$ per cercare di comprendere e quantificare il ruolo della porzione glicosilica acetilata nel processo di micellizzazione.

Di solito, il primo stadio nella caratterizzazione chimico-fisica di nuovi tensioattivi è la determinazione della cmc: la conoscenza di questo dato è fondamentale sia nella progettazione delle esperienze, sia nell'interpretazione dei risultati.

I valori della cmc sono riportati nel rif [560], e in Tab. 37, in cui sono state sottolineate le differenze dai valori di cmc ottenuti sia attraverso misure di conducibilità che di tensione superficiale in funzione della concentrazione. Questo comportamento è stato spiegato ipotizzando la formazione di piccoli aggregati micellari, non attivi a livello di superficie ma con una maggiore mobilità ionica rispetto al monomero, prima della vera e propria formazione delle micelle. Questo rende ragione del fatto che i valori della cmc da misure di tensione superficiale sono sempre più bassi di quelli da misure di conducibilità.

La cmc è stata valutata anche attraverso un metodo termodinamico assumendo come valore di cmc l'ascissa del primo punto di flesso delle curve di L_ϕ vs. m . Nella Tab. 37 sono riportati i valori di cmc ottenuti con i diversi metodi, insieme a quelli ottenuti con metodi termodinamici, in particolare a partire dalle entalpie: quest'ultimi (escluso il caso del C_8AGCB) sono compresi tra i valori ottenuti per via conduttimetrica e quelli ottenuti per via tensiometrica. Se la tensione superficiale è riferita ad una proprietà di superficie e la conducibilità misura una proprietà di bulk, la termodinamica risente di entrambi gli effetti.

In ogni caso, i valori di cmc suggeriscono che la sostituzione di un gruppo metilico con un gruppo ingombrante (2, 3, 4, 6-tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosil)etile aumenta l'idrofobicità del composto e, come conseguenza, abbassa il valore di cmc: per esempio la cmc di C₁₂AGCB è circa un terzo di quella del DTAB. I logaritmi delle cmc termodinamiche sono linearmente correlati con il numero di atomi di carbonio.

Entalpie molari apparenti e parziali

In Fig. 94 sono confrontati gli andamenti delle entalpie molari apparenti in funzione della molalità per le differenti lunghezze della catena alchilica esaminate.

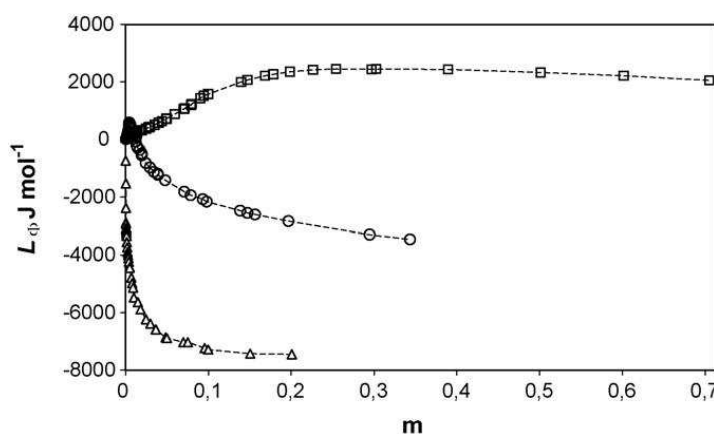


Fig. 94. Entalpie molari apparenti dei tensioattivi C₈AGCB (quadrati), C₁₂AGCB (cerchi) e C₁₆AGCB (triangoli) in funzione della molalità.

L'andamento generale delle curve delle entalpie molari apparenti e parziali in funzione della concentrazione è in accordo con quanto atteso per tensioattivi ionici: le curve, dopo la crescita nella regione premicellare, tendono a raggiungere un valore costante a concentrazioni molto superiori alla cmc, diventando pressoché parallele. Come ci si attende, l'abbassamento delle curve nella regione premicellare è proporzionale al numero di atomi di carbonio nella catena alchilica. Per il composto C₁₆AGCB, il valore molto basso della cmc non consente accurate misure dei calori di diluizione nella regione premicellare: l'andamento generale delle curve delle entalpie molari apparenti e parziali sopra la cmc non è influenzato, anche se le curve potrebbero essere spostate di una piccola quantità nei loro valori assoluti, rispetto allo stato di riferimento a diluizione infinita. I valori di plateau di C₈AGCB e C₁₂AGCB differiscono

di 5.7 kJ mol^{-1} , mentre quelli di C_{16}AGCB differiscono da quelli di C_{12}AGCB di 4.87 kJ mol^{-1} : è così possibile estrarre un valore medio di contributo di gruppo per il $-\text{CH}_2-$ nella regione postmicellare: esso risulta -1.3 kJ mol^{-1} . Questo valore è un po' più basso di quello ottenuto nel caso di altri tensioattivi, sia cationici che anionici [545].

E' molto interessante valutare l'effetto della parte glicosilica acetilata, legata alla testa polare, sulla termodinamica delle soluzioni, confrontando l'andamento del composto dodecilico in studio con quello del DTAB (dodeciltrimetilammonio bromuro) [536] e del DEDAB (dodeciletildimetilammonio bromuro) [545]. Il confronto degli andamenti delle entalpie molari apparenti di questi tre composti dodecilici sopra menzionati è riportato in Fig. 96.

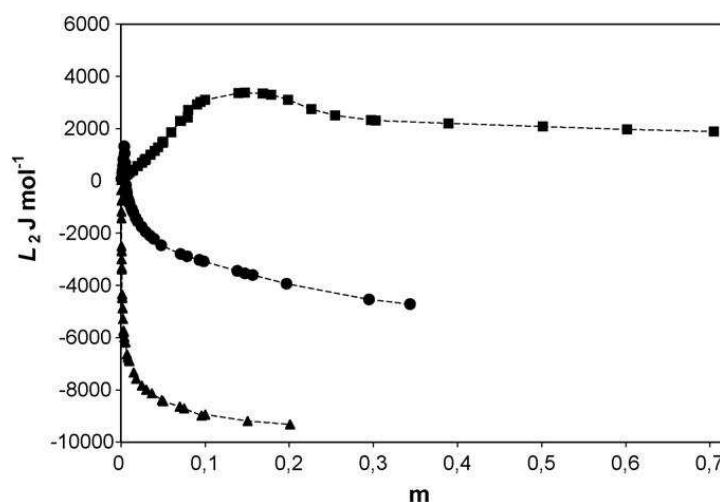


Fig. 95. Entalpie molari parziali dei tensioattivi C_8AGCB (quadrati), C_{12}AGCB (cerchi) e C_{16}AGCB (triangoli) in funzione della molalità.

L'effetto della sostituzione di un gruppo metilico legato all'azoto carico positivamente da parte di un gruppo (2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosil)etilico comporta una modesta diminuzione (circa -0.5 kJ mol^{-1}) nel valore di plateau, a conferma del piccolo incremento nell'idrofobicità totale della molecola. Questo comportamento, come suggerito dal confronto col DEDAB, sembra dovuto al risultato di due differenti contributi. Infatti, la sostituzione di un gruppo metilico legato all'azoto carico positivamente con un gruppo etilico come nel caso di DEDAB e DTAB (Fig. 96), dà luogo ad un aumento nella regione di plateau di circa 1.6 kJ mol^{-1} , simile a quanto ottenuto dalla rimozione di un gruppo metilenico nella coda idrofobica.

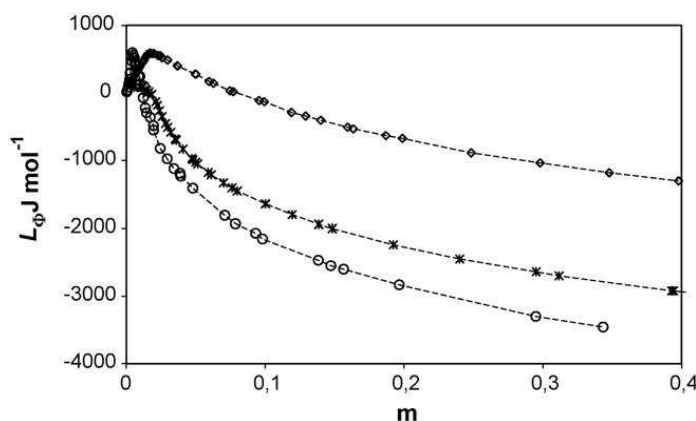


Fig. 96. Entalpie molari apparenti del C₁₂AGCB (cerchi), del DEDAB (rombi) e del DTAB (asterischi), in funzione della molarità.

Quindi l'effetto totale del gruppo 2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosil è di abbassare il valore di plateau di -2.2 kJ mol^{-1} . Questo significa che l'effetto dello zucchero acetilato come sostituito è quello di ridurre in modo rilevante il bilancio idrofilo/lipofilo della molecola, probabilmente perché questo gruppo è in grado di schermare la carica positiva sull'azoto quaternario, a causa della presenza di un numero notevole di atomi di ossigeno.

Dall'applicazione del modello di transizione di pseudofase (descritto nella sezione di "Elaborazione dei Dati") per ottenere la variazione di entalpia alla micellizzazione [561-564] si sono ottenute le entalpie riportate nella Tab. 37. Esse sono linearmente correlate con il numero di atomi di carbonio nella catena alchilica. È anche possibile estrarre il contributo di gruppo per il metilene: si ottiene un valore di -1.3 kJ mol^{-1} per gruppo, valore comparabile con quello ottenuto nel caso dei tensioattivi anionici potassio 3-((alchilcarbonil)amino)-4-idrossibenzoati (-1.4 kJ mol^{-1} per gruppo), 4-((alchilcarbonil)amino)-benzoati ($-1.33 \text{ kJ mol}^{-1}$ per gruppo) [565] e i sali di potassio degli acidi p-n-alchilbenzoici [566], ma più elevato del contributo medio ottenuto nel caso di altri tensioattivi cationici (-1.1 kJ mol^{-1} per gruppo) [545].

Volumi e compressibilità

Le proprietà volumetriche, come i volumi e le compressibilità, riflettono le interazioni soluto-solvente: una grande variazione in queste interazioni avviene quando inizia la formazione delle micelle. Come è stato detto nella sezione dei metodi, i volumi molari apparenti sono ottenuti misurando con l'accuratezza più alta la frequenza di

oscillazione di un tubo ad U riempito con la soluzione di concentrazione nota. Un elevato grado di accuratezza è richiesto in particolare quando si misurano soluzioni diluite, ad esempio nella regione premicellare. Per i composti in studio abbiamo incontrato molte difficoltà nell'ottenere dati riproducibili che si conformino ai nostri standard sperimentali. Ipotizziamo che questo sia dovuto all'elevata tendenza di questa classe di tensioattivi ad adsorbirsi sulla superficie del vetro. I dati sono stati ottenuti da soluzioni preparate di fresco per pesata (evitando di diluire una soluzione precedente) e dopo aver lavato accuratamente il tubo ad U, fino all'ottenimento del valore corretto di densità dell'acqua bidistillata e degasata. Inoltre, il valore molto basso della cmc del C₁₆AGCB non consente indagini nella regione premicellare o in nessun punto vicino alla cmc.

Anche nel caso delle proprietà volumetriche, al fine di estrarre dagli andamenti i parametri di micellizzazione, si è utilizzata l'equazione 7 ricavata da un modello di transizione di pseudofase [517, 524, 536, 551, 567]. In Tab. 37 sono riportati i valori così ottenuti.

I valori alla cmc, $X_{\phi,cmc}$, possono essere ottenuti dai dati in tabella utilizzando l'equazione 8.

Nella Fig. 97 sono confrontati gli andamenti dei volumi molari apparenti in funzione della concentrazione per i tensioattivi in studio.

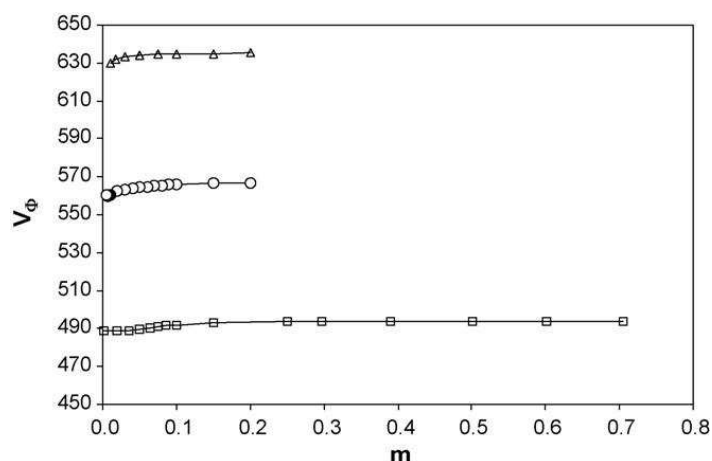


Fig. 97. Volumi molari apparenti del C₈AGCB (quadrati), del C₁₂AGCB (cerchi) e C₁₆AGCB (triangoli), in funzione della molalità.

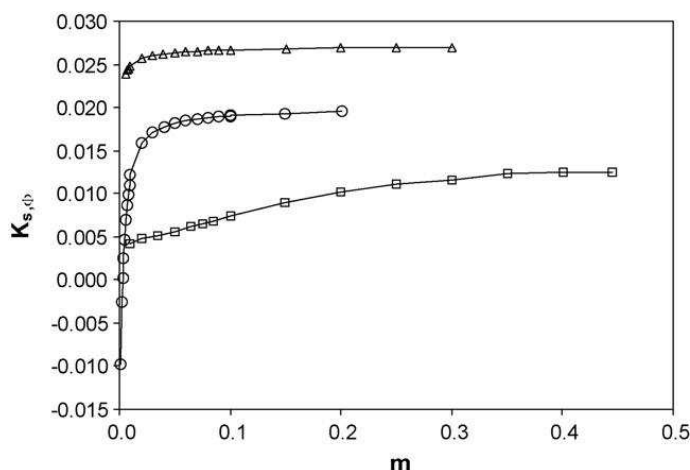


Fig. 98. Compressibilità molari apparenti del C₈AGCB (quadrati), del C₁₂AGCB (cerchi) e C₁₆AGCB (triangoli), in funzione della molalità.

Non è consentita una valutazione molto precisa dei cambiamenti delle proprietà volumetriche alla micellizzazione a causa delle difficoltà descritte sopra, sia nel misurare accuratamente i volumi e le compressibilità a basse concentrazioni che nel determinare i valori di cmc. I dati riportati in Tab. 37 necessitano quindi di qualche commento.

I valori dei volumi molari apparenti in fase micellare ($V_{\phi,m}$) differiscono di circa $17 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ per gruppo $-\text{CH}_2-$. Il contributo del $-\text{CH}_2-$ ottenuto nella regione micellare è confrontabile con quello ottenuto per tensioattivi cationici tipo piridinico o nicotinamidico [568] e indipendente dal grande ingombro sterico sulla testa polare. Utilizzando la cmc termodinamica nella Tab. 37, dalle equazioni 7 e 8 sono stati determinati per C₈AGCB il valore dei volumi apparenti alla cmc, $V_{\phi,cmc}$ ($489.2 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$) e la variazione di volume alla micellizzazione, ΔV_m ($5.2 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$), un valore accettabile per un tensioattivo con una corta catena. Per C₁₂AGCB, si può ottenere dallo stesso modello, assumendo che la cmc sia simile a quella del DEDAB e del DTAB, una variazione di volume alla micellizzazione di $7.2 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$. Questo valore è in accordo con l'andamento di V_ϕ vs m e con il valore che possiamo ottenere applicando il contributo di gruppo per il metilene, riportato per gli alchiltrimetilammonio bromuri nel ref. [525] ($0.5 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ gruppo}^{-1}$). Assumendo lo stesso contributo di gruppo, è possibile valutare per C₁₆AGCB un $\Delta V_m = 9.2 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ e, sottraendo questo valore a $V_{\phi,m}$, si trova $V_{\phi,cmc} = 626.0 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$.

In Tab. 37 sono riportati anche i parametri di compressibilità ricavati dalle equazioni 7 e 8 per C₈AGCB e C₁₂AGCB. Bisogna osservare che i valori calcolati e quelli sperimentali ricavati dall'equazione 7 non si accordano per C₈AGCB nella regione prima del valore di plateau, probabilmente a causa dell'ampio range di concentrazioni in cui avviene la transizione micellare per i tensioattivi a corta catena, per i quali è forse più appropriato un modello ad azione di massa. La K_{s,cmc} di C₁₆AGCB è stata valutata utilizzando il contributo di gruppo ottenuto confrontando C₈AGCB e C₁₂AGCB, mentre ΔK_{s,m} è stata valutata dalla differenza tra K_{s,m} (sperimentale) e K_{s,cmc}. I valori di K_{s,m} e ΔK_{s,m} ottenuti in questo modo, si correlano bene con il numero di atomi di carbonio nella catena alchilica (Fig. 98) e il contributo di gruppo risulta essere di 1.3·10⁻³ cm³ bar⁻¹ mol⁻¹ -CH₂-⁻¹ nella fase micellare, e di 1.9·10⁻³ cm³ bar⁻¹ mol⁻¹ -CH₂-⁻¹ per la variazione della compressibilità molare adiabatica alla micellizzazione, un valore più grande di 1.5·10⁻³ cm³ bar⁻¹ mol⁻¹, riportato nel riferimento [569] per gli alchiltrimetilammonio bromuri. Infatti, in seguito alla formazione delle micelle, si ha una maggiore variazione di volume per effetto della pressione a causa della rottura della cavità rigida in cui è alloggiata la parte idrofobica della molecola e della riduzione dell'elettrostrizione dovuta al legame dei controioni alla micella.

Confrontando i volumi di C₁₂AGCB con quelli del DEDAB e del DTAB è possibile ricavare il volume del gruppo (2, 3, 4, 6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)etile. La sostituzione di un metile con questo gruppo ingombrante porta ad un aumento nel volume della molecola di 272 cm³ mol⁻¹, sia come monomero che in fase micellare. Utilizzando il volume del gruppo metilico che presente nel rif. [187] (19.06 cm³ mol⁻¹), il volume dell'intero sostituito risulta di 291 cm³ mol⁻¹. Dal confronto con il DEDAB si ricava che la sostituzione di un idrogeno da parte del gruppo 2, 3, 4, 6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosilico provoca un aumento nel volume di 257 cm³ mol⁻¹.

Lo studio di questi tensioattivi è presentato nella pubblicazione:
Fisicaro, Emilia; Biemmi, Mariano; Compari, Carlotta; Duce, Elenia; Peroni, Monica; Viscardi, Guido; Quagliotto, Pierluigi. *Thermodynamic properties of aqueous micellar solutions of some new acetylated gluco-cationic surfactants*, Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects (2007), 301(1-3), 129-136.

TENSIOATTIVI GLUCOCATIONICI DISACETILATI

Proprietà Termodinamiche

Lo studio delle proprietà termodinamiche delle soluzioni acquose dei tensioattivi glucocationici $C_{12}DGCB$ e $C_{16}DGCB$, mai riportate in letteratura, e il loro confronto con i dati ottenuti dai corrispondenti composti acetilati $C_{12}AGCB$ e $C_{16}AGCB$ ha permesso di valutare il contributo dato dall'acetilazione dei gruppi ossidrilici della porzione glucosilica al processo di micellizzazione [563, 564, 570].

La cmc di questi tensioattivi, riportata in Tab. 37, è stata ottenuta da misure di conducibilità [560].

Entalpie molari apparenti e parziali

In Fig. 99, sono confrontate le curve delle entalpie molari apparenti e parziali vs. m a 298 K per le diverse lunghezze della catena. L'andamento complessivo di queste curve è in accordo con i comportamenti dei tensioattivi ionici: le curve, dopo la crescita nella regione premicellare, si appiattiscono a concentrazioni superiori alla cmc, dove diventano sostanzialmente parallele. Come ci si aspetta, l'abbassamento delle curve nella regione micellare è proporzionale al numero di atomi di carbonio della catena alchilica.

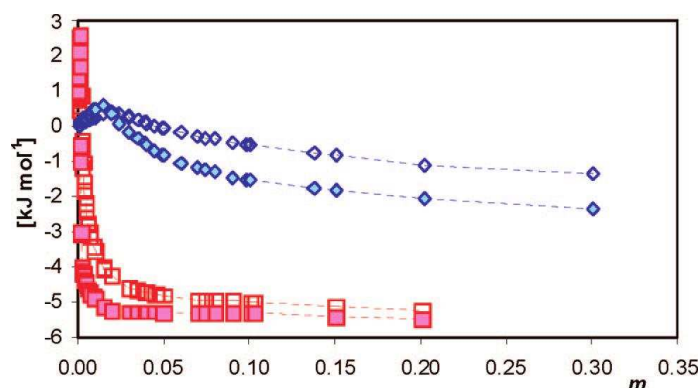


Fig. 99. Entalpie molari apparenti (simboli vuoti) e parziali (simboli pieni) di $C_{12}DGCB$ (rombi blu) e $C_{16}DGCB$ (quadrati rossi) in funzione della molalità.

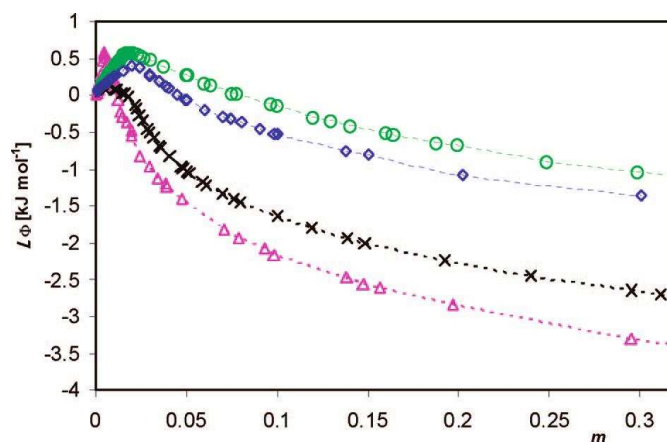


Fig. 100. Entalpie molari apparenti di C₁₂DGCB (rombi blu), C₁₂AGCB, (triangoli rosa), DEDAB (cerchi verdi), e DTAB (asterichi) in funzione della molalità.

Gli andamenti delle entalpie molari apparenti e parziali in funzione di m , quando confrontati con quelli di DTAB (dodeciltrimetilammonio bromuro) [564] e DEDAB (dodecildimetiletilammonio bromuro) [536] (Fig. 100), suggeriscono che sostituire un gruppo metilico con un gruppo ingombrante (2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosil)etilico aumenta l'idrofobicità del composto e, di conseguenza, abbassa il valore della cmc. Al contrario, il gruppo disacetilato (β -D-glucopiranosil)etilico abbassa l'idrofobicità portandola ad un livello simile a quella del DEDAB. L'effetto della sostituzione del gruppo metilico legato all'azoto del DTAB carico positivamente da parte di un gruppo (β -D-glucopiranosil)etilico fa aumentare di circa 1.3 kJ mol^{-1} il valore di plateau delle entalpie molari apparenti in funzione di m , confermando così la diminuzione nell'idrofobicità complessiva della molecola. Questo comportamento, come emerge dal confronto con il DTAB e il DEDAB, sembra essere il risultato di due contributi distinti. La sostituzione di un metile legato all'azoto con un'etile, come avviene nel passaggio da DTAB a DEDAB, genera (si veda Fig. 100) un aumento nella regione di plateau di circa 1.6 kJ mol^{-1} , come nel caso della rimozione di un metilene dalla catena idrofobica. Quindi, l'effetto globale del gruppo β -D-glucopiranosilico è di abbassare il plateau di -0.3 kJ mol^{-1} . Precedentemente abbiamo valutato [570] che l'effetto totale del 2, 3, 4, 6-tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosile è di abbassare il plateau di -2.2 kJ mol^{-1} : siamo quindi risaliti all'effetto dell'acetilazione dei quattro gruppi OH sulla porzione zuccherina, che è di -1.9 kJ mol^{-1} . In Fig. 101 è rappresentato questo

effetto. In questa figura è descritto l'effetto dell'acetilazione sulle entalpie molari apparenti in funzione di m .

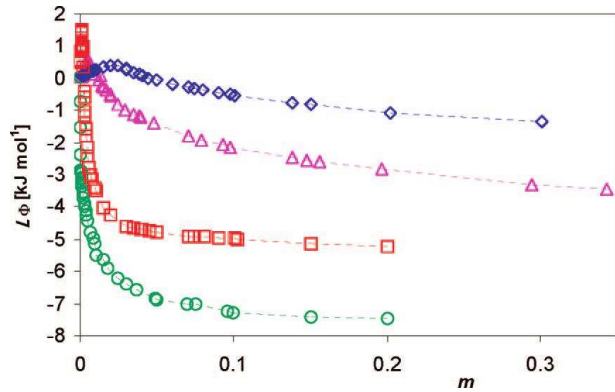


Fig. 101. Effetto dell'acetilazione sui gruppi idrossilici dello zucchero:entalpie molari apparenti di $C_{12}DGCB$ (rombi blu), $C_{12}AGCB$ (triangoli rosa), $C_{16}DGCB$ (quadrati rossi), e $C_{16}AGCB$ (cerchi verdi) in funzione della molalità.

	DTAB	DEDAB	C_8AGCB	$C_{12}AGCB$	$C_{16}AGCB$	$C_{12}DGCB$	$C_{16}DGCB$
cmc (mmol l^{-1})	15.1	14.0	5.78 (tens. sup.) 29.3 (conduc.) 50 (termodin.)	2.63 (tens. sup.) 5.48 (conduc.) 4 (termodin.)	0.21 (tens. sup.) 1.25 (conduc.) 0.4 (termodin.)	21.3	1.42
β	0.68	0.72	0.44	0.47	0.56	0.71	0.7
ΔH_m (kJ mol^{-1})	da -8 a -1.5	-2.1	1.6	-3.6	-8.8	-2.2	-7.3
$\Delta C_{p,m}$ ($\text{JK}^{-1} \text{mol}^{-1}$)	-500	-426	—	—	—	—	—
$V_{\phi,cmc}$ ($\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$)	288.20	302.80	489.2	559.60	626.00	402.85	458.06
$V_{\phi,m}$ ($\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$)	294.80	309.40	494.5	566.80	635.20	408.85	466.96
ΔV_m ($\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$)	6.6	6.6	5.2	7.2	9.2	6.0	8.3
$K_{S_{\phi,cmc}}$ ($\text{bar}^{-1} \text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$)	-0.0024	-0.00199	0.00286	0.00039	-0.00207	-0.00236	-0.00527
$K_{S_{\phi,m}}$ ($\text{bar}^{-1} \text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$)	0.0112	0.01173	0.01328	0.01978	0.02381	0.01030	0.01379
ΔK_{S_m} ($\text{bar}^{-1} \text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$)	0.0136	0.013716	0.01042	0.01939	0.025883	0.01266	0.019063

Tab. 37. Cmc, grado di associazione del controione (β), e cambiamenti nelle proprietà termodinamiche alla micellizzazione di DTAB, DEDAB, C_8AGCB , $C_{12}AGCB$, $C_{16}AGCB$, $C_{12}DGCB$, $C_{16}DGCB$ a 298 K.

Dall'applicazione del modello di transizione di pseudofase per ottenere la variazione di entalpia alla micellizzazione [536, 545, 562, 563, 570], sono state ottenute le entalpie riportate in Tab. 37. In accordo con quanto ottenuto per i composti acetilati (Tab. 37), e per altri tensioattivi, come per esempio il 3-((alchilcarbonil) amino)-4-idrossibenzoato di potassio ($-1.4 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ gruppo}^{-1}$) [565] e i sali di potassio degli acidi p-n-alchilbenzoici [566], il contributo di gruppo per il metilene ha un valore di $-1.3 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ gruppo}^{-1}$. Inoltre, dai valori di ΔH_m dei C_n DGCB e dei C_n AGCB riportati in Tab. 37, risulta che l'acetilazione dei gruppi ossidrilici sullo zucchero diminuisce la variazione dell'entalpia di micellizzazione di circa -1.5 kJ mol^{-1} .

Volumi e compressibilità

In Tab. 37 sono riportati i valori dei volumi molari apparenti in fase micellare, $V_{\phi,m}$, del C_{12} DGCB e del C_{16} DGCB. Essi differiscono di circa $14.5 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ per $-\text{CH}_2-$, un contributo di gruppo confrontabile con quello di altre classi di tensioattivi cationici [572]. Dall'eq. (7), usando il valore della cmc ottenuto da misure conduttimetriche, si sono ottenuti i cambiamenti nel volume alla micellizzazione, V_m . Questi risultano di $6.0 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ per il C_{12} DGCB e di $8.3 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ per il C_{16} DGCB, con un contributo di gruppo di $0.57 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ per $-\text{CH}_2-$, confrontabile con quello degli alchiltrimetilammonio bromuri nel rif. [520] ($0.5 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ gruppo}^{-1}$).

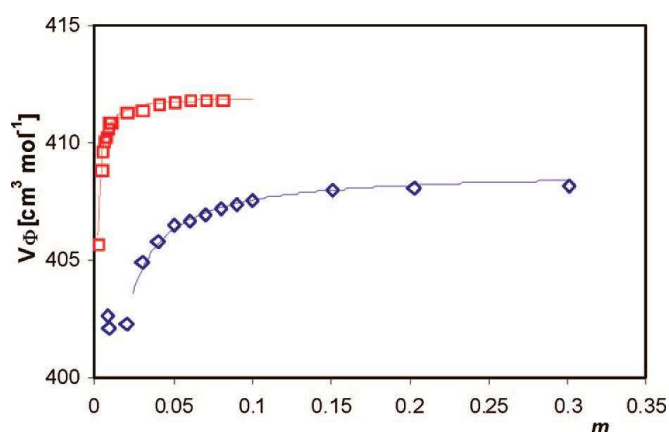


Fig. 102. Volumi molari apparenti di C_{12} DGCB (rombi blu) e C_{16} DGCB (quadrati rossi) in funzione della molalità. Per il C_{16} DGCB, è riportato ($V_{\phi} - 55$) in funzione di m , per confrontare meglio gli andamenti. Sono inclusi anche i risultati provenienti dal fit dei dati sperimentali per mezzo dell'eq 7 (linea continua).

I parametri di compressibilità per il C₁₂DGCB ed il C₁₆DGCB, ottenuti sempre per mezzo delle eq.(7) e (8), sono riportati in Tab. 37. Per questi composti, i valori delle compressibilità molari apparenti in fase micellare, $K_{s,\phi,m}$ sono alti e positivi. Il contributo di gruppo del -CH₂- in fase micellare è di $+9 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^3 \text{ bar}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ed è simile a quanto riportato nel rif [517] ($+9.4 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^3 \text{ bar}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ -CH}_2^{-1}$), nel rif. [573] ($0.97 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^3 \text{ bar}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) e per alcuni tensioattivi gemini propanedil- α,ω -bis(dimetilalchilammonio bromuri) ($1.15 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^3 \text{ bar}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) [567].

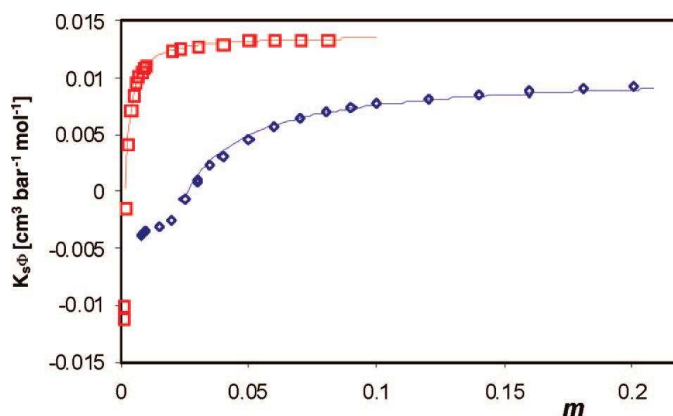


Fig. 103. Compressibilità isoentropiche molari apparenti di C₁₂DGCB (rombi blu) e C₁₆DGCB (quadrati rossi) in funzione della molalità. Sono inclusi anche i risultati provenienti dal fit dei dati sperimentali per mezzo dell'eq 7 (linea continua).

Dai valori di $K_{s,\phi,cmc}$ ottenuti dall'eq. (8), quando il tensioattivo è presente in soluzione come monomero, si calcola un contributo negativo per le compressibilità molari apparenti per il gruppo -CH₂- ($-7 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^3 \text{ bar}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ -CH}_2^{-1}$), in accordo con quanto ricavato dai dati riportati nel rif. [580] per gli alchiltrimetilammonio bromuri, ma più elevato di quanto riportato da Kudryashov [581] e Fukada [582]. È, infatti, generalmente accettato che a temperatura ambiente il contributo di gruppo del -CH₂- sulla compressibilità molare sia negativo e piuttosto piccolo. Questo è dovuto al bilancio tra il contributo negativo causato dall'aumento della densità delle molecole di acqua intorno alla cavità e il contributo positivo della cavità stessa. Per il cambiamento nella compressibilità molare adiabatica alla micellizzazione è stato ottenuto un valore di $1.6 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^3 \text{ bar}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ -CH}_2^{-1}$, confrontabile con il valore di $1.5 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^3 \text{ bar}^{-1} \text{ mol}^{-1}$, riportato nel rif. [525] per gli alchiltrimetilammonio bromuri. Anche qui, come nel caso dei tensioattivi glucocationici acetati, come conseguenza della formazione delle

micelle, la rottura della cavità rigida che ospita la porzione idrofobica della molecola di tensioattivo, unitamente alla riduzione dell'elettrostrizione dovuta al legame del controione nelle micelle, permette una più ampia variazione del volume con la pressione.

Il volume occupato dal gruppo (β -D-glucopiranosil)etile si può calcolare confrontando i volumi del C_{12} DGCB con quelli del DTAB e del DEDAB. La sostituzione del metile del DTAB con questo gruppo provoca un aumento nel volume della molecola di $114 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$, sia come monomero che in fase micellare. Per avere il volume dell'intero sostituito si deve però sommare a questo valore il volume del gruppo metilico di $19.06 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ presente nel riferimento [541], e si ottiene $133 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$. Invece, dal confronto con il DEDAB, la sostituzione di un idrogeno del gruppo etile con il gruppo β -D-glucopiranosil provoca un aumento di volume di $99 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$.

Ricordiamo che per i gruppi (2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosil)etile e 2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosile erano stati valutati rispettivamente volumi di 291 e $257 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$.

Inoltre, come mostrato in Fig. 104, in cui gli andamenti del composto dodecilico acetilato e disacetilato sono riportati in confronto con il DEDAB, l'acetilazione della porzione glicosidica, unita ad una grande variazione nel volume, porta ad un consistente aumento della compressibilità della molecola.

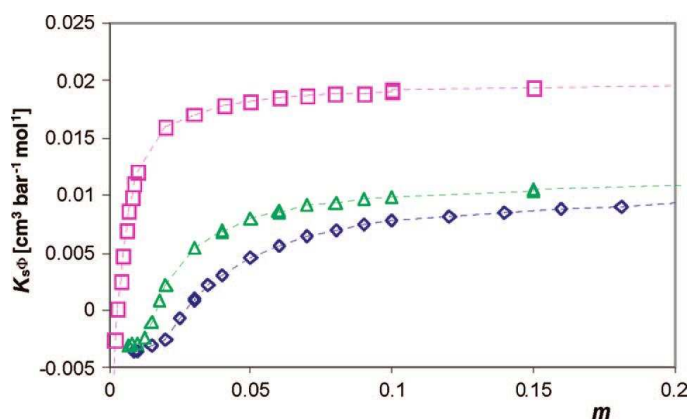


Fig. 104. Compressibilità isoentropiche molari apparenti di C_{12} DGCB (rombi blu), C_{16} AGCB, (quadrati rosa), e DEDAB (triangoli verdi) in funzione della molalità

Lo studio di questi tensioattivi è presentato nella pubblicazione:
Fisicaro, Emilia; Compari, Carlotta; Biemmi, Mariano; Duce, Elenia; Peroni, Monica;
Donofrio, Gaetano; Sansone, Francesco; Rozycka-Roszak, Bozenna; Pruchnik, Hanna;
Barbero, Nadia; Viscardi, Guido; Quagliotto, Pierluigi. *Thermodynamics and Biological
Properties of the Aqueous Solutions of New Glucocationic Surfactants*, Journal of
Physical Chemistry B (2008), 112(31), 9360-9370.

TENSIOATTIVI GLUCOCATIONICI ACETILATI E DISACETILATI

DSC

Gli effetti del C₁₆DGCB e del C₁₆AGCB sulle transizioni di fase della dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) sono mostrate nelle Fig. 65, per il metodo 1 e 2. Il C₁₆DGCB abbassa la temperatura di pretransizione (T_p) e alla concentrazione di 0.06 la annulla per entrambi i metodi (Tab. 21). Il C₁₆AGCB annulla la pretransizione anche alla concentrazione più bassa.

La fase principale di transizione si allarga e si sposta progressivamente verso temperature più basse all'aumentare della concentrazione dei tensioattivi studiati con entrambi i metodi. Il C₁₆DGCB influisce sulla fase principale di transizione dei liposomi di DPPC in modo simile per entrambi i metodi, ma la sposta di più per il secondo metodo rispetto al primo. Il C₁₆AGCB influisce sulla transizione per entrambi i metodi in modo differente. Nel caso del metodo 1, le fasi principali di transizione sono asimmetriche e divise in due componenti a rapporti molari più alti di 0.03, mentre sono quasi simmetriche per il secondo metodo. A differenza del C₁₆DGCB, il C₁₆AGCB diminuisce la temperatura della fase principale di transizione (T_m) maggiormente nel primo metodo che nel secondo (Fig. 64).

La transizione di fase da gel a fluido dei doppi strati acquosi della DPPC è indipendente dalla temperatura perché, secondo la regola delle fasi, un sistema trifasico a due componenti non ha gradi di libertà a pressione costante. L'aggiunzione di un tensioattivo cambia in certa misura le proprietà della transizione. Il sistema in studio consiste di tre componenti e acquista un grado di libertà.

La transizione avviene entro un range di temperature e si sposta progressivamente a temperature più basse con l'aumento della concentrazione dei composti studiati, come avviene nell'aggiunzione di un' impurezza ad un sistema di un solo componente. Quindi, l'abbassamento della temperatura di transizione di fase può essere interpretato in termini di un abbassamento del punto di congelamento.

Secondo questo modello, la temperatura di transizione di fase dovrebbe diminuire linearmente con la concentrazione della sostanza aggiunta. Nei nostri risultati T_m non decresce monotonicamente per nessun composto con nessuno dei due metodi (Fig. 64). Questo suggerisce che, oltre al mescolamento di molecole lipidiche con il tensioattivo,

si instaurano anche interazioni tra il tensioattivo e le molecole lipidiche. Ci si aspetta che le grandi teste polari del tensioattivo interagiscano con le teste polari del lipide e che le molecole d'acqua siano coinvolte in queste interazioni. Con lo scopo di comprendere meglio il ruolo svolto dall'acqua in queste interazioni, i tensioattivi sono stati addizionati ai liposomi sia attraverso una fase acquosa (metodo 1) che attraverso una fase lipidica (metodo 2). I metodi di preparazione del campione non sono completamente equivalenti e, sebbene i campioni siano all'equilibrio, ci si può aspettare un risultato diverso per ciascun metodo. A causa delle diverse tecniche di preparazione del campione, gli stati di equilibrio dei campioni potrebbero essere diversi per i metodi 1 e 2.

Sembra che le teste polari del C₁₆DGCB possano interagire con le teste polari dei lipidi in una modalità simile a quella degli zuccheri. Infatti, come nel caso degli zuccheri [583], il gruppo idrossilico del C₁₆DGCB può formare dei legami ad idrogeno con l'atomo di ossigeno dei fosfati del lipide. Di conseguenza, le interazioni elettrostatiche tra le teste polari del lipide si indeboliscono e questo causa la perdita di impaccamento del doppio strato e lo spostamento della transizione a temperature più basse. I cambiamenti nella struttura dei liposomi non sono così grandi come potrebbe invece risultare dalla presenza della pretransizione a basse concentrazioni di C₁₆DGCB. Ci si aspetta che la formazione di legami ad idrogeno non dipenda dal modo in cui il C₁₆DGCB viene aggiunto ai liposomi, e questo spiegherebbe perché influisca sulla transizione di fase principale in modo simile per entrambi i metodi. L'opposto si osserva per il C₁₆AGCB. In questo caso, l'influenza del C₁₆AGCB sulla transizione di fase principale dipende fortemente dalla modalità con cui il tensioattivo è stato aggiunto alla DPPC. La transizione viene modificata maggiormente ed è più spostata a temperature inferiori per il metodo 1 rispetto al 2. Questo suggerisce che le molecole d'acqua sono coinvolte nell'interazione tra le teste polari del C₁₆AGCB e le teste polari del lipide. Infatti, a causa della presenza dei sostituenti acilici, la testa polare del C₁₆AGCB non è più in grado di formare legami a idrogeno con i lipidi. Perciò, la testa polare del C₁₆AGCB interagisce con i gruppi polari del lipide in modo differente rispetto al C₁₆DGCB e le interazioni sono fortemente aumentate dalla presenza dell'acqua. Quando aggiunto alla fase acquosa, il composto C₁₆AGCB induce cambiamenti nella struttura dei liposomi significativamente più grandi rispetto al C₁₆DGCB ed annulla la pretransizione anche alle più basse concentrazioni. Inoltre, in presenza di alte concentrazioni di C₁₆AGCB, la fase principale di transizione per il metodo 1 si separa in

due componenti (Fig. 65). La temperatura T_m^I del primo componente è quasi indipendente dalla concentrazione del tensioattivo ed è circa la stessa T_m della DPPC. Al contrario, la temperatura T_m^{II} del secondo componente dipende fortemente dalla concentrazione del tensioattivo (Fig. 64). Il componente I potrebbe essere attribuito al C_{16} DGCB-domini poveri od alla DPPC pura, ed il componente II al C_{16} DGCB-domini ricchi.

Saggi Biologici

Le interazioni dei C_n AGCB con $n = 8, 12, 16$ e C_n DGCB con $n = 12, 16$ con il DNA plasmidico pEGFPC1 (Clontech) sono state monitorate attraverso il saggio EMSA (Electrophoresis Mobility Shift) su gel di agarosio. L'attività è stata osservata solo per il C_{16} AGCB alle concentrazioni più alte e per il C_{16} DGCB alla concentrazione di $200 \mu M$ (Fig. 66). Infine, per testare la capacità degli stessi composti di rilasciare il DNA nelle cellule, è stato eseguito un saggio di trasfezione transiente con un plasmide con una cassetta di espressione di EGFP sotto il controllo del promotore CMV (pEGFP-C1, Clontech) per visualizzare l'espressione di EGFP al microscopio a fluorescenza. In accordo con i risultati EMSA, il C_{16} AGCB è stata l'unica molecola a mostrare una bassa capacità di trasfezione quando coformulata con il DOPE (Fig. 67).

I risultati dei saggi biologici mostrano che le strutture studiate non sono in grado di interagire in modo specifico con il DNA e di compattarlo. Per questo motivo non sono utilizzabili in gene delivery, sebbene sia stato provato che alcuni tensioattivi gemini cationici basati sullo zucchero mostrino un'eccellente efficienza di trasfezione [584]. La maggiore limitazione alla loro attività è probabilmente dovuta al fatto che sono tensioattivi con un'unica carica positiva ed a singola catena. Infatti, lipidi cationici multivalenti potrebbero formare liposomi con una maggiore densità di carica superficiale rispetto a quelli monovalenti, quindi generalmente ci si aspetta che diano luogo ad un miglior legame con il DNA ed un miglior rilascio [180].

AFM

Per verificare la capacità dei composti sotto studio ad indurre cambiamenti strutturali nel DNA abbiamo utilizzato l'AFM [585-586]. Questa tecnica è stata usata con successo per studiare l'interazione sia di ligandi sintetici [587-588] sia di proteine [589] con il

DNA. Gli esperimenti AFM sono stati condotti usando DNA circolare, in tapping mode in aria. Seguendo i risultati EMSA e di trasfezione transiente, abbiamo usato i composti con code a 16 atomi di carbonio per osservare con l'AFM la loro interazione con il DNA plasmidico. La Fig. 68a mostra l'immagine tipica del DNA plasmidico da solo depositato sulla mica. Sono presenti sia plasmidi singoli che concatameri con alcuni supercoil che portano la doppia elica a incrociarsi su se stessa diverse volte. Le Fig. 68b e 68c mostrano il DNA plasmidico dopo incubazione rispettivamente con il C₁₆AGCB ed il C₁₆DGCB. In accordo con i risultati EMSA, l'interazione con il DNA è molto bassa e la struttura del DNA non viene modificata molto, se non per un leggero aumento nel numero di strutture supercoil. Nella Fig. 68d si può vedere come l'aggiunta di DOPE in rapporto 2:1 al composto acetilato porti alla formazione di alcune strutture condensate, non omogenee sia per forma che per dimensione, anche se la maggior parte del plasmide rimane nella sua forma iniziale. L'addizione del DOPE da solo al plasmide o al C₁₆DGCB invece del C₁₆AGCB non dà immagini significativamente differenti dalle Fig. 68b e 68c (immagini non mostrate).

La maggiore capacità del C₁₆AGCB nel delivery del DNA, specialmente in presenza del DOPE, potrebbe essere spiegata dal fatto che questa molecola è in grado di indurre un cambiamento più significativo rispetto al C₁₆DGCB nella struttura delle membrane cellulari e/o per la formazione di strutture condensate quando coformulato con il DOPE (Fig. 68d).

Lo studio di biologico di questi tensioattivi è presentato nella pubblicazione:
Fisicaro, Emilia; Compari, Carlotta; Biemmi, Mariano; Duce, Elenia; Peroni, Monica; Donofrio, Gaetano; Sansone, Francesco; Rozycka-Roszak, Bozena; Pruchnik, Hanna; Barbero, Nadia; Viscardi, Guido; Quagliotto, Pierluigi. *Thermodynamics and Biological Properties of the Aqueous Solutions of New Glucocationic Surfactants*, Journal of Physical Chemistry B (2008), 112(31), 9360-9370.

TENSIOATTIVI GEMINI DIPIRIDINICI

Il gruppo di ricerca, presso il quale ho svolto questa tesi, ha raggiunto risultati interessanti a livello d'efficienza di gene delivery con una classe di tensioattivi gemini di tipo ammonio quaternario chiamati bis- C_n BEC, in particolare se coformulati con il DOPE [517, 590]. Questa è infatti risultata essere doppia rispetto a quella degli agenti trasfettanti commerciali ed è per questo motivo che si è scelto di proseguire con lo studio e la caratterizzazione di altre classi di gemini. È stata quindi presa in considerazione una nuova serie, nella quale le teste polari sono costituite da uno ione piridinio. Il fine è quello di ottenere ulteriori informazioni sull'interazione tra tensioattivi gemini e DNA, sulla termodinamica di autoaggregazione, sulla possibilità di valutare teoricamente le loro proprietà e di definire valide relazioni struttura-attività che permettano di ottimizzare le prestazioni come vettori.

A questo scopo sono state considerate le proprietà termodinamiche delle soluzioni acquose dei composti 12-Py(2)-n-(2)Py-12 MS/Cl e le proprietà tensidiche dei composti con controione metansolfonato e degli analoghi con catena alchilica fluorurata. Inoltre, per i composti idrogenati con controione cloruro è stata valutata la capacità d'interagire con il DNA e per la serie con catena a sedici atomi anche l'efficienza trasfettiva.

Entalpie molari apparenti e parziali

Lo studio delle proprietà termodinamiche delle soluzioni acquose dei tensioattivi, utilizzando metodi diretti, permette di verificare la regola dell'additività e di calcolare il contributo dato da ogni gruppo che costituisce la molecola, con lo scopo di poter prevedere il comportamento termodinamico di queste soluzioni a partire dalla loro struttura chimica. In letteratura sono presenti i contributi dei gruppi metilenici e fluorometilenici, così come dei costituenti della testa polare e dei differenti controioni [541-543, 561, 563, 565, 567, 591, 592]. Per i tensioattivi gemini, invece, non è ancora chiaro se può essere applicata la regola del contributo di gruppo e se sia possibile utilizzare il contributo di gruppo ricavato dallo studio dei monomeri per prevederne le proprietà in soluzione. Per quanto riguarda le entalpie, il contributo di gruppo per il metilene, quando è aggiunto alla catena idrofobica dei gemini, sembra essere superiore a quello del monomero [567, 592]. Mancano invece dati relativi all'effetto del metilene

quando questo viene aggiunto allo spaziatore, cioè al ponte che unisce le due teste polari identiche, nonostante sia evidente la grossa influenza che la sua lunghezza ha sui parametri strutturali delle micelle.

Una dimostrazione dell'importanza che hanno le curve entalpiche nell'ottenimento di preziose informazioni sul comportamento dei tensioattivi in soluzione è data dalla ben documentata transizione da micelle sferiche a micelle a bastoncino da parte degli alogenuri dell'alchildiil- α,ω -bis(dimetilalchilammonio) con spaziatori corti [593, 594] (i composti con spaziatori più lunghi danno luogo solo a micelle sferiche). La valutazione delle entalpie molari apparenti e parziali a 298 K delle soluzioni acquose dei tensioattivi cationici propanediil- α,ω -bis(octildimetilammonio bromuri) e propanediil- α,ω -bis(dodecildimetilammonio bromuri) in funzione della loro concentrazione ha permesso la determinazione del cambiamento d'entalpia associato a questa transizione, che si verifica nella fase micellare [567].

Partendo da questo presupposto, sono stati determinati gli andamenti delle entalpie molari apparenti e parziali in funzione della concentrazione per questa nuova classe di gemini con lo scopo di poter ottenere non solo informazioni di carattere termodinamico, ma anche strutturale.

Gli andamenti delle entalpie molari apparenti e parziali dei composti aventi la stessa lunghezza della catena alchilica, ma diverso spaziatore, sono riportati nelle Fig. 105 e 106.

Come già sottolineato in precedenza, nel caso dei tensioattivi ionici l'andamento delle curve prevede un aumento nella regione premicellare e un livellamento al di sopra della cmc, dove le curve sono quasi parallele. L'abbassamento delle curve nella regione postmicellare, proporzionale al numero di atomi di carbonio nella catena alchilica e in generale all'idrobità globale della molecola, è attribuito alle interazioni elettrostatiche all'interno della soluzione micellare. Le curve sembrano avere l'andamento atteso, ma in realtà l'effetto dell'aggiunta del gruppo $-\text{CH}_2-$ allo spaziatore non provoca un aumento monotono nei valori delle entalpie nella zona micellare, come si può vedere nelle Fig. 105 e 106, e questo rende impossibile stabilire un contributo per il gruppo $-\text{CH}_2-$ dello spaziatore, anche perché è difficile prevedere questo effetto dai dati ricavati a partire dai monomeri.

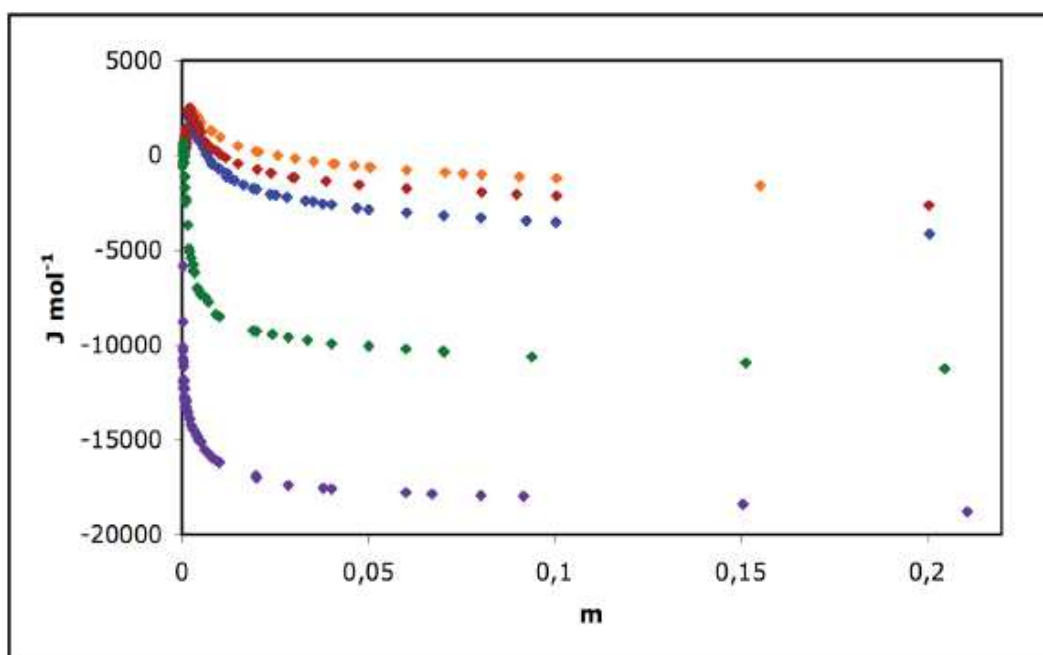


Fig. 105. Entalpie molari apparenti dei tensioattivi 12-Py(2)-2-(2)Py-12 MS (rombi arancioni), 12-Py(2)-3-(2)Py-12 MS (rombi blu), 12-Py(2)-4-(2)Py-12 MS (rombi rossi), 12-Py(2)-8-(2)Py-12 MS (rombi verdi) e 12-Py(2)-12-(2)Py-12 MS (rombi viola) in funzione della molalità, m .

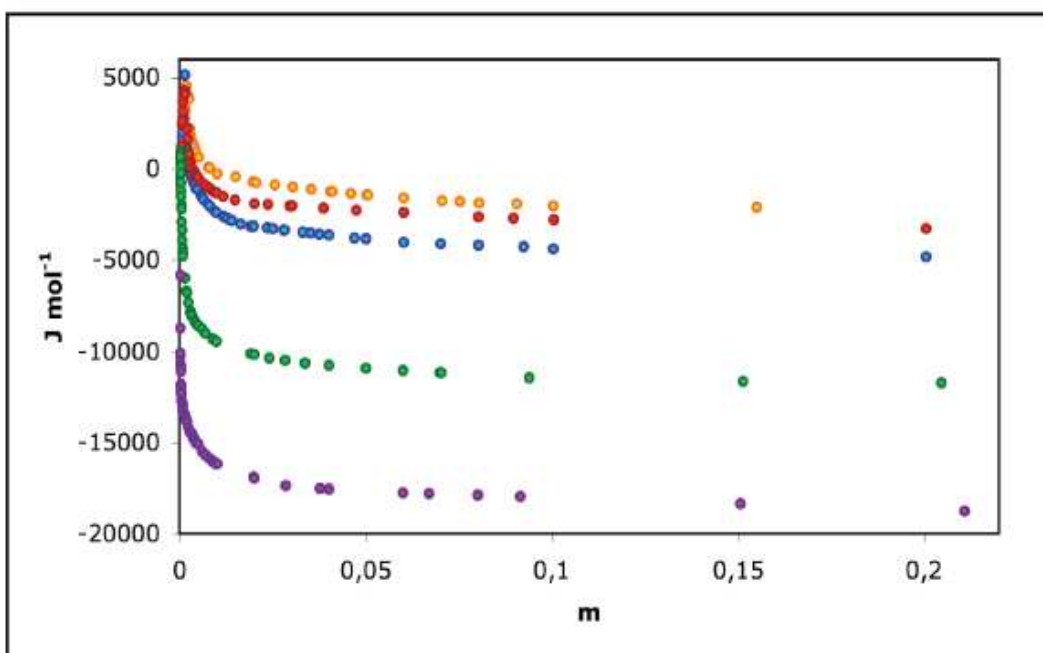


Fig. 106. Entalpie molari parziali dei tensioattivi 12-Py(2)-2-(2)Py-12 MS (pallini gialli), 12-Py(2)-3-(2)Py-12 MS (pallini blu), 12-Py(2)-4-(2)Py-12 MS (pallini rossi), 12-Py(2)-8-(2)Py-12 MS (pallini verdi) e 12-Py(2)-12-(2)Py-12 MS (pallini viola) in funzione della molalità, m .

Se il $-\text{CH}_2-$ è aggiunto alla catena idrofobica provoca un abbassamento nella curva dell'entalpia di circa -1.5 kJ mol^{-1} [563], ma se questo è aggiunto allo spaziatore dà un effetto completamente diverso. Per esempio, abbiamo dimostrato che le curve entalpiche del dodecildimetilammonio bromuro (DEDAB) a 298 K giacciono circa allo stesso livello di quelle del dodeciltrimetilammonio bromuro (DTAB) e questo ci ha permesso di valutare il contributo di gruppo del metilene, al valore del plateau, quando viene aggiunto alla testa polare che è circa $+1.6 \text{ kJ mol}^{-1}$ gruppo⁻¹ per gli L_ϕ e circa $+1.75 \text{ kJ mol}^{-1}$ gruppo⁻¹ per gli L_2 [536]. Questo effetto è molto vicino a quello ottenuto accorciando la catena alchilica di un gruppo metilenico [536, 563, 564]. La presenza dell'etile legato all'azoto quaternario permette sia una migliore delocalizzazione della carica, sia un aumento della dimensione della testa polare, portando ad una maggiore separazione delle cariche sulla superficie delle micelle del DEDAB rispetto a quelle del DTAB. Inoltre, abbiamo confrontato diversi tensioattivi dodecilici aventi lo stesso controione con lo scopo di poter valutare esclusivamente l'effetto che la porzione idrofilica ha sulle proprietà entalpiche delle soluzioni [542]. È quindi stato possibile stabilire una sorta di "scala di delocalizzazione della carica" sulla testa polare: più la carica è delocalizzata, più il comportamento è simile a quello dei tensioattivi non ionici. L'abbassamento del valore di plateau nelle curve delle entalpie molari apparenti e parziali in funzione della concentrazione è in relazione con l'incremento d'idrofobicità causato dall'allungarsi della catena alchilica e dall'aumento della dimensione delle micelle. Invece, a parità di catena alchilica e controione il valore di plateau è strettamente legato alla modulazione della densità di carica dovuta ad effetti induttivi e di risonanza. Questi effetti non influenzano il valore della cmc (cioè l'energia libera di formazione delle micelle), infatti il suo valore per il DEDAB è solo di poco inferiore a quello del DTAB, mentre influiscono pesantemente sulle entalpie e di conseguenza sulle entropie. Tutto questo è vero solo se alla testa polare è legata una catena alchilica molto corta e se si parla di tensioattivi monometrici. Se la lunghezza della catena aumenta, prevale l'effetto idrofobico (come dimostrato nel caso dell' N-dodecil-N-benzilmorfolino cloruro, dove il benzile legato all'azoto può essere considerato come una seconda catena [595]).

Tutto diventa più complicato nel caso dei tensioattivi gemini e un esempio è dato proprio dai composti in studio: innanzitutto i valori riportati in Tab. 38 confermano che l'addizione di gruppi metilenici allo spacer non provoca l'abbassamento di tipo

monotonico delle cmc e non aumenta in modo significativo l'idrofobicità dell'intera molecola [596].

Composti	cmc^a (mmol L ⁻¹)	$\beta\%$	cmc^b (mmol L ⁻¹)
2a	2.07	74	0.52
3a	2.09	72	1.00
4a	1.93	40	1.15
8a	1.32	57	0.29
12a	0.75	57	0.11
3b	1.51	69	
4b	1.28	67	
8b	1.11	44	
12b	0.22	48	

a)conducibilità, b)tensione superficiale.

Tab. 38. Valori delle cmc e del grado di associazione del controione $\beta\%$ per i composti 12-Py(2)-n-(2)Py-12 MS (a) e 12-Py(2)-n-(2)Py-12 Cl (b).

Le curve entalpiche in Fig. 107 evidenziano come la curva del composto 12-Py(2)-3-(2)Py-12 MS sia più bassa di quella del composto con spaziatore a due atomi di carbonio 12-Py(2)-2-(2)Py-12 MS di circa -2.0 kJ mol^{-1} per le entalpie molari apparenti, una quantità superiore a quella data dall'addizione di un $-\text{CH}_2-$ nella catena alchilica di un tensioattivo monomero. L'aggiunta di un ulteriore $-\text{CH}_2-$ allo spaziatore con il composto 12-Py(2)-4-(2)Py-12 MS dà luogo ad un comportamento insolito: si osserva infatti un'inversione nell'andamento e la curva dello spaziatore a quattro atomi di carbonio giace tra quella del 12-Py(2)-2-(2)Py-12 MS e del 12-Py(2)-3-(2)Py-12 MS, avvicinandosi maggiormente al primo. Il valore del plateau nella regione micellare, per le entalpie molari apparenti in funzione della concentrazione, del 12-Py(2)-8-(2)Py-12 MS si abbassa di circa -8 kJ mol^{-1} rispetto a quello del 12-Py(2)-4-(2)Py-12 MS, dando un contributo medio di gruppo di -2 kJ mol^{-1} , che è comparabile a quello ricavabile tra il 12-Py(2)-2-(2)Py-12 MS e il 12-Py(2)-3-(2)Py-12 MS. Se però si va a valutare la differenza tra le curve, nella medesima regione, tra il 12-Py(2)-8-(2)Py-12 MS e il 12-Py(2)-2-(2)Py-12 MS, il valore si abbassa e il contributo del $-\text{CH}_2-$ si

avvicina a quello che il metilene ha quando viene aggiunto alla catena alchilica del tensioattivo monomero. Gli andamenti delle curve non mostrano nessuna peculiarità nel range delle concentrazioni esaminate e non avviene alcuna transizione da micelle sferiche a micelle a bastoncino.

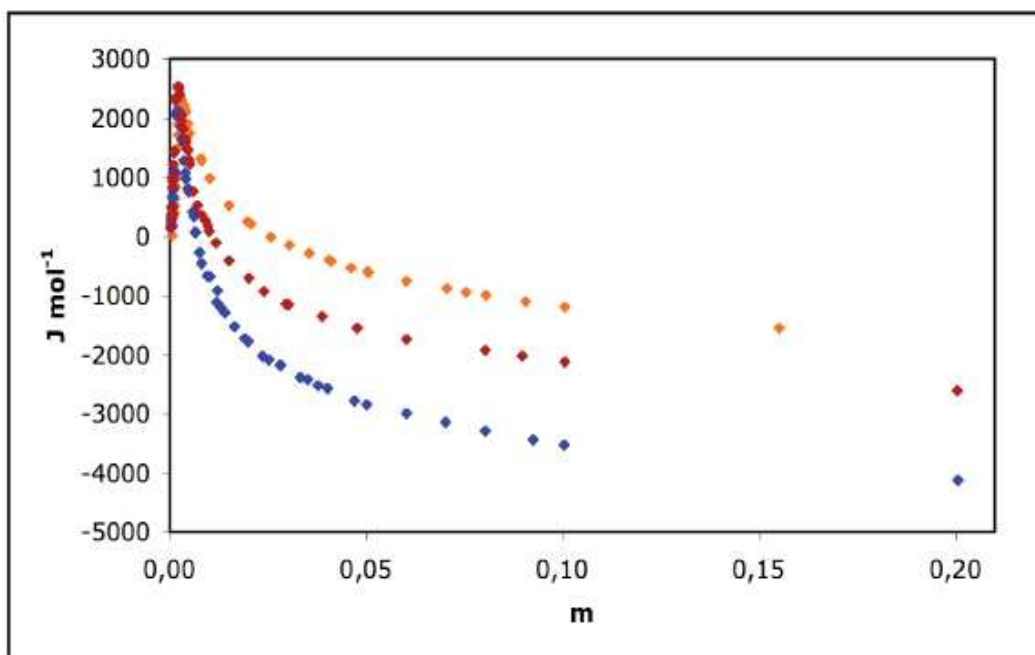


Fig. 107. Entalpie molari apparenti dei tensioattivi 12-Py(2)-2-(2)Py-12 MS (rombi arancioni), 12-Py(2)-3-(2)Py-12 MS (rombi blu) e 12-Py(2)-4-(2)Py-12 MS (rombi rossi) in funzione della molalità, m . Inversione della curva del composto con spaziatore a 4 atomi di carbonio che si posiziona al di sopra del 12-Py(2)-3-(2)Py-12 MS.

Per spiegare questo comportamento inatteso, abbiamo ipotizzato un cambiamento conformazionale della molecola: quando la lunghezza dello spacer raggiunge la misura adatta, la molecola si ripiegherebbe su se stessa a libro (Fig. 108), permettendo interazioni di tipo stacking, mediate dai controioni, tra i due anelli piridinici. Questo tipo di riarrangiamento non sarebbe possibile sia quando lo spaziatore è troppo corto (2 o 3 atomi di carbonio), a causa della perdita di libertà conformazionale sia quando lo spaziatore è troppo lungo, poiché i due anelli piridinici sono troppo distanti.

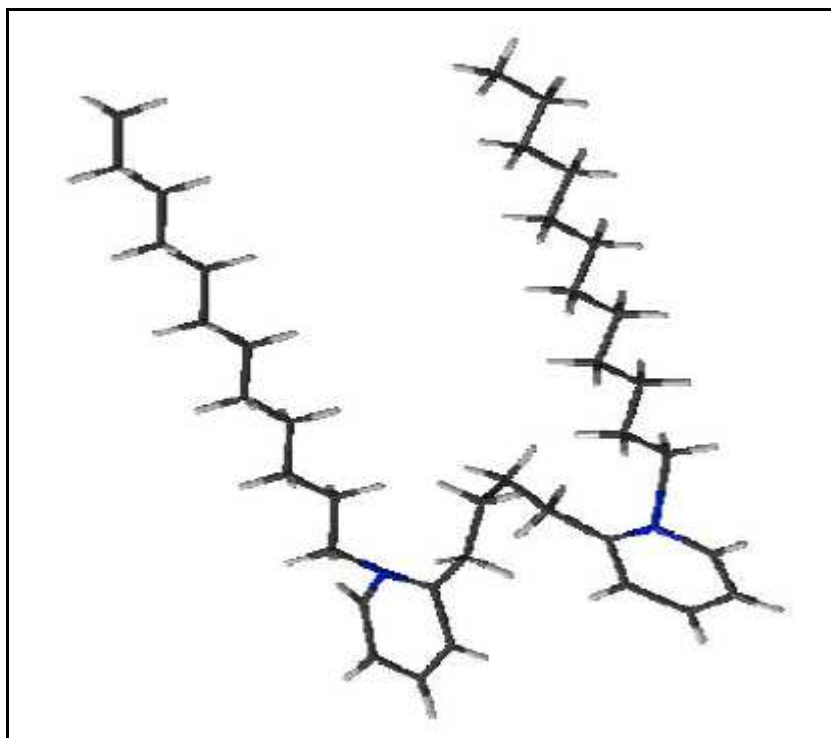


Fig. 108. Conformazione ipotizzata per il composto 12-Py(2)-4-(2)Py-12 MS in soluzione.

Con lo scopo di ottenere il cambiamento di entalpia alla micellizzazione, abbiamo applicato un modello di transizione di pseudofase e il risultato ottenuto rispecchia lo stesso andamento descritto in precedenza, senza avere però la possibilità di estrarre un contributo di gruppo per il $-\text{CH}_2-$, quando viene aggiunto allo spaziatore, e con la stessa inversione tra il 12-Py(2)-3-(2)Py-12 MS e il 12-Py(2)-4-(2)Py-12 MS. I valori di ΔH_{mic} sono riportati in Tab 39.

È stata presa in considerazione anche la serie di composti aventi il gruppo Cl al posto del metansolfonato MS (12-Py(2)-n-(2)Py-12 Cl, con $n = 3, 4, 8, 12$) per verificare quale potesse essere l'eventuale effetto del controione.

Osservando le curve nelle Fig. 109 e 110, si può notare il medesimo peculiare andamento già visto per i 12-Py(2)-n-(2)Py-12 MS, con l'inversione della curva del composto con spaziatore a quattro atomi di carbonio che si posiziona al di sopra della curva del composto 12-Py(2)-3-(2)Py-12 Cl. Anche in questo caso diventa impossibile stabilire il contributo di gruppo dato dal $-\text{CH}_2-$, mancando la classica additività.

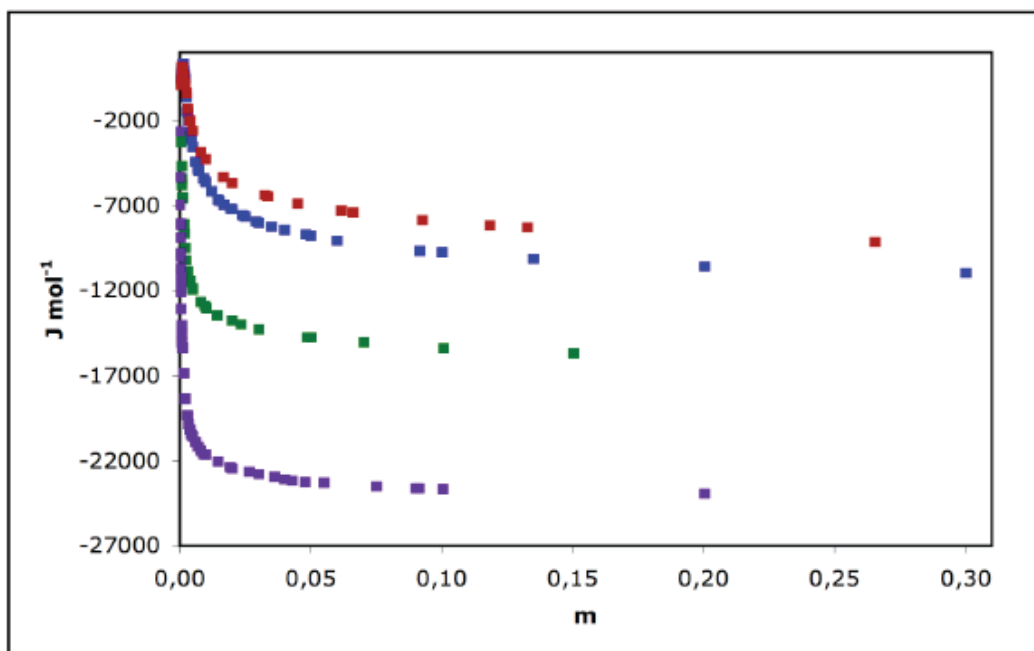


Fig. 109. Entalpie molari apparenti dei tensioattivi 12-Py(2)-3-(2)Py-12 Cl (quadrati blu), 12-Py(2)-4-(2)Py-12 Cl (quadrati rossi), 12-Py(2)-8-(2)Py-12 Cl (quadrati verdi) e 12-Py(2)-12-(2)Py-12 Cl (quadrati viola) in funzione della molalità, m .

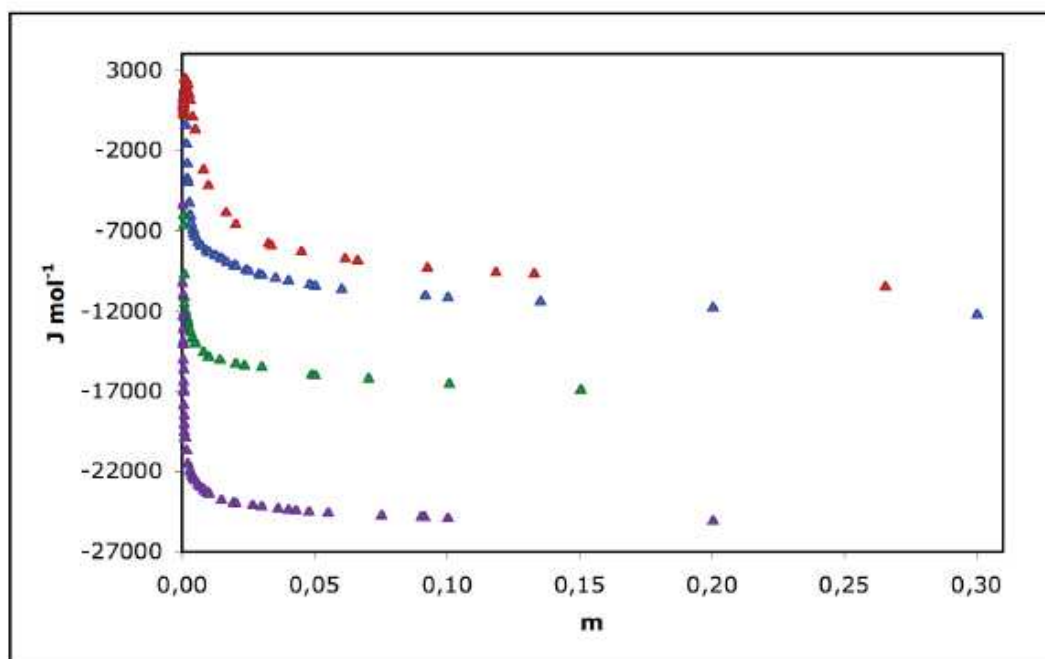


Fig. 110. Entalpie molari parziali dei tensioattivi 12-Py(2)-3-(2)Py-12 Cl (triangoli blu), 12-Py(2)-4-(2)Py-12 Cl (triangoli rossi), 12-Py(2)-8-(2)Py-12 Cl (triangoli verdi) e 12-Py(2)-12-(2)Py-12 Cl (triangoli viola) in funzione della molalità, m .

Per il controione è invece possibile definire un contributo di gruppo, infatti, i plateau dei composti clorurati hanno valori di entalpie più negativi rispetto agli analoghi metansolfonati ma, sia che venga utilizzato il gruppo Cl, sia che venga utilizzato il gruppo MS, l'andamento generale delle curve rimane inalterato. Non solo, se si va a valutare lo spostamento dei plateau dei 12-Py(2)-n-(2)Py-12 Cl in funzione dello spaziatore, si ottengono dei valori del tutto confrontabili con quelli dei 12-Py(2)-n-(2)Py-12 MS ed è come se nel passaggio da un controione all'altro le curve venissero semplicemente traslate verso il basso (Fig. 111). Infatti, se si considerano le entalpie molari apparenti, la differenza tra la curva del composto 12-Py(2)-4-(2)Py-12 MS e quella del 12-Py(2)-3-(2)Py-12 MS è di circa -1.5 kJ mol^{-1} e per i clorurati è di circa -1.7 kJ mol^{-1} . Valori simili si ottengono anche confrontando le curve dei composti con spaziatore a quattro e otto carboni che, come già detto in precedenza, è di -8.0 kJ mol^{-1} per i metansolfonati e di circa -7.9 kJ mol^{-1} per i clorurati.

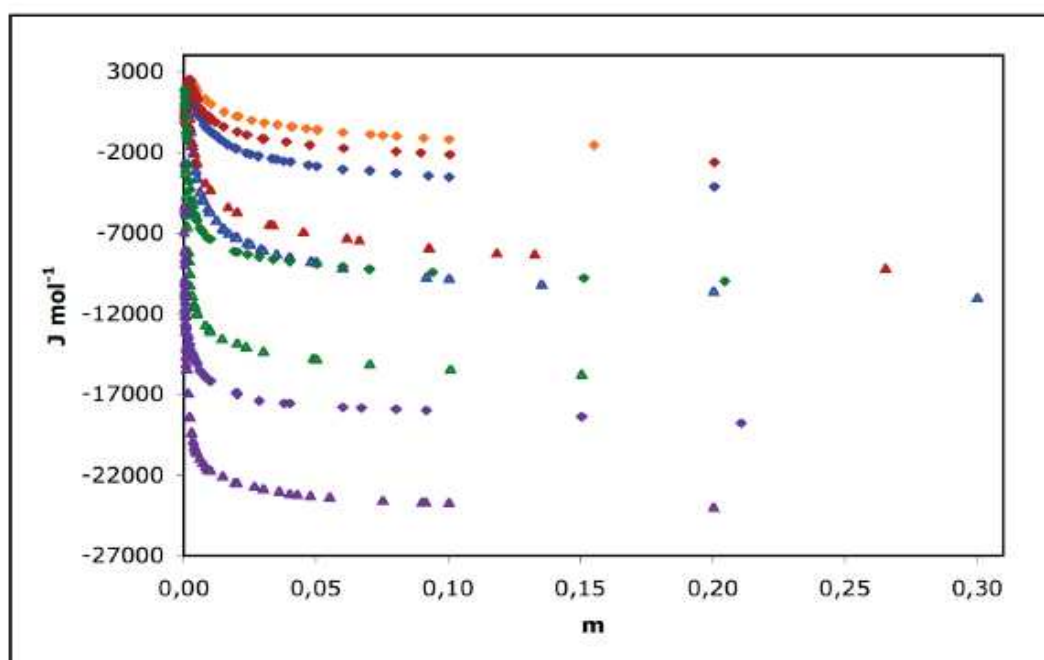


Fig. 111. Entalpie molari apparenti dei composti 12-Py(2)-2-(2)Py-12 MS (rombi arancione), 12-Py(2)-3-(2)Py-12 MS (rombi blu), 12-Py(2)-4-(2)Py-12 MS (rombi rossi), 12-Py(2)-8-(2)Py-12 MS (rombi verdi), 12-Py(2)-12-(2)Py-12 MS (rombi viola), 12-Py(2)-3-(2)Py-12 Cl- (triangoli blu), 12-Py(2)-4-(2)Py-12 Cl- (triangoli rossi), 12-Py(2)-8-(2)Py-12 Cl- (triangoli verdi) e 12-Py(2)-12-(2)Py-12 Cl- (triangoli viola) in funzione di m .

Tutto questo sta ad indicare che non è il tipo di controione, bensì la struttura stessa di questi gemini dipiridinici che determina la conformazione finale che la molecola assume in soluzione e, di conseguenza, anche il particolare comportamento che si osserva.

Tensioni superficiali

L'ipotesi della variazione strutturale è sostenuta anche dalle misure di tensione superficiale riportate nel grafico in Fig. 112 e dalle informazioni contenute nella Tab. 39 e ricavabili dalle equazioni 14 e 15.

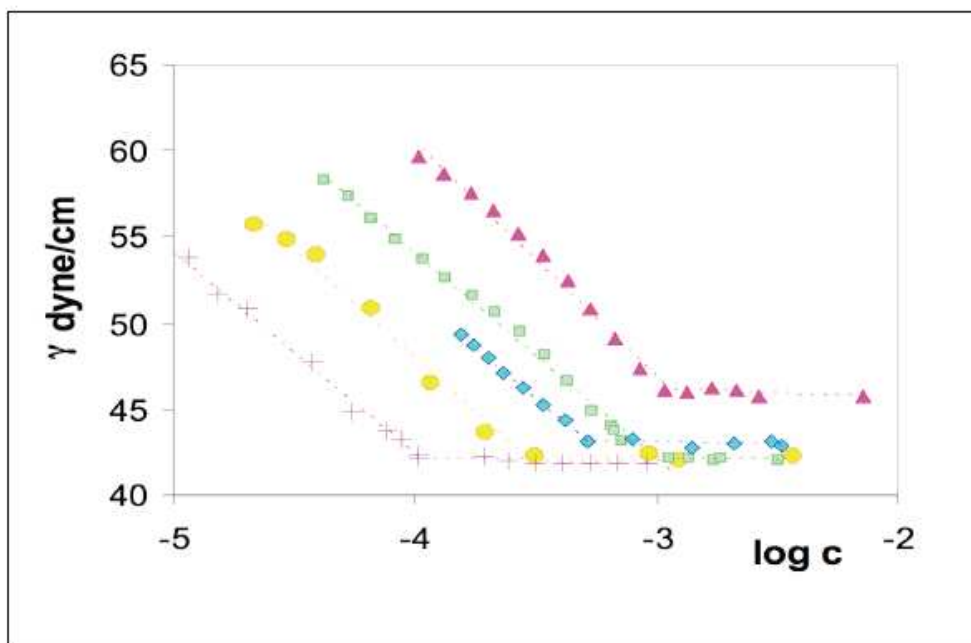


Fig. 112. Tensioni superficiali in funzione del logaritmo della concentrazione per i composti 12-Py(2)-2-(2)Py-12 MS (rombi azzurri), 12-Py(2)-3-(2)Py-12 MS (quadrati verdi), 12-Py(2)-4-(2)Py-12 MS (triangoli fucsia), 12-Py(2)-8-(2)Py-12 MS (pallini gialli) e 12-Py(2)-12-(2)Py-12 MS (asterischi).

Il composto 12-Py(2)-4-(2)Py-12 MS presenta, nelle curve delle tensioni superficiali in funzione di $\log c$, lo stesso comportamento anomalo già evidenziato nelle curve entalpiche. L'area occupata dalla molecola all'interfaccia, $A_{\min}$, è significativamente più bassa per il 12-Py(2)-4-(2)Py-12 MS rispetto agli altri composti della serie e questo suggerisce una certa tendenza della molecola a ripiegarsi.

compound	s	cmc ^b (conduc.) [mmol/L]	β^b	ΔH_{mic} [kJ/mol]	cmc (surf.tens.) [mmol/L]	γ_{cmc} [dyne/cm]	$\Gamma \times 10^{10}$ [mol/cm ²]	A_{min} [nm ²]	C_{20} [mmol/L]	cmc/ C_{20}
12-Py(2)-2-(2)Py-12 MS	2	2.07	74	-3.9	0.52	42.96	1.02	16.2	0.09	5.8
12-Py(2)-3-(2)Py-12 MS	3	2.09	72	-5.5	1.00	42.06	1.05	15.9	0.15	6.7
12-Py(2)-4-(2)Py-12 MS	4	1.93	40	-4.4	1.15	45.95	1.20	13.9	0.42	2.7
12-Py(2)-8-(2)Py-12 MS	8	1.32	57	-10.8	0.29	42.19	1.10	15.1	0.05	6.0
12-Py(2)-12-(2)Py-12 MS	12	0.75	57	17.6	0.11	41.97	1.02	0.015	7.0	

Tab. 39. Dati ricavati dalle misure di tensione superficiale per i tensioattivi 12-Py(2)-n-(2)Py-12 MS (n = 2, 3, 4, 8, 12) applicando le equazioni 14 e 15. Sono anche riportati i valori di variazione di entalpia alla micellizzazione e di cmc ottenuti da misure di conducibilità.

Inoltre, i valori delle cmc ottenuti dalle misure di tensione superficiale e i C_{20} presentano un massimo quando lo spaziatore è di quattro metileni e l'ulteriore aggiunta di otto metileni (12-Py(2)-12-(2)Py-12 MS) abbassa la cmc di solo un ordine di grandezza (Fig. 113). Il valore più alto di C_{20} , insieme al rapporto più basso cmc/ C_{20} e al valore più alto di γ_{cmc} , indica una grande tendenza del 12-Py(2)-4-(2)Py-12 MS a formare micelle anziché ad adsorbirsi all'interfaccia aria/acqua: la forma più compatta assunta dalla molecola potrebbe favorire l'assemblaggio delle micelle.

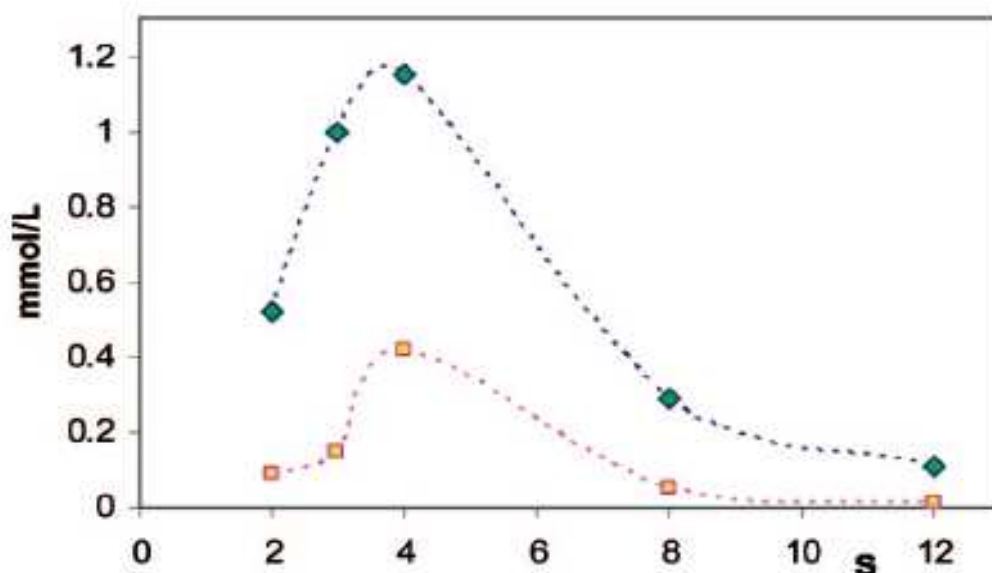


Fig. 113. Cmc (rombi) e C_{20} (quadrati) in funzione della lunghezza dello spaziatore (s) per i tensioattivi 12-Py(2)-n-(2)Py-12 MS (n = 2, 3, 4, 8, 12).

Inoltre, dai dati in Tab. 39 si nota come i valori di cmc ottenuti dalla tensione superficiale siano più bassi di quelli ottenuti dalla conducibilità. Un comportamento analogo è stato descritto anche da Pinazo [597] per un'altra classe di tensioattivi gemini cationici ed un risultato simile è stato dimostrato recentemente anche da Esumi [598]. Rosen ha evidenziato come la formazione di aggregati premicellari, specialmente per tensioattivi gemini con spacer molto corto, porti a cmc sostanzialmente differenti [599], se si confrontano i valori ottenuti a partire dalle tensioni superficiali e quelli ottenuti a partire dalle conducibilità. Questo risultato permette di ipotizzare che, a concentrazioni ben al di sotto della cmc, questi tensioattivi possano formare piccoli aggregati premicellari non attivi a livello della superficie che possono prevenire un ulteriore adsorbimento alla superficie.

Anche le misure di tensione superficiale dei tensioattivi gemini dipiridinici clorurati con catena a 16 atomi di carbonio 16-Py(2)-n-(2)Py-16 Cl ($n = 3, 4, 8, 12$) (Fig. 114) e i dati contenuti nella Tab. 40 e ricavabili dalle equazioni 14 e 15 avvalorano l'ipotesi del riarrangiamento strutturale per il composto con spaziatore a quattro metileni.

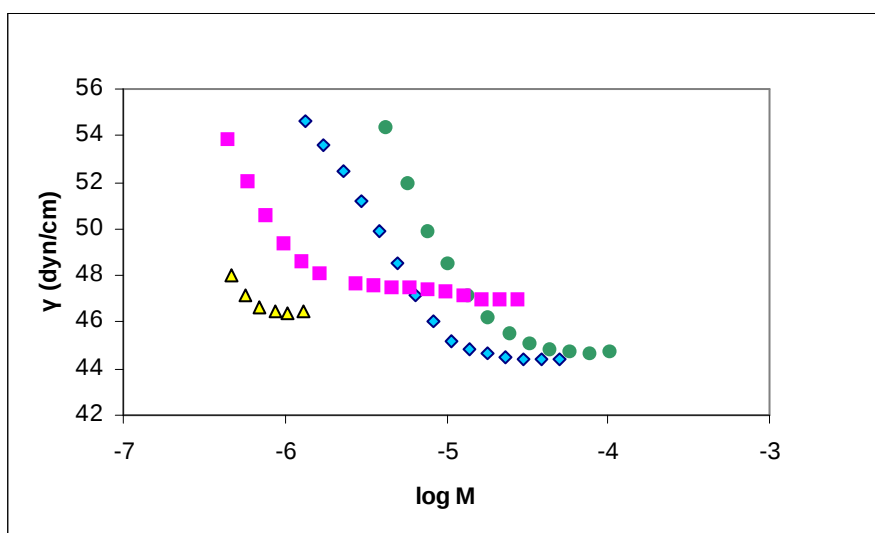


Fig. 114. Tensione superficiale in funzione del logaritmo della concentrazione dei tensioattivi 16-py-3-py-16 Cl (quadrati azzurri), 16-py-4-py-16 Cl (cerchi verdi), 16-py-8-py-16 Cl (quadrati rosa), 16-py-12-py-16 Cl (triangoli gialli).

Due osservazioni in particolare possono indicare questo particolare comportamento:

- 1) l'area minima per molecola all'interfaccia cresce al crescere della lunghezza dello spaziatore, come atteso, se si eccettua proprio il composto con spaziatore a 4 metileni:

quest'ultimo ha un'area più bassa degli altri e una cmc più alta; 2) la concentrazione eccesso superficiale massima decresce al crescere della lunghezza dello spaziatore ad eccezione del composto con spaziatori a quattro metileni, che presenta il valore più elevato di eccesso superficiale.

Composto	Cmc ^a	Cmc ^b	cmc _c /cmc _s ratio	γ_{lim}	Γ	A _{min}	C ₂₀	pC ₂₀	Cmc/C ₂₀
	*10 ⁻⁵	*10 ⁻⁵			*10 ¹⁰		*10 ⁻⁵		
	(mol/L)	(mol/L)		(mN/m)	(mol/cm ²)	(Å ²)	(mol/L)		
16-py-3-py 2Cl	8.51	1.1	8	44.5	0.95	174	0.2754	5.56	4.53
16-py-4-py 2Cl	9.42	1.9	5	44.9	1.13	147	0.5370	5.27	3.28
16-py-8-py 2Cl	8.38	0.15	59	47.3	0.89	186	0.0661	6.18	2.50
16-py-12-py 2Cl	5.95	0.073	88	46.4	0.70	239	0.0151	6.82	5.06

a) da misure di conducibilità: fitting non lineare

b) da misure di tensione superficiale

Tab. 40. Dati ricavati dalle misure di tensione superficiale per i tensioattivi 16-Py(2)-n-(2)Py-16 Cl (n = 3, 4, 8, 12) applicando le equazioni 14 e 15. Sono anche riportati i valori di cmc ottenuti da misure di conducibilità.

Saggi biologici e immagini AFM

I saggi biologici al momento sono stati effettuati solo sui composti 16-Py(2)-n-(2)Py-16 Cl con n = 3, 4, 8, 12.

Il saggio EMSA (Fig. 78) dimostra chiaramente come tutta la serie dei gemini con catena a sedici atomi di carbonio sia in grado di legarsi al DNA e come, fatta eccezione per il composto con spacer a tre atomi di carbonio, tutti siano in grado di bloccare il suo “shift” già a concentrazioni superiori a 25 μ M.

Diverso è invece il risultato del saggio di trasfezione transiente (Fig. 79). In questo caso solo il composto con spacer a quattro atomi di carbonio è in grado di trasfettare anche senza la presenza del colipide DOPE. L'aggiunta del lipide helper consente di aumentare parzialmente la percentuale delle cellule trasfettate, soprattutto nel rapporto 1:2, fino ad un risultato che si avvicina molto a quello del reagente commerciale di riferimento GenePorter. Per quanto riguarda gli altri composti, solo il 16-(2)Py-8-Py(2)-16 Cl dà qualche risultato, anche se non di grosso rilievo e solamente in presenza del DOPE con un rapporto 1:1.

Questi dati evidenziano, confermando peraltro casi già presenti in letteratura [600], che purtroppo non sempre ad un'elevata capacità di compattare il DNA corrisponde un'efficiente trasfezione e questo perché un buon vettore deve essere in grado non solo di interagire in modo efficace con gli acidi nucleici, ma anche permettere la dissociazione intracellulare del DNA dal complesso. Il composto 16-(2)Py-4-Py(2)-16 Cl, quindi, è dotato di caratteristiche particolari che lo contraddistinguono dal resto della serie.

I risultati ottenuti dallo studio termodinamico dei composti con catena alchilica a dodici atomi di carbonio (12-(2)Py-n-Py(2)-12 Cl/MS) hanno dimostrato come proprio il composto con spacer a quattro metileni presenti un comportamento anomalo, che abbiamo cercato di spiegare con la possibile formazione d'interazioni di tipo stacking che causerebbero il ripiegamento della molecola su se stessa, teoria supportata anche dal basso valore di A_{min} . L'ipotesi è che, anche nel caso dei composti con catena alchilica a sedici atomi di carbonio, lo spacer a quattro consenta l'instaurarsi di questo tipo d'interazioni e di conseguenza permetta alla molecola di adottare la particolare conformazione "a libro", che probabilmente influenza la modalità attraverso cui il composto va ad interagire con il DNA. Osservando le immagini AFM dei composti 16-(2)Py-n-Py(2)-16 Cl si può vedere come, a parità di rapporto DNA/lipide cationico (1:3000), il 16-(2)Py-4-Py(2)-16 Cl sia l'unico in grado di compattare completamente il plasmide, mentre i composti con spaziatori più lunghi formino solo degli aggregati parziali. All'origine di questo risultato ci sarebbe la diversa conformazione assunta dai composti in soluzione: quando lo spaziatore si allunga, le due teste polari sono costrette ad interagire con le cariche negative dei fosfati del DNA in punti del filamento distanti tra di loro e quindi lo compattano con più difficoltà.

Le immagini AFM dei 12-(2)Py-n-Py(2)-12 Cl sono state fatte a tre rapporti DNA/lipide differenti. Nel rapporto 1:1000 nessuno dei quattro composti ha un effetto particolarmente evidente sul DNA. Invece, nel secondo rapporto (1:3000) tutti dimostrano di essere in grado di interagire con il DNA e cominciano a formarsi i primi aggregati, anche se parziali; solo il 12-(2)Py-3-Py(2)-12 Cl sembra ancora scarsamente attivo, quindi nel caso dello spacer a tre metileni probabilmente le teste polari sono troppo vicine per dare luogo ad un'interazione efficace a basse concentrazioni, come dimostrato anche dal saggio EMSA dei 16-(2)Py-n-Py(2)-16 Cl). Quando si raggiunge il rapporto 1:6000 (Fig. 115) gli aggregati diventano sempre più consistenti e nel caso dei

composti 12-(2)Py-4-Py(2)-12 Cl e 12-(2)Py-8-Py(2)-12 Cl compaiono delle vere e proprie strutture condensate e il DNA viene completamente compattato.

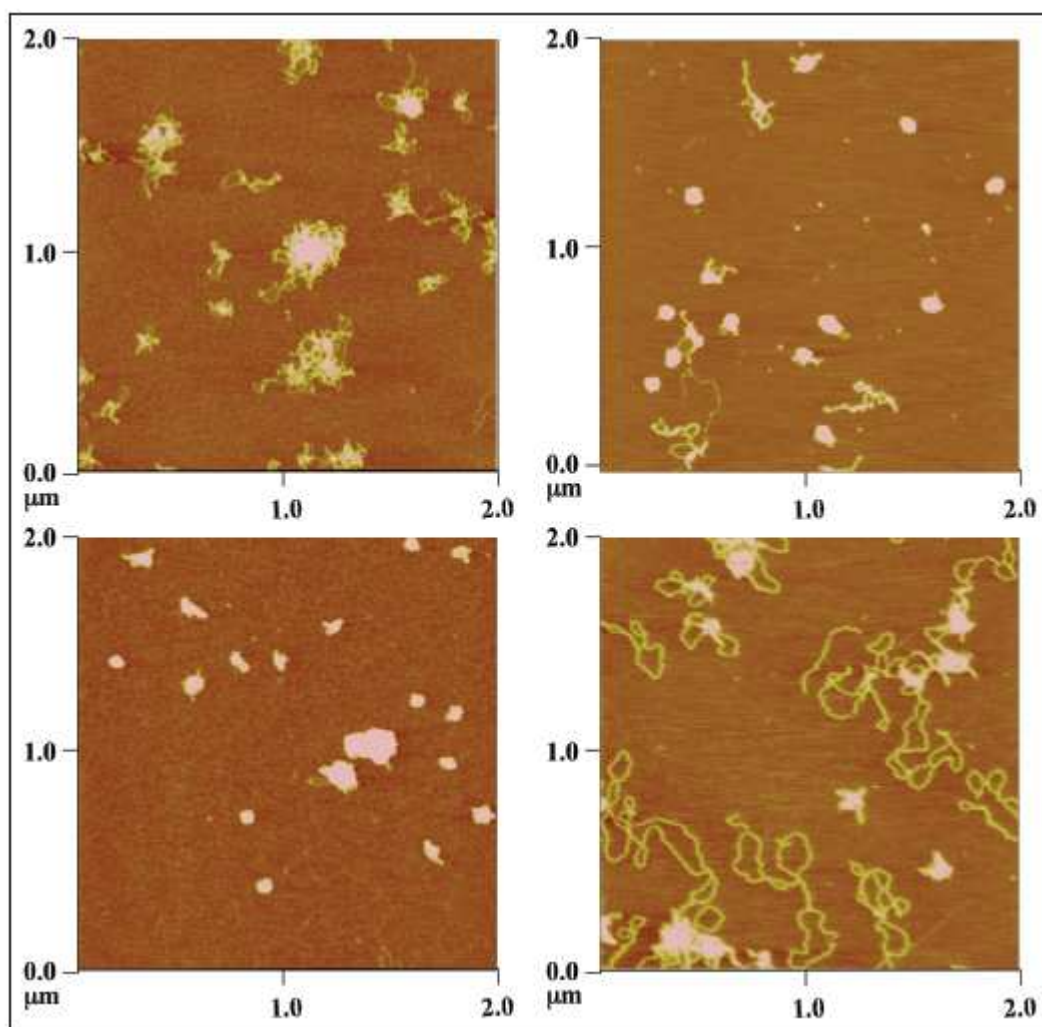


Fig. 115. Immagini AFM dei composti 12-(2)Py-3-Py(2)-12 Cl (in alto a sinistra), 12-(2)Py-4-Py(2)-12 Cl (in alto a destra), 12-(2)Py-8-Py(2)-12 Cl (in basso a sinistra) e 12-(2)Py-12-Py(2)-12 Cl (in basso a destra) nel rapporto DNA/lipide 1:6000.

Esperimenti analoghi sono stati ripetuti anche in presenza del DOPE in rapporto con il lipide di 2:1 e, al contrario di quanto era accaduto per i glucocationici (C₁₆AGCB), non si osservano grosse differenze rispetto al lipide da solo (Fig. 116).

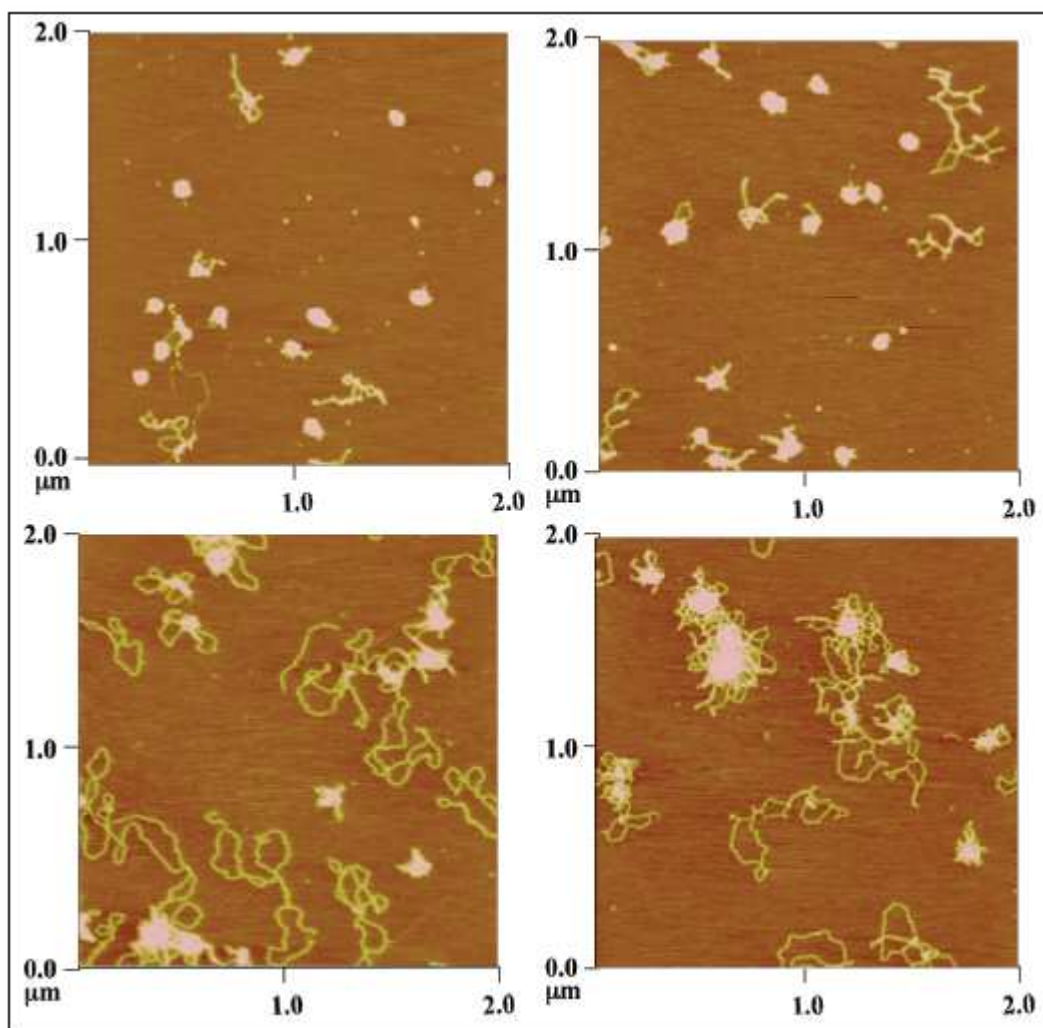


Fig. 116. Immagini AFM dei composti 12-(2)Py-4-Py(2)-12 Cl (in alto a sinistra), 12-(2)Py-4-Py(2)-12 Cl in presenza di DOPE (in alto a destra), 12-(2)Py-12-Py(2)-12 Cl (in basso a sinistra) e 12-(2)Py-12-Py(2)-12 Cl in presenza di DOPE (in basso a destra) nel rapporto DNA/lipide 1:6000 e lipide/DOPE 1:2. Si può osservare come non ci sia una sostanziale differenza quando viene aggiunto anche il colipide.

Quindi, nel caso dei gemini 12-(2)Py-n-Py(2)-12 Cl i più efficaci nel compattare il plasmide sono i due composti con spaziatori a quattro e otto atomi di carbonio, che sono poi gli stessi spaziatori ad avere dei risultati nel saggio di trasfezione dei 16-(2)Py-n-Py(2)-16 Cl; in questo caso non ci sono i dati dei rapporti superiori a 1:3000, però il risultato nella trasfezione fa pensare ad una possibile analogia di andamento tra le due classi. A parità di rapporti, il composto 16-(2)Py-4-Py(2)-16 Cl risulta il più efficiente nella compattazione del DNA (Fig. 117), fatto probabilmente dovuto alla combinazione della presenza della catena alchilica a sedici e dello spaziatore a quattro poiché, come già descritto in letteratura, è la combinazione tra i tre domini base del lipide (porzione idrofobica, linker e testa idrofila) a determinarne il successo come vettori. La causa non

può essere solo la lunghezza della catena alchilica, visto che il 12-(2)Py-8-Py(2)-12 Cl e il 16-(2)Py-8-Py(2)-16 Cl sembrerebbero avere un comportamento simile.

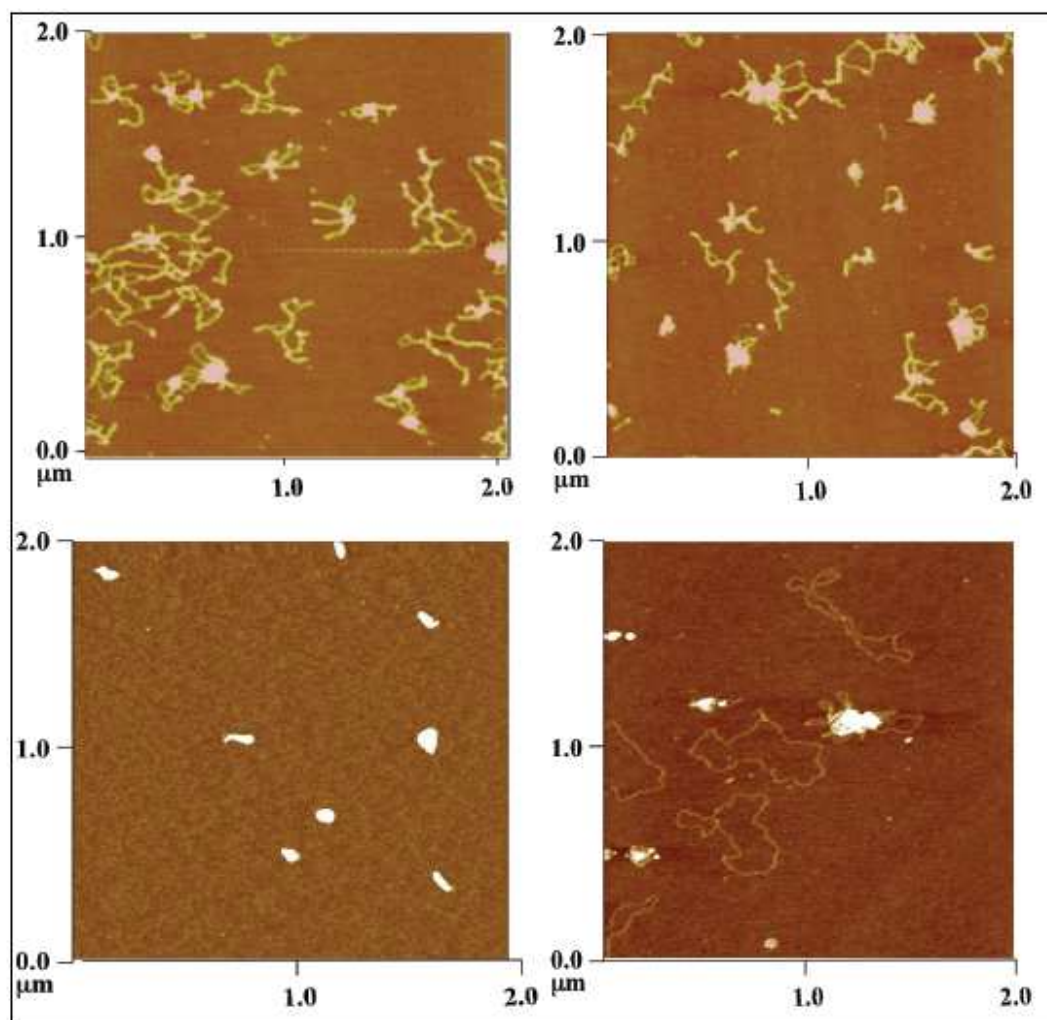


Fig. 117. Immagini AFM dei composti 12-(2)Py-4-Py(2)-12 Cl (in alto a sinistra), 12-(2)Py-8-Py(2)-12 Cl (in alto a destra), 16-(2)Py-4-Py(2)-16 Cl (in basso a sinistra) e 16-(2)Py-8-Py(2)-16 Cl (in basso a destra) nel rapporto DNA/lipide 1:3000. Il comportamento dei composti è molto simile, fatta eccezione per il 16-(2)Py-4-Py(2)-16 Cl che è l'unico ad essere in grado di compattare il DNA già a questo rapporto.

Tuttavia, secondo la nostra ipotesi, l'elemento fondamentale è la conformazione assunta dalla molecola 16-(2)Py-4-Py(2)-16 Cl. L'effetto positivo del suo spaziatore potrebbe non riguardare solo la fase della compattazione, ma anche step successivi della trasfezione, come per esempio facilitare la fuoriuscita dall'endosoma o il rilascio del plasmide dal complesso: questo potrebbe contribuire a spiegare la sua maggiore efficacia trasfettiva se confrontato con il 16-(2)Py-8-Py(2)-16 Cl.

Per quanto riguarda il ruolo del DOPE, poiché nelle immagini AFM fatte sui 12-(2)Py-n- Py(2)-12 Cl ha dimostrato di non avere un ruolo rilevante sulla compattazione, probabilmente l'incremento nella trasfezione si ottiene grazie alle sue proprietà fusogeniche.

Lo studio di questi tensioattivi è presentato in parte nella pubblicazione:
Fiscaro, Emilia; Compari, Carlotta; Biemmi, Mariano; Duce, Elenia; Peroni, Monica; Barbero, Nadia; Viscardi, Guido; Quagliotto, Pierluigi. *Unusual Behavior of the Aqueous Solutions of Gemini Bispyridinium Surfactants: Apparent and Partial Molar Enthalpies of the Dimethanesulfonates*, Journal of Physical Chemistry B (2008), 112(39), 12312-12317.

PROCESSI DI IDRATAZIONE IDROFOBICA

Lo studio dei processi idrofobici ha sempre avuto grande interesse fra i chimici in quanto tali processi hanno tutti luogo nell'acqua, componente essenziale di ogni organismo vivente. Questi processi [601-604] che, a prima vista, sembrano non essere correlati, sono suddivisi in:

- a. dissoluzione in acqua di gas e liquidi idrofobici
- b. denaturazione delle proteine
- c. formazione di micelle in acqua
- d. associazione idrofobica (o legame idrofobico)
- e. protonazione di anioni carbossilato
- f. formazione di un complesso tra un substrato e una proteina
- g. effetto di un sostituito polare sulla capacità termica
- h. effetto di un sostituito carico sulla struttura del solvente

Queste reazioni sono definite come “*processi di idratazione idrofobica*”, definizione che sembra essere apparentemente contraddittoria dal momento che “idrofobico” sta a indicare una sostanza che ha avversione per l'acqua e tende a fuggire da essa (cioè una sostanza dotata di bassa solubilità in acqua), mentre “idratazione” indica che tali sostanze, avendo una predilezione per l'acqua, tendono ad essere idratate. L'effetto idrofobico [605] consiste nella preferenza di una molecola apolare o della coda apolare di una molecola a risiedere in un ambiente apolare non acquoso. Questa tendenza fu valutata da Tanford [606, 607] determinando la variazione di energia libera degli aminoacidi sciolti in acqua o in etanolo e prendendo la glicina come valore zero sulla scala. La *driving force* dell'effetto idrofobico è stata considerata essere l'entropia attribuendo l'incremento in entropia alle molecole d'acqua disordinate espulse dall'interfaccia tra le due catene apolari. Ben-Naim [608] parlò di interazione idrofobica e andò a valutare l'energia di questa interazione.

La solubilità dei gas nobili e apolari è stata studiata e discussa con lo scopo di chiarire l'interazione tra le sostanze apolari e l'acqua e da qui l'origine dell'effetto idrofobico. Si è osservato [609] che le molecole apolari formano idrati cristallini molto stabili, nei quali una gabbia poliedrica di molecole d'acqua forma una cavità che ospita la sostanza apolare. Questi idrati sono relativamente stabili e mostrano elevati calori di formazione negativi con valori quasi costanti ($\Delta H = -65 \pm 4 \text{ kJ mol}^{-1}$) indipendentemente

dalla dimensione della molecola apolare. Questo non implica la formazione di un legame tra una porzione della molecola e l'acqua, sebbene abbia sicuramente luogo una interazione con la struttura del solvente. Il cambiamento negativo di entalpia potrebbe essere dovuto non tanto al legame quanto alla riorganizzazione del solvente. Guillot e Giussani [610] hanno valutato la dipendenza dell'idratazione idrofobica dalla temperatura, per mezzo di calcoli di dinamica molecolare delle solubilità, dei gas rari o del metano in acqua. Essi trovarono che la valutazione della funzione di distribuzione di coppia tra soluto e solvente permetteva di stabilire se si formavano gabbie di tipo clatrato attorno al soluto. Lee e Graziano [611] suggerirono l'ipotesi che il trasferimento di una molecola idrofobica dalla fase non acquosa all'acqua coinvolgesse due comportamenti di compensazione diversi ma correlati. L'idratazione idrofobica è accompagnata dalla riorganizzazione del solvente, che è un processo di compensazione, e come tale dovrebbe essere irrilevante fintantoché è coinvolta l'energia libera del legame idrofobico. Conclusero che la vera causa dell'idrofobicità dovesse essere cercata altrove piuttosto che nella riorganizzazione del solvente. Graziano [612] studiò il fenomeno della convergenza entropica nell'idratazione idrofobica.

La formazione delle micelle è stata attribuita all'effetto idrofobico che porta le code apolari delle molecole ad aggregarsi. Si sta cercando di capire se la carica della micella possa contribuire o meno all'associazione del complesso. Secondo Zana [613] l'energia libera di micellizzazione nel caso di un tensioattivo ionico convenzionale 1:1 dipende da β che è il grado di legame del controione. Secondo il modello di pseudo-fase, l'equilibrio dipende dalla concentrazione di una singola unità e non è influenzato dalla carica. Il processo di denaturazione di una proteina fu studiato da un punto di vista termodinamico da Privalov [614-618], Sturtevant [619, 620], Brandts [621], Lumry [622, 623]. Recentemente, Lumry [622] e Winzor e Jackson [626] hanno sollevato alcuni dubbi sul fatto che i dati termodinamici potessero essere applicati in modo vantaggioso ai processi isotermici.

ANALISI TERMODINAMICA

Il modello molecolare per la solubilità di sostanze non polari in acqua da noi formulato parte dal presupposto [601-603] che la struttura dell'acqua sia costituita da due tipi di *clusters* con struttura rispettivamente, W_I e W_{II} e da molecole di acqua isolate W_{III} . I *clusters* W_I formano il bulk del solvente e sono tenuti uniti tramite deboli legami

a idrogeno e formano una struttura a bassa densità. Il *cluster* W_{II} invece forma una gabbia d'acqua intorno alle molecole di soluto: queste molecole d'acqua sono tenute insieme da forti legami a idrogeno e formano una struttura ad alta densità [627, 628]. Infine, la terza forma W_{III} è costituita da molecole d'acqua libere (Fig. 118).

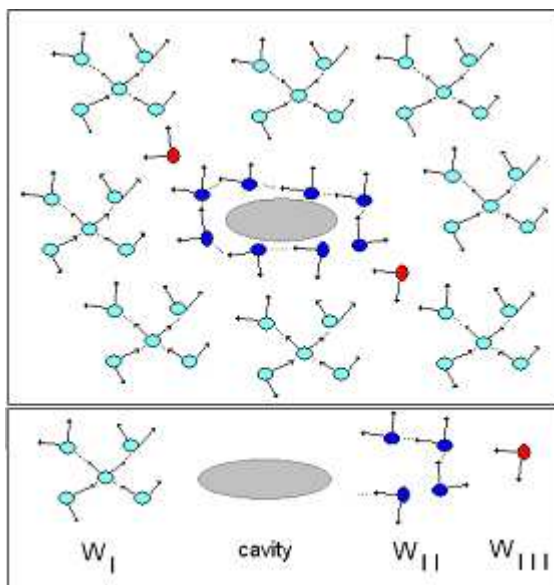


Fig. 118. Struttura dell'acqua. In presenza di una molecola idrofobica ha luogo una trasformazione da W_I a ($W_{II} + W_{III}$) con formazione di una cavità.

Quando una sostanza non polare si trova in acqua si verifica il rilascio di molecole d'acqua tipo W_{III} dal *cluster* di tipo W_I con formazione del *cluster* W_{II} e creazione di una cavità per ospitare il soluto. Il volume della cavità dipende dal numero ξ_w delle molecole d'acqua espulse. In alcuni tipi di reazioni, come sarà spiegato in seguito, ha luogo il processo opposto con trasformazione di W_{II} in W_I con condensazione delle molecole W_{III} e conseguente riempimento di una parte della cavità. Questo modello ha permesso di interpretare in modo soddisfacente i processi di solubilizzazione delle molecole non polari in acqua e la formazione delle micelle.

L'analisi di questi processi inizia dallo studio dei cambiamenti di energia libera in funzione della temperatura. Più esattamente, si inizia con lo studio del diagramma

$$(-\Delta G_{app}^{\circ})/RT = \ln K_{app} = f(1/T) \quad (20)$$

La costante K_{app} assume una precisa denominazione a seconda del processo interessato: nel processo di dissoluzione in acqua di gas e liquidi idrofobici rappresenta la costante di solubilità $k_{sol} = x_2$ (frazione molare); nel processo di denaturazione delle proteine la costante di denaturazione K_{den} tra lo stato nativo e denaturato; nel processo di micellazione la costante di formazione di una micella $K_{mic} = 1/(cmc)$; nel processo di protonazione degli anioni carbossilato la costante di protonazione K_H ; nei processi di complessazione tra substrato e proteina la costante di formazione K_f , etc. Alcuni diagrammi mostrano una concavità verso l'alto e un minimo vicino alla temperatura ambiente (Fig. 119), altri presentano un massimo nello stesso range di temperatura (Fig. 120).

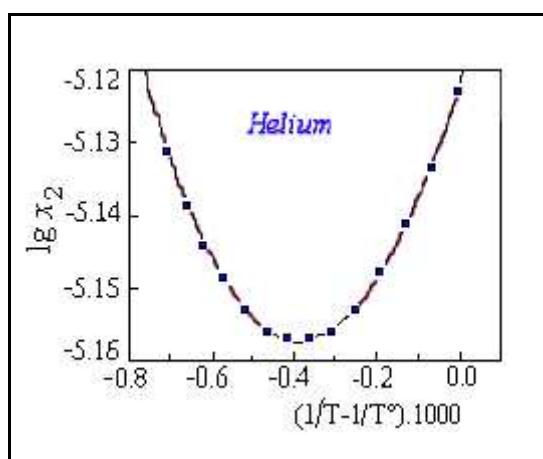


Fig. 119. Solubilità dell'elio in funzione del reciproco della temperatura

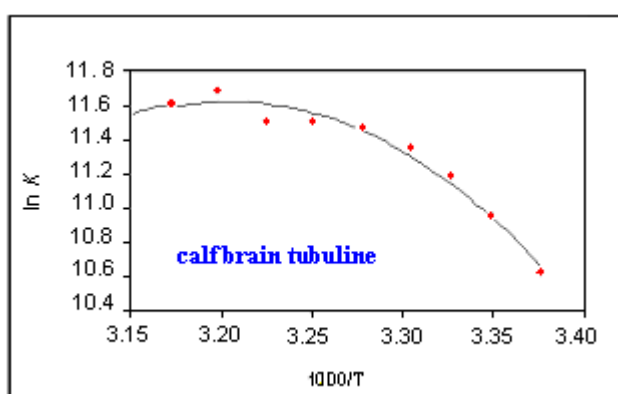


Fig. 120. Costante di formazione del bio-complesso in funzione del reciproco della temperatura.

La forma opposta delle curve, che si è visto essere strettamente legata al tipo di equilibrio con l'acqua coinvolta, costituisce un valido criterio per suddividere i processi in due classi:

- CLASSE A: 1) dissoluzione in acqua di gas non polari
 2) dissoluzione in acqua di liquidi non polari
 3) denaturazione delle proteine
 4) protonazione di anioni carbossilato

- CLASSE B: 1) formazione di micelle in acqua
 2) formazione di un complesso tra un substrato e una proteina
 3) effetto di un sostituito polare sulla capacità termica
 4) effetto di un sostituito carico sul solvente
 5) associazione idrofobica (o legame idrofobico)

L'importanza del tipo di curvatura che caratterizza tali processi deriva dal fatto che ognuna ha un ben definito tipo di tangente. Infatti, la tangente relativa all'equazione (20) è calcolata con l'equazione di Van't Hoff

$$\partial(\ln K_{app}) / \partial(1/T) = -\Delta H_{app} / R \quad (21)$$

La variazione di entalpia così calcolata, per ogni composto di classe A quando è messa in grafico in funzione di T è lineare, con una pendenza $\Delta C_{p,A}$ positiva

$$\Delta H_{app} = \Delta H_0 + \Delta C_{p,A} T \quad (22)$$

dove $\Delta H_0 < 0$ e $\Delta C_{p,A} > 0$ (Fig. 121). Sia l'intercetta ΔH_0 che la pendenza $\Delta C_{p,A}$ sono differenti per ogni composto. In ogni processo di classe A, la reazione è apparentemente esotermica a basse temperature e, passando attraverso un punto adiabatico (minimo della curva) diventa endotermica oltre il minimo di temperatura.

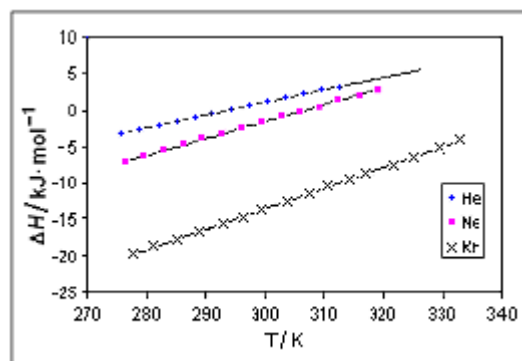


Fig. 121. Grafico di ΔH_{app} in funzione di T/K per i gas nobili. La pendenza dipende dal raggio del gas.

Applicando il principio di diluizione termica equivalente (*TED*) si può scrivere:

$$\Delta C_{p,A} = C_{p,w} n_w \quad (23)$$

dove $C_{p,w} = 75.36 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ è la capacità termica isobara molare dell'acqua e n_w è un numero ottenuto dividendo $\Delta C_{p,A}$ sperimentale per $C_{p,w}$. Quindi si ottiene:

$$\Delta H_{app} = \Delta H_0 + n_w C_{p,w} T \quad (24)$$

dove n_w è il numero di molecole d'acqua coinvolte nel processo ed è proporzionale alle dimensioni del soluto.

Siccome come vedremo in seguito n_w può essere anche negativo, si fa corrispondere a n_w un numero reale $\xi_w = |n_w|$ e in questo modo, l'introduzione del valore assoluto trasferisce qualsiasi cambiamento di segno alla quantità termodinamica molare.

La relazione tra n_w e la dimensione delle molecole di soluto può essere confermata considerando le variazioni del volume coinvolto. Mettendo in grafico il volume molare parziale V_2 dei composti alchilici nel loro stato liquido in funzione di ξ_w si può calcolare il cambiamento del volume parziale delle molecole d'acqua W_{III} coinvolte che è $\Delta V_2 = 19.9/\text{cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \xi_w^{-1}$, comparabile col valore $V_2 = 18.5/\text{cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ calcolato da Kharakoz [629, 630] per ogni molecola d'acqua. Considerando che il contributo del volume parziale dei composti alchilici alla soluzione è accompagnato da una contrazione generale di $-27.7/\text{cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$, si può concludere che ha luogo una riduzione del volume quando il soluto è aggiunto all'acqua e di conseguenza la cavità formata nel solvente per ospitare il soluto è più piccola. Questa contrazione della cavità potrebbe essere una

conseguenza della trasformazione delle molecole d'acqua della gabbia che circonda la cavità da W_I a W_{II} . Infatti, l'acqua W_{II} ha una densità maggiore e un volume più piccolo rispetto a W_I . Tale contrazione è confermata dai dati riportati da Franks [631] circa il volume parziale eccesso V_2^E di soluti in acqua in funzione della concentrazione di soluto. Un V_2^E negativo implica un netto restringimento quando il soluto è aggiunto all'acqua. In altre parole, il soluto in soluzione acquosa non occupa un volume pari a quello del suo stato liquido puro. La dipendenza della concentrazione da V_2^E mostra che per composti apolari il volume parziale decresce con l'aumento di concentrazione. In più, la diminuzione è maggiore all'aumentare della dimensione della porzione idrofoba, cioè n_w diventa più grande.

	n_w	$V_{cav}/\text{cm}^3 \text{ mol}^{-1}$	$V_2/\text{cm}^3 \text{ mol}^{-1}$	$\Delta V/\text{cm}^3 \text{ mol}^{-1}$
Methane	2.75	50.88	26.5	-24.38
Ethane	3.98	75.63	53.0	-22.63
Propane	4.89	90.47	68.9	-21.57

Tab.41. Volume della cavità e volume del soluto [632, 633].

Mettendo in grafico, per i composti studiati, i valori di entalpia estrapolati, ΔH_0 in funzione di $\xi_w = |n_w|$, si ottiene una funzione lineare:

$$\Delta H_0 = \Delta H_0^{(\xi_w=0)} + \xi_w \Delta h_w \quad (25)$$

dove $\Delta h_w = -21.6 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \xi_w^{-1}$ rappresenta il cambiamento di entalpia molare (esotermico) per la trasformazione da W_I a W_{II} , associato ad ogni molecola d'acqua W_{III} rilasciata dalla cavità: cioè l'incremento nelle molecole W_{III} di una unità produce calore ed espande la cavità.

Il valore estrapolato $\Delta H_0^{(\xi_w=0)} = -17.7 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, indipendentemente dalla dimensione del soluto, rappresenta l'affinità residua tra acqua e soluto. Possiamo rappresentare il cambiamento di entalpia in questi composti, includendo l'equazione (25) nell'equazione (24), con l'equazione generale:

$$\Delta H_{app} = \Delta H_0^{(\xi_w=0)} + n_w \Delta h_w + n_w C_{p,w} T = -17.7 - 21.6 \xi_w + \xi_w C_{p,w} T \quad (26)$$

Il processo di formazione della cavità è esotermico ($\Delta H_{cafor} = \Delta h_w \cdot \xi_w < 0$, dove *cafor* sta per “*formazione della cavità*”) e il calore prodotto è proporzionale alla dimensione della cavità perché dipende da ξ_w .

Mentre, per i processi di classe B, si ottiene un’espressione uguale all’equazione (22) ma con pendenza negativa

$$\Delta H_{app} = \Delta H_0 + \Delta C_{p,B} T \quad (27)$$

con $\Delta H_0 > 0$ e $\Delta C_{p,B} < 0$. Anche qui, sia l’intercetta ΔH_0 che la pendenza $\Delta C_{p,B}$ sono diverse per ogni composto della classe B e sono proporzionali alla dimensione delle molecole. In ogni processo di classe B, la reazione è apparentemente endotermica a basse temperature e diventa esotermica oltre il massimo di temperatura. Anche per la classe B il numero n_w può essere calcolato dividendo la pendenza sperimentale per $C_{p,w}$ ottenendo così numeri negativi ($n_w < 0$). Gli stessi argomenti usati per i processi della classe A possono essere usati qui per sostenere il reale significato di $\xi_w = |n_w|$.

Se, per ogni processo e ogni temperatura, calcoliamo ΔS_{app} tramite l’equazione di Helmholtz-Gibbs

$$T\Delta S_{app} = \Delta H_{app} - \Delta G_{app} \quad (28)$$

e mettiamo in grafico ΔS_{app} rispetto a $\ln T$, si ottiene una linea retta per ogni composto della classe A

$$\Delta S_{app} = \Delta S_{(0)} + \Delta C_{p,A} \ln T \quad (10)$$

dove la pendenza $\Delta C_{p,A}$ ($\Delta C_{p,A} > 0$) è esattamente la stessa di quella ottenuta dall’equazione (22) per l’entalpia di quel composto. L’intercetta $\Delta S_{(0)} < 0$ mostra un contributo negativo all’entropia, indipendentemente dalla temperatura (Fig. 122).

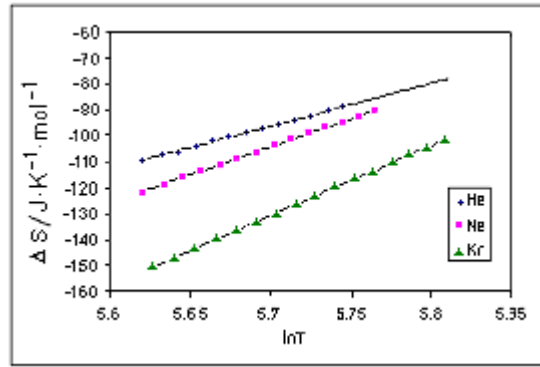


Fig. 122. Grafico di ΔS_{app} in funzione di $\ln T$. Le pendenze sono le stesse della Fig. 121.

Possiamo ora procedere, analogamente, con l'entropia dei processi di classe B, mettendo in grafico l'entropia in funzione di $\ln T$ e si ottiene così una funzione lineare

$$\Delta S_{app} = \Delta S_0 + \Delta C_{p,B} \ln T \quad (30)$$

dove la pendenza è negativa ($\Delta C_{p,B} < 0$, $n_w < 0$) ed è esattamente uguale a quella ottenuta dall'equazione (27) per l'entalpia per lo stesso composto. L'intercetta $\Delta S_0 > 0$ mostra un contributo positivo all'entropia, indipendentemente dalla temperatura.

Le intercette ΔH_0 dell'equazione (25) e ΔS_0 dell'equazione (29) ottenute per i diversi composti della classe A sono funzioni lineari di ξ_w producendo così equazioni generali per l'entalpia apparente

$$\Delta H_{app} = \Delta H_0^{(\xi_w=0)} + \xi_w \Delta h_w + \xi_w C_{p,w} T \quad (31)$$

e per l'entropia apparente

$$\Delta S_{app} = \Delta S_0^{(\xi_w=0)} + \xi_w \Delta s_w + \xi_w C_{p,w} \ln T \quad (32)$$

Per l'entalpia e l'entropia dei processi di classe B le equazioni generali possono essere scritte

$$\Delta H_{app} = \Delta H_0^{(\xi_w=0)} + \xi_w \Delta h_w - \xi_w C_{p,w} T \quad (33)$$

e

$$\Delta S_{app} = \Delta S_0^{(\xi_w=0)} + \xi_w \Delta s_w - \xi_w C_{p,w} \ln T \quad (34)$$

MODELLO MOLECOLARE: CLASSE A

I più importanti risultati delle analisi termodinamiche relative ai processi di classe A possono essere così riassunti:

1. il grafico di $\ln K_{app}$ in funzione di $(1/T)$ mostra una curva con un minimo con convessità rivolta verso il basso.

2. la variazione di entalpia ΔH_{app} in funzione della temperatura è rappresentata da una linea retta con una pendenza $\Delta C_{p,A}$ positiva. Se dividiamo $\Delta C_{p,A}$ per $C_{p,w}$, che è la capacità termica isobara molare dell'acqua, otteniamo n_w che rappresenta il numero di molecole d'acqua W_{III} espulse dal solvente per formare una cavità, per ospitare uno specifico soluto ($\Delta C_{p,A} = C_{p,w} n_w$ dove $C_{p,w} = 75.36 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\text{mol}^{-1}$).

3. la variazione di entropia ΔS_{app} in funzione di $\ln T$ è rappresentata da una linea retta con una pendenza $\Delta C_{p,A}$ positiva che è esattamente la stessa di quella ottenuta per l'entalpia. La corrispondenza delle due pendenze implica che n_w sia lo stesso ottenuto sia con le funzioni entalpiche che entropiche.

4. le funzioni entalpiche ed entropiche sono la somma di tre termini, ognuno dei quali corrisponde ad uno specifico passaggio molecolare (interazione soluto-solvente, riempimento della cavità e agitazione termica delle molecole d'acqua W_{III}) con corrispondenti termini in entalpia ed entropia. Perciò la variazione entalpica ΔH_{app} può essere rappresentata dall'equazione (31) e la variazione entropica ΔS_{app} dall'equazione (33).

I riferimenti bibliografici [632-642] riguardano i processi appartenenti a questa classe e da essi sono stati tratti i dati necessari per l'analisi condotta.

Caratteristiche della Classe A

Tutto l'insieme delle funzione termodinamiche per i processi di classe A è riportato in Tab. 42.

$$\Delta H_{app} = \Delta H_0^{(\xi_w=0)} + \xi_w \Delta h_w + \xi_w C_{p,w} T \quad \text{eq(33)}$$

$$\Delta S_{app} = \Delta S_0^{(\xi_w=0)} + \xi_w \Delta s_w + \xi_w C_{p,w} \ln T \quad \text{eq(34)}$$

ENTALPIA					RANGE DI ξ_w
Dissoluz. gas	$\Delta H_{app} = -17.7$	$-21.6 \cdot \xi_w$	$+\xi_w \cdot 0.0754 \cdot T$	$\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	2-6
Dissoluz. liquidi	$\Delta H_{app} = +4.6$	$-23.3 \cdot \xi_w$	$+\xi_w \cdot 0.0754 \cdot T$	$\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	2.7-5.4
Denat. proteine	$\Delta H_{app} = +211.8$	$-22.1 \cdot \xi_w$	$+\xi_w \cdot 0.0754 \cdot T$	$\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	80-140
Proton. anioni carb.	$\Delta H_{app} = +0.1$	$-21.8 \cdot \xi_w$	$+\xi_w \cdot 0.0754 \cdot T$	$\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	1.8-2.3
ENTROPIA					RANGE DI ξ_w
Dissoluz. gas	$\Delta S_{app} = -86.4$	$-445.4 \cdot \xi_w$	$+\xi_w \cdot 75.4 \cdot \ln T$	$\text{J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$	2-6
Dissoluz. liquidi	$\Delta S_{app} = -0.5$	$-447 \cdot \xi_w$	$+\xi_w \cdot 75.4 \cdot \ln T$	$\text{J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$	2.7-5.4
Denat. proteine	$\Delta S_{app} = +415$	$-428.5 \cdot \xi_w$	$+\xi_w \cdot 75.4 \cdot \ln T$	$\text{J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$	80-140
Proton. acidi	$\Delta S_{app} = +104$	$-442.6 \cdot \xi_w$	$+\xi_w \cdot 75.4 \cdot \ln T$	$\text{J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$	1.8-2.3

Tab. 42. Funzioni entalpiche ed entropiche per i processi di classe A

MODELLO MOLECOLARE: CLASSE B

I più importanti risultati delle analisi termodinamiche relative ai processi di classe B possono essere così riassunti:

1. il grafico di $\ln K_{app}$ in funzione di $(1/T)$ mostra una curva con un massimo con convessità rivolta verso l'alto.
2. la variazione di entalpia ΔH_{app} in funzione della temperatura è rappresentata da una linea retta con una pendenza $\Delta C_{p,B}$ negativa. Anche per i processi di classe B il numero n_w può essere calcolato dividendo la pendenza sperimentale $\Delta C_{p,B}$ per $C_{p,w}$ ottenendo dei valori negativi ($n_w < 0$). Perciò è stato introdotto il valore assoluto $\xi_w = |n_w|$, per rappresentare il numero reale di molecole d'acqua W_{III} .
3. la variazione di entropia ΔS_{app} in funzione di $\ln T$ è rappresentata da una linea retta con una pendenza $\Delta C_{p,B}$ negativa che è esattamente la stessa di quella ottenuta per l'entalpia.
4. questi processi implicano una condensazione di molecole d'acqua ξ_w .

Dei processi di classe B è stato da noi studiato direttamente il fenomeno della formazione di micelle attraverso misure di conducibilità condotte sui tensioattivi DeTAB, DTAB, TTAB, CTAB i cui risultati sono riportati nelle Tab. 31-34 e nelle Fig. 89-92 e che hanno portato alla determinazione delle funzioni termodinamiche descritte in Tab. 35 e alla determinazione dei numeri di molecole d'acqua n_w riportati in Tab. 36.

Formazione di micelle

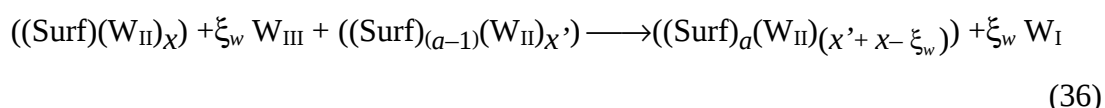
Nella formazione delle micelle l'entalpia apparente risulta essere una funzione di n_w , però con $n_w < 0$. Introducendo il simbolo $\xi_w = |n_w|$, l'entalpia apparente nella formazione di una micella sarà data da

$$\Delta H_{app} = \Delta H_0^{(\xi_w=0)} + \xi_w \Delta h_w - n_w C_{p,w} T = -4.22 + 23.2 \xi_w - \xi_w C_{p,w} T \quad (35)$$

dove ξ_w rappresenta il numero delle molecole d'acqua W_{III} della reazione. Il calore endotermico associato ad ogni molecola d'acqua è $\Delta h_w = 23.1 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \xi_w^{-1}$ e il termine $-\xi_w C_{p,w} T \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ rappresenta il calore rilasciato dalle molecole d'acqua di tipo W_{III} quando si condensano in clusters W_I . Il numero n_w ($n_w < 0$ perché la pendenza $C_{p,w} n_w = \Delta C_p$ è negativa) dipende in questo caso dalla riduzione della cavità. Ciascuna molecola

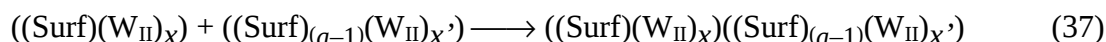
di tensioattivo idrofobico, prima della micellizzazione, è circondata in soluzione da una “tasca” d’acqua $(W_{II})_X$, che forma una gabbia con meccanismo analogo a quello proposto per la dissoluzione dei gas. Quando due porzioni separate, per esempio due catene alifatiche, si uniscono l’una all’altra per formare una micella $((Surf)_a(W_{II}))_{(X'+X-\xi_w)}$ (dove a indica il numero di monomeri già aggregati) le cavità coalescono e la cavità risultante risulterà essere più piccola della somma dei volumi delle cavità componenti (Fig. 123). Quindi le molecole d’acqua W_{III} devono rientrare nella struttura del bulk W_I per riempire l’eccesso di cavità. Secondo questo approccio, lo scambio si riferisce ad una qualunque unità monomerica a e la coalescenza delle cavità ha luogo tra la micella $(a-1)$ con x' unità d’acqua W_{II} , circondata dalla sua cavità, e un monomero aggiunto con la sua cavità. Il numero ξ_w si riferisce all’ultimo monomero aggiunto, quale che sia il numero di aggregazione a .

Il processo totale può essere scritto come



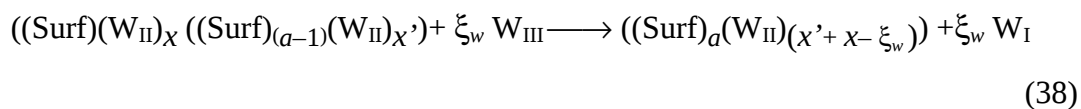
e corrisponde all’entalpia apparente ΔH_{app} (equazione 33).

Il contatto iniziale



corrisponde a $\Delta H_0^{(\xi_w=0)} = -3.6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Questa variazione entalpica molto bassa sta a indicare l’affinità monomero-monomero.

Il successivo passaggio della reazione è



che corrisponde a $\Delta h_w = +23.1/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\xi_w^{-1}$ indicando il calore endotermico necessario per trasformare W_{II} in W_I collocando ciascuna delle molecole $\xi_w W_{III}$ nel bulk per riempire l’eccesso di cavità. Infine, l’entalpia $-\xi_w C_{p,w} T$ indica la quantità di calore rilasciato dalle molecole d’acqua $\xi_w W_{III}$ quando sono ricollocate nel bulk.

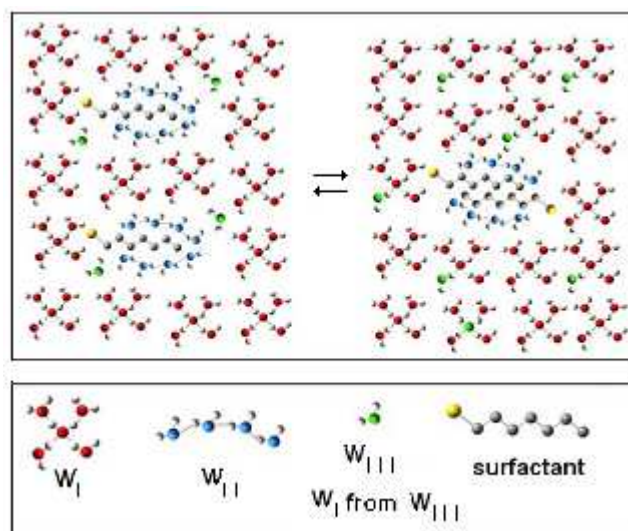


Fig. 123. Equilibrio tra tensioattivo e fase micellare

Per verificare la validità del modello proposto, anche nel caso delle micelle, è stato determinato il cambiamento di energia libera ΔG di formazione delle micelle a diverse temperature. Il parametro termodinamico scelto per monitorare la reazione è la concentrazione micellare critica (*cmc*).

Il cambiamento di energia libera della soluzione è

$$\Delta G = \mu^\theta_{s(micelle)} - \mu^\theta_{s(solut)} - RT \ln[\mathcal{S}] = \Delta G^\theta_{mic} - RT \ln[\mathcal{S}] \quad (39)$$

dove $\mu^\theta_{s(micelle)}$ è il potenziale chimico standard del tensioattivo $\mathcal{S}$ nella pseudofase aggregata, $\mu^\theta_{s(solut)}$ è il potenziale chimico standard del monomero in soluzione, $[\mathcal{S}]$ è la concentrazione del tensioattivo e ΔG^θ_{mic} è l'energia libera standard di formazione delle micelle. Nel punto in cui monomero e aggregato coesistono in equilibrio, quindi $\Delta G = 0$, $[\mathcal{S}] = (cmc)$ l'energia libera standard si ottiene da questa relazione:

$$-\Delta G^\theta_{mic} = RT \ln k_{mic} = -RT \ln (cmc) \quad (40)$$

con $k_{mic} = 1/(cmc)$, dove la (*cmc*) non è soggetta alla legge sull'azione di massa applicabile alle reazioni chimiche. Si può piuttosto parlare di una variazione di fase chimico-fisica. Oppure, nel caso in cui la formazione di micelle sia vista come una reazione di equilibrio, come proposto da Zana [613], l'energia libera di micellizzazione nel caso di tensioattivo ionico convenzionale 1:1 è data da:

$$-\Delta G_{mic}^{\theta} = RT (1 + \beta) \ln(cmc) \quad (41)$$

dove β è il grado di legame del controione. La stessa equazione è ottenuta usando il modello di separazione pseudofase. Per i tensioattivi ionici, l'equazione (40) diventa uguale all'equazione (41). La differenza, comunque, è sostanziale perché l'equazione (41) è soggetta alla legge sull'azione di massa e dunque corrisponde a una reazione chimica. I parametri termodinamici possono essere calcolati con entrambi gli approcci, ma solo i dati calcolati utilizzando il modello di pseudofase sono in accordo con i dati sperimentali, includendo la corrispondenza tra l'entalpia di Van't Hoff e l'entalpia calorimetrica di formazione delle micelle. Secondo il nostro modello è l'affinità supramolecolare che porta alla formazione delle micelle e la dipendenza di ΔG_{mic}^{θ} dalla temperatura è soprattutto dovuta al riempimento, da parte delle molecole d'acqua, del vuoto lasciato nella cavità dall'associazione delle catene idrofobiche ed è scarsamente influenzato dal cambiamento della sfera polare delle micelle. Inoltre, va sottolineato come nella formazione delle micelle non sono le molecole di tensioattivo, bensì quelle d'acqua a giocare il ruolo più importante.

Nel caso di formazione di micelle l'entropia può essere rappresentata dall'equazione

$$\Delta S_{app} = \Delta S_0^{(\xi_w=0)} + \xi_w \Delta S_w - \xi_w C_{p,w} \ln T \quad (42)$$

dove ΔS_{app} corrisponde alla reazione totale dell'equazione (36). Il termine $\Delta S_0^{(\xi_w=0)} = +10.2 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ corrisponde alla reazione dell'equazione (37) e sta a indicare il guadagno entropico da parte del ligando (Surf) quando è legato al recettore (Surf)_(a-1), indipendentemente dalla dimensione del ligando. Il termine $\Delta S_0^{(\xi_w=0)} = +10.2 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ corrispondente all'equazione (18) indica la riduzione della cavità equivalente all'espulsione del volume del solvente quando una molecola d'acqua W_{III} è ricollocata come bulk W_I . Questo guadagno entropico $+428\xi_w/\text{J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ è enorme ed è la quantità termodinamica che guida la reazione. Infine, l'entropia $-\xi_w C_{p,w} \ln T$ indica l'entropia termica rilasciata dalle molecole d'acqua $\xi_w W_{III}$ quando si condensano in fondo alla struttura W_I .

I riferimenti bibliografici [643-646] riguardano gli altri processi appartenenti a questa classe e da essi sono stati tratti i dati necessari per l'analisi condotta.

Caratteristiche della Classe B

Tutto l'insieme delle funzione termodinamiche per i processi di classe B è riportato in Tab. 43.

$$\Delta H_{app} = \Delta H_0^{(\xi_w=0)} + \xi_w \Delta h_w - \xi_w C_{p,w} T \quad \text{eq(43)}$$

$$\Delta S_{app} = \Delta S_0^{(\xi_w=0)} + \xi_w \Delta S_w - \xi_w C_{p,w} \ln T \quad \text{eq(44)}$$

ENTALPIA						RANGE DI ξ_w
Micella	$\Delta H_{app} =$	-4.22	$+23.2 \cdot \xi_w$	$-\xi_w \cdot 75.4 \cdot T$	$\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	4- 19
Bio-complesso	$\Delta H_{app} =$	-120.9	$+24.3 \cdot \xi_w$	$-\xi_w \cdot 75.4 \cdot T$	$\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	19- 189
ENTROPIA						
Micella	$\Delta S_{app} =$	+10.2	$+428 \cdot \xi_w$	$-\xi_w \cdot 75.4 \cdot \ln T$	$\text{J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$	4- 19
Bio-complesso	$\Delta S_{app} =$	+262	$+436.2 \cdot \xi_w$	$-\xi_w \cdot 75.4 \cdot \ln T$	$\text{J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$	19- 189

Tab. 43. Funzioni entalpiche ed entropiche per i processi di classe B

CONFRONTO TRA LE DUE CLASSI

Confrontando le funzioni termodinamiche della classe A con quelle della classe B osserviamo uno stretto collegamento. Infatti le funzioni termodinamiche ΔH_{app} e ΔS_{app} in entrambe le classi possono essere divise in tre termini ognuno dei quali può essere attribuito a uno specifico passaggio della reazione. L'entalpia apparente ΔH_{app} nella dissoluzione dei gas non polari è definita dalla seguente equazione:

$$\Delta H_{app} = \Delta H_0^{(\xi_w=0)} + \xi_w \Delta h_w + \xi_w C_{p,w} T \quad (33)$$

Mentre ΔH_{app} nella formazione delle micelle è dato dalla seguente equazione:

$$\Delta H_{app} = \Delta H_0^{(\xi_w=0)} + \xi_w \Delta h_w - \xi_w C_{p,w} T \quad (43)$$

Il primo termine $\Delta H_0^{(\xi_w=0)} = -17.7 \text{ /kJmol}^{-1}$ per i gas non polari e $\Delta H_0^{(\xi_w=0)} = -3.6/\text{kJmol}^{-1}$ per le micelle sta a indicare l'attrazione esistente tra gas e solvente nel primo caso e tra i monomeri nel secondo caso. Le differenti entità osservate vanno incontro a

tutte le aspettative. Il secondo termine $\xi_w \Delta h_w$ è legato alla formazione della cavità (esotermico) nella classe A ($\Delta H_{cafor} = \xi_w \Delta h_w < 0$) o alla riduzione della cavità (endotermico) nella classe B ($\Delta H_{cared} = \xi_w \Delta h_w > 0$). Nella classe A avviene la seguente reazione ($\xi_w W_I \rightarrow \xi_w W_{II} + \xi_w W_{III} + \text{cavity}$) che corrisponde alla trasformazione dell'acqua da W_I a W_{II} e la creazione di una cavità con espulsione delle molecole d'acqua W_{III} mentre nella classe B avviene la reazione opposta rappresentata dall'espressione ($\xi_w W_{II} + \xi_w W_{III} \rightarrow \xi_w W_I - \text{cavity}$). Vale la pena notare che i valori unitari $\Delta h_w = -21.6 / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \xi_w^{-1}$ nella dissoluzione dei gas e $\Delta h_w = +23.1 / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \xi_w^{-1}$ nella formazione delle micelle sono praticamente uguali, a parte il segno, che è opposto. Questi due processi sono ben rappresentativi delle rispettive classi. Il terzo termine $\pm \xi_w C_{p,w} T / \text{kJmol}^{-1}$ corrisponde al calore assorbito dalle molecole d'acqua $\xi_w W_{III}$ che sono rilassate dalla struttura nella classe A ($+ \xi_w C_{p,w} T$) mentre nella classe B ($- \xi_w C_{p,w} T$) rappresenta la stessa quantità di calore perso dalle molecole d'acqua W_{III} che sono condensate nella struttura del bulk.

Per quanto riguarda l'entropia apparente ΔS_{app} nella dissoluzione dei gas non polari è definita dalla seguente equazione:

$$\Delta S_{app} = \Delta S_0^{(\xi_w=0)} + \xi_w \Delta s_w + \xi_w C_{p,w} \ln T \quad (34)$$

Mentre ΔS_{app} nella formazione delle micelle è dato dalla seguente equazione:

$$\Delta S_{app} = \Delta S_0^{(\xi_w=0)} + \xi_w \Delta s_w - \xi_w C_{p,w} \ln T \quad (44)$$

Nei processi di classe A il primo termine $\Delta S_0^{(\xi_w=0)} = -86.4 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ corrisponde all'energia cinetica persa dalle molecole di gas una volta intrappolate nella gabbia del solvente, mentre nei processi di classe B il primo termine indica un cambiamento positivo di entropia, $\Delta S_0^{(\xi_w=0)} = +10.2 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$, prodotto dalla diluizione del soluto quando scompare dalla soluzione associandosi al resto della micella. Il secondo termine $\xi_w \Delta s_w$ è, analogamente all'entalpia, associato alla formazione della cavità nella classe A ($\Delta S_{cafor} = \xi_w \Delta s_w < 0$) o alla riduzione della cavità nella classe B ($\Delta S_{cared} = \xi_w \Delta s_w > 0$). Anche qui i valori sono molto simili ma di segno opposto: $\Delta s_w = -445 / \text{J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \xi_w^{-1}$ nella classe A e $\Delta s_w = +428 / \text{J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \xi_w^{-1}$ nella classe B. Questa corrispondenza dei valori con segno opposto è un'ulteriore prova della validità del modello molecolare

proposto. Come già visto per l'entalpia, questi due processi sono ben rappresentativi delle rispettive classi. Infine, il terzo termine si riferisce all'entropia termica $\Delta S_{Th} = \xi_w C_{p,w} \ln T / J \cdot K^{-1} \cdot mol^{-1}$ associato con il passaggio di stato delle molecole d'acqua W_{III} e rappresenta nella classe A l'entropia termica guadagnata dalle molecole d'acqua W_{III} quando raggiungono il livello termico appropriato alla temperatura T . Nella classe B, l'entropia termica $\Delta S_{Th} = -\xi_w C_{p,w} \ln T / J \cdot K^{-1} \cdot mol^{-1}$ rappresenta la stessa energia cinetica persa come calore rilasciato dalle molecole d'acqua W_{III} quando sono nuovamente condensate nel bulk.

Questo studio è presentato nelle pubblicazioni:

1. Fiscaro, E.; Compari, C.; Duce, E.; Biemmi, M.; Peroni, M.; Braibanti, A. *Thermodynamics of micelle formation in water, hydrophobic processes and surfactant self-assemblies*, Physical Chemistry Chemical Physics (2008), 10(26), 3903-3914.
2. Fiscaro, E.; Compari, C.; Duce, E.; Biemmi, M.; Peroni, M.; Braibanti, A. *Hydrophobic hydration processes*, Submitted.

INIBITORI DI HIV-1 INTEGRASI

MECCANISMO D'AZIONE DELL'ENZIMA

L'integrasi del virus dell'immunodeficienza umana di tipo I (HIV-1 IN) è un target interessante e consolidato per sviluppare nuovi agenti antiretrovirali [647-655]. Il ruolo fondamentale dell'integrasi nel ciclo di replicazione virale e la mancanza di una controparte umana di questo enzima rendono auspicabile l'aggiunta di IN-inibitori alla terapia antiretrovirale esistente [656-658, 700]. Ci si aspetta che l'uso di IN-inibitori aumenti gli effetti della terapia attraverso una potenziale azione sinergica, senza incrementare gli effetti tossici.

Il processo di integrazione è catalizzato dall'IN attraverso due reazioni distinte: la reazione di 3'-processing e quella di strand transfer [659-661] (Fig. 124). In seguito all'azione della trascrittasi inversa, il cDNA virale viene attivato per l'integrazione nel citoplasma con un cleavage endonucleolitico dell'estremità 3' del DNA virale per mezzo della rimozione degli ultimi due nucleotidi (GT). Questo passaggio è noto come reazione di 3'-processing e genera due estremità CA-3'-idrossilate, che sono gli intermedi reattivi richiesti per lo step successivo, la reazione di strand transfer.

Dopo il 3'-processing, IN rimane legata al cDNA virale come complesso multimerico che si lega ad entrambe le estremità del DNA virale all'interno di particelle intracellulari, chiamate complessi di preintegrazione.

Il complesso di preintegrazione trasloca successivamente nel nucleo, dove IN catalizza l'unione delle estremità processate 3'-OH con il fosfato del DNA all'estremità 5' del cromosoma dell'ospite (reazione di strand transfer). L'integrazione virale è portata a termine con la rimozione di nucleotidi spaiati e dalla riparazione del gap eseguita da enzimi cellulari, conducendo alla formazione di un provirus stabile.

HIV-1 IN appartiene ad una grande famiglia di polinucleotidil trasferasi che include le trasposasi e le polimerasi [662-664] ed è composta da una singola catena polipeptidica di 288 amminoacidi che si ripiega in tre domini funzionali. Il dominio catalitico comprende i residui 51-212 e contiene il motivo D,D(35)E, due aspartati (D64 e D116) ed un glutammato (E152), che sono essenziali per l'attività enzimatica [665, 666]. La conservazione di questa triade catalitica si estende al di là delle integrasi retrovirali, in quanto i retrotrasposoni e qualche trasposasi procariotica possiedono la stessa disposizione dei residui carbossilici essenziali alla catalisi.

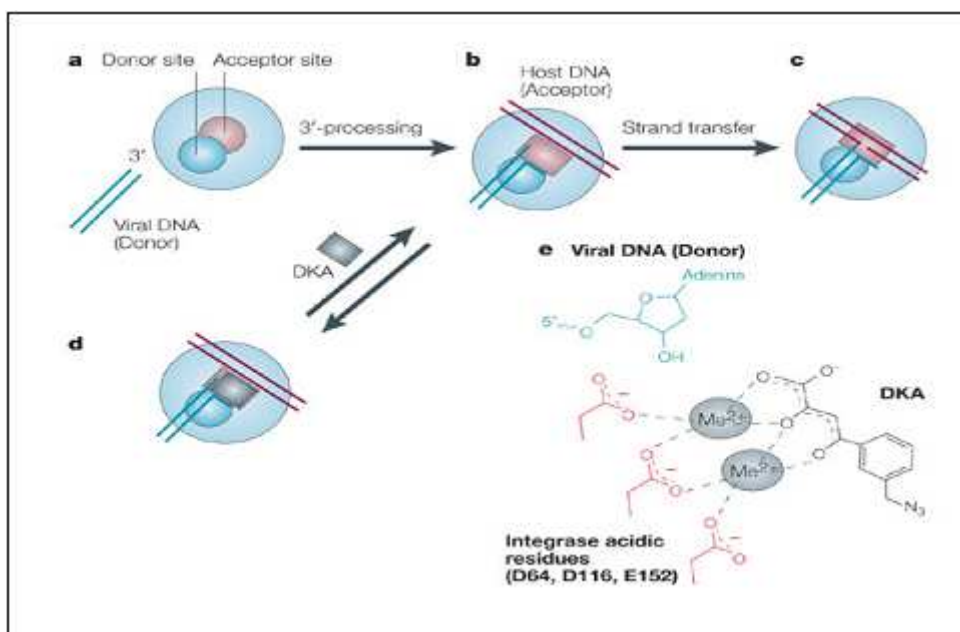


Fig.124. Schema del meccanismo d'azione di HIV-1 integrasi.

Questi residui coordinano gli ioni metallici divalenti come Mg^{2+} o Mn^{2+} , forse con un meccanismo “two-metal-ion”, similmente al altre polimerasi polinucleotidiche [662, 667-669]. Come rivelato dalle strutture a raggi X del dominio catalitico dell'HIV-1 IN, i due residui aspartato (D64 e D116) formano un complesso di coordinazione con Mg^{2+} [666]. È stato proposto che un secondo metallo possa essere coordinato verosimilmente da E152 (con anche D64 e D116) una volta che HIV-1 IN si lega al suo substrato di DNA [670, 671]. Inoltre, è stato ipotizzato che non è necessaria la costante presenza dei due ioni metallici nel sito attivo dell'integrasi durante l'intera reazione enzimatica. In quest'ottica, il primo ione metallico, legato ai due aspartati, potrebbe giocare un ruolo fondamentale nella reazione di 3'-processing, mentre il secondo, legato prevalentemente al glutammato, potrebbe essere più di rilievo nella reazione di strand transfer [672, 673]. È quindi probabile che i cofattori metallici coordinino IN con la struttura fosfodiesterica del DNA substrato durante i passaggi di 3'-processing e di strand transfer. Nella maggior parte delle strutture, il dominio catalitico contiene un loop, comprendente i residui 141-150, che può essere stabilizzato dal DNA [658].

GLI INIBITORI DI HIV-1 INTEGRASI: I β -DICHETO ACIDI

In passato, moltissimi composti con diverse caratteristiche strutturali sono stati descritti come inibitori dell'IN [658, 674-678]. La maggior parte di loro inibisce sia l'enzima virale che la replicazione virale in colture cellulari ed in modelli animali. La

classe dei composti con una porzione β -dicheto acida (di cui gli esempi più significativi sono riportati in Fig. 125), scoperta indipendentemente dagli scienziati della Shionogi & Co. e della Merck, è subito emersa come la più promettente nell'inibizione di HIV-1 IN [679].

I β -dicheto acidi comprendono tre componenti strutturali (Fig. 126): a) una porzione β -dichetonica, b) una porzione aromatica o eteroaromatica; c) un gruppo carbossilico, che può essere rimpiazzato anche da altre funzioni bioisosteriche.

I β -dicheto acidi ed i loro congeneri rappresentano non solo la classe più importante di inibitori dell'IN, ma anche un prototipo consolidato di chelanti metallici.

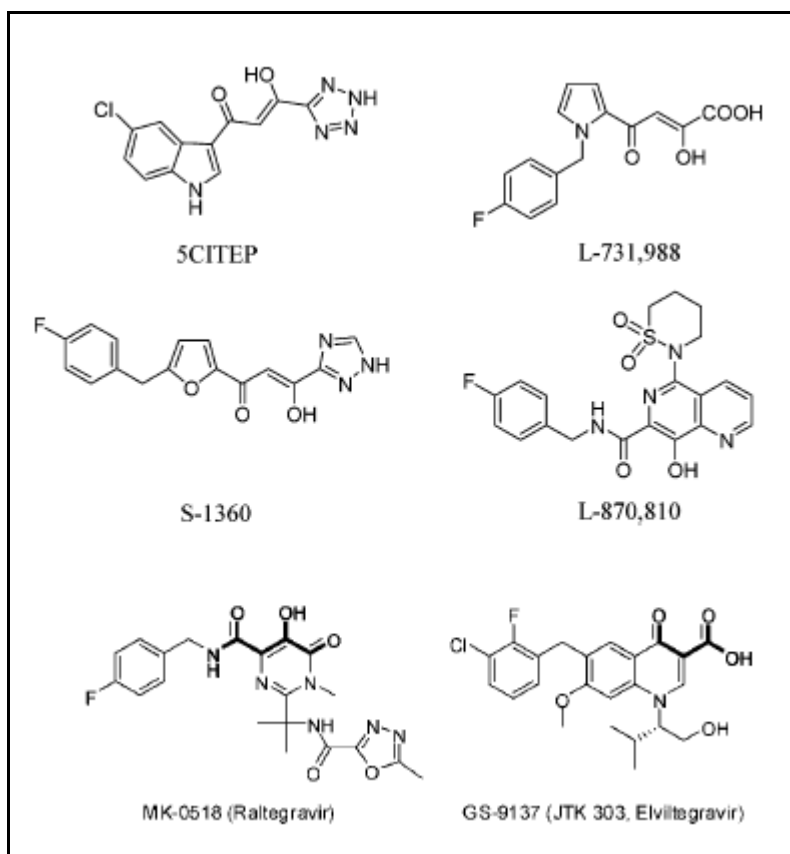


Fig. 125. β -dicheto acidi (o loro bioisosteri) più importanti.

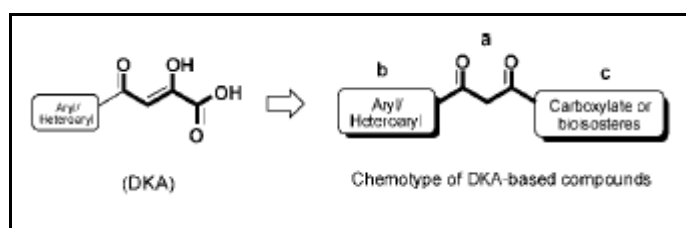


Fig. 126. Parti strutturali dei β -dicheto acidi.

Un bioisostero dei dicheto acidi, 5CITEP, è stato successivamente cocristallizzato con l'enzima, fornendo così la prima struttura a raggi X di un inibitore all'interno del complesso con HIV-1 IN [680]. Altri membri della famiglia dei dicheto acidi, come L-731,988, sono stati estesamente studiati [681-686]. Parecchi congeneri dei dicheto acidi inibiscono selettivamente la reazione di strand transfer e, in saggi su colture cellulari, inibiscono l'integrazione senza coinvolgere le fasi iniziali del ciclo replicativo dell'HIV [681-687]. Dei quattro composti che sono riusciti ad arrivare ai clinical trials, S-1360 [688, 689], L-870,810 [690, 691], GS-9137 e MK-0518, solo quest'ultimo è stato commercializzato con il nome di Raltegravir [692-694]. Della terza molecola è attesa a breve l'immissione sul mercato con il nome di Elvitegravir [695, 696]. Del primo e del secondo composto è stato bloccato lo sviluppo per problemi farmacocinetici [697]. Sebbene per i dicheto acidi siano stati riportati diversi studi sintetici e biologici, il meccanismo con cui essi si legano all'IN non è stato ancora pienamente compreso. Si ritiene che il motivo farmacoforico β -dicheto acido possa essere coinvolto in un sequestro funzionale di uno o di entrambi gli ioni metallici divalenti (Fig. 127) per formare un complesso ligando- M^{2+} -IN [670, 698, 699]. Di conseguenza questo bloccherebbe lo stato di transizione del complesso IN-DNA [658, 687] attraverso la competizione con il DNA substrato, agendo da "inibitore interfacciale" [655, 687]. È quindi evidente come sia di grande importanza acquisire informazioni sul meccanismo d'azione dei dicheto acidi, che potrebbe rivelarsi utile nella progettazione di nuovi inibitori dell'IN.

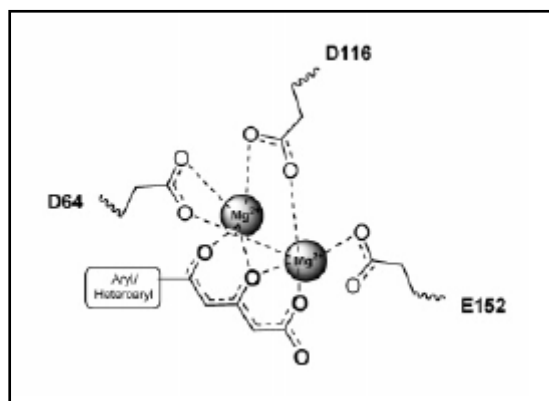


Fig. 127. Ruolo dei β -dicheto acidi nel sito attivo dell'enzima.

APPROCCIO DI STUDIO

In uno studio precedente [701], si è proposta una serie di complessi metallici dei β -dicheto acidi come nuovi prototipi di inibitori dell'IN: è stata sintetizzata una serie di complessi usando i ligandi H_2L^1 (**1**) (acido (2Z)-2-idrossi-4-osso-4-fenilbut-2-enoico) e H_2L^2 (**2**) (acido (2Z)-4-[1-(4-fluorobenzil)-1*H*-pirrol-2-il]-2-idrossi-4-ossobut-2-enoico) (Fig. 43) ed i loro esteri metilici assieme ad un set di ioni metallici divalenti (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+}). Complessi con diverse stechiometrie sono stati dapprima isolati, pienamente caratterizzati e poi testati per l'inibizione dell'IN. Questi complessi hanno inibito HIV-1 IN in un range da micromolare a nanomolare. In particolare, hanno mostrato una certa dipendenza dal metallo (soprattutto il complesso tra il Co^{2+} e il ligando H_2L^1 , che ha mostrato il miglior profilo biologico). Questi risultati hanno dato l'impulso per condurre una serie di studi di docking. Inizialmente il docking è stato condotto sui ligandi H_2L^1 e H_2L^2 ed i loro esteri metilici (nella forma monodeprotonata e bideprotonata) nel sito attivo dell'IN contenente lo ione Mg^{2+} .

Successivamente il docking è stato fatto sugli stessi composti come complessi di Mg^{2+} e Co^{2+} nel sito attivo, con e senza rimozione dello ione Mg^{2+} . I risultati dei vari docking sono stati poi confrontati.

Il set dei complessi metallici dei ligandi H_2L^1 e H_2L^2 è stato ampliato con la sintesi dei derivati al Pd^{2+} e Pt^{2+} e di due nuovi complessi con Mg^{2+} , uno dei quali, contenente $Mg(NO_3)_2$, ha mostrato un'attività inibitoria in un range submicromolare. La struttura di questo composto è stata risolta con cristallografia a raggi X a singolo cristallo.

Per caratterizzare meglio l'abilità di complessazione dei β -dicheto acidi, abbiamo condotto una serie di misure potenziometriche per determinare le costanti di equilibrio tra H_2L^1 e H_2L^2 con Mn^{2+} e Ca^{2+} . Sebbene Mg^{2+} sia un cofattore più verosimile per il funzionamento di IN nelle cellule (a causa della sua abbondanza rispetto a Mn^{2+}), IN preferisce Mn^{2+} in vitro. Ca^{2+} è uno ione fisiologicamente significativo, con una chimica di coordinazione simile a quella del Mg^{2+} .

STUDIO POTENZIOMETRICO

Lo studio potenziometrico sul comportamento delle soluzioni dei composti H_2L^1 e H_2L^2 è stato condotto con gli ioni Ca^{2+} e Mn^{2+} (Fig. 128 e Tab. 44). Per evitare problemi di solubilità, tutte le titolazioni sono state condotte in soluzione metanolo/acqua (9:1 v/v). Il miglior fit delle curve sperimentali è stato ottenuto usando il set di specie

riportato in Tab. 44. Le specie trovate in soluzione con il Mn^{2+} [H_2L ligando diprotico, ML_2^{2-} , M_2L^{2+} , M_2L_2 , e $\text{M}_2\text{L}_2(\text{OH})^-$] sono le stesse trovate per il Mg^{2+} [701], ma le costanti di formazione e mostrano una maggiore stabilità rispetto a quelle dei complessi con il Mg^{2+} . Le specie ML_2^{2-} e $\text{M}_2\text{L}_2(\text{OH})^-$ non sono state trovate per il Ca^{2+} : in soluzione alcalina è presente solo Ca_2L_2 . Come mostrato dai diagrammi di distribuzione in Fig. 128a-d, a pH fisiologico, la specie M_2L_2 è la più abbondante per entrambi i ligandi e gli ioni metallici. M_2L^{2+} si forma a pH più acido. La costanti di formazione della specie monomerica, ML , e della dimerica, M_2L_2 , non possono essere raffinate insieme, probabilmente a causa della loro alta correlazione matematica. Come già osservato nel rif. [701], con il solo utilizzo della potenziometria non possiamo escludere completamente la presenza in soluzione della specie monomerica, poiché il modello con ML invece di M_2L_2 è solo leggermente sfavorito. La ragione della nostra scelta è dovuta, oltre a valori statistici lievemente migliori, al fatto che M_2L_2 è anche supportato da dati spettroscopici e di molecular modeling.

	<i>p</i>	<i>q</i>	<i>r</i>	M = Ca(II)		M = Mn(II)		M = Mg(II) ^b	
				H_2L^1	H_2L^2	H_2L^1	H_2L^2	H_2L^1	H_2L^2
$\text{M} + 2 \text{L} \rightleftharpoons \text{ML}_2$	1	2	0			11.58(0.29)	13.41(0.35)	8.81(0.30)	12.45(0.26)
$2 \text{M} + \text{L} \rightleftharpoons \text{M}_2\text{L}$	2	1	0	10.42(0.06)	11.24(0.11)	10.12(0.26)	12.16(0.15)	9.43(0.17)	10.46(0.16)
$2 \text{M} + 2 \text{L} \rightleftharpoons \text{M}_2\text{L}_2$	2	2	0	18.27(0.05)	19.26(0.11)	17.85(0.16)	20.92(0.17)	14.14(0.25)	17.99(0.10)
$2 \text{M} + 2 \text{L} + \text{OH} \rightleftharpoons \text{M}_2\text{L}_2(\text{OH})$	2	2	-1			8.46(0.16)	11.62(0.17)	3.89(0.18)	7.80(0.10)
	<i>p</i>	<i>q</i>	<i>r</i>	H_2L^{1b}		H_2L^{2b}			
$\text{L} + \text{H} \rightleftharpoons \text{LH}$	0	1	1	9.89(0.02)		11.66(0.03)			
$\text{L} + 2\text{H} \rightleftharpoons \text{LH}_2$	0	1	2	13.70(0.04)		15.91(0.06)			

Tab. 44. Costanti di protonazione di H_2L^1 e H_2L^2 e di formazione dei complessi tra questi due composti ed i cationi metallici divalenti Ca^{2+} e Mn^{2+} . Per completezza sono riportate anche le costanti di formazione ottenute con Mg^{2+} [701].

Nel caso del Mn^{2+} , è stato introdotto anche ML_2^{2-} , formato dalla coordinazione degli ossigeni del 2-enolato e del carbossilato con lo ione metallico (Fig. 128c-d), mentre la specie con il ligando monoprotonato, HL^- , è stata scartata dal software. $\text{ML}(\text{OH})^-$, o il suo dimero $\text{M}_2\text{L}_2(\text{OH})_2^-$, aumentano leggermente i parametri statistici del fitting ma, ammesso che si formino, si formano solo a pH molto alcalino (Fig. 128a-b). Le curve sperimentale e calcolata si sovrappongono perfettamente per le titolazioni condotte ai rapporti M:L 1:2 e 1:4 per tutte le coppie metallo: ligando esaminate. Il fit leggermente peggiore per il rapporto M:L 1:1 può essere spiegato attraverso un'idrolisi parziale del

catione, non evitata dalla bassa quantità di ligando in soluzione. Infatti, in questo caso, i punti della titolazione raggiungono l'equilibrio molto lentamente a pH intermedio.

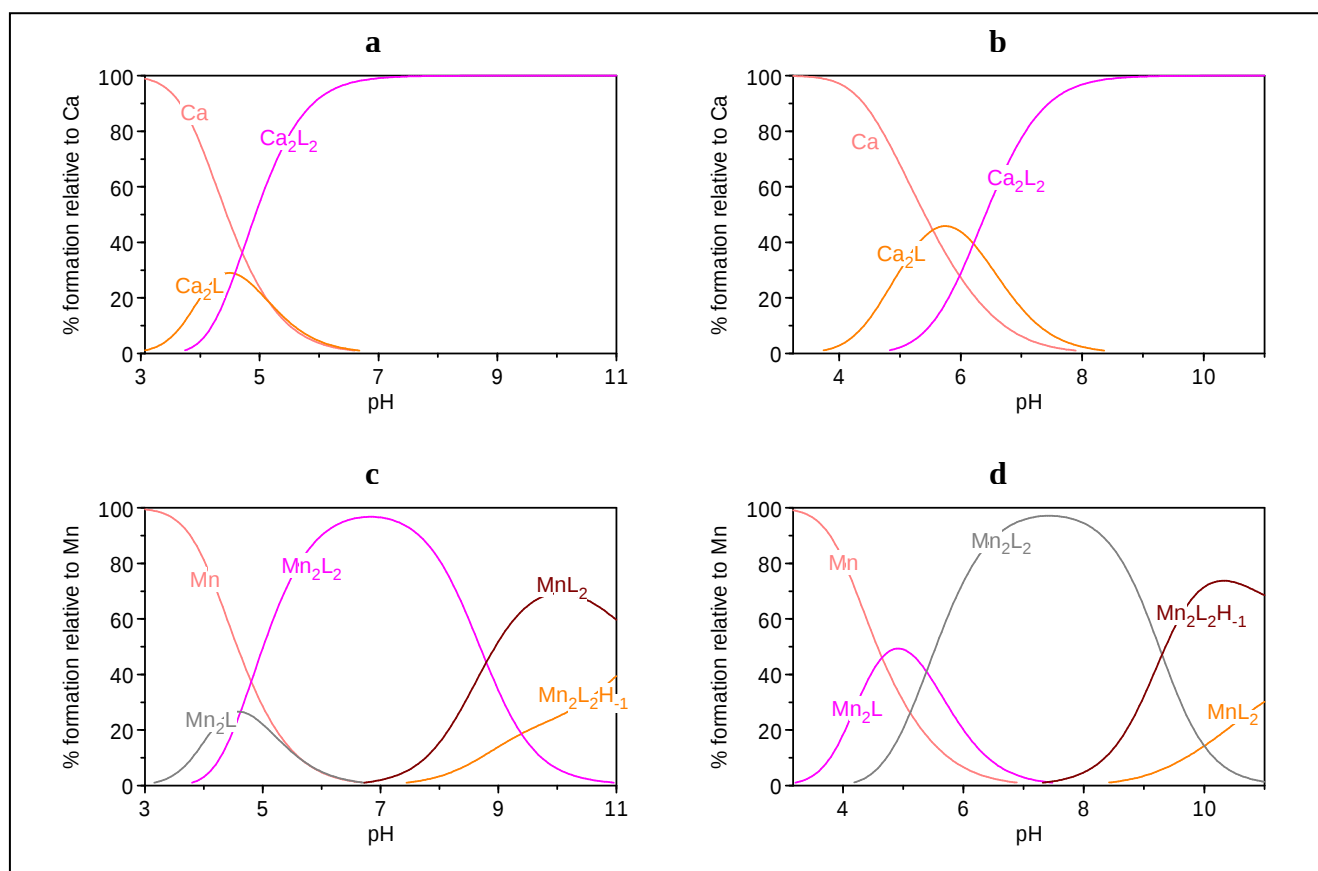


Fig. 128. Diagrammi di distribuzione dei complessi ligando-metallo ai rapporti L:M = 2:1 (la concentrazione del ligando è 4 mM). a) L = H_2L^1 , M = Ca^{2+} ; b) L = H_2L^2 , M = Ca^{2+} ; c) L = H_2L^1 , M = Mn^{2+} ; d) L = H_2L^2 , M = Mn^{2+} .

COME SI LEGANO GLI INIBITORI NEL SITO ATTIVO DELL'INTEGRASI?

Benché l'esatto meccanismo d'azione degli inibitori dell'IN non sia ancora stato chiarito, si ritiene che la maggior parte degli inibitori specifici dell'IN interferiscano con gli ioni metallici nel sito attivo dell'enzima. La chelazione del metallo nel sito catalitico può essere così sfruttata per progettare nuovi inibitori con una più alta selettività verso l'IN [699]. Ovviamente si potrà ottenere una maggiore comprensione quando sarà disponibile una struttura cristallina dell'enzima complessato con il DNA substrato.

È generalmente accettato che il Mg^{2+} sia il cofattore più probabile per l'integrazione nelle cellule, data la sua abbondanza un milione di volte superiore al Mn^{2+} , anche se l'attività dell'enzima purificato è più alta con Mn^{2+} rispetto a Mg^{2+} .

Nella progettazione di ligandi selettivi che interagiscono con questi ioni metallici, è necessario fare considerazioni strutturali e sulle caratteristiche elettroniche dei centri donatori del ligando. In particolare, Mg^{2+} preferisce una coordinazione ottaedrica, ma l'ingombro sterico dei ligandi polidentati potrebbe impedire la coordinazione. Mn^{2+} forma in prevalenza composti ottaedrici ad alto spin ed ha una sfera di coordinazione più flessibile di quella del più piccolo Mg^{2+} . Sebbene Mn^{2+} possa rimpiazzare funzionalmente Mg^{2+} nel suo ruolo catalitico e strutturale, le diverse caratteristiche elettroniche e geometriche dei due ioni possono spiegare i differenti comportamenti osservati nelle diverse condizioni dei saggi enzimatici, così come le diverse attività degli inibitori con frammenti farmacoforici bioisosteri. È quindi importante investigare la capacità di complessazione del farmacoforo dicheto acido. Nel nostro studio è particolarmente interessante notare che parecchie specie [ML_2^{2-} , M_2L^{2+} , M_2L_2 , e $\text{M}_2\text{L}_2(\text{OH})^-$] sono state trovate per il Mn^{2+} in soluzione attraverso titolazioni potenziometriche. Queste specie erano le stesse per Mg^{2+} [701], ma con una stabilità maggiore. Nel caso del Mg^{2+} , le specie M_2L_2 erano predominanti a pH fisiologico per entrambi i ligandi H_2L^1 e H_2L^2 . L'alta affinità per il Mn^{2+} mostrata dai β -dicheto acidi potrebbe in parte spiegare perché molti inibitori che erano stati identificati con uno screening che prevedeva Mn^{2+} come cofattore siano inattivi in presenza di Mg^{2+} . Inoltre, le specie M_2L_2 sono risultate predominanti a pH fisiologico per il Ca^{2+} , con costanti di formazione confrontabili con quelle del complesso con Mn^{2+} . Tuttavia, titolando H_2L^1 , si è osservata la presenza di una piccola quantità (~10%) di ML_2 a pH fisiologico. La titolazione del complesso con Ca^{2+} è stata eseguita sia per ampliare la valutazione della capacità di complessazione di questi composti, sia per studiare l'affinità dei β -dicheto acidi nei confronti di altri ioni metallici fisiologicamente importanti.

Un altro punto importante da chiarire è in quale step della sequenza catalitica agiscano i β -dicheto acidi. Questo è un aspetto importante per il design di nuovi inibitori, in quanto i ligandi liberi o i complessi possono interagire con uno o due metalli, sia direttamente in un singolo passaggio che in maniera sequenziale. In realtà, qualche β -dicheto acido ha un'attività inibitoria verso lo step di 3'-processing ma a più alte concentrazioni rispetto allo strand transfer. Quindi essi si possono legare prima del 3'-processing (per esempio ad un Mg^{2+}) e poi interagire con l'altro metallo quando esso è mantenuto nel sito attivo. Oppure, si possono legare indipendentemente e non sequenzialmente in entrambi gli step in modo più o meno forte, a seconda della disponibilità di uno o di ambedue gli ioni metallici. La selettività mostrata dai β -dicheto

acidi per la reazione di strand transfer potrebbe quindi essere spiegata dal fatto che gli inibitori necessitano di entrambi gli ioni metallici per legarsi fortemente e che il secondo metallo si lega solo in presenza del DNA substrato. In realtà, in seguito a studi cristallografici, solo un Mg^{2+} è stato trovato nel sito attivo [702, 703], ma la presenza del DNA virale potrebbe essere critica per il legame del secondo metallo. Questa è una rappresentazione più realistica delle condizioni fisiologiche. L'assenza di questo secondo ione metallico nelle strutture cristalline fa ipotizzare che lo ione metallico sia legato al substrato (i. e. il DNA). Considerando i β -dicheto acidi come inibitori competitivi di questo substrato, l'ipotesi che i β -dicheto acidi agiscano sotto forma di complessi metallici è in buon accordo con questa idea.

Siccome abbiamo dimostrato la formazione di complessi da parte dei β -dicheto acidi in soluzione, i nostri studi si orientano verso l'ipotesi che questi composti possano formare immediatamente complessi in studi enzimatici in vitro e in presenza di ioni metallici divalenti nello spazio intracellulare in vivo. In base a questa idea, i β -dicheto acidi e i loro complessi metallici possono agire da inibitori interfacciali, sia con un unico meccanismo, sia interferendo con l'IN ed il DNA accettore (virale). In questo modo possono bloccare la reazione di strand transfer, come detto precedentemente. Questa interferenza con l'enzima potrebbe essere dovuta ai seguenti meccanismi: a) il complesso si lega così com'è all'IN, trattiene i suoi ioni metallici ed occupa il sito di legame come una singola entità "statica" o b) in seguito al legame con IN, avviene uno scambio dinamico degli ioni metallici, e il ligando rilascia i suoi metalli complessati e forma un complesso con gli ioni metallici nel sito di legame. Gli studi di modellismo molecolare sembrano supportare l'ipotesi che i β -dicheto acidi stessi possano agire da complessi, o formare un complesso stabile con gli ioni metallici nel sito attivo. In realtà, i complessi hanno mostrato una migliore energia di docking rispetto al ligando libero ed un'accomodazione più favorevole nel sito attivo, specialmente se considerati nella forma monomerica. In assenza di una struttura del cocristallo, il modello del meccanismo di inibizione "two-metal binding" può essere ragionevolmente esteso alla famiglia dei β -dicheto acidi.

Lo studio dei β -dicheto acidi inibitori di HIV-1 integrasi è presentato nella pubblicazione:

Bacchi, Alessia; Biemmi, Mariano; Carcelli, Mauro; Carta, Fabrizio; Compari, Carlotta; Fisicaro, Emilia; Rogolino, Dominga; Sechi, Mario; Sippel, Martin; Sottriffer, Christoph A.; Sanchez, Tino W.; Neamati, Nouri. *From Ligand to Complexes. Part 2. Remarks on Human Immunodeficiency Virus type 1 Integrase Inhibition by β -Diketo Acid Metal Complexes*, Journal of Medicinal Chemistry (2008), 51(22), 7253-7264.

CONCLUSIONI

TENSIOATTIVI CATIONICI COME VETTORI NON-VIRALI IN TERAPIA GENICA

Il risultato più importante ottenuto in questi anni di tesi è certamente quello di aver posto in rilievo il ruolo fondamentale della conformazione del lipide nel processo di trasfezione. Nella letteratura precedente è infatti possibile trovare informazioni circa l'effetto di ciascun singolo componente della molecola (le teste polari, le code alchiliche, il linker, lo spaziatore) sulle proprietà trasfettive (l'effetto della “struttura primaria” del vettore) e non esistono dati sull'influenza della conformazione della molecola in soluzione (la “struttura secondaria”). L'effetto della struttura secondaria è importante soprattutto per i tensioattivi gemini, che hanno la caratteristica di modificare la loro conformazione in funzione della lunghezza dello spaziatore.

Il lavoro svolto ha permesso di evidenziare come la particolare configurazione che il lipide assume in soluzione sia in grado di influenzare non solo proprietà come quelle termodinamiche o tensidiche, ma anche la modalità di delivery.

Più in particolare, oltre all'effetto di allungamento della catena alchilica, si è cercato di determinare il contributo di gruppo per le proprietà termodinamiche dei possibili sostituenti legati alla testa polare di tensioattivi cationici monomerici e quello della variazione della lunghezza dello spacer tra le teste polari dei tensioattivi gemini, aspetto riguardo al quale sono ancora scarsi i dati presenti in letteratura.

Le misure effettuate sui tensioattivi glucocationici monomerici e in particolare il confronto tra C_nAGCB e C_nDGCB ha permesso di quantificare l'influenza dell'acetilazione dei gruppi -OH dello zucchero sul processo di micellizzazione: la presenza degli acetili, come atteso, aumenta l'idrofobicità della molecola, abbassando così il valore delle cmc e di ΔH_m .

Confrontando $C_{12}AGCB$ e $C_{12}DGCB$ con DEDAB e DTAB si è potuto ricavare il volume dei gruppi 2, 3, 4, 6, -tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosile, (β -D-glucopiranosil)etile e β -D-glucopiranosile.

Per quanto riguarda l'interazione con le membrane artificiali di DPPC, sembra che il gruppo -OH dello zucchero disacetilato formi legami ad idrogeno con l'atomo d'ossigeno dei fosfati dei lipidi causando la perdita d'impaccamento del doppio strato e lo spostamento della transizione da doppio strato in fase gel a doppio strato in fase liquida-cristallina a temperature più basse. L'acetilazione presente sul $C_{16}AGCB$, invece, impedisce la formazione di questi legami e nell'interazione diventa

fondamentale il coinvolgimento delle molecole d'acqua; tuttavia esso è in grado di provocare cambiamenti più significativi nella membrana, in presenza di acqua, suggerendo la formazione di domini. Il saggio EMSA evidenzia come né i composti acetilati, né quelli disacetilati siano in grado di dare un'interazione significativa con il DNA, fatta eccezione per entrambi i composti a sedici atomi di carbonio ad alte concentrazioni.

Il saggio di trasfezione transiente però dimostra che solo il C₁₆AGCB riesce a trasfettare le cellule, anche se con scarsi risultati e solo in presenza del DOPE in rapporto 1:2. Questi risultati sono confermati dalle immagini AFM, dove appunto è evidente che l'effetto dei C₁₆AGCB e C₁₆DGCB sul DNA è assolutamente trascurabile e solo la presenza del DOPE riesce ad indurre una parziale compattazione nel caso del composto acetilato.

Questo fatto però potrebbe giustificare il risultato, seppur minimo, ottenuto da questo tensioattivo nella trasfezione.

Il risultato più rilevante riguarda però il particolare comportamento evidenziato dall'altra classe di lipidi analizzata: i gemini dipiridinici. Infatti, per i 12-Py(2)-n-(2)Py-12 MS/Cl, l'andamento delle curve entalpiche non rientra nel comportamento standard dei tensioattivi ionici. In tutte e due le serie, indipendentemente dal controione, si osserva l'inversione della curva del composto con spaziatore a quattro atomi di carbonio che si posiziona al di sopra di quello con spaziatore a tre. Questo comportamento inusuale non ha consentito di calcolare il contributo di gruppo del -CH₂- quando questo viene aggiunto allo spacer. L'ipotesi proposta per spiegare i risultati ottenuti presuppone l'instaurarsi d'interazioni tipo stacking tra le teste polari della molecola, mediate dai controioni, che consentono alla struttura di ripiegarsi su se stessa in una conformazione a "libro".

Lo stesso comportamento anomalo è visibile negli andamenti delle tensioni superficiali delle serie 12-Py(2)-4-(2)Py-12 MS e 16-Py(2)-n-(2)Py-16 Cl e il valore di A_{min} del composto con spacer a quattro, più basso rispetto agli altri composti, confermerebbe l'ipotesi proposta poichè suggerisce una certa tendenza della molecola a ripiegarsi.

Per quanto riguarda le immagini AFM, sia i composti con catena alchilica a dodici che a sedici atomi di carbonio sono in grado di interagire con il DNA. Il composto più efficiente per la compattazione è risultato essere il 16-Py(2)-4-(2)Py-16 Cl, che è attivo già ad un rapporto DNA/lipide di 1:3000; tuttavia anche i composti 12-Py(2)-4-(2)Py-12

Cl e 12-Py(2)-8-(2)Py-12 Cl sono in grado di compattare completamente il lipide ad un rapporto 1:6000. Il saggio EMSA effettuato sui 16-Py(2)-n-(2)Py-16 Cl ha confermato la loro capacità di legare il DNA.

Infine, il saggio di trasfezione transiente ha dimostrato l'efficacia trasfettiva del composto 16-Py(2)-4-(2)Py-16 Cl, con cui sono stati ottenuti ottimi risultati sia in assenza che in presenza del colipide DOPE (soprattutto in rapporto lipide/DOPE 1:2), che ne aumenta l'efficienza fino ad arrivare a risultati comparabili con quelli dell'agente trasfettante commerciale di riferimento GenePorter. Anche il composto 16-Py(2)-8-(2)Py-16 Cl ha dato qualche risultato, ma solo in presenza del lipide helper e in rapporto lipide/DOPE 1:1.

Il buoni risultati ottenuti con il gemini 16-Py(2)-4-(2)Py-16 Cl sono stati correlati alla particolare conformazione che il lipide assumerebbe in soluzione, come già proposto per i tensioattivi bis- C_n BEC, e al fatto che la lunghezza dello spaziatore consenta alla molecola di ripiegarsi su se stessa e quindi di interagire con i fosfati carichi negativamente del DNA in modo da facilitarne la compattazione. Nei composti con spaziatore più lungo (per esempio 12 atomi di carbonio), infatti, le teste polari andrebbero ad interagire con il doppio filamento in punti distanti l'uno dall'altro rendendo più difficile la compattazione; con spaziatori più corti (per esempio tre atomi di carbonio), invece, le teste polari si troverebbero troppo vicine per dare un'interazione efficace, soprattutto a basse concentrazioni. Bisogna però sottolineare anche l'importanza della concomitante presenza sia della catena alchilica a sedici atomi di carbonio, sia dello spaziatore a quattro. Infatti, il composto analogo, ma con catena alchilica più corta (12-Py(2)-4-(2)Py-12 Cl), ha bisogno di una concentrazione maggiore per condensare completamente il DNA, mentre a parità di catena laterale (16-Py(2)-n-(2)Py-16 Cl), il composto con spacer a quattro è l'unico della serie che ha dato un risultato significativo nel saggio di trasfezione transiente, anche senza il colipide. Anche se non sono disponibili i dati di trasfezione dei 12-Py(2)-n-(2)Py-12 Cl, il fatto che, seppur a concentrazioni più elevate, tutti i gemini dipiridinici con catena alchilica a dodici carboni sono in grado di compattare il DNA, fa supporre che la conformazione particolare del composto con spaziatore a quattro possa influire anche su altri step della trasfezione come la fuoriuscita dall'endosoma o il rilascio del plasmide dal complesso.

Per quanto riguarda invece il ruolo del DOPE, mentre per i tensioattivi glucocationici andava ad agire anche a livello della compattazione, come dimostrato dalle immagini AFM, nel caso dei gemini 16-Py(2)-4-(2)Py-16 Cl non sembrerebbe avere nessun

effetto di rilievo, l'incremento della trasfezione quindi è da correlare alle sue proprietà fusogeniche.

Il confronto tra le classi dei glucocationici e dei gemini conferma l'effetto favorevole della presenza di due cariche positive sulla molecola che, come è noto, consentono una migliore compattazione del DNA. Inoltre, in entrambi i casi la catena alchilica a sedici atomi di carbonio si è dimostrata essere la più efficace.

In conclusione, risulta evidente come la struttura e la conseguente conformazione che il lipide assume, da solo o associato ad un colipide, sia un fattore fondamentale per permettere un'interazione efficace con il DNA, evento che rappresenta il punto base di partenza per la trasfezione cellulare e di conseguenza per avere un vettore non-virale di successo.

PROCESSI DI IDRATAZIONE IDROFOBICA

L'applicazione del modello termodinamico-statistico – messo a punto dal gruppo di ricerca presso cui ho svolto il Dottorato – allo studio della formazione delle micelle da parte di tensioattivi cationici ha evidenziato come i suoi componenti si avvicinino l'uno all'altro creando una cavità attorno alle unità associate che risulta essere più piccola della somma delle cavità che circondavano i singoli componenti separati. L'aumento di entropia, dovuto al riempimento di parte della cavità ed uguale all'incremento di volume del solvente, è la driving force dell'interazione idrofobica. Nel nostro modello questo aumento di entropia è attribuito alla “riduzione della cavità” all'interfaccia, con conseguente ristrutturazione delle molecole d'acqua ed espansione del volume del solvente.

Il numero di molecole d'acqua (n_w) coinvolte nel processo di micellizzazione è negativo poiché esse devono riempire lo spazio vuoto lasciato dalla riduzione di volume della cavità che circonda il soluto ed è proporzionale alle sue dimensioni.

Il numero di molecole d'acqua coinvolte nel processo di idratazione idrofobica consente di suddividere i processi in due classi: Quindi abbiamo classificato i processi idrofobici come:

- CLASSE A: (dissoluzione in acqua di gas non polari, dissoluzione in acqua di liquidi non polari, denaturazione delle proteine, protonazione di anioni carbossilato) caso in cui

n_w è positivo ($n_w > 0$). Questo implica che un numero n_w di molecole d'acqua W_{III} vengano rilasciate dalla struttura (acqua tipo W_I) per formare una cavità.

- CLASSE B: (formazione di micelle in acqua, formazione di un complesso tra un substrato e una proteina, effetto di un sostituito polare sulla capacità termica, effetto di un sostituito carico sul solvente, associazione idrofobica) caso in cui n_w è negativo ($n_w < 0$). Questo implica che un numero n_w di molecole d'acqua W_{III} ritornino nella struttura (acqua tipo W_I) per riempire l'eccesso di cavità che si forma.

INIBITORI DI HIV-1 INTEGRASI

Attraverso lo studio potenziometrico è stata indagata la distribuzione in soluzione dei complessi formati da due β -dicheto acidi (una promettente classe di inibitori dell'enzima HIV-1 integrasi) con gli ioni Mn^{2+} e Ca^{2+} . È interessante notare che per queste due molecole (H_2L^1 e H_2L^2) sono state trovate parecchie specie [ML_2^{2-} , M_2L^{2+} , M_2L_2 , e $M_2L_2(OH)^-$] per la complessazione con Mn^{2+} in soluzione. Queste specie sono le stesse che erano state trovate per Mg^{2+} , ma con una stabilità maggiore. Inoltre, titolando H_2L^1 , a pH fisiologico si è osservata la presenza di una piccola quantità (~10%) di ML_2 .

Per il Ca^{2+} , altro ione metallico fisiologicamente importante che ha permesso di ampliare la valutazione della capacità di complessazione di questi composti, a pH fisiologico sono risultate predominanti le specie M_2L_2 , con costanti di formazione confrontabili con quelle del complesso con Mn^{2+} .

BIBLIOGRAFIA

- [1] Verma IM, Somina M. *Nature* 1997;389:239-242.
- [2] Anderson WF. *Nature* 1998;392:25-30.
- [3] Yla-Herttuala S, Martin JE. *Lancet* 2000;355:213-222.
- [4] <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/>
- [5] Hollon T. *Nature Med* 2000;6:6
- [6] Schroder AR, et al. *Cell* 2002;110:521-529.
- [7] Woods NB, et al. *Blood* 2003;101:1284-1289.
- [8] Li Z, et al. *Science* 2002;296:497.
- [9] Hacein-Bey-Abina S, et al. *Science* 2003;302:415-419.
- [10] Check E. *Nature* 2003;423:573-574.
- [11] Wolff IA, Malone RW, Williams P, et al. *Science*. 1990;247:1465-1468.
- [12] Hickman MA, Malone RW, Lehmann-Bruinsma K, et al. *Hum Gene Ther*. 1994;5:1177-1183.
- [13] Zhang G, Vargo D, Budker V, Armstrong N, Knechtle S, Wolff IA. *Hum Gene Ther*. 1997;8:1763-1772.
- [14] Budker V, Zhang G, Knechtle S, Wolff IA. *Gene Ther*. 1996;3:593-598.
- [15] Choate KA, Khavari PA. *Hum Gene Ther*. 1997;8:1659-1665.
- [16] Meyer KB, Jr, Thompson MM Jr, Levy MY, Jr, Barton LG, Jr, Szoka FC, Jr. *Gene Ther*. 1995;2:450-460.
- [17] Synnes, M.; Prydz, K.; Lovdal, T.; Brech, A. and Berg, T. (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, 1421(2), 317-328.
- [18] Wells, J.M.; Li, L.H.; Sen, A.; Jahreis, G.P. and Hui, S.W. (2000) *Gene Ther.*, 7(7), 541-547.
- [19] Synnes, M.; Prydz, K.; Lovdal, T.; Brech, A. and Berg, T. (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, 1421(2), 317-328.
- [20] Chan, C.K.; Senden, T. and Jans, D.A. (2000) *Gene Ther.*, 7(19), 1690-1697.
- [21] Chan, C.K. and Jans, D.A. (2001) *Gene Therapy*, 8 (2), 166-171.
- [22] Chan, C.K. and Jans, D.A. (1999) *Hum. Gene Ther.*, 10(10), 1695-1702.
- [23] Chan, C.K.; Hubner, S.; Hu, W. and Jans, D.A. (1998) *Gene Ther.*, 5(9), 1204-1212.
- [24] Uherek, C.; Fominaya, J. and Wels, W. (1998) *J. Biol. Chem.*, 273(15), 8835-8841.
- [25] Paul, R.W.; Weissner, K.E.; Loomis, A.; Sloane, D.L.; LaFoe, D.; Atkinson, E.M. and Overell, R.W. (1997) *Hum. Gene Ther.*, 8(10), 1253-1262.
- [26] Fominaya, J. and Wels, W. (1996) *J. Biol. Chem.*, 271(18), 10560-10568.
- [27] Chen, S.Y.; Zani, C.; Khouri, Y. and Marasco, W.A. (1995) *Gene Ther.*, 2(2), 116-123.
- [28] Perales, J.C.; Ferkol, T.; Beegen, H.; Ratnoff, O.D. and Hanson, R.W. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 91(9), 4086-4090.
- [29] Edwards, R.J.; Carpenter, D.S. and Minchin, R.F. (1996) *Gene Ther.*, 3(10), 937-940.
- [30] Junbo, H.; Li, Q.; Zaide, W. and Yunde, H. (1999) *Int. J. Mol. Med.*, 3(6), 601-608.
- [31] Han, J. and Il Yeom, Y. (2000) *Int. J. Pharm.*, 202(1-2), 151-160.
- [32] Liang, W.W.; Shi, X.; Deshpande, D.; Malanga, C.J. and Rojanasakul, Y. (1996) *Biochim. Biophys. Acta*, 1279(2), 227-234.
- [33] Kollen, W.J.; Schembri, F.M.; Gerwig, G.J.; Vliegenthart, J.F.; Glick, M.C. and Scanlin, T.F. (1999) *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 20(5), 1081-1086.
- [34] Chen, J.; Gamou, S.; Takayanagi, A. and Shimizu, N. (1994) *FEBS Lett.*, 338(2), 167-169.
- [35] Chen, J.; Gamou, S.; Takayanagi, A.; Ohtake, Y.; Ohtsubo, M. and Shimizu, N. (1998) *Hum. Gene Ther.*, 9(18), 2673-2681.
- [36] Yano, L.; Shimura, M.; Taniguchi, M.; Hayashi, Y.; Suzuki, T.; Hatake, K.; Takaku, F. and Ishizaka, Y. (2000) *Hum. Gene Ther.*, 11(7), 995-1004.
- [37] Sato Y, Yamauchi N, Takahashi M, et al. *FASEB J*. 2000;14:2108-2118.
- [38] Schughart K, Rasmussen UB. *Methods Mol Med*. 2002;69:83-94.
- [39] Schughart K, Bischoff R, Rasmussen UB, et al. *Hum Gene Ther*. 1999;10:2891-2905.
- [40] Desigaux L, Gourden C, Bello-Roufai M, et al. *Hum Gene Ther*. 2005;16:821-829.
- [41] Freeman DJ, Niven RW. *Pharm Res*. 1996;13:202-209
- [42] Lemoine IL, Farley R, Huang L. *Gene Ther*. 2005;12:1275-1282.
- [43] Ross GF, Bruno MD, Uyeda M, et al. *Gene Ther*. 1998;5:1244-1250.
- [44] Walther W, Stein U, Siegel R, Fichtner I, Schlag PM. *J Gene Med*. 2005;7:477-485
- [45] Glasspool-Malone J, Malone RW. *Hum Gene Ther*. 1999;10:1703-1713.
- [46] Yang NS, Burkholder I, Roberts B, Martinell B, McCabe D. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87:9568-9572.
- [47] Yang, N.S. and Sun, W.H. (1995) *Nat. Med.*, 1(5), 481-483.
- [48] Irvine, K.R.; Rao, J.B.; Rosenberg, S.A. and Restifo, N.P. (1996) *J. Immunol.*, 156(1), 238-245.
- [49] Mahvi, D.M.; Burkholder, J.K.; Turner, J.; Culp, J.; Malter, J.S.; Sondel, P.M. and Yang, N.S. (1996) *Hum. Gene Ther.*, 7(13), 1535-1543.

- [50] Turner, J.G.; Tan, J.; Crucian, B.E.; Sullivan, D.M.; Ballester, O.F.; Dalton, W.S.; Yang, N.S.; Burkholder, J.K. and Yu, H. (1998) *Hum. Gene Ther.*, 9(8), 1121-1130.
- [51] Tanigawa, K.; Yu, H.; Sun, R.; Nickoloff, B.J. and Chang, A.E. (2000) *Cancer Immunol. Immunother.*, 48(11), 635-643.
- [52] Rakhmievich, A.L.; Janssen, K.; Turner, J.; Culp, J. And Yang, N.S. (1997) *Hum. Gene Ther.*, 8(11), 1303-1311.
- [53] Rakhmievich, A.L.; Timmins, J.G.; Janssen, K.; Pohlmann, E.L.; Sheehy, M.J. and Yang, N.S. (1999) *J. Immunother.*, 22(2), 135-144.
- [54] Sakai, T.; Hisaeda, H.; Nakano, Y.; Ishikawa, H.; Maekawa, Y.; Ishii, K.; Nitta, Y.; Miyazaki, J. and Himeno, K. (2000) *Immunology*, 99(4), 615-624.
- [55] Tuting, T.; Gambotto, A.; Baar, J.; Davis, I.D.; Storkus, W.J.; Zavodny, P.J.; Narula, S.; Tahara, H.; Robbins, P.D. and Lotze, M.T. (1997) *Gene Ther.*, 4(10), 1053-1060.
- [56] O'Brien J, Lummis SC. *Brain Res Brain Res Protoc.* 2002;10:12-15.
- [57] Heller LC, Ugen K, Heller R. *Expert Opin Drug Deliv.* 2005;2:255-268.
- [58] Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH. *Embo J.* 1982;1:841-845.
- [59] Wolf, H.; Rols, M.P.; Boldt, E.; Neumann, E. and Teissie, J. (1994) *Biophys. J.*, 66(2 Pt 1), 524-531.
- [60] Neumann, E. and Rosenheck, K. (1972) *J. Membr. Biol.*, 10(3), 279-290.
- [61] Neumann, E.; Schaefer-Ridder, M.; Wang, Y. And Hofschneider, P.H. (1982) *Embo J.*, 1(7), 841-845.
- [62] Robello, M. and Gliozzi, A. (1989) *Biochim. Biophys. Acta*, 982(1), 173-176.
- [63] Hasson E, Slovatizky Y Shimoni Y, Falk H, Panet A, Mitrani E. *J Gene Med.* 2005;7:926-935.
- [64] Dean DA, Machado-Aranda D, Blair-Parks K, Yeldandi AV, Young JL. *Gene Ther.* 2003;10:1608-1615.
- [65] Magin-Lachmann C, Kotzamanis G, D'Aiuto L, Cooke H, Huxley C, Wagner E. *J Gene Med.* 2004;6:195-209.
- [66] Molnar MJ, Gilbert R, Lu Y, et al. *Mol Ther.* 2004;10:447-455.
- [67] Wells, J.M.; Li, L.H.; Sen, A.; Jahreis, G.P. and Hui, S.W. (2000) *Gene Ther.*, 7(7), 541-547.
- [68] Nishi, T.; Yoshizato, K.; Yamashiro, S.; Takeshima, H.; Sato, K.; Hamada, K.; Kitamura, I.; Yoshimura, T.; Saya, H.; Kuratsu, J. and Ushio, Y. (1996) *Cancer Res.*, 56(5), 1050-1055.
- [69] Yoshizato, K.; Nishi, T.; Goto, T.; Dev, S.B.; Takeshima, H.; Kino, T.; Tada, K.; Kimura, T.; Shiraishi, S.; Kochi, M.; Kuratsu, J.I.; Hofmann, G.A. and Ushio, Y. (2000) *Int. J. Oncol.*, 16(5), 899-905.
- [70] Goto, T.; Nishi, T.; Tamura, T.; Dev, S.B.; Takeshima, H.; Kochi, M.; Yoshizato, K.; Kuratsu, J.; Sakata, T.; Hofmann, G.A. and Ushio, Y. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 97(1), 354-359.
- [71] McMahon 3M, Wells DJ. *BioDrugs.* 2004;18:155-165.
- [72] McMahon JM, Signori E, Wells KE, Fazio VM, Wells DJ. *Gene Ther.* 2001;8:1264-1270.
- [73] Sakai M, Nishikawa M, Thanaketpaisam O, Yamashita F, Hashida M. *Gene Ther.* 2005;12:607-616.
- [74] Durieux AC, Bonnefoy R, Busso T, Freyssen D. *J Gene Med.* 2004;6:809-816.
- [75] Gissel H, Clausen T. *Acta Physiol Scand.* 2001;171:327-334.
- [76] Kim HJ, Greenleaf JF, Kinnick RR, Bronk JT, Bolander ME. *Hum Gene Ther.* 1996;7:1339-1346.
- [77] Koch S, Pohl P, Cobet U, Rainov NO. *Ultrasound Med Biol.* 2000;26:897-903.
- [78] Huber PE, Jenne J, Debus J, Wannenmacher MF, Pfisterer P. *Ultrasound Med Biol.* 1999;25:1451-1457.
- [79] Liu F, Song Y, Liu D. *Gene Ther.* 2000;7:2023-2027.
- [80] Zhang G, Budker V, Wolff JA. *Hum Gene Ther.* 1999; 10:1735-1737.
- [81] Zhang G, Gao X, Song YK, et al. *Gene Ther.* 2004;11:675-682.
- [82] Miao CH, Thompson AR, Loeb K, Ye X. *Mol Ther.* 2001;3:947-957.
- [83] Miao CH, Ye X, Thompson AR. *Hum Gene Ther.* 2003;14:1297-1305.
- [84] Zhang G, Song YK, Liu D. *Gene Ther.* 2000;7:1344-1349.
- [85] Aline SF, Crespo A, Dasi F. *Gene Ther.* 2003;10:1672-1679.
- [86] Stoll SM, Sclimenti CR, Baba EJ, Meuse L, Kay MA, Cates MP. *M o l Ther.* 2001;4:122-129.
- [87] Jiang J, Yamato E, Miyazaki J. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;289:1088-1092.
- [88] Yang J, Chen S, Huang L, Michalopoulos GK, Liu Y. *Hepatology.* 2001;33:848-859.
- [89] Maruyama H, Higuchi N, Kameda S, Miyazaki J, Gejyo F. *Mel Biotechnol.* 2004;26:165-172.
- [90] Weiss, R.A. and Tailor, C.S. (1995) *Cell*, 82(4), 531-533.
- [91] Miller, D.G.; Edwards, R.H. and Miller, A.D. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 91(1), 78-82.
- [92] van Zeijl, M.; Johann, S.V.; Closs, E.; Cunningham, J.; Eddy, R.; Shows, T.B. and O'Hara, B. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 91(3), 1168-1172.
- [93] Roe, T.; Reynolds, T.C.; Yu, G. and Brown, P.O. (1993) *Embo J.*, 12(5), 2099-2108.
- [94] Miller, A.D. (1990) *Hum. Gene Ther.*, 1(1), 5-14.
- [95] Bordinon, C.; Notarangelo, L.D.; Nobili, N.; Ferrari, G.; Casorati, G.; Panina, P.; Mazzolari, E.; Maggioni, D.; Rossi, C.; Servida, P. and et al. (1995) *Science*, 270(5235), 470-475.

- [96] Costello, E.; Munoz, M.; Buetti, E.; Meylan, P.R.; Diggelmann, H. and Thali, M. (2000) *Gene Ther.*, 7(7),596-604.
- [97] Bergelson, J.M.; Cunningham, J.A.; Droguett, G.; Kurt- Jones, E.A.; Krithivas, A.; Hong, J.S.; Horwitz, M.S.; Crowell, R.L. and Finberg, R.W. (1997) *Science*, 275(5304), 1320-1323.
- [98] Wickham, T.J.; Mathias, P.; Cheresch, D.A. and Nemerow, G.R. (1993) *Cell*, 73(2), 309-319.
- [99] Albert, M.J. (1986) *Arch. Virol.*, 88(1-2), 1-17.
- [100] Bett, A.J.; Haddara, W.; Prevec, L. and Graham, F.L. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91(19), 8802-8806.
- [101] Kochanek, S.; Clemens, P.R.; Mitani, K.; Chen, H.H.; Chan, S. and Caskey, C.T. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(12), 5731-5736.
- [102] Fisher, K.J.; Choi, H.; Burda, J.; Chen, S.J. and Wilson, J.M. (1996) *Virology*, 217(1), 11-22.
- [103] Graham, F.L. and Prevec, L. (1995) *Mol. Biotechnol.*, 3(3), 207-220.
- [104] Krougliak, V. and Graham, F.L. (1995) *Hum. Gene Ther.*, 6(12), 1575-1586.
- [105] Yang, Y. and Wilson, J.M. (1995) *J. Immunol.*, 155(5), 2564-2570.
- [106] Yeh, P. and Per r ic audet, M. (1997) *F aseb J.*, 11(8) , 615-623.
- [107] Trapnell, B.C. and Gorziglia, M. (1994) *Curr. Opin. Biotechnol.*, 5(6), 617-625.
- [108] Roth, J.A.; Swisher, S.G.; Merritt, J.A.; Lawrence, D.D.; Kemp, B.L.; Carrasco, C.H.; El-Naggar, A.K.; Fossella, F.V.; Glisson, B.S.; Hong, W.K.; Khurl, F.R.; Kurie, J.M.; Nesbitt, J.C.; Pisters, K.; Putnam, J.B.; Schrupp, D.S.; Shin, D.M. and Walsh, G.L. (1998) *Semin. Oncol.*, 25(3 Suppl 8), 33-37.
- [109] Hu, Z. and Garen, A. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 97(16), 9221-9225.
- [110] Alemany, R.; Balague, C. and Curiel, D.T. (2000) *Nat. Biotechnol.*, 18(7), 723-727.
- [111] Barkats, M.; Bilang-Bleuel, A.; Buc-Caron, M.H.; Castel- Barthe, M.N.; Corti, O.; Finiels, F.; Horellou, P.; Revah, F.; Sabate, O. and Mallet, J. (1998) *Prog. Neurobiol.*, 55(4), 333-341.
- [112] Russell, D.W.; Miller, A.D. and Alexander, I.E. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 91(19), 8915-8919.
- [113] Weger, S.; Wistuba, A.; Grimm, D. and Kleinschmidt, J.A. (1997) *J. Virol.*, 71(11), 8437-8447.
- [114] Ding, L.; Lu, S. and Munshi, N.C. (1997) *Gene Ther.*, 4(11), 1167-1172.
- [115] Buller, R.M.; Janik, J.E.; Sebring, E.D. and Rose, J.A. (1981) *J. Virol.*, 40(1), 241-247.
- [116] Chiorini, J.A.; Kim, F.; Yang, L. and Kotin, R.M. (1999) *J. Virol.*, 73(2), 1309-1319.
- [117] Srivastava, A.; Lusby, E.W. and Berns, K.I. (1983) *J. Virol.*, 45(2), 555-564.
- [118] Im, D.S. and Muzyczka, N. (1989) *J. Virol.*, 63(7), 3095- 3104.
- [119] Im, D.S. and Muzyczka, N. (1992) *J. Virol.*, 66(2), 1119- 1128.
- [120] Young, S.M.; McCarty, D.M.; Degtyareva, N. And Samulski, R.J. (2000) *J. Virol.*, 74(9), 3953-3966.
- [121] Im, D.S. and Muzyczka, N. (1990) *Cell*, 61(3), 447-457.
- [122] Xiao, X.; Xiao, W.; Li, J. and Samulski, R.J. (1997) *J. Virol.*, 71(2), 941-948.
- [123] Rolling, F. and Samulski, R.J. (1995) *Mol. Biotechnol.*, 3(1), 9-15.
- [124] Kearns, W.G.; Afione, S.A.; Fulmer, S.B.; Pang, M.C.; Erikson, D.; Egan, M.; Landrum, M.J.; Flotte, T.R. and Cutting, G.R. (1996) *Gene Ther.*, 3(9), 748-755.
- [124] Ferrari, F.K.; Samulski, T.; Shenk, T. and Samulski, R.J. (1996) *J. Virol.*, 70(5), 3227-3234.
- [126] Xiao, X.; Li, J. and Samulski, R.J. (1996) *J. Virol.*, 70(11), 8098-8108.
- [127] Fisher, K.J.; Jooss, K.; Alston, J.; Yang, Y.; Haecker, S.E.; High, K.; Pathak, R.; Raper, S.E. and Wilson, J.M. (1997) *Nat. Med.*, 3(3), 306 312.
- [128] Kaplitt, M.G.; Leone, P.; Samulski, R.J.; Xiao, X.; Pfaff, D.W.; O'Malley, K.L. and Daring, M.J. (1994) *Nat. Genet.*, 8(2), 148-154.
- [129] Koeberl, D.D.; Alexander, I.E.; Halbert, C.L.; Russell, D.W. and Miller, A.D. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 94(4), 1426-1431.
- [130] Flotte, T.R.; Afione, S.A.; Solow, R.; Drumm, M.L.; Markakis, D.; Guggino, W.B.; Zeitlin, P.L. and Carter, B.J. (1993) *J. Biol. Chem.*, 268(5), 3781-3790.
- [131] Fisher-Adams, G.; Wong, K.K.; Podsakoff, G.; Forman, S.J. and Chatterjee, S. (1996) *Blood*, 88(2), 492-504.
- [132] Russell, D.W. and Hirata, R.K. (1998) *Nat. Genet.*, 18(4), 325-330.
- [133] Inoue, N.; Hirata, R.K. and Russell, D.W. (1999) *J. Virol.* , 73(9), 7376-7380.
- [134] Hirata, R.K. and Russell, D.W. (2000) *J. Virol.*, 74(10), 4612-4620.
- [135] Gruenheid, S.; Gatzke, L.; Meadows, H. and Tufaro, F. (1993) *J. Virol.*, 67(1), 93-100.
- [136] Yeung, S.; Bockhold, K. and Tufaro, F. (1999) *Gene Ther.*, 6(9), 1536-1544.
- [137] Lachmann, R.H. and Efstathiou, S. (1999) *Clin. Sci. (Colch)*, 96(6), 533-541.
- [138] Kennedy, P.G. (1997) *Brain*, 120(Pt 7), 1245-1259.
- [139] Risky, D.M.; Marconi, P.C.; Oligino, T.J.; Rouse, R.J.; Fink, D.J.; Cohen, J.B.; Watkins, S.C. and Glorioso, J.C. (1998) *Gene Ther.*, 5(11), 1517-1530.
- [140] Akkaraju, G.R.; Huard, J.; Hoffman, E.P.; Goins, W.F.; Pruchnic, R.; Watkins, S.C.; Cohen, J.B. and Glorioso, J.C. (1999) *J. Gene Med.*, 1(4), 280-289.

- [141] Oligino, T.; Ghivizzani, S.; Wolfe, D.; Lechman, E.; Krisky, D.; Mi, Z.; Evans, C.; Robbins, P. and Glorioso, J. (1999) *Gene Ther.*, 6(10), 1713-1720.
- [142] Marconi, P.; Krisky, D.; Oligino, T.; Poliani, P.L.; Ramakrishnan, R.; Goins, W.F.; Fink, D.J. and Glorioso, J.C. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 93(21), 11319-11320.
- [143] Krisky, D.M.; Wolfe, D.; Goins, W.F.; Marconi, P.C.; Ramakrishnan, R.; Mata, M.; Rouse, R.J.; Fink, D.J. and Glorioso, J.C. (1998) *Gene Ther.*, 5(12), 1593-1603.
- [144] Greco, A.; Bausch, N.; Coute, Y. and Diaz, J.J. (2000) *Electrophoresis*, 21(12), 2522-2530.
- [145] Toda, M.; Rabkin, S.D.; Kojima, H. and Martuza, R.L. (1999) *Hum. Gene Ther.*, 10(3), 385-393.
- [146] Todryk, S.; McLean, C.; Ali, S.; Entwistle, C.; Bournsnel, M.; Rees, R. and Vile, R. (1999) *Hum. Gene Ther.*, 10(17), 2757-2768.
- [147] Huard, J.; Krisky, D.; Oligino, T.; Marconi, P.; Day, C.S.; Watkins, S.C. and Glorioso, J.C. (1997) *Neuromuscul. Disord.*, 7(5), 299-313.
- [148] Carpenter, D.E. and Stevens, J.G. (1996) *Hum. Gene Ther.*, 7(12), 1447-1454.
- [149] Wu, G.Y., Wu, C.H., 1987. *J. Biol. Chem.* 262, 4429-4432.
- [150] Brown, M.D., Scha'tzlein, A., Brownlie, A., Jack, V., Wang, W., Tetley, L., Gray, A.I., Uchegbu, I.F., 2000. *Bioconj. Chem.* 11, 880-891.
- [151] Wadhwa, M.S., Collard, W.T., Adami, R.C., McKenzie, D.L., Rice, K.G., 1997. *Bioconj. Chem.* 8, 81-88.
- [152] Benns, J.M., Choi, J.S., Mahato, R.I., Park, J.S., Kim, S.W., 2000. *Bioconjug. Chem.* 11, 637-645.
- [153] Wolfert, M. A., Seymour, L. W. (1996) *Hum. Gene Ther.*, 3: 269-273.
- [154] Wolfert, M.A., Schacht, E.H., Toncheva, V., Ulbrich, K., Nazarova, O., Seymour, L.W. (1996) *Hum. Gene Ther.*, 7: 2123-2133.
- [155] Boussif, O., Lezoualch, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B., Behr, J.-P. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 7297-7301.
- [156] Helander, I. M., Alakomi, H. L., Kala-Latva, K., Koski, P. (1997) *Microbiology*, 143: 3193-3199.
- [157] Godbey, W.T., Mikos, A.G. (2001) *J. Controlled Rel.*, 72:115-125.
- [158] Godbey, W.T., Wu, K.K., Mikos, A.G. (2001) *Biomaterials* 22 : 471-480.
- [159] Fischer, D., Li, Y.X., Ahlemeyer, B., Krieglstein, J., Kissel, T. (2003) *Biomaterials*, 24: 1121-1131.
- [160] Thomas, M., Ge, Q., Lu, J.J., Chen, J.Z., Klibanov, A.M. (2005) *Pharm. Res.*, 22: 373-380.
- [161] Lungwitz, U., Breunig, M., Blunk, T., Göpferich A. (2005) *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 60: 247-266.
- [162] Koyama, Y., Ito, T., Matsumoto, H., Tanioka, A., Okuda, T., Yamaura, N., Aoyagi, H., Niidome, T. (2003) *J. Biomat. Sci.-Polym. Ed.*, 14: 515-531.
- [163] Oupicky, D., Ogris, M., Howard, K.A., Dash, P.R., Ulbrich, K., Seymour, L.W. (2002) *Mol., Ther.*, 5: 463-472.
- [164] Tang, GP; Zeng, JM; Gao, SJ; Ma, YX; Shi, L; Li, Y; Too, HP; Wang, S. (2003) *Biomaterials*, 24: 2351-2362.
- [165] Thomas, M., Klibanov, A.M. (2002) *Proc. Nat. Ac. Sci. USA.*, 99: 14640-14645.
- [166] Boussif O, Lezoualch F, Zanta MA, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92:7297-7301.
- [167] Sonawane ND, J4 Szolca FC, Jr, Verkman AS. *J Biol Chem*. 2003;278:44826-44831.
- [168] Bielinska, A.U., Kukowska-Latallo, J.F., Baker, J.R. Jr (1997) *Biochim. Biophys. Acta*, 1353: 180-190.
- [169] Bielinska, A.U., Chen, C.L., Johnson, J., Baker, J.R. (1999) *Bioconjugate Chem.*, 10: 843-850.
- [170] Haensler, J., Szoka, F.C. (1993) *Bioconjugate Chem.*, 4: 372-379.
- [171] Tomalia, D. A., Naylor, A. M., and Goddard, W. A., I11 (1990) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 29: 138-175.
- [172] Subbarao, N. K., Parente, R. A., Szoka, F. C., Nadasdi, L. and Pongracz, K. (1987) *J. Biol. Chem.*, 26: 2964-2972.
- [173] Kukowska-Latallo, J.F., Chen, C.L., Eichman, J., Bielinska, A.U., Baker, J.R., (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 264: 253-261.
- [174] Manunta, M., Tan, P.H., Sagoo, P., Kashefi, K., George, A.J.T. (2004) *Nucl. Acids Res.*, 32: 2730-2739.
- [175] Verbaan, F.J., Oussoren, C., Snel, C.J., Crommelin, D.J.A., Hennink, W.E., Storm, G. (2004) *J. Gene Med.*, 6: 64-75.
- [176] Greenland, J. R., Liu, H., Berry, D., Anderson, D. G., Kim, W.-K., Irvine, D.J., Langer R., Letvin, N. L. (2005) *Mol. Ther.*, 12: 164-170.
- [177] Liu, W. G., De Yao, K. (2002) *J. Controlled Rel.*, 83: 1-11.
- [178] Richardson, S.C.W., Kolbe, H.V.J., Duncan, R. (1999) *Int. J. Pharm.*, 178: 231-243.
- [179] Niculescu-Duvaz D, Heyes J, Springer CJ (2003) *Curr Med Chem* 10:1233-1261
- [180] Martin B, Sainlos M, Aissaoui A, Oudrhiri N, Hauchecorne M, Vigneron JP, Lehn JM, Lehn P (2005) *Curr Pharm Des* 11:375-394
- [181] Hirko A, Tang F, Hughes JA (2003) *Curr Med Chem* 10:1185-1193

- [182] Simberg D, Weisman S, Talmon Y, Barenholz Y (2004) *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 21:257–317
- [183] Kim JK, Choi SH, Kim CO, Park JS, Ahn WS, Kim CK (2003) *J Pharm Pharmacol* 55:453–460
- [184] Eastman SJ, Siegel C, Tousignant J, Smith AE, Cheng SH, Scheule RK (1997) *Biochim Biophys Acta* 1325:41–62
- [185] Prasad TK, Gopal V, Madhusudhana RN (2003) *Biochim Biophys Acta* 1619:59–69
- [186] Ciani L, Ristori S, Salvati A, Calamai L, Martini G (2004) *Biochim Biophys Acta* 1664:70–79
- [187] Xu Y, Hui SW, Frederik P, Szoka FC Jr (1999) *Biophys J* 77:341–353
- [188] Hafez IM, Maurer N, Cullis PR (2001) *Gene Ther* 8:1188–1196
- [189] Safinya CR (2001) *Curr Opin Struct Biol* 11:440–448
- [190] May S, Ben Shaul A (2004) *Curr Med Chem* 11:151–167
- [191] Pozharski E, MacDonald RC (2003) *Biophys J* 85:3969–3978
- [192] Matulis D, Rouzina I, Bloomfield VA (2002) *J Am Chem Soc* 124:7331–7342
- [193] May S, Harries D, Ben Shaul A (2000) *Biophys J* 78:1681–1697
- [194] Koltover I, Salditt T, Safinya CR (1999) *Biophys J* 77:915–924
- [195] Zhang Y, Garzon-Rodriguez W, Manning MC, Anchordoquy TJ (2003) *Biochim Biophys Acta* 1614:182–192
- [196] Tarahovsky YS, Koynova R, MacDonald RC (2004) *Biophys J* 87:1054–1064
- [197] Zabner J, Fasbender AJ, Moninger T, Poellinger KA, Welsh MJ (1995) *J Biol Chem* 270:18997–19007
- [198] Akao T, Fukumoto T, Ihara H, Ito A (1996) *FEBS Lett* 391:215–218
- [199] Zuidam NJ, Barenholz Y (1998) *Biochim Biophys Acta* 1368:115–128
- [200] W.L. Hsu, H.L. Chen, W. Liou, H.K. Lin, W.L. Liu, *Langmuir* 21 (2005) 9426–9431.
- [201] Israelachvili JN, Marcelja S, Horn RG (1980) *Q Rev Biophys* 13:121–200
- [202] Wasungu, L; Hoekstra, D.; *Journal of Controlled Release* 116 (2006) 255–264
- [203] Radler, J. O.; Koltover, I.; Salditt, T.; Safinya, C. R. *Science* 1997, 275, 810–4.
- [204] Koltover, I.; Salditt, T.; Radler, J. O.; Safinya, C. R. *Science* 1998, 281, 7881.
- [205] Ho, R. J.; Rouse, B. T.; Huang, L. *Biochemistry* 1986, 25, 5500–6.
- [206] Sternberg, B.; Sorgi, F. L.; Huang, L. *FEBS Lett.* 1994, 356, 361–6.
- [207] Hirko A, Tang F, Hughes JA, *Current Medicinal Chemistry*, 2003, 10, 1185–1193
- [208] Templeton, N.S., Lasic, D.D., Frederik, P.M., Strey, H.H., Roberts, D.D., Pavlakis, G.N., 1997. *Nature Biotechnol.* 15, 647–652.
- [209] Rakhmanova VA, Pozharski EV, MacDonald RC (2004) *J Membr Biol* 200:35–45
- [210] Dias R, Antunes F, Miguel M, Lindman S, Lindman B (2002) *Braz J Med Biol Res* 35:509–522
- [211] Song, Y.K., Liu, F., Chu, S., Liu, D., 1997. *Hum. Gene Ther.* 8, 1585– 1594.
- [212] Ogris, M., Brunner, S., Schuller, S., Kircheis, R., Wagner, E., 1999. *Gene Ther.* 6, 595–605.
- [213] Tomlinson, E., Rolland, A.P. *J. Controlled Release* 1996, 39, 357–372.
- [214] Eastman, S.J., Siegel, C., Tousignant, J., Smith, A.E., Cheng, S.H., Scheule, R.K. *Biochim. Biophys. Acta* 1997, 1325, 41 - 62.
- [215] Pires, P., Simões, S., Nir, S., Gaspar, R., Düzgünes, N. and Pedroso de Lima, M.C. *Biochim. Biophys. Acta* 1999, 1418, 71–84.
- [216] Pedroso de Lima, M.C., Simoes, S., Pires, P., Faneca, H., Duzgunes, N. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2001, 4, 277–294.
- [217] Ahmad A, Evans HM, Ewert K, George CX, Samuel CE, Safinya CR (2005) *J Gene Med* 7:739–748
- [218] Hirota, S., Tros de Ilarduya, C., Barron, L.G., Szoka, F.C.Jr. *Biotechniques* 1999, 27, 286–290.
- [219] S. Huebner, E. Politsch, U. Vierl, G. Cevc, *Biochim. Biophys. Acta* 1421 (1999) 1–4.
- [220] V. Oberle, U. Bakowsky, I.S. Zuhorn, D. Hoekstra, *Biophys. J.* 79 (2000) 1447–1454.
- [221] M.T. Kennedy, E.V. Pozharski, V.A. Rakhmanova, R.C. MacDonald, *Biophys. J.* 78 (2000) 1620–1633.
- [222] G. Caracciolo, D. Pozzi, H. Amenitsch, R. Caminiti, *Langmuir* 21 (2005) 11582–11587.
- [223] D. Simberg, S. Weisman, Y. Talmon, Y. Barenholz, *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.* 21 (2004) 257–317.
- [224] Oberle, V., Bakowsky, U., Zuhorn, I.S., Hoekstra D. *Biophys. J.* 2000, 79, 1447–1454.
- [224] N.S. Templeton, D.D. Lasic, P.M. Frederik, H.H. Strey, D.D. Roberts, G.N. Pavlakis, *Nat. Biotechnol.* 15 (1997) 647–652.
- [225] D. Hirsch-Lerner, M. Zhang, H. Eliyahu, M.E. Ferrari, C.J. Wheeler, Y. Barenholz, *Biochim. Biophys. Acta* 1714 (2005) 71–84.
- [226] V.M. Meidan, J. Glezer, S. Salomon, Y. Sidi, Y. Barenholz, J.S. Cohen, G. Lilling, *J. Liposome Res.* 16 (2006) 27–43.
- [227] I. van derWoude, H.W. Visser, M.B. ter Beest, A.Wagenaar, M.H. Ruiters, J.B. Engberts, D. Hoekstra, *Biochim. Biophys. Acta* 1240 (1995) 34–40.

- [228] I.S. Zuhorn, U. Bakowsky, E. Polushkin, W.H. Visser, M.C.A. Stuart, J.B. F.N. Engberts, D. Hoekstra, *Molec. Ther.* 11 (2005) 801–810.
- [229] M. Scarzello, J. Smisterova, A. Wagenaar, M.C. Stuart, D. Hoekstra, J.B. Engberts, R. Hulst, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 10420–10429.
- [230] I.S. Zuhorn, W.H. Visser, U. Bakowsky, J.B. Engberts, D. Hoekstra, *Biochim. Biophys. Acta* 1560 (2002) 25–36.
- [231] Ulrich AS (2002) *Biosci Rep* 22:129–150
- [232] Takeuchi K, Ishihara M, Kawaura C, Noji M, Furuno T, Nakanishi M (1996) *FEBS Lett* 397:207–209
- [233] Almofti MR, Harashima H, Shinohara Y, Almofti A, Li W, Kiwada H (2003) *Mol Membr Biol* 20:35–43
- [234] Lobo, B.A., Davis, A., Koe, G., Smith, J.G., Middaugh, C.R. *Arch. Biochem. Biophys.* 2001, 386, 95–105.
- [235] Siegel DP, Epand RM (1997) *Biophys J* 73:3089–3111
- [236] Harvie, P., Wong, F.M., Bally, M.B. *Biophys. J.* 1998, 75, 1040–1051.
- [237] Simoes, S., Slepishkin, V., Pires, P., Gaspar, R., Pedroso de Lima, M.C., Düzgünes, N. *Gene Ther.* 1999, 6, 1798–1807.
- [238] Koltover I, Salditt T, Radler JO, Safinya CR (1998) *Science* 281:78–81
- [239] Simberg D, Danino D, Talmon Y, Minsky A, Ferrari ME, Wheeler CJ, Barenholz Y (2001) *J Biol Chem* 276:47453–47459
- [240] Smisterova J, Wagenaar A, Stuart MCA, Polushkin E, ten Brine G, Hulst R, Engberts JBFN, Hoekstra D (2001) *J Biol Chem* 276:47615–47622
- [241] Mok KW, Cullis PR (1997) *Biophys J* 73:2534–2545
- [242] N.J. Zuidam, Y. Barenholz, *Biochim. Biophys. Acta* 1368 (1998) 115–128.
- [243] M. Scarzello, V. Chupin, A. Wagenaar, M.C.A. Stuart, J.B.F.N. Engberts, R. Hulst, *Biophys. J.* 88 (2005) 2104–2113.
- [244] J.M. Seddon, *Biochim. Biophys. Acta* 1031 (1990) 1–69.
- [245] Liu, Y., Mounkes, L.C., Liggitt, H. D., Brown, C.S., Solodin, I., Heath, T.D., Debs, R.J. *Nat. Biotech.* 1997, 15, 167–173.
- [246] Wang, J., Guo, X., Xu, Y., Barron, L., Szoka, F.C. Jr. *J. Med. Chem.* 1998, 41, 2207–2215.
- [247] Hong, K., Zheng, W., Baker, A., Papahadjopoulos, D. *FEBS Lett.* 1997, 400, 233–237.
- [248] Sternberg, B., Hong, K., Zheng, W., Papahadjopoulos, D. *Biochim. Biophys. Acta* 1998, 1375, 23–35.
- [249] Smith, J.G., Wedeking, T., Vernachio, J.H., Way, H., Niven, R.W. *Pharm. Res.* 1998, 15, 1356–1363.
- [250] Semple, S. C., Chonn, A. and Cullis, P. R., 1996, *Biochemistry*, 35, 2521–2525.
- [251] Chen, Z. and Rand, R. P., 1997, *Biophysical Journal*, 73, 267–276.
- [252] Goncalves E, Debs RJ, Heath TD (2004) *Biophys J* 86:1554–1563
- [253] Whitmore M, Li S, Huang L (1999) *Gene Ther* 6:1867–1875
- [254] Wheeler JJ, Palmer L, Ossanlou M, MacLachlan I, Graham RW, Zhang YP, Hope MJ, Scherrer P, Cullis PR (1999) *Gene Ther* 6:271–281
- [255] Lasic DD (1998) *Trends Biotechnol* 16:307–321
- [256] Ross PC, Hui SW (1999) *Gene Ther* 6:651–659
- [257] Faneca H, Simoes S, Pedroso de Lima MC (2004) *J Gene Med* 6:681–692
- [258] Zelphati O, Uyechi LS, Barron LG, Szoka FC Jr (1998) *Biochim Biophys Acta* 1390:119–133
- [259] Anchordoquy, T.J., Girouard, L.G., Carpenter, J.F., Kroll, D.J. *J. Pharm. Sci.* 1998, 87, 1046–1051
- [260] Zelphati, O., Nguyen, C., Ferrari, M., Felgner, J., Tsai, Y., Felgner, P.L. *Gene Ther.* 1998, 5, 1272–1282.
- [261] Li, B., Li, S., Tan, Y., Stolz, D.B., Watkins, S.C., Block, L.H., Huang, L. *J. Pharm. Sci.* 2000, 89, 355–364.
- [262] Ledley, F.D. *Pharm. Res.* 1996, 13, 1595–1614.
- [263] Mahato, I.R., Rolland, A., Tomlinson, E. *Pharm. Res.* 1997, 14, 853–859.
- [264] Faneca, H., Simoes, S., Pedroso de Lima, M.C. *Biochim. Biophys. Acta* 2002, 1567, 23–33.
- [265] J. Rejman, A. Wagenaar, J.B. Engberts, D. Hoekstra, *Biochim. Biophys. Acta* 1660 (2004) 41–52.
- [266] J.W. Holland, C. Hui, P.R. Cullis, T.D. Madden, *Biochemistry* 35 (1996) 2618–2624.
- [267] J.W. Holland, P.R. Cullis, T.D. Madden, *Biochemistry* 35 (1996) 2610–2617.
- [268] G. Blume, G. Cevc, M.D. Crommelin, I.A. Bakker-Woudenberg, C. Kluft, G. Storm, *Biochim. Biophys. Acta* 1149 (1993) 180–184.
- [269] F. Shi, L. Wasungu, A. Nomden, M.C.A. Stuart, E. Polushkin, J.B.F.N. Engberts, D. Hoekstra, *Biochem. J.* 366 (2002) 333–341.
- [270] Medina-Kauwe LK, Xie J, Hamm-Alvarez S (2005) *Gene Ther* 12:1734–1751
- [271] Mounkes LC, Zhong W, Cipres-Palacin G, Heath TD, Debs RJ (1998) *J Biol Chem* 273:26164–26170

- [272] Mislick KA, Baldeschwieler JD (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* 93:12349–12354
- [273] J. Zabner, A.J. Fasbender, T. Moninger, K.A. Poellinger, M.J. Welsh, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 18997–19007.
- [274] El Ouahabi, M. Thiry, S. Schiffmann, R. Fuks, H. Nguyen-Tran, J.M. Ruysschaert, M. Vandenbranden, *J. Histochem. Cytochem.* 47 (1999) 1159–1166.
- [275] B. Nichols, *J. Cell Sci.* 116 (2003) 4707–4714.
- [276] S.D. Conner, S.L. Schmid, *Nature* 422 (2003) 37–44.
- [277] M. Kirkham, R.G. Parton, *Biochim. Biophys. Acta* 1745 (2005) 273–286.
- [278] F. Shi, D. Hoekstra, *J. Control. Release* 97 (2004) 189–209.
- [279] L.K. Medina-Kauwe, *Gene Ther.* 12 (2005) 863–864.
- [280] I.A. Khalil, K. Kogure, H. Akita, H. Harashima, *Pharmacol. Rev.* 58 (2006) 32–45.
- [281] I.A. Khalil, K. Kogure, S. Futaki, H. Harashima, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 3544–3551
- [282] I.S. Zuhorn, R. Kalicharan, D. Hoekstra, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 18021–18028.
- [283] J. Rejman, A. Bragonzi, M. Conese, *Molec. Ther.* 12 (2005) 468–474.
- [284] J. Rejman, V. Oberle, I.S. Zuhorn, D. Hoekstra, *Biochem. J.* 377 (2004) 159–169.
- [285] Duzgunes N, De Ilarduya CT, Simoes S, Zhdanov RI, Konopka K, Lima Pedroso de MC (2003) *Curr Med Chem* 10:1213–1220
- [286] Mukherjee S, Ghosh RN, Maxfield FR (1997) *Physiol Rev* 77:759–803
- [287] Elouahabi A, Ruysschaert JM (2005) *Mol Ther* 11:336–347
- [288] Zelphati O, Szoka FC Jr (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* 93:11493–11498
- [289] Zuhorn IS, Bakowsky U, Polushkin E, Visser WH, Stuart MC, Engberts JB, Hoekstra D (2005) *Mol Ther* 11:801–810
- [290] Ewert K, Ahmad A, Evans HM, Safinya CR (2005) *Expert Opin Biol Ther* 5:33–53
- [291] Fattal E, Nir S, Parente RA, Szoka FC Jr (1994) *Biochemistry* 33:6721–6731
- [292] Bhattacharya S, Mandal SS (1998) *Biochemistry* 37:7764–7777
- [293] Lewis RN, McElhaney RN (2000) *Biophys J* 79:1455–1464
- [294] de Kruijff B (1997) *Curr Opin Chem Biol* 1:564–569
- [295] Ewert K, Evans HM, Ahmad A, Slack NL, Lin AJ, Martin-Herranz A, Safinya CR (2005) *Adv Genet* 53:119–155
- [296] Bentz J, Ellens H, Lai MZ, Szoka FC Jr (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* 82:5742–5745
- [297] Barenholz Y (2001) *Curr Opin Colloidal Interf Sci* 6:66–77
- [298] Verma SK, Mani P, Sharma NR, Krishnan A, Kumar VV, Reddy BS, Chaudhuri A, Roy RP, Sarkar DP (2005) *J Biol Chem* 280:35399–35409
- [299] Kumar VV, Pichon C, Refregiers M, Guerin B, Midoux P, Chaudhuri A (2003) *Gene Ther* 10:1206–1215
- [300] Pack DW, Putnam D, Langer R (2000) *Biotechnol Bioeng* 67:217–223
- [301] Bennis JM, Choi JS, Mahato RI, Park JS, Kim SW (2000) *Bioconjug Chem* 11:637–645
- [302] Singh RS, Goncalves C, Sandrin P, Pichon C, Midoux P, Chaudhuri A (2004) *Chem Biol* 11:713–723
- [303] Zhu J, Munn RJ, Nantz MH (2000) *J Am Chem Soc* 122:2645–2646
- [304] Lechardeur D, Sohn KJ, Haardt M, Joshi PB, Monck M, Graham RW, Beatty B, Squire J, O’Broovich H, Lukacs GL (1999) *Gene Ther* 6:482–497
- [305] Lechardeur D, Verkman AS, Lukacs GL (2005) *Adv Drug Deliv Rev* 57:755–767
- [306] Lukacs GL, Haggie P, Seksek O, Lechardeur D, Freedman N, Verkman AS (2000) *J Biol Chem* 275:1625–1629
- [307] Lechardeur D, Lukacs GL (2002) *Curr Gene Ther* 2:183–194
- [308] Pollard H, Toumaniantz G, Amos JL, Avet-Loiseau H, Guihard G, Behr JP, Escande D (2001) *J Gene Med* 3:153–164
- [309] Huang Z, Li W, MacKay JA, Szoka FC Jr (2005) *Mol Ther* 11:409–417
- [310] Dean DA, Strong DD, Zimmer WE (2005) *Gene Ther* 12:881–890
- [311] Pante N, Aebi U (1996) *Crit Rev Biochem Mol Biol* 31:153–199
- [312] Gasiorowski JZ, Dean DA (2003) *Adv Drug Deliv Rev* 55:703–716
- [313] Dean DA, Dean BS, Muller S, Smith LC (1999) *Exp Cell Res* 253:713–722
- [314] Cornelis S, Vandenbranden M, Ruysschaert JM, Elouahabi A (2002) *DNA Cell Biol* 21:91–97
- [315] Brunner S, Sauer T, Carotta S, Cotten M, Saltik M, Wagner E (2000) *Gene Ther* 7:401–407
- [316] Brunner S, Furtbauer E, Sauer T, Kursu M, Wagner E (2002) *Mol Ther* 5:80–86
- [317] Subramanian A, Ranganathan P, Diamond SL (1999) *Nat Biotechnol* 17:873–877
- [318] van der Aa MA, Koning GA, d’Oliveira C, Oosting RS, Wilschut KJ, Hennink WE, Crommelin DJ (2005) *J Gene Med* 7:208–217
- [319] Guillaume C, Delepine P, Mercier B, Gobin E, Leroy JP, Morin V, Ferec C (2000) *J Pharm Sci* 89:639–645
- [320] Dean DA (1997) *Exp Cell Res* 230:293–302

- [321] Vacik J, Dean BS, Zimmer WE, Dean DA (1999) *Gene Ther* 6:1006–1014
- [322] Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M., Danielsen, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, 84, 7413.
- [323] Felgner, J.H., Kumar, R., Sridhar, C.N., Wheeler, C.J., Tsai, Y.J., Border, R., Ramsey, P., Martin, M., Felgner, P.L. *J. Biol. Chem.*, 1994, 269, 2550.
- [324] Leventis, R., Silvius, J.R. *Biochim. Biophys. Acta*, 1990, 1023, 124.
- [325] Massing, U., Kley, J.T., Gurtesch, L., Fankhaenel, S. *Chem. Phys. Lipids*, 2000, 105, 189.
- [326] Ren, T., Liu, D. *Tetrahedron Lett.*, 1999, 40, 209.
- [327] Bennett, M.J., Aberle, A.M., Balasubramaniam, R.P., Malone, J.G., Malone, R.W., Nantz, M.H. *J. Med. Chem.*, 1997, 40, 4069.
- [328] Pinnaduwa, P., Schmitt, L., Huang, L. *Biochim. Biophys. Acta*, 1989, 985, 33.
- [329] Ballas, N., Zakai, N., Sela, I., Loyter, A. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1988, 939, 8.
- [330] Remy, J.S., Sirlin, C., Vierling, P., Behr, J.P. *Bioconjugate Chem.*, 1994, 5, 647.
- [331] Banerjee, R., Das, P.K., Srilakshmi, G.V., Chaudhuri, A., Rao, N.M. *J. Med. Chem.*, 1999, 42, 4292.
- [332] Deshmukh, H.M., Huang, L. *New J. Chem.*, 1997, 21, 113.
- [333] Lasic, D.D. *Liposomes in Gene Delivery*, CRC Press: Boca Raton, 1997.
- [334] Srilakshmi, G.V., Sen, J., Chaudhuri, A., Ramadas, Y., Rao, N.M. *Biochim. Biophys. Acta*, 2002, 1599, 87.
- [335] Menger, F.M., Keiper, J.S. *Angew Chem. Int. Ed.*, 2000, 39, 1906.
- [336] Rosenzweig, H.S., Rakhmanova, V.A., MacDonald, R.C. *Bioconjug. Chem.*, 2001, 12, 258.
- [337] Ilies, M.A., Balaban, A.T. *Expert Opin. Ther. Patents*, 2001, 11, 1729.
- [338] Miller, A.D. *Angew Chem. Int. Ed.*, 1998, 37, 1768.
- [339] Byk, G., Scherman, D. *Exp. Opin. Ther. Patents*, 1998, 8, 1125.
- [340] Gao, X., Huang, L. *Biochim. Biophys. Acta*, 1991, 179, 280.
- [341] Farhood, H., Bottega, R., Epand, R.M., Huang, L. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1992, 1111, 239.
- [342] Ghosh, Y.K., Visweswariah, S.S., Bhattacharya, S. *FEBS Lett.*, 2000, 473, 341.
- [343] Okayama, R., Noji, M., Nakanishi, M. *FEBS Lett.*, 1997, 408, 232.
- [344] Behr, J.-P. *Tetrahedron Lett.*, 1986, 27, 5861
- [345] Behr, J.-P., Demeneix, B., Loeffler, J.P., Perez-Mutul, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86, 6982.
- [346] Byk, G., Dubertret, C., Escriou, V., Frederic, M., Jaslin, G., Rangara, R., Pitard, B., Crouzet, J., Wils, P., Schwartz, B., Scherman, D. *J. Med. Chem.*, 1998, 41, 229.
- [347] Byk, G., Frederic, M., Scherman, D. *Tetrahedron Letters*, 1997, 38, 3219.
- [348] Lee, E.R., Marshall, J., Siegel, C.S., Jiang, C.W., Yew, N.S., Nichols, M.R., Nietupski, J.B., Ziegler, R.J., Lane, M.B., Wang, K.X., Wan, N.C., Scheule, R.K., Harris, D.J., Smith, A.E., Cheng, S.H. *Hum. Gene Ther.*, 1996, 7, 1701.
- [349] Cooper, R.G., Etheridge, C.J., Stewart, L., Marshall, J., Rudginsky, S., Cheng, S.H., Miller, A.D. *Chem. Eur. J.*, 1998, 4, 137.
- [350] Hawley-Nelson, P., Ciccarone, V., Gebeyehu, G., Jessee, J., Felgner, P.L. *Focus*, 1993, 15, 73.
- [351] Hofland, H.E., Shephard, L., Sullivan, S.M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93, 7305.
- [352] Hofland, H.E., Nagy, D., Liu, J.J., Spratt, K., Lee, Y.L., Danos, O., Sullivan, S.M. *Pharm. Res.*, 1997, 14, 742.
- [353] Wheeler, C.J., Sukhu, L., Yang, G., Tsai, Y., Bustamente, C., Felgner, P., Norman, J., Manthorpe, M. *Biochim. Biophys. Acta*, 1996, 1280, 1.
- [354] Wheeler, C.J., Felgner, P.L., Tsai, Y.J., Marshall, J., Sukhu, L., Doh, S.G., Hartikka, J., Nietupski, J., Manthorpe, M., Nichols, M., Plewe, M., Liang, X., Norman, J., Smith, A., Cheng, S.H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93, 11454.
- [355] Vigneron, J.P., Oudrhiri, N., Fauquet, M., Vergely, L., Bradley, J.C., Basseville, M., Lehn, P., Lehn, J.M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93, 9682.
- [356] Ruyschaert, J.M., el Ouahabi, A., Willeaume, V., Huez, G., Fuks, R., Vandenbranden, M., Di Stefano, P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1994, 203, 1622.
- [357] Oudrhiri, N., Vigneron, J.P., Peuchmaur, M., Leclerc, T., Lehn, J.M., Lehn, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94, 1651.
- [358] Densmore, C.L., Giddings, T.H., Waldrep, J.C., Kinsey, B.M., Knight, V. *J. Gene Med.*, 1999, 1, 251.
- [359] Patel, M., Vivien, E., Hauchecorne, M., Oudrhiri, N., Ramasawmy, R., Vigneron, J.P., Lehn, P., Lehn, J.M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001, 281, 536.
- [360] Heyes, J.A., Niculescu-Duvaz, D., Cooper, R.G., Springer, C.J. *J. Med. Chem.*, 2002, 45, 99.
- [361] Bhattacharya, S., Subramanian, M., Hiremath, U.S. *Chem. Phys. Lipids*, 1995, 78, 177.
- [362] Solodin, I., Brown, C.S., Bruno, M.S., Chow, C.Y., Jang, E.H., Debs, R.J., Heath, T.D. *Biochemistry*, 1995, 34, 13537

- [363] Niven, R., Zhang, Y., Huang, P., Wang, J. In WO9925342, 1999
- [364] Liang, E., Hughes, J. *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, 1369, 39.
- [365] Huang, S.K., Jin, B., Quinn, Y.P., Zalipsky, S., Zhang, W.M. In WO0126625, 2001.
- [366] van der Woude, I., Wagenaar, A., Meekel, A.A., ter Beest, M.B., Ruiters, M.H., Engberts, J.B., Hoekstra, D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94, 1160.
- [367] Meekel, A.A.P., Wagenaar, A., Smisterova, J., Kroeze, J.E., Haadsma, P., Bosgraaf, B., Stuart, M.C.A., Brisson, A., Ruiters, M.H.J., Hoekstra, D., Engberts, J.B.F.N. *Eur. J. Org. Chem.*, 2000, 665.
- [368] Aberle, A.M., Tablin, F., Zhu, J., Walker, N.J., Gruenert, D.C., Nantz, M.H. *Biochemistry*, 1998, 37, 6533.
- [369] Li S, Rizzo MA, Bhattacharya S, Huang L. 1998. *Gene Ther.* 5:930
- [370] Liu Y, Mounkes LC, Liggitt HD, Brown CS, Solodin L, et al. 1997. *Nat. Biotechnol.* 15:167
- [371] Mahato RI, Anwer K, Tagliaferri F, Meaney C, Leonard P, et al. 1998. *Hum. Gene Ther.* 9:2083
- [372] Thierry AR, Rabinovich P, Peng B, Mahan LC, Bryant JL, et al. 1997. *Gene Ther.* 4:226
- [373] L. G. Barron, L. Gagne, and F. C. Szoka Jr. *Hum. Gene Ther.* (1999), 10, 1683- 1694.
- [374] L. G. Barron and F. C. Szoka. In L. Huang, M. C. Hung, and E. Wagner (eds.), *Nonviral Vectors for Gene Therapy*, Academic, San Diego, 1999, pp. 229-266.
- [375] Liu F, Qi H, Huang L, Diu L. *Gene Ther* 1997;4:517-523.
- [376] Yang JP, Huang L. *Gene Ther* 1997;4:950-960.
- [377] Kitson C, Angel B, Judd D, Rothery S, Severs NJ, Dewar A, Huang L, Wadsworth SC, Cheng SH, Geddes DM, Alton EFWF. *Gene Ther* 1999;6:536-546.
- [378] Litzinger DC, Brown JM, Wala I, Kaufman SA, Van GY, Farell CL, Collins D. *Biochim Biophys Acta* 1996;1281:139-149.
- [379] Li S, Tseng WC, Stolz DB, Wu SP, Watkins SC, Huang L. *Gene Ther* 1999;6:585-594.
- [380] Yang JP, Huang L. *Gene Ther* 1998;5:380-387.
- [381] Crook K, Stevenson BJ, Dubouchet M, Porteous DJ. 1998. *Gene Ther.* 5: 137
- [382] Ambegia E, Ansell S, Cullis P, Heyes Palmer L, MacLachlan I. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1669:155-163.
- [383] Guo X, Jr, Szoka FC, Jr. *Bioconjug Chem.* 2001;12:291-300.
- [384] G.F. Walker, C. Fella, J. Pelisek, J. Fahrmeir, S. Boeckle, M. Ogris, E. Wagner, *Molec. Ther.* 11 (2005) 418–425.
- [385] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter. *Molecular Biology of the Cell*. Garland, New York, 2002.
- [386] Thierry AR, Lunardi-Iskandar Y, Bryant JL, Rabinovich P, Gallo RC, Mahan LC. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92:9742-9746.
- [387] Hyde SC, Southern KW, Gileadi U, et al. *Gene Ther.* 2000;7:1156-1165.
- [388] Noone PG, Hohneker KW, Thou Z, et al. *Mol Ther.* 2000;1:105-114.
- [389] Bragonzi A, Dina G, Villa A, et al. *Gene Ther.* 2000;7:1753-1760.
- [390] Duncan JE, Whittsett JA, Horowitz AD. *Hum Gene Ther.* 1997;8:431-438.
- [391] Rosenecker J, Naundorf S, Gersting SW. et al. *J Gene Med.* 2003;5:49-60.
- [392] Simberg D, Weisman S, Taimon Y, Faerman A, Shoshani T, *J Biol Chem.* 2003;278:39858-39865.
- [393] Song YK, Liu F, Liu D. *Gene Ther.* 1998;5:1531-1537.
- [394] Sellins K, Fradkin L, Liggitt D, Dow S. *Mol Ther* 2005; 12: 451–459.
- [395] Krieg AM. *J Gene Med.* 1999;1:56-63.
- [396] McLachlan G, Stevenson BJ, Davidson DJ, Porteous DJ. *Gene Ther.* 2000;7:384-392.
- [397] Yew NS, Wang KX, Przybylska M, Bagley RG, Stedman M. 1999. *Hum. Gene Ther.* 10:223
- [398] Liu F, Shollenberger LM, Huang L. *FASEB J* 2004; 18: 1779–1781.
- [399] Plank C, Jr, Mechtler K, It, Szoka FC, Jr; Wagner E. *Hum Gene Ther.* 1996;7:1437-1446.
- [400] Penske DB, MacLachlan I, Cullis PR. *Curr Opin Mol Ther.* 2001;3:153-158.
- [401] Song LY, Ahkong QF, Rong Q, et al. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1558:I-13.
- [402] Wetzter B, Byk G, Frederic M, et al. *Biochem J.* 2001;356:747-756.
- [403] Tang F, Hughes JA. *Bioconj Chem.* 1999;10:791-796.
- [404] Ruiz FE, Clancy JP, Perricone MA, et al. *Hum Gene Ther.* 2001;12:751 761.
- [405] Scheule RK, St George JA, Bagley RG, et al. *Hum Gene Ther.* 1997;8:689-707.
- [406] Yew NS, Scheule RK. *Adv Genet.* 2005;53:189-214.
- [407] R. Bottega, R.M. Epand, *Biochemistry* 31 (1992) 9025–9030.
- [408] A. Roosjen, J. Smisterova, C. Driessen, J.T. Anders, A. Wagenaar, D. Hoekstra, R. Hulst, J.B.F.N. Engberts, *Eur. J. Org. Chem.* 7 (2002) 1271–1277.
- [409] M.A. Ilies, W.A. Seitz, M.T. Caproiu, M. Wentz, R.E. Garfield, A.T. Balaban, *Eur. J. Org. Chem.* 14 (2003) 2645–2655.
- [410] M.A. Ilies, B.H. Johnson, F. Makori, A. Miller, A.S. William, E. Seitz, B. Thompson, A.T. Balaban, *Arch. Biochem. Biophys.* 435 (2005) 217–226.
- [411] B.E. Yingyongnarongkul, M. Howarth, T. Elliott, M. Bradley, *Chem. Eur. J.* 10 (2004) 463–473.

- [412] F.X. Tang, J.A. Hughes, *J. Control. Release* 62 (1999) 345–358.
- [413] S.J. Freedland, R.W. Malone, H.M. Borchers, Z. Zadourain, J.G. Malone, M.J. Bennett, M.H. Nantz, J.H. Li, P.H. Gumerlock, K.L. Erickson, *Biochem. Mol. Med.* 59 (1996) 144–153.
- [414] H. Farhood, R. Bottega, R.M. Epand, L. Huang, *Biochim. Biophys. Acta* 1111 (1992) 239–246.
- [415] J.S. Choi, E.J. Lee, H.S. Jang, J.S. Park, *Bioconjug. Chem.* 12 (2001) 108–113.
- [416] D.L. Liu, J.J. Hu, W.H. Qiao, Z.S. Li, S.B. Zhang, L.B. Cheng, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15 (2005) 3147–3150.
- [417] D.L. Liu, J.J. Hu, W.H. Qiao, Z.S. Li, S.B. Zhang, L.B. Cheng, *Lipids* 40 (2005) 839–848.
- [418] T. Ren, G.S. Zhang, D.X. Liu, *Tetrahedron Lett.* 42 (2001) 1007–1010.
- [419] J.A. Boomer, D.H. Thompson, *Chem. Phys. Lipids* 99 (1999) 145–153.
- [420] J.A. Boomer, D.H. Thompson, S.M. Sullivan, *Pharm. Res.* 19 (2002) 1292–1301.
- [421] Kresina, T.F.; Branch, A.D.; Kresina, Editor 2001, Wiley-Liss: New York, 1–22.
- [422] Zhu N, Liggitt D, Liu Y, Debs R. *Science* 1993;261:209–211.
- [423] Li S, Huang L. *Gene Ther* 1997;4:891–900.
- [424] Sakurai F, Nishioka T, Saito H, Baba T, Okuda A, Matsumoto O, Taga T, Yamashita F, Hashida M. *Gene Ther* 2001;8:677–686.
- [425] Li S, Huang L. *Gene Ther* 1997;4:930–937.
- [426] Sorgi FL, Bhattacharya S, Huang L. *Gene Ther* 1997;4:961–968.
- [427] Pitard B, Aguerre O, Airiau M, Lachages AM, Boukhnikachvilli T, Byk G, Dubertret C, Herviou C, Scherman D, Mayaux JF, Crouzet J. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:14412–14417.
- [428] Xing, X., Zhang, S., Chang, J.Y., Tucker, S.D., Chen, H., Huang, L., Hung, M.C. *Gene Ther.*, 1998, 5, 1538.
- [429] Hortobagyi, G.N., Ueno, N.T., Xia, W., Zhang, S., Wolf, J.K., Putnam, J.B., Weiden, P.L., Willey, J.S., Carey, M., Branham, D.L., Payne, J.Y., Tucker, S.D., Bartholomeusz, C., Kilbourn, R.G., De Jager, R.L., Sneige, N., Katz, R.L., Anklesaria, P., Ibrahim, N.K., Murray, J.L., Theriault, R.L., Valero, V., Gershenson, D.M., Bevers, M.W., Huang, L., Lopez-Berestein, G., Hung, M.C. *J. Clin. Oncol.*, 2001, 19, 3422.
- [430] Nabel, G.J., Nabel, E.G., Yang, Z.Y., Fox, B.A., Plautz, G.E., Gao, X., Huang, L., Shu, S., Gordon, D., Chang, A.E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90, 11307.
- [431] Hottiger, M.O., Dam, T.N., Nickoloff, B.J., Johnson, T.M., Nabel, G.J. *Gene Ther.*, 1999, 6, 1929.
- [432] Schatzlein, A.G., 2001. *Anti-Cancer Drugs* 12, 275–304.
- [433] Aoki, K., Yoshida, T., Sugimura, T., Terada, M., 1995. *Cancer Res.* 55, 3810–3816.
- [434] Egilmez, N.K., Cuenca, R., Yokota, S.J., Sorgi, F., Bankert, R.B., 1996. *Gene Ther.* 3, 607–614.
- [435] Anwer, K., Kao, G., Proctor, B., Anscombe, I., Florack, V., Earls, R., Wilson, E., McCreery, T., Unger, E., Rolland, A., Sullivan, S.M., 2000. *Gene Ther.* 7, 1833–1839.
- [436] Anwer, K., Kao, G., Proctor, B., Rolland, A., Sullivan, S., 2000. *J. Drug Target.* 8, 125–135.
- [437] Zou, Y.Y., Zong, G., Ling, Y.H., Perez-Soler, R., 2000. *Cancer Gene Ther.* 7, 683–696.
- [438] Vogel, J.C. *Hum. Gene Ther.*, 2000, 11, 2253.
- [439] Daniels, G.A., Galanis, E. *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 2001, 3, 70.
- [440] Galanis, E., Hersh, E.M., Stopeck, A.T., Gonzalez, R., Burch, P., Spier, C., Akporiaye, E.T., Rinehart, J.J., Edmonson, J., Sobol, R.E., Forscher, C., Sondak, V.K., Lewis, B.D., Unger, E.C., O'Driscoll, M., Selk, L., Rubin, J. *J. Clin. Oncol.*, 1999, 17, 3313.
- [441] Oshikawa, K., Shi, F., Rakhmilevich, A.L., Sondel, P.M., Mahvi, D.M., Yang, N.S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96, 13351.
- [442] Hui, K.M., Ang, P.T., Huang, L., Tay, S.K. *Gene Ther.*, 1997, 4, 783.
- [443] Nabel, E.G., Yang, Z., Muller, D., Chang, A.E., Gao, X., Huang, L., Cho, K.J., Nabel, G.J., 1994. *Hum. Gene Ther.* 5, 1089–1094.
- [444] Nabel, G.J., Gordon, D., Bishop, D.K., Nicoloff, B.J., Yang, Z.Y., Aruga, A., Cameron, M.J., Nabel, E.G., Chang, A.E., 1996. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 15388–15393.
- [445] Stopeck, A.T., Hersh, E.M., Brailey, J.L., Clark, P.R., Norman, J., Parker, S.E., 1998. *Cancer Gene Ther.* 5, 119–126.
- [446] Kawakami S, Yamashita F, Nishikawa M, Takakura Y, Hashida M. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;252:78–83.
- [447] Kawakami S, Fumoto S, Nishikawa M, Yamashita F, Hashida M. *Pharm Res* 2000;17:306–313.
- [448] Fumoto S, Kawakami S, Ito Y, Shigeta K, Yamashita F, Hashida M. *Mol Ther* 2003;7:719–729.
- [449] Garin-Chesa P, et al. *Am J Pathol* 1993;142:557–567.
- [450] Ross JF, Chaudhuri PK, Ramam M. *Cancer* 1994;73:2432–2443.
- [451] Reddy JA, Abburi C, Hofland H, Howard SJ, Vlahov I, Wils P, Leamon CP. *Gene Ther* 2002;9:1542–1550.
- [452] Hofland HEJ, Masson C, Iginla S, Osetinsky I, Reddy JA, Leamon CP, Scherman D, Bessodes M, Wils P. *Mol Ther* 2002;5:739–744.

- [453] Hood JD, Bednarski M, Frausto R, Guccione S, Reisfeld RA, Xiang R, Cheresch DA. *Science* 2002;296:2404-2407.
- [454] Mukherjee A, Prasad TK, Rao NM, Banerjee R. *J Biol Chem* 2005;280:15619-15627.
- [455] Reddy BS, Banerjee R. *Angew Chem Int Ed* 2005;44:6723-6727.
- [456] Felix R, During G. *Lancet* 2003;361:681-689.
- [457] Yang, Y., Raper, S.E., Cohn, J.A., Engelhardt, J.F., Wilson, J.M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90, 4601.
- [458] Davies, J.C., Geddes, D.M., Alton, E.W. *Mol. Med. Today*, 1998, 4, 292.
- [459] Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J.L. *Science*, 1989, 245, 1066.
- [460] Alton, E., Geddes, D. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 1998, 30, 205.
- [461] Alton, E., Kitson, C. *Expert Opin. Investig. Drugs*, 2000, 9, 1523.
- [462] Geddes, D., Alton, E. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 1998, 30, 205.
- [463] Geddes, D.M., Alton, E.W. *Thorax*, 1999, 54, 1052
- [464] Jaffe, A., Bush, A., Geddes, D.M., Alton, E.W. *Arch Dis. Child*, 1999, 80, 286.
- [465] Jaffe, A., Judd, D., Ratcliffe, C., Cheng, S.H., Bush, A., Geddes, D.M., Alton, E.W. *Gene Ther.*, 2000, 7, 273.
- [466] Porteous, D.J., Alton, E.W., 1993. *Bioessays* 15, 485-486.
- [467] Porteous, D.J., Dorin, J.R., 1993. *Hum. Mol. Gen.* 2, 211-212.
- [468] Caplen, N.J., Alton, E., Middleton, P.G., Dorin, J.R., Stevenson, B.J., Gao, X., Durham, S.R., Jeffery, P.K., Hodson, M.E., Coutelle, C., Huang, L., Porteous, D.J., Williamson, R., Geddes, D.M., 1995. *Nature Med.* 1, 39-46.
- [469] Gill, D.R., Southern, K.W., Mofford, K.A., Seddon, T., Huang, L., Sorgi, F., Thomson, A., MacVinish, L.J., Ratcliff, R., Bilton, D., Lane, D.J., Littlewood, J.M., Webb, A.K., Middleton, P.G., Colledge, W.H., Cuthbert, A.W., Evans, M.J., Higgins, C.F., Hyde, S.C., 1997. *Gene Ther.* 4, 199-209.
- [470] Ennist, D.L. *Trends Pharm. Sci.*, 1999, 20, 260.
- [471] Bragonzi, A., Boletta, A., Biffi, A., Muggia, A., Sersale, G., Cheng, S.H., Bordignon, C., Assael, B.M., Conese, M. *Gene Ther.*, 1999, 6, 1995.
- [472] Alton EW, Middleton PG, Caplen NJ, Smith SN, Steel DM, Munkonge FM, Jeffery PK, Geddes DM, Hart SL, Williamson R, et al. *Nat Genet* 1993;5:135-142.
- [473] Middleton, P.G., Caplen, N.J., Gao, X., Huang, L., Gaya, H., Geddes, D.M., Alton, E.W. *Eur. Respir. J.*, 1994, 7, 442.
- [474] Chadwick, S.L., Kingston, H.D., Stern, M., Cook, R.M., O'Connor, B.J., Lukasson, M., Balfour, R.P., Rosenberg, M., Cheng, S.H., Smith, A.E., Meeker, D.P., Geddes, D.M., Alton, E.W. *Gene Ther.*, 1997, 4, 937.
- [475] Zabner, J., Cheng, S.H., Meeker, D., Launsbach, J., Balfour, R., Perricone, M.A., Morris, J.E., Marshall, J., Fashbender, A., Smith, A.E., Welsh, M.J. *J. Clin. Invest.*, 1997, 100, 1529.
- [476] Porteous, D.J., Dorin, J.R., McLachlan, G., Davidson-Smith, H., Davidson, H., Stevenson, B.J., Carothers, A.D., Wallace, W.A., Moralee, S., Hoenes, C., Kallmeyer, G., Michaelis, U., Naujoks, K., Ho, L.P., Samways, J.M., Imrie, M., Greening, A.P., Innes, J.A. *Gene Ther.*, 1997, 4, 210.
- [477] Norman, J.A., Hobart, P., Manthorpe, M., Felgner, P., Wheeler, C. *Vaccine*, 1997, 15, 801.
- [478] Guillaume, C., Delepine, P., Droal, C., Montier, T., Tymen, G., Claude, F. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001, 286, 464.
- [479] Alton, E.W.F.W., 2000. *Proc. Int. Symp. Control Rel. Bioactive Mater.* 27, 176.
- [480] Davies, J.C., Geddes, D.M., Alton, E.W.F.W. *Curr Opin Pharmacol*, 2001, 1, 272.
- [481] Stribling R, Brunette E, Liggit D, Gaensler K, Debs R. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:11277-11281.
- [482] Blomer, U., Naldini, L., Verma, I.M., Trono, D., Gage, F.H. *Hum. Mol. Genet.*, 1996, 5, 1397.
- [483] Federoff, H.J. *Gene Ther.*, 1999, 6, 1907.
- [484] Yenari, M.A., Fink, S.L., Sun, G.H., Chang, L.K., Patel, M.K., Kunis, D.M., Onley, D., Ho, D.Y., Sapolsky, R.M., Steinberg, G.K. *Ann. Neurol.*, 1998, 44, 584.
- [485] Costantini, L.C., Bakowska, J.C., Breakefield, X.O., Isacson, O. *Gene Ther.*, 2000, 7, 93.
- [486] Pardridge, W. *Drug Discov. Today*, 2001, 6, 125.
- [487] Yang, K., Clifton, G.L., Hayes, R.L. *J. Neurotrauma*, 1997, 14, 281.
- [488] Shi, N., Pardridge, W.M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 97, 7567.
- [489] Zhu, J., Zhang, L., Hanisch, U.K., Felgner, P.L., Reszka, R. *Gene Ther.*, 1996, 3, 472.
- [490] Zou, L.L., Huang, L., Hayes, R.L., Black, C., Qiu, Y.H., Perez-Polo, J.R., Le, W., Clifton, G.L., Yang, K. *Gene Ther.*, 1999, 6, 994.
- [491] Murray, K.D., McQuillin, A., Stewart, L., Etheridge, C.J., Cooper, R.G., Miller, A.D., Gurling, H.M. *Gene Ther.*, 1999, 6, 190.
- [492] Ohki, E.C., Tilkins, M.L., Ciccarone, V.C., Price, P.J. *J. Neurosci. Methods*, 2001, 112, 95.
- [493] Nabel, E.G., Plautz, G., Nabel, G.J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89, 5157.

- [494] Abraham, N.G., Lavrovsky, Y., Schwartzman, M.L., Stoltz, R.A., Levere, R.D., Gerritsen, M.E., Shibahara, S., Kappas, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, 92, 6798.
- [495] Wright, M.J., Rosenthal, E., Stewart, L., Wightman, L.M., Miller, A.D., Latchman, D.S., Marber, M.S. *Gene Ther.*, 1998, 5, 301.
- [496] DeBruyne, L.A., Li, K., Chan, S.Y., Qin, L., Bishop, D.K., Bromberg, J.S. *Gene Ther.*, 1998, 5, 1079.
- [497] Mann, M.J. *Mol. Med. Today*, 2000, 6, 285.
- [498] Scholl, F.G., Sen, L., Drinkwater, D.C., Laks, H., Ma, X.Y., Hong, Y.S., Chang, P., Cui, G. *J. Heart Lung Transplant.*, 2001, 20, 322.
- [499] Laitinen, M., Hartikainen, J., Hiltunen, M.O., Eranen, J., Kiviniemi, M., Narvanen, O., Makinen, K., Manninen, H., Syvanne, M., Martin, J.F., Laakso, M., Yla-Herttuala, S., 2000. *Hum. Gene Ther.* 11, 263–270.
- [500] Smith, B.F., Baker, H.J., Curiel, D.T., Jiang, W., Conry, R.M., 1998. *Gene Ther.* 5, 865–868.
- [501] Gregoriadis, G., Saffie, R., De Souza, J.B., 1997. *FEBS Lett.* 402, 107–110.
- [502] Singh, M., Briones, M., Ott, G., O'Hagan, D., 2000. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 811–816.
- [503] Fellowes, R., Etheridge, C.J., Coade, S., Cooper, R.G., Stewart, L., Miller, A.D., Woo, P., 2000. *Gene Ther.* 7, 967–977.
- [504] Birchall, J.C., Marichal, C., Campbell, L., Alwan, A., Hadgraft, J., Gumbleton, M. *Int. J. Pharm.*, 2000, 197, 233.
- [505] Madry, H., Reszka, R., Bohlender, J., Wagner, J. *J. Mol. Med.*, 2001, 79, 184.
- [506] Imai, E. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2001, 16, 26.
- [507] Kitamura, M., Tsuboniwa, N., Azuma, H., Wang, J., Matsumiya, K., Matsumoto, K., Kaneda, Y., Takahara, S., Okuyama, A. *Transplant. Proc.*, 2001, 33, 2865.
- [508] Campeau, P., Chapdelaine, P., Seigneurin-Venin, S., Massie, B., Tremblay, J.P. *Gene Ther.*, 2001, 8, 1387.
- [509] Madry, H., Trippel, S.B. *Gene Ther.*, 2000, 7, 286.
- [510] Pleyer, U., Groth, D., Hinz, B., Keil, O., Bertelmann, E., Rieck, P., Reszka, R. *Exp. Eye Res.*, 2001, 73, 1.
- [511] Abul-Hassan, K., Walmsley, R., Boulton, M. *Curr. Eye Res.*, 2000, 20, 361.
- [512] F. M. Menger, C. A. Littau. *J. Am. Chem. Soc.* (1991), 113, 1451-1452.
- [513] C. A. Bunton, L. Robinson, J. Schaak, M. F. Stam. *J. Org. Chem.* (1971), 36, 2346.
- [514] R. A. Moss, J. M. Li. *J. Am. Chem. Soc.* (1992), 114, 9227.
- [515] C. McGregor, C. Perrin, M. Monck, P. Camilleri, A. J. Kirby. *J. Am. Chem. Soc.* (2001), 123, 6215.
- [516] S. D. Wetting, R. E. Verrall, M. Foldvari. *Current Gene Therapy*, (2008), 8, 9-23.
- [517] Fisicaro, E.; Compari, C.; Duce, E.; Donofrio, G.; Rozycka-Roszak, B.; Wouzniak, E. *Biochim. Biophys. Acta: Gen. Subj.* 2005, 1722, 224–233.
- [518] Rozycka-Roszak, B.; Pruchnik, H. *Z. Naturforsch.* 2000, 55c, 240–244.
- [519] Rozycka-Roszak, B.; Przyczyna, A. *Chem. Phys. Lipids* 2003, 123, 209–221.
- [520] Viscardi, G.; Quagliotto, P.; Barolo, C.; Savarino, P.; Barni, E.; Fisicaro, E. *J. Org. Chem.* 2000, 65 (24), 8197-8203.
- [521] Fisicaro, E.; Braibanti, A. *Talanta* 1988, 35, 769-774.
- [522] Gran, G. *Analyst* 1952, 77, 661.
- [523] Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca, A. *Talanta* 1996, 43, 1739-1753.
- [524] S. D. Wetting, R. E. Verral. *J. of Colloid Interface Sci.* (2001), 235, 310.
- [525] R. De Lisi, S. Milioto, R. E. Verral. *J. Solution Chem.* (1990), 19, 665.
- [526] M. Iqbal, R. E. Verral. *J. Phys. Chem.* (1987), 91, 967.
- [527] T. V. Chalikian, A. P. Sarvazyan, K. Breslauer. *J. Phys. Chem.* (1993), 97, 13017.
- [528] J. J. Galán, A. González-Pérez, J. R. Rodríguez. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* (2003), 72, 465.
- [529] J. J. Galán, A. González-Pérez, J. R. Rodríguez. *Fluid Phase Equilibria* (2004), 224, 7.
- [530] E. Junquera, E. Aicart. *Langmuir* (2002), 18, 9250.
- [531] E. Junquera, L. Peña, E. Aicart. *Langmuir* (1997), 13, 219.
- [532] S.K. Mehta, K.K. Bhasin, R. Chauhan, S. Dham. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* (2005), 255, 153.
- [533] P. Carpena, J. Aguiar, P. Bernaola-Galvan, Ruiz C. Carnero, *Langmuir*, (2002), 18, 6054.
- [534] E. G. Alami, G. Beinert, P. Marie, R. Zana. *Langmuir* (1993), 9, 1465.
- [535] L. Perez, A. Pinazo, M. J. Rosen, M. R. Infante. *Langmuir* (1998), 14, 2307.
- [536] E. Fisicaro, M. Biemmi, C. Compari, E. Duce, M. Peroni. *J Colloid Surface Sci.*, (2007), 305, 301–307.
- [537] R. De Lisi, S. Milioto, M. Castagnolo, A. Inglese, *J. Sol. Chem.* 16 (1987) 373.
- [538] S.K. Mehta, K.K. Bhasin, A. Kumar, S. Dham, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 278 (2006) 17.

- [539] K. Hiramatsu, K. Kameyama, R. Ishiguro, M. Moroi, H. Hayase, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 76 (2003) 1903.
- [540] R. Zana, *J. Coll. Inter. Sci.* 78 (1980) 330.
- [541] N.M. van Os, J.R. Haak, L.A.M. Rupert, in: *Physico-Chemical Properties of Selected Anionic, Cationic and Nonionic Surfactant*, Elsevier, Amsterdam, 1993.
- [542] E. Fiscaro, E. Pelizzetti, M. Barbieri, P. Savarino, G. Viscardi, *Thermochimica Acta*, 168 (1990) 143.
- [543] E. Fiscaro, M. Barbieri, E. Pelizzetti, P. Savarino, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 87 (1991) 2983.
- [544] B. Rozycka-Roszak, U. Walkowiak, S. Witek, S. Przystalski, *Colloids Poly. Sci.* 267 (1989) 831.
- [545] E. Fiscaro, A. Ghiozzi, E. Pelizzetti, G. Viscardi, P. Quagliotto, *J. Colloid Interface Sci.* 182 (1996) 549.
- [546] E. Fiscaro, C. Compari, A. Braibanti, *Physical Chemistry and Chemical Physics (PCCP)* 6(16) (2004) 4156.
- [547] D. Khatua, A. Gupta, J. Dey, *J. Colloid Interference Sci.* 298 (2006) 451.
- [548] Lollo CP, Banaszczuk MG, Mullen PM, et al. *Methods Mol Med.* 2002;69:1-13.
- [549] G. Basu Ray, I. Chakraborty, S. Ghosh, S.P. Moulik, R. Palepu, *Langmuir* 21 (2005) 1095.
- [550] J.M. Richmond, ed., *Cationic surfactants: Organic Chemistry*, Marcel Dekker, New York, 1990.
- [551] M. Frindi, B. Michels, H. Levy, R. Zana, *Langmuir* 10 (1994) 1140.
- [552] Mata J., Varade D., Bahadur P., *Termochim. Acta* 428 (2005) 147.
- [553] J. Dahmen, T. Frejd, G. Magnusson, G. Noori, A.S. Carlstrom, *Carbohydr. Res.* 127 (1984) 15–25.
- [554] J. Dahmen, T. Frejd, G. Magnusson, G. Noori, *Carbohydr. Res.* 114 (1983) 328–330.
- [555] R.R. Schmidt, J. Michel, M. Roos, *Liebigs Ann. Chem.* 7 (1984) 1343–1357.
- [556] R.R. Schmidt, J. Michel, *Angew Chem. Int. Ed.* 21 (1982) 72–73.
- [557] M. Blanzat, E. Perez, I. Rico-Lattes, D. Prome, J.C. Prome, A. Lattes, *Langmuir* 15 (1999) 6163–6169.
- [558] A. Pasc-Banu, M. Blanzat, M. Belloni, E. Perez, C. Mingotaud, I. Rico-Lattes, T. Labrot, R. Oda, *J. Fluorine Chem.* 126 (2005) 33–38.
- [559] I. Rico-Lattes, M. Blanzat, S. Franceschi-Messant, E. Perez, A. Lattes, *CR Chimie* 8 (2005) 807–814.
- [560] P.L. Quagliotto, G. Viscardi, C. Barolo, D. D'Angelo, E. Barni, C. Compari, E. Duce, E. Fiscaro, *J. Org. Chem.* 70 (24) (2005) 9858–9866.
- [561] R. De Lisi, E. Fiscaro, S. Milioto, E. Pelizzetti, P. Savarino, *J. Solution Chem.* 19 (1990) 247–270.
- [562] E. Fiscaro, A. Ghiozzi, E. Pelizzetti, G. Viscardi, P. Quagliotto, *J. Colloid Interf. Sci.* 184 (1996) 147–154.
- [563] J.E. Desnoyers, G. Perron, in: R. Zana (Ed.), *Surfactant Solutions—New Methods of Investigation*, Marcel Dekker Inc., New York, 1987, p. 1.
- [564] R. De Lisi, E. Fiscaro, S. Milioto, *J. Solution Chem.* 17 (1988) 1015–1041.
- [565] E. Fiscaro, C. Compari, P.L. Quagliotto, G. Viscardi, *J. Colloid Interf. Sci.* 255 (2) (2002) 410–416.
- [566] E. Fiscaro, C. Compari, Y. Moroi, *Polyhedron* 21 (2002) 1497–1502.
- [567] E. Fiscaro, C. Compari, E. Duce, C. Contestabili, P. Quagliotto, G. Viscardi, *J. Phys. Chem. B* 109 (2005) 1744–1749.
- [568] R. De Lisi, C. Ostiguy, G. Perron, J.E. Desnoyer, *J. Colloid Interface Sci.* 71 (1979) 147-166.
- [569] P. Gianni, L. Lepori, *Journal of Solution Chemistry* 25 (1996) 1-42.
- [570] E. Fiscaro, M. Biemmi, C. Compari, E. Duce, M. Peroni, G. Viscardi and P. L. Quagliotto, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 301 (2007) 129-136.
- [571] E. Fiscaro, E. Pelizzetti, G. Viscardi, P. Quagliotto, L. Trossarelli, *J. Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 84 (1994) 59-70.
- [572] G.D. Schmidt-Wolf, I.G. Schmidt-Wolf, *Trends Mol. Med.* 9 (2003) 67-72.
- [573] Zana, R. *J. Colloid Interface Sci.* 2002, 246, 182-190.
- [580] Quagliotto, P.; Viscardi, G.; Barolo, C.; Barni, E.; Bellinvia, S.; Fiscaro, E.; Compari, C. *J. Org. Chem.* 2003, 68 (20), 7651-7660.
- [581] E. Kudryashov, T. Kapustina, S. Morrissey, V. Buckin, K. Dawson, *Journal of Colloid and Interface Science* 203 (1998) 59-68.
- [582] K. Fukada, J. Li, M. Fujii, T. Kato, T. Seimiya, *J. Oleo Sci.* 51 (2002) 103-111.
- [583] M. Bryszewska, R. M. Epand, *Biochimica et Biophysica Acta* 943 (1988) 485-492
- [584] P.C. Bell, M. Bergsma, I.P. Dolbnya, W. Bras, M.C.A. Stuart, A. E. Rowan, M.C. Feiters, J.B.F.N. Engberts, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 1551-1558.
- [585] C. Bustamante; C. Rivetti, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 1996, 25, 395-429.
- [586] H. G. Hansma, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 2001, 52, 71-92.
- [587] F. Sansone, M. Dudic, G. Donofrio, C. Rivetti, L. Baldini, A. Casnati, S. Cellai, and R. Ungaro, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 14528-14536.

- [588] C. Volcke, S. Pirotton, Ch. Grandfils, C. Humbert, P. A. Thiry, I. Ydens, P. Dubois, M. Raes, M. J. *Biotechnol.* 2006, 125, 11-21.
- [589] P. Ceci, S. Cellai, E. Falvo, C. Rivetti, G. L. Rossi, E. Chiancone, *Nucleic Acids Res.* 2004, 32, 5935-5944.
- [590] P. Misiak, B. Rózycka-Roszak, A. Mozrzymas, E. Fiscaro. *J. Solution Chem.* (2007), 36, 845-851.
- [591] H. H. Zuidema, , G. W. Waters *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 1941, 13, 312.
- [592] B. Rozycka-Roszak, E. Fiscaro, A. Ghiozzi. *J. Colloid Interface Sci.* (1996), 184, 209.
- [593] D. Danino, Y. Talmon, R. Zana. *Langmuir* (1995), 11, 1448.
- [594] N. Hattori, H. Hirata, H. Okabayashi, M. Furusaka, C. J. O'Connor, R. Zana. *Colloid Polym. Sci.* (1999), 277, 95.
- [595] B. Rózycka-Roszak, E. Fiscaro. *Thermochim. Acta* (1992), 205, 19-31.
- [596] R. Zana, M. Benrraou, R. Rueff. *Langmuir* (1991), 7, 1072.
- [597] A. Pinazo, X. Wen, L. Perez, M. R. Infante, E. I. Franes. *Langmuir* (1999), 15, 3134-3142.
- [598] T. Yoshimura, H. Yoshida, A. Ohno, K. Esumi. *J. Colloid Interface Sci.* (2003), 267, 167-172.
- [599] K. Tsubone, Y. Arakawa, M. J. Rosen. *J. Colloid Interface Sci.* (2003), 262, 516-524.
- [600] M.E. Ferrari, C.M. Nguyen, O. Zelphati, Y. Tsai, P.L. Felgner. *Hum. Gene Ther.* (1998), 9, 341 – 351.
- [601] E. Fiscaro, C. Compari, E. Duce, A. Braibanti, *J. Solut. Chem.*, 2008, 37, 487
- [602] E. Fiscaro, C. Compari, A. Braibanti, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2004, 6, 4156
- [603] E. Fiscaro, C. Compari, A. Braibanti, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2005, 7, 1324
- [604] E. Fiscaro, C. Compari, E. Duce, M. Biemmi, M. Peroni, A. Braibanti, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2008, 10(26), 3903
- [605] L. R. Pratt and D. Chandler (1977) *J. Chem. Phys.*, 67, 3683
- [606] C. Tanford, (1973), *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*, New York, Wiley
- [607] C. Tanford, *J. Am. Chem. Soc.*, 84, 4240 (1962)
- [608] Ben-Naim, *Solvation Thermodynamics*, Plenum, New York, (1987)
- [609] M. Klotz, *Brookhaven Symp. Biol.*, 13, 25 (1960)
- [610] B. Guillot and Y. Giussani, *J. Chem. Phys.*, 1993, 99, 8075
- [611] B. Lee and G. Graziano, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118, 5163
- [612] G. Graziano, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2004, 6, 406
- [613] R. Zana, *Langmuir*, (1996) 12, 1208
- [614] W. Pfeil, P. L. Privalov, *Biophys.*, 1976, Chem. 4, 23
- [615] P. L. Privalov, *Pure & Appl. Chem.*, 1976, 47, 293
- [616] P. L. Privalov, S. J. Gill, *Adv. Protein Chem.*, 1988, 39, 191
- [617] P. L. Privalov, *Ann. Rev. Biophys. Chem.*, 1989, 18, 47
- [618] P. L. Privalov, *FEBS Letts.*, 40, S140 (1974)
- [619] J. M. Sturtevant, *Adv. Biophys. Bioeng.*, 1974, 3, 35
- [620] J. M. Sturtevant, *Ann. Rev. Phys. Chem.*, 1987, 38, 463
- [621] J. F. Brandts and L. Hunt., *J. Am. Chem. Soc.*, 1967, 89, 4826
- [622] R. Lumry, *Biophysical Chemistry*, (2003), 105, 545
- [623] R. Lumry, in A. Braibanti (Ed.), *Bioenergetics and thermodynamics: model systems*, Reidel, D. F. Shiao, R. Lumry, J. Fahey, *J. Am. Chem. Soc.*, 1971, 93, 2024
- [626] D. J. Winzor and C. M. Jackson, *J. Mol. Recognition*, 2006, 19, 389
- [627] G. E. Walrafen, *J. Chem. Phys.*, 1968, 42, 244
- [628] G. E. Walrafen, M. R. Fisher, M. S. Hokmabady and W. H. Yang, *J. Chem. Phys.*, 1986, 85, 6970
- [629] D. P. Kharakoz, *J. Solution Chem.*, 1992, 21, 569
- [630] D. P. Kharakoz, *Biophys. Chem.*, 1989, 34, 115
- [631] F. Franks, *Water*, The Royal Society of Chemistry, London, 1983, p. 45. 28 N. Matubayasi, L. H. Reed and R. M. Levy, *J. Phys. Chem.*, 1994, 98, 10640
- [632] E. Wilhelm, R. Battino, R. J. Wilcock, *Chem. Rev.*, 1977, 73, 1
- [633] A. Braibanti, E. Fiscaro, F. Dallavalle, J. D. Lamb, J. L. Oscarson, *J. Phys. Chem.*, 1993, 97, 8062
- [634] P. W. Atkins, *Elem. of Physical Chemistry*, Oxford, 1992, p. 90
- [635] A. Braibanti, E. Fiscaro, A. Ghiozzi, C. Compari, M. Panelli, *J. Solution Chem.*, 1995, 24, 703
- [636] A. Ben-Naim, J. Wilf, H. Yaacobi, *J. Phys. Chem.*, 1973, 77, 95
- [637] S. J. Gill, N. F. Nichols, I. Wadso, *J. Chem. Thermodynamics*, 1975, 7, 175
- [638] A. Braibanti, E. Fiscaro, F. Dallavalle, J. D. Lamb, J. L. Oscarson, F. X. Ughi *J. Phys. Chem.*, 1993, 97, 8071
- [639] A. De Robertis, C. De Stefano, C. Rigano, S. Sammartano, *J. Solution Chem.*, 1990, 19, 569
- [640] D. D. J. Wright, *J. Am. Chem. Soc.*, 1934, 56, 314
- [641] F. S. Feates, D. J. G. Ives, *J. Chem. Soc.*, 1956, 2798
- [642] H. S. Harned, R. W. Ehlers, *J. Am. Chem. Soc.*, 1934, 15, 2379

- [643] J. C. Lee, S. N. Timasheff, *Biochemistry*, 1979, 16, 1754
- [644] H. J. Hinz, M. J. Gorbunoff, B. Price, S. N. Timasheff, *Biochemistry*, 1979, 18, 3084
- [645] S. Cabani, G. Conti, A. Martinelli and E. Matteoli, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. I*, 1973, 61, 461
- [646] S. Cabani, *Port. Electrochim. Acta*, 1985, 3, 5
- [647] De Clercq, E. *Nat. Rev. Drug Discovery* 2002, 1, 13-25.
- [648] Turpin, J. A. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* 2003, 1, 97-128.
- [649] De Clercq, E. *J. Med. Chem.* 2005, 48, 1297-1313.
- [650] Pommier, Y.; Neamati, N. *Adv. Virus Res.* 1999, 52, 427-458.
- [651] Neamati, N.; Marchand, C.; Pommier, Y. *Adv. Pharmacol.* 2000, 49, 147-165.
- [652] Neamati, N. *Expert Opin. Invest. Drugs* 2001, 10, 281-296.
- [653] D'Angelo, J.; Mouscadet, J. F.; Desmaele, D.; Zouhiri, F.; Leh, H. *Pathol. Biol.* 2001, 49, 237-246.
- [654] Anthony, N. J. *Curr. Top. Med. Chem.* 2004, 4, 979-990.
- [655] Pommier, Y.; Johnson A. A.; Marchand, C. *Nat. Rev. Drug Discovery* 2005, 4, 236-248.
- [656] Richman, D. D. *Nature* 2001, 410, 995-1001.
- [657] Cohen, J. Therapies. *Science* 2002, 296, 2320-2324.
- [658] Little, S. J.; Holte, S.; Routy, J. P.; Daar, E. S.; Markowitz, M.; Collier, A. C.; Koup, R. A.; Mellors, J. W.; Connick, E.; Conway, B.; Kilby, M.; Wang, L.; Whitcomb, J. M.; Hellmann, N. S., Richman, D. D. *New Engl. J. Med.* 2002, 387, 385-394.
- [659] Engelman, A.; Mizuuchi, K.; Craigie, R. *Cell* 1991, 67, 1211-1221.
- [660] Brown, P. O. *Integration*; Cold Spring Harbor Press, 1999.
- [661] Asante-Appiah, E.; Skalka, A. M. *Adv. Virus Res.* 1999, 52, 351-369.
- [662] Steitz, T. A. *Nature* 1998, 391, 231-232.
- [663] Dyda, F.; Hickman, A. B.; Jenkins, T. M.; Engelman, A.; Craigie, R.; Davies, D. R. *Science* 1994, 266, 1981-1986.
- [664] Rice, P. A.; Baker, T. A. *Nat. Struct. Biol.* 2001, 8, 302-307
- [665] Esposito, D.; Craigie, R. *Adv. Virus Res.* 1999, 52, 319-333.
- [666] Chiu, T. K.; Davies, D. R. *Curr. Top. Med. Chem.* 2004, 4, 671-686.
- [667] Steitz, T. A. *J. Biol. Chem.* 1999, 274, 17395-17398.
- [668] Horton, N. C.; Perona, J. J. *Nat. Struct. Biol.* 2001, 8, 290-293.
- [669] Feng, M.; Patel, D.; Dervan, J. J.; Ceska, T.; Suck, D.; Haq, I.; Sayers, J. R. *Nat. Struct. Biol.* 2004, 11, 450-456.
- [670] Grobler, J. A.; Stillmock, K.; Hu, B.; Witmer, M.; Felock, P.; Espeseth, A. S.; Wolfe, A.; Egbertson, M.; Bourgeois, M.; Melamed, J.; Wai, J. S.; Young, S.; Vacca, J.; Hazuda, D. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002, 99, 6661-6666.
- [671] Marchand, C.; Johnson, A. A.; Karki, R. G.; Pais, G. C.; Zhang, X.; Cowansage, K.; Patel, T. A.; Nicklaus, M. C.; Burke, T. R., Jr.; Pommier, Y. *Mol. Pharmacol.* 2003, 64, 600-609.
- [672] Long, Y. Q.; Jiang, X. H.; Dayam, R.; Sanchez, T.; Shoemaker, R.; Sei, S.; Neamati, N. *J. Med. Chem.* 2004, 47, 2561-2573.
- [673] Lins, R. D.; Adesokan, A.; Soares, T. A.; Briggs, J. M. *Pharmacol. Ther.* 2000, 85, 123-131.
- [674] Neamati, N. *Expert Opin. Ther. Pat.* 2002, 12, 709-724.
- [675] Dayam, R.; Neamati, N. *Curr. Pharm. Des.* 2003, 9, 1789-1802.
- [676] Gupta, S. P.; Nagappa, A. N. *Curr. Med. Chem.* 2003, 10, 1779-1794.
- [677] Maurin, C.; Bailly, F.; Cotellet, P. *Curr. Med. Chem.* 2003, 10, 1795-1810.
- [678] Johnson, A. A.; Marchand, C.; Pommier, Y. *Curr. Top Med. Chem.* 2004, 4, 671-686.
- [679] Pais, G. C. G.; Burke, T. R. *Drugs Future* 2002, 27, 1101-1111.
- [680] Goldgur, Y.; Craigie, R.; Cohen, G. H.; Fujiwara, T.; Yoshinaga, T.; Fujishita, T.; Sugimoto, H.; Endo, T.; Murai, H.; Davies, D. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999, 96, 13040-13043.
- [681] Hazuda, D. J.; Felock, P.; Witmer, M.; Wolfe, A.; Stillmock, K.; Grobler, J. A.; Espeseth, A.; Gabryelski, L.; Schleif, W.; Blau, C.; Miller, M. D. *Science* 2000, 287, 646-650.
- [682] Wai, J. S.; Egbertson, M. S.; Payne, L. S.; Fisher, T. E.; Embrey, M. W.; Tran, L. O.; Melamed, J. Y.; Langford, H. M.; Guare, J. P., Jr.; Zhuang, L.; Grey, V. E.; Vacca, J. P.; Holloway, M. K.; Naylor-Olsen, A. M.; Hazuda, D. J.; Felock, P. J.; Wolfe, A. L.; Stillmock, K. A.; Schleif, W. A.; Gabryelski, L. J.; Young, S. D. *J. Med. Chem.* 2000, 43, 4923-4926.
- [683] Plummers, W.; Pais, G.; Van Maele, B.; Pannecouque, C.; Fikkert, V.; Burke, T. R., Jr.; De Clercq, E.; Witvrouw, M.; Neamati, N.; Debyser, Z. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002, 46, 3292-3297.
- [684] Pais, G. C. G.; Zhang, X.; Marchand, C.; Neamati, N.; Cowansage, K.; Svarovskaia, E. S.; Pathak, V. K.; Tang, Y.; Nicklaus, M.; Pommier, Y.; Burke, T. R., Jr. *J. Med. Chem.* 2002, 45, 3184-3194.
- [685] Marchand, C.; Zhang, X.; Pais, G. C. G.; Cowansage, K.; Neamati, N.; Burke, T. R., Jr.; Pommier, Y. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 12596-12603.
- [686] Sechi, M.; Derudas, M.; Dallochio, R.; Dessi, A.; Bacchi, A.; Sannia, L.; Carta, F.; Palomba, M.; Ragab, O.; Chan, C.; Shoemaker, R.; Sei, S.; Dayam, R.; Neamati, N. *J. Med. Chem.* 2004, 47, 5298-5310.

- [687] Espeseth, A. S.; Felock, P.; Wolfe, A. Witmer, M.; Grobler, J.; Anthony, N.; Egbertson, M.; Melamed, J. Y.; Young, S.; Hamill, T.; Cole, J. L.; Hazuda D. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000, 97, 11244-11249.
- [688] Yoshinaga, T. S.; Fujishita, T.; Fujiwara, T. Presented at the 9th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Seattle, WA, 2002.
- [689] Billich, A. *Curr. Opin. InVest. Drugs* 2003, 4, 206-209.
- [690] Young, S. Presented at the XIV International AIDS Conference, West Point, PA, 2002.
- [691] Hazuda, D. J.; Young, S. D.; Guare, J. P.; Anthony, N. J.; Gomez, R. P.; Wai, J. S.; Vacca, J. P.; Handt, L.; Motzel, S. L.; Klein, H. J.; Dornadula, G.; Danovich, R. M.; Witmer, M. V.; Wilson, K. A. A.; Tussey, L.; Schleif, W. A.; Gabryelski, L. S.; Jin, L.; Miller, M. D.; Casimiro, D. R.; Emini, E. A.; Shiver, J. W. *Science* 2004, 305, 528-532.
- [692] Wang, Y.; Serradell, N.; Bolos, J.; Rosa, E. *Drugs Future* 2007, 32, 118-122.
- [693] Rowley, M. *Prog. Med. Chem.* 2008, 46, 1-28.
- [694] Grinsztejn, B.; Nguyen, B.-Y.; Katlama, C.; Gatell, J. M.; Lazzarin, A.; Vittecoq, V.; Gonzalez, C. J.; Chen, J.; Harvey, C. M.; Isaacs, R. D. *Lancet* 2007, 369, 1261-1269.
- [695] Sorbera, L. A.; Serradell, N. GS-9137. *Drugs Future* 2006, 31, 310-313.
- [696] Sato, M.; Motomura, T.; Aramaki, H.; Matsuda, T.; Yamashita, M.; Ito, Y.; Kawakami, H.; Matsuzaki, Y.; Watanabe, W.; Yamataka, K.; Ikeda, S.; Kodama, E.; Matsuoka, M.; Shinkai, H. *J. Med.Chem.* 2006, 49, 1506-1508.
- [697] Witvrouw, M.; Van Maele, B.; Vercammen, J., Hantson, A.; Engelborghs, Y.; De Clercq, E.; Pannecouque, Debyser, Z. *Curr. Drug. Metab.* 2004, 5, 291-304.
- [698] Grobler, J. A.; Stillmock, K.; Hu, B.; Witmer, M.; Felock, P.; Espeseth, A. S.; Wolfe, A.; Egbertson, M.; Bourgeois, M.; Melamed, J.; Wai, J. S.; Young, S.; Vacca, J.; Hazuda, D. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002, 99, 6661-6666.
- [699] Sechi, M.; Carcelli, M.; Rogolino, D.; Neamati, N. Role of metals in HIV-1 integrase inhibitor design. In: *HIV-1 Integrase: Mechanism of Action and Inhibitor Design*; John Wiley & Sons: New York, in press.
- [700] Barbaro, G.; Scozzafava, A.; Mastrolorenzo, A.; Supuran, C. T. *Curr. Pharm. Des.* 2005, 11, 1850-1843.
- [701] Sechi, M.; Bacchi, A.; Carcelli, M.; Compari, C.; Duce, E.; Fisicaro, E.; Rogolino, D.; Gates, P.; Derudas, M.; Al-Mawsawi, L. Q.; Neamati, N. *J. Med. Chem.* 2006, 49, 4248-4260.
- [702] Chiu, T. K.; Davies, D. R. *Curr. Top. Med. Chem.* 2004, 4, 965-77.
- [703] Jaskolski, M.; Alexandratos, J. N.; Bujacz, G.; Wlodawer, A. Structural studies of retroviral integrases. In: *HIV-1 Integrase: Mechanism of Action and Inhibitor Design*; John Wiley & Sons: New York, in press.

PUBBLICAZIONI

1. Bacchi, Alessia; Biemmi, Mariano; Carcelli, Mauro; Carta, Fabrizio; Compari, Carlotta; Fisicaro, Emilia; Rogolino, Dominga; Sechi, Mario; Sippel, Martin; Sottriffer, Christoph A.; Sanchez, Tino W.; Neamati, Nouri. *From Ligand to Complexes. Part 2. Remarks on Human Immunodeficiency Virus type 1 Integrase Inhibition by β -Diketo Acid Metal Complexes.* Journal of Medicinal Chemistry (2008), 51(22), 7253-7264.
2. Fisicaro, Emilia; Compari, Carlotta; Biemmi, Mariano; Duce, Elenia; Peroni, Monica; Barbero, Nadia; Viscardi, Guido; Quagliotto, Pierluigi. *Unusual Behavior of the Aqueous Solutions of Gemini Bispyridinium Surfactants: Apparent and Partial Molar Enthalpies of the Dimethanesulfonates.* Journal of Physical Chemistry B (2008), 112(39), 12312-12317.
3. Fisicaro, Emilia; Compari, Carlotta; Biemmi, Mariano; Duce, Elenia; Peroni, Monica; Donofrio, Gaetano; Sansone, Francesco; Rozycka-Roszak, Bozenna; Pruchnik, Hanna; Barbero, Nadia; Viscardi, Guido; Quagliotto, Pierluigi. *Thermodynamics and Biological Properties of the Aqueous Solutions of New Glucocationic Surfactants.* Journal of Physical Chemistry B (2008), 112(31), 9360-9370.
4. Fisicaro, E.; Compari, C.; Duce, E.; Biemmi, M.; Peroni, M.; Braibanti, A. *Thermodynamics of micelle formation in water, hydrophobic processes and surfactant self-assemblies.* Physical Chemistry Chemical Physics (2008), 10(26), 3903-3914.
5. Fisicaro, Emilia; Biemmi, Mariano; Compari, Carlotta; Duce, Elenia; Peroni, Monica; Viscardi, Guido; Quagliotto, Pierluigi. *Thermodynamic properties of aqueous micellar solutions of some new acetylated gluco-cationic surfactants.* Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects (2007), 301(1-3), 129-136.
6. Fisicaro, Emilia; Biemmi, Mariano; Compari, Carlotta; Duce, Elenia; Peroni, Monica. *Thermodynamics of aqueous solutions of dodecyldimethylethylammonium bromide.* Journal of Colloid and Interface Science (2007), 305(2), 301-307.

7. Fisicaro, E.; Compari, C.; Duce, E.; Biemmi, M.; Peroni, M.; Braibanti, A. *Hydrophobic hydration processes*. Submitted.

COMUNICAZIONI A CONGRESSI

1. Antonio Braibanti, Alessia Bacchi, Mariano Biemmi, Mauro Carcelli, Carlotta Compari, Elenia Duce, Emilia Fiscaro, Monica Peroni, Dominga Rogolino, Mario Sechi. *Ca(II), Mg(II), Mn(II)/ β -diketo acids complexes for inhibition of HIV-1 integrase*, XVIII Italian-Spanish congress on thermodynamic of metal complexes, Cagliari June 5th-9th 2007 - P4.

2. E. Fisicaro, C. Compari, E. Duce, M. Biemmi, M. Peroni, A. Braibanti. *Thermodynamics of Micelle Formation in Water and Supramolecular Assemblies*, XVIII Italian-Spanish congress on thermodynamic of metal complexes, Cagliari June 5th-9th 2007 - P30.

3. Elenia Duce, Mariano Biemmi, Carlotta Compari, Emilia Fisicaro, Monica Peroni. *Potential vectors for gene delivery: chemico-physical properties of gemini dipyridinium cationic surfactants with 16 atoms carbons hydrophobic chain* 8Th ULLA Summer school 29 June 2007 - 7 July 2007- Leiden, The Netherlands -P31.

4. Monica Peroni, Elenia Duce, Mariano Biemmi, Carlotta Compari, Emilia Fisicaro. *Chimico-physical and biological properties of newly synthesised glucocationic surfactants* 8Th ULLA Summer school 29 June 2007 - 7 July 2007- Leiden, The Netherlands -P80.

5. Mariano Biemmi, Mauro Carcelli, Carlotta Compari, Elenia Duce, Emilia Fisicaro, Monica Peroni, Dominga Rogolino, Mario Sechi. *Inhibition of HIV-1 integrase by Ca(II), Mg(II), Mn(II)/ β -diketo acids complexes* 8Th ULLA Summer school 29 June 2007 - 7 July 2007- Leiden, The Netherlands -P10.

6. M. Biemmi, E. Fisicaro, C. Compari, E. Duce, M. Peroni, F. Sansone. *Chemico-Physical Properties of Gemini Dipyridinium Cationic Surfactants with 16 Carbons Hydrophobic Chain as Potential Non-Viral Vectors for Gene Delivery*, VIII Congresso Nazionale di Chimica Supramolecolare Trieste 19-22 Settembre 2007 –P12.

7. M. Biemmi, E. Fisicaro, C. Compari, E. Duce, M. Peroni. *Chemico-Physical Properties of Gemini Dipyridinium Cationic Surfactants with 16 Carbons Hydrophobic Chain as Potential Non-Viral Vectors for Gene Delivery*, “8th Mediterranean Conference on Calorimetry and Thermal Analysis - MEDICTA 2007” Palermo 25 - 29 Settembre 2007-P76.

PARTECIPAZIONI A SCUOLE E CONGRESSI

1. 3-8 settembre 2006

Scuola di Chimica Fisica: *Materiali Compositi: dalle Scienze Molecolari alle Nanotecnologie*. Società Chimica Italiana, Università degli Studi di Torino.

2. 17-20 settembre 2006

International Visions on Blood Substitutes. Università degli Studi di Parma.

3. 25-29 settembre 2006

Scuola di Chimica Computazionale: *Introduzione, per Esercizi, all’Uso del Calcolatore in Chimica Organica e Biologica*. Società Chimica Italiana, Università degli Studi di Siena.

4. 9 marzo 2007

American Association of Pharmaceutical Scientists Italian University Network (AIItUN) Student Chapter 2007 Meeting. Università degli Studi di Ferrara.

5. 29 giugno – 7 luglio 2007

8th ULLA Summer School. ULLA Consortium, University of Leiden (The Netherlands).

6. 9-22 settembre 2007

VIII Congresso Nazionale di Chimica Supramolecolare. Università degli Studi di Trieste.

7. 25-29 settembre 2007

8th Mediterranean Conference on Calorimetry and Thermal Analysis - MEDICTA 2007. Università degli Studi di Palermo.

8. 5 maggio – 3 luglio 2008

Corso di perfezionamento in “Tecniche di NMR avanzata”

Centro Interdipartimentale Misure "G. Casnati", Università degli Studi di Parma

Ringrazio con particolare affetto la Professoressa Emilia Fisicaro che ha sempre seguito con grandi professionalità, competenza, attenzione e disponibilità l'intero lavoro svolto durante il mio dottorato.

Un sentito ringraziamento alla Professoressa Mariannina Impicciatore ed alla Professoressa Elisabetta Barocelli, coordinatori del Dottorato, per la supervisione a questo lavoro.

Un ringraziamento particolare alla Dottoressa Carlotta Compari per i suoi preziosi consigli di laboratorio ed il suo costante incoraggiamento.

Grazie a Monica ed Elenia, con le quali ho condiviso a stretto contatto l'esperienza del dottorato.

Ringrazio anche tutti i tesisti e il personale universitario conosciuti in questi tre anni.

Un grazie di cuore, infine, ai miei genitori, per non avermi mai fatto mancare il loro sostegno.