

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102012902070272A1

Publication Date

20140119

Applicant

UNIVERSITA DEGLI STUDI DI MILANO -BICOCCA

Title

NANOCOSTRUTTI CON ATTIVITA FARMACOLOGICA.

NANOCOSTRUTTI CON ATTIVITÀ FARMACOLOGICA

DESCRIZIONE

La presente invenzione riguarda metodi e mezzi per trasportare sostanze attive nel citosol della cellula. In particolare l'invenzione riguarda mezzi che permettano di trasportare direttamente nel citosol sostanze capaci di interagire con sistemi proteici, quali la famiglia dei Fattori Nucleari delle Cellule T Attivate (NFAT) o acidi nucleici localizzati nel citosol. In particolare l'invenzione riguarda costrutti nanometrici utili nel trattamento di malattie infiammatorie, metodi per la loro preparazione e composizioni che li contengono.

10 STATO DELLA TECNICA ANTERIORE

Citosol

Il citosol è la frazione solubile del citoplasma privata degli organuli cellulari, costituita da una soluzione di sali minerali, molecole organiche, macromolecole e proteine. In questo comparto cellulare avvengono reazioni biochimiche di fondamentale importanza per la fisiologia della cellula e degli organismi viventi in generale. Tra le reazioni che avvengono nel citosol vi è la reazione di defosforilazione della proteina NFAT da parte della proteina Ca^{2+} /calmodulina fosfatasi calcineurina (Cn).

NFAT

20 Con proteina NFAT si intende un membro di una famiglia di fattori di trascrizione composto dai membri NFAT1 (NFATc2), NFAT2 (NFATc1), NFAT3 (NFATc4) e NFAT4 (NFATc3), loro diverse isoforme. Le proteine della famiglia NFAT sono evolutivamente legate alla famiglia REL-NF-kB di fattori di trascrizione. Le proteine NFAT sono state originariamente identificate come fattori di trascrizione in grado di regolare la produzione di IL-2 nelle cellule T, da allora diverse funzioni di NFAT nell'immunità adattativa sono state progressivamente identificate, comprese la differenziazione e l'attivazione delle cellule B e T.

NFAT è attivato in neutrofili, macrofagi e cellule dendritiche (DC) in risposta al Curdlan, ma è anche attivato nelle DC in risposta a LPS e regolato da $TNF\alpha$ nei macrofagi.

30

L'attività delle isoforme 1-4 è controllata dalla calcineurina (Cn), una fosfatasi Ca^{2+} /calmodulina-dipendente che una volta attivata da un aumento della concentrazione intracellulare Ca^{2+} , defosforila i motivi di fosforilazione presenti all'N-terminale di NFAT, esponendo una sequenza d'importo nucleare che determina l'importazione nucleare di NFAT. Le proteine NFAT interagiscono con proteine partner chiamate genericamente NFATn per produrre complessi fattori di trascrizione NFAT attivi e per controllare, in ultima analisi, la produzione di citochine.

Malattie autoimmuni croniche ed infiammatorie, nonché problemi correlati al rigetto di trapianto sono comunemente trattati con farmaci immunosoppressivi, compresa ciclosporina A (CsA) e FK506, che sono potenti inibitori della trascrizione genica di citochine in cellule immunitarie attivate. CsA e FK506 inibiscono l'attività di Cn. Tuttavia, essi hanno effetti collaterali molto forti. CsA è responsabile di lesioni vascolari di piccoli vasi, in particolare all'interno di reni, e di vasi di grandi dimensioni a causa d'ipertensione e iperlipidemia, mentre FK506 può portare a nefrotossicità, neurotossicità, diabete mellito e ipertensione. L'alto livello di tossicità di questi farmaci è dovuto al fatto che Cn è ubiquitariamente espresso e che non controlla solo l'attivazione di NFAT ma anche di altri fattori di trascrizione.

Pertanto, c'è necessità di nuovi farmaci immunosoppressori meno tossici che, inibendo specificatamente il percorso NFAT, inibiscano l'espressione delle molecole infiammatorie chiave richieste per l'attivazione della risposta immunitaria.

VIVIT

Peptidi con sequenza Pro-X-Ile-X-Ile-Thr (PxIxIT), derivati dal motivo conservato di legame alla Cn trovato nelle proteine NFAT, competono con NFAT per il legame alla Cn compromettendone il legame e la defosforilazione di NFAT come mostrato nei saggi enzimatici. In particolare, è stato dimostrato che l'oligopeptide Val-Ile-Val-Ile-Thr (VIVIT) in forma di 16mero possiede un'elevata affinità per Cn e inibisce efficacemente NFAT e la sua attività, ma non l'attività del fattore di trascrizione NF- κ B come indicato dall'attivazione dei rispettivi geni reporter (Aramburu et al. Science. 1999). Pertanto, il peptide VIVIT è più selettivo di CsA e FK506 che inibiscono

l'attivazione di entrambi i fattori di trascrizione. Infatti la domanda di brevetto **WO2008156363** descrive diversi costrutti comprendenti una sequenza VIVIT per uso nel generico trattamento di infiammazioni.

È tuttavia ben noto che il materiale peptidico non è in grado di attraversare autonomamente la membrana cellulare per riversarsi direttamente nel citosol, ed in ogni caso esistono ben noti problemi di stabilità *in vivo* che limitano l'uso di tale materiale. Risultati riportati nella parte sperimentale della presente domanda hanno confermato che peptidi comprendenti la sequenza VIVIT non riescono a raggiungere il citosol delle cellule, dove è localizzata la proteina bersaglio Cn, in una quantità sufficiente per essere efficaci come inibitori dei processi infiammatori. (Sieber et al. Cell communication and signaling: CCS. 2009).

Nanoparticelle. È noto che particelle solide di dimensioni nanometriche rappresentano un valido sistema veicolante per il trasporto di molecole attive. Una volta legate alle nanoparticelle, tali molecole risultano protette dalla degradazione *in vivo* e possono essere trasportate e rilasciate all'interno della cellula.

La maggior parte delle nanoparticelle utilizzate nel settore terapeutico/diagnostico possono essere classificate in due classi principali: particelle che contengono molecole organiche come componente principale e quelli che utilizzano elementi inorganici, di solito metalli, come nucleo. Queste ultime presentano numerosi vantaggi, quali: 1) la possibilità di sfruttare il nucleo cristallino per ottenere una proprietà fisica rilevante, 2) il nucleo inorganico consente il controllo efficace sulle caratteristiche dimensionali e morfologiche del nanocostrutto finale.

La maggior parte delle nanoparticelle inorganiche commerciali condividono la stessa struttura di base: un nucleo centrale di morfologia sferica, cubica o anisotropica, che definisce le proprietà fisiche (comprese fluorescenza, proprietà ottiche, magnetiche, ed elettroniche della particella), con un rivestimento protettivo organico sulla loro superficie. Questo rivestimento protegge il nucleo dalla degradazione fisiologica *in vivo*

e permette la formazione di legami elettrostatici o covalenti con (bio)molecole organiche che possiedono gruppi funzionali utilizzabili per il legame.

Il problema posto dalle nanoparticelle utilizzate come *carrier* di sostanze biologicamente attive consiste nel fatto che normalmente tali nanostrutture sono internalizzati nella cellula attraverso la via endosomiale, e diretti al processo di degradazione lisosomiale. In tal senso la sostanza biologicamente attiva è degradata e quindi non ha la possibilità di raggiungere il citosol in quantità farmacologicamente attiva.

La domanda di brevetto internazionale **WO2005065081** descrive la preparazione di nanoparticelle magnetiche comprendenti un rivestimento anfifilico anche utilizzabili come *carrier* di molecole attive. Il documento descrive l'utilizzo di tali nanoparticelle in metodi diagnostici o trattamenti terapeutici di tumori. Tuttavia, nessuna valutazione sui target cellulari di tali particelle è stata eseguita dagli autori del documento.

Scopo della presente invenzione è quello di evitare gli svantaggi ancora presenti nei sistemi dell'arte anteriore.

SOMMARIO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione si basa sull'inattesa scoperta che nanoparticelle comprendenti un rivestimento a base di polimero anfifilico sono in grado di veicolare e rilasciare una molecola attiva direttamente nel citosol della cellula. Dal citosol la molecola può poi diffondere anche all'interno del nucleo. Senza voler limitare la portata dell'invenzione a specifiche teorie scientifiche, tale risultato è verosimilmente conseguito almeno in parte grazie alla capacità del nanostruttura, di seguito indicato come MYTS, di attraversare direttamente la membrana cellulare ed in parte alla capacità di evadere il tradizionale sistema endosomiale e quindi il cammino di degradazione lisosomiale.

Oggetto della presente invenzione è quindi un metodo per veicolare una molecola all'interno del citosol di una cellula comprendente i seguenti passaggi:

- a) predisporre un nanocostrutto (MYTS), comprendente una nanoparticella inorganica con un rivestimento a base di polimero anfifilico e una molecola attiva legata a tale particella attraverso detto rivestimento anfifilico;
- b) porre detto nanocostrutto in contatto con detta cellula.
- 5 Un secondo oggetto della presente invenzione è un nanocostrutto comprendente una nanoparticella inorganica con un rivestimento esterno a base di polimero anfifilico e una molecola con attività farmacologica legata a detta nanoparticella attraverso il polimero anfifilico per uso nel trattamento di una malattia associata a un evento e/o processo molecolare localizzato nel citosol della cellula.
- 10 Un terzo oggetto della presente invenzione è una composizione farmaceutica comprendente i nanocostrutti sopra descritti e/o uno o più eccipienti farmaceuticamente accettabili, per uso nel trattamento di uno stato infiammatorio.
- Un quarto oggetto della presente invenzione è un metodo per la preparazione di un nanocostrutto comprendente i seguenti passaggi:
- 15 a) predisporre una soluzione/sospensione di nanoparticelle inorganiche con un rivestimento esterno di un polimero anfifilico attivato tramite linker;
- b) aggiungere a detta soluzione/sospensione una o più molecole attive lasciandola reagire con detto linker.
- In forme di realizzazione specifiche del metodo, del nanocostrutto e della composizione farmaceutica, la molecola attiva è un peptide contenete il - o consistente nel - peptide VIVIT.
- 20

BREVE DESCRIZIONE DELLE FIGURE

25

Figura 1. Analisi TEM di DC dopo l'esposizione con i nanocostrutti MYTS. DC derivate dal midollo osseo di topo sono state co-coltivate con i nanocostrutti per cinque ore e poi analizzate mediante TEM. La freccia nera indica MYTS all'interno degli endosomi, la freccia grigia indica MYTS che evadono gli endosomi ed entrano nel citosol.

Figura 2. Inibizione della trasduzione del segnale di NFAT mediante i nanocostrutti MYTS-VIVIT in DC derivate dal midollo osseo. Le DC sono state pretrattate o meno con le quantità indicate di MYTS-VIVIT per due ore e quindi attivate con LPS per 18 ore. Le quantità di IL-2 e TNF α nel surnatante sono state misurate con metodo ELISA.

5 Figura 3. La via NFAT è attiva nei neutrofili. Topi geneticamente modificati per IL-2/GFP sono stati trattati o meno con le MYTS-VIVIT e due ore dopo sono stati iniettati con LPS per via intravenosa. Le barre rappresentano la percentuale di neutrofili della milza GFP⁺ Ly6G⁺ tre ore dopo il trattamento con LPS. In questo modello murino, GFP è inserito nel secondo esone di IL-2 quindi ha la stessa regolazione di IL-2.

10 Figura 4. Inibizione del pathway di NFAT nella formazione di edema a livello della zampa in risposta a LPS. Gli animali sono stati pretrattati o meno con i nanocostrutti (MYTS-VIVIT) o FK-506 (2 h circa) e quindi trattati localmente con LPS. L'edema è stato misurato nei punti temporali indicati in figura.

Figura 5. Inibizione dello sviluppo di artrite. Figura 5A: i topi sono stati trattati
15 endovena, o non trattati, al giorno -1, 0, +1, +3, +6, +9, + 12 con i nanocostrutti (MYTS-VIVIT) o con nanoconiugati MYTS-VEET (un peptide simile a VIVIT in cui la sequenza è stata modificata, perdendo quindi di specificità per Cn). Il giorno 0 rappresenta l'inizio della procedura di induzione dell'artrite. I punteggi clinici indicativi della severità dell'artrite sono stati valutati nei giorni indicati. Nella Figura 5B sono mostrate fotografie
20 rappresentative dell'artrite al settimo giorno di un topo trattato e non trattato.

Figura 6. Inibizione del rigetto da trapianto di cute. Cute maschile è stata innestata in topi femmina. I topi sono stati iniettati endovena o meno con i nanocostrutti (MYTS-VIVIT o MYTS-VEET) al giorno -1, 0, +1, +3, +6, +9, +12, +15. Inoltre, i topi sono stati poi lasciati senza alcun trattamento per ulteriori 20 giorni. I pannelli M in M
25 rappresentano i controlli non trattati e mostrano il trapianto di cute da topo maschio a topo maschio. Come si può vedere l'innesto è chiaramente accettato. I pannelli M in F rappresentano il trapianto di cute da topo maschio a topo femmina senza trattamento con i nanocostrutti. La cicatrice del rigetto è ben visibile al giorno 30. Il rigetto è anche osservabile nei pannelli M in F (maschio in femmina) trattati con i nanocostrutti di
30 controllo MYTS-VEET. Viceversa nei pannelli rappresentanti il trapianto di maschio in

femmina con trattamento MYTS-VIVIT (M in F + MYTS-VIVIT) è ben visibile l'accettazione dell'innesto. Il grafico a barre sottostante rappresenta una quantificazione dei risultati dell'esperimento. In sostanza il trapianto è accettato nell'80% dei casi trattati con i nanocostrutti MYTS-VIVIT, mentre è rigettato nel 100% dei casi non trattati e nell'80% dei casi trattati con i nanocostrutti di controllo MYTS-VEET.

Figura 7. Rappresentazione schematica del metodo di preparazione dei nanocostrutti MYTS-VIVIT secondo una specifica forma di realizzazione descritta in dettaglio negli esempi.

Figura 8. Produzione di citochine da parte delle cellule dendritiche trasdotte o meno con il peptide con sequenza SEQ ID NO:1 in risposta all'LPS. DC trasdotte con il peptide con sequenza SEQ ID NO:1 fuso alla proteina GFP e DC non trasdotte sono state stimulate con LPS (100 ng/ml) per 18 ore. La produzione di IL-2 (NFAT-dipendente, pannello superiore) e di TNF- α (NFAT-indipendente, pannello inferiore) è stata poi valutata mediante saggio ELISA. Da notare che l'espressione del peptide con sequenza SEQ ID NO:1 abbatte la produzione di IL-2.

Figura 9. Il peptide con sequenza SEQ ID NO:1 non modificato o lo stesso peptide con una coda di 11 Arginine non è in grado di penetrare nel citosol delle DC e bloccare l'attività di NFAT. DC derivate da midollo osseo sono state pretrattate o meno con il peptide con sequenza SEQ ID NO:1 (25 μ M) o con il peptide coniugato ad una coda di 11 Arginine (25 μ M) prima di essere stimulate per 18 ore con 100 ng/ml di LPS. Il rilascio di IL-2 (pannello superiore) e di TNF- α (pannello inferiore) nel surnatante è stato poi valutato attraverso il saggio ELISA. Da notare che né il peptide non modificato né il peptide modificato con la coda di 11 Arginine erano in grado di inibire l'attività di NFAT.

Figura 10. Il peptide con sequenza SEQ ID NO:1 incluso nei liposomi non è in grado di penetrare nel citosol delle DC e bloccare l'attività di NFAT. DC derivate da midollo osseo sono state pretrattate o meno con il peptide incluso in liposomi a base fosfolipidica prima di essere stimulate per 18 ore con 100 ng/ml di LPS. Il rilascio di IL-2 (pannello superiore) e di TNF- α (pannello inferiore) nel surnatante è stato poi

valutato attraverso il saggio ELISA. Da notare che il peptide incluso nei liposomi non era in grado di inibire l'attività di NFAT.

Figura 11. (A) La nanoparticella è costituita di un core magnetico di magnetite cristallina di circa 8 nm di diametro. Il linker N-fosfonometil acido imminodiacetico fosfonato (PMIDA) viene usato per introdurre un sito di immobilizzazione per il composto organico sull'ossido di ferro sfruttando l'elevata affinità del gruppo fosfonato per il Fe-OH superficiale sulla nanoparticella. I due gruppi carbossilici sono convertiti in ammino gruppi tramite condensazione con il linker diammino bifunzionale 2,2-(etilendiossi)bis(etilammina) (EDBE) via attivazione con N-idrossisuccinimidil estere (NHS). Successivamente, i due ammino gruppi sono convertiti in gruppi piridiltiopropionato (PDP) reattivi verso i tioli tramite addizione di N-succinimidil-3[2-piridiltio]-propionato (reagente SPDP). Infine, il nanoconstrutto finale è ottenuto per reazione del nanocongiugato con il medesimo peptide utilizzato nel nanoconstrutto MYTS-VIVIT (sequenza SEQ ID NO:1). (B) DC derivate da midollo osseo sono state pretrattate o meno con il peptide direttamente legato alle nanoparticelle magnetiche (è stata utilizzata una concentrazione che corrisponde ad avere il peptide 25 μ M) prima di essere stimulate per 18 ore con 100 ng/ml di LPS. Il rilascio di IL-2 (pannello superiore) e di TNF- α (pannello inferiore) nel surnatante è stato poi valutato attraverso il saggio ELISA. Da notare che il peptide direttamente legato alle nanoparticelle non era in grado di inibire l'attività di NFAT.

Figura 12. Internalizzazione e localizzazione citosolica del nanoconstrutto MYTS-enfuvirtide. Nell'immagine qui di seguito si vede chiaramente la localizzazione del farmaco antiretrovirale marcato con sonda fluorescente all'interno del citosol di neuroni ottenuti da criosezioni di estratti cerebrali di topo trattato con MYTS-enfuvirtide. Si possono chiaramente osservare degli spot di fluorescenza in corrispondenza di neuroni solo nel caso di enfuvirtide coniugato a MYTS (riga 3 in basso, canale di fluorescenza), mentre non si rileva traccia di fluorescenza nel controllo e nei campioni estratti da topi trattati con il farmaco marcato non coniugato alle nanoparticelle (riga 1 e 2 rispettivamente).

Figura 13. Analisi TEM di DC dopo l'esposizione con i nanoconstrutti MYTS-

polietilenglicole. L'esperimento dimostra la localizzazione nel citosol di MYTS-polietilenglicole ($PM_{PEG} = 2000$ Da). Nell'immagine si osservano nanostrutture coniugate con PEG₂₀₀₀ fuoriusciti dagli endosomi mentre gli endosomi stessi risultano intatti.

Figura 14. Rappresentazione schematica del processo di coniugazione del peptide con sequenza SEQ ID NO:1 al nanostruttura mediante il linker EDBE-PDP, secondo una
5 forma di realizzazione preferita dell'invenzione.

Figura 15. Dispersioni ad alta concentrazione di nanoparticelle marcate con fluoroforo e non (MYTS-FITC e MYTS, rispettivamente), sono state incorporate in una quantità circa doppia di crema base e poi aggiunte al resto della crema base a diluizioni
10 successive, mescolando fino alla completa omogeneizzazione. Le suddette preparazioni sono state applicate per tre giorni consecutivi sulla cute di topi C57BL/6 precedentemente rasati (area di 1 cm²). I topi sono stati sacrificati ed è stata prodotta una sospensione unicellulare dalla regione di cute trattata. Le cellule sono poi state analizzate al FACS per determinare l'uptake in cellule di origine ematopoietica
15 (CD45+) e non (CD45-). Come si può notare dalla figura le nanoparticelle vengono inglobate da entrambi i gruppi di cellule.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

20 La presente invenzione si compone dei seguenti aspetti, descritti in dettaglio di seguito.

Nanoparticella inorganica

Le nanoparticelle composite a base inorganica condividono la stessa struttura di base: un nucleo centrale che definisce le proprietà fisiche (comprese fluorescenza, proprietà
25 ottiche, magnetiche, ed elettroniche della particella), e opzionalmente un rivestimento protettivo organico sulla superficie. Il rivestimento organico, come ad esempio un tensioattivo idrofobico che aumenta la solubilità delle nanoparticelle in sospensione, sarà preferibilmente a catena lunga scelto ad esempio tra acido oleico, oleilamina, trioctilfosfina.

Le nanoparticelle inorganiche della presente invenzione hanno generalmente un nucleo metallico o di ossido metallico, di tipo cristallino o non cristallino. Metalli idonei sono ad esempio oro, argento, ferro, manganese, rame, nickel, platino, palladio. Esempi di ossido di metalli sono invece $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, Fe_3O_4 , MnFe_2O_4 , CoFe_2O_4 , MnO ,
5 quantum dots (es. CdSe , CdS , CdSe/ZnS , ecc.), TiO_2 , SiO_2 , CeO_2 .

Generalmente saranno usate nanoparticelle di dimensioni comprese tra 5 e 50 nanometri.

Esempi di nanoparticelle che possono essere usate nella presente invenzione sono preparate come descritto, per esempio, in J. Park et al. (*Nat. Mater.* 2004, 3, 891-895),
10 L. Polito et al. (*J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 12712-12724), M. Brust et al. (*J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1994, 801-802), C. B. Murray et al. (*J. Am. Chem. Soc.* 1993, 115, 8706-8715), o sono disponibili commercialmente, per esempio, da: AC Diagnostics, Inc. (Fayetteville, AR; USA); SkySpring Nanomaterials, Inc. (Houston, TX; USA); Sigma-Aldrich (St. Louis, MO; USA); Life Technologies Ltd (Paisley, UK);
15 mkNANO (Mississauga, ON; Canada).

Rivestimento di nanoparticelle con un polimero anfifilico

Il metodo della presente invenzione prevede l'uso di un nanostruttura comprendente una nanoparticella inorganica o composita come sopra descritta avente un rivestimento
20 esterno di un polimero anfifilico.

Esempi di procedimenti per preparare nanoparticelle inorganiche con un rivestimento esterno di un polimero anfifilico sono descritti in dettaglio nella domanda di brevetto WO2005065081 incorporata qui integralmente mediante referenza. Tali procedimenti prevedono la formazione del rivestimento anfifilico mediante l'uso di un ligando di
25 *capping* e di un copolimero anfifilico a blocchi. Normalmente il rivestimento anfifilico è costituito da copolimeri a blocchi.

Una lista esemplificativa ma non limitativa di ligandi di *capping* è fornita a pagina 10 rigo 21-30 e pagina 11 rigo 1-3 della domanda di brevetto WO2005065081.

Una lista esemplificativa ma non limitativa di copolimeri anfifilici a blocchi è fornita da
30 pagina 11 a pagina 23 della domanda di brevetto WO2005065081.

In una forma di realizzazione il rivestimento anfifilico è ottenuto per condensazione di poliisobutilene-anidride maleica e dodecilammina (PMA) come descritto ad esempio in C.-A. J. Lin et al. *Small* 2008, 3, 334-341.

5 Molecola legata alla nanoparticella attraverso detto rivestimento anfifilico

Il nanostruttura della presente invenzione comprende inoltre una molecola attiva legata alla nanoparticella attraverso il rivestimento anfifilico.

Detta molecola può essere qualsiasi molecola avente un'affinità per una o più molecole bersaglio localizzate nel citosol. Con l'espressione "avente un'affinità per una o più
10 molecole bersaglio localizzate nel citosol" s'intende che la molecola è in grado di interagire con la molecola bersaglio nell'ambiente citoplasmatico.

La molecola può essere scelta tra, ma non è limitata a: peptidi, proteine (ad esempio anticorpi monoclonali o policlonali), zuccheri, polimeri sintetici, polinucleotidi, acidi grassi, piccole molecole organiche o loro combinazioni.

15 Con la parola "polinucleotidi" s'intende comprendere DNA, RNA, siRNA, miRNA, sia di origine virale, batterico, vegetale o animale (ad esempio, di mammifero), sia sintetico, a singolo filamento, a doppio filamento, comprendente nucleotidi naturali o non naturali, o chimicamente modificati. Inoltre, la molecola può anche includere molecole marcate, ad esempio con marcatura radioattiva o con fluorofori.

20 La molecola attiva potrà essere un peptide scelto tra, ma non limitato a, Ac-Tyr-Thr-Ser-Leu-Ile-His-Ser-Leu-Ile-Glu-Glu-Ser-Gln-Asn-Gln-Gln-Glu-Lys-Asn-Glu-Gln-Glu-Leu-Leu-Glu-Leu-Asp-Lys-Trp-Ala-Ser-Leu-Trp-Asn-Trp-Phe-NH₂ (enfuvirtide SEQ ID NO:6), peptidi che favoriscono la penetrazione di sostanze nel nucleo (nuclear localization sequence), o un peptide comprendente la sequenza Val-Ile-Val-Ile-Thr (V-I-
25 V-I-T, SEQ ID NO:5).

I peptidi che comprendono la sequenza amminoacidica consenso Val-Ile-Val-Ile-Thr, derivati dal motivo di legame di Cn trovato nelle proteine NFAT sono peptidi idonei ad inibire selettivamente la via di trasduzione del segnale delle proteine appartenenti alla famiglia NFAT. Esempi di questi peptidi sono peptidi aventi una sequenza
30 amminoacidica scelta tra SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5.

Ulteriori peptidi che inibiscono selettivamente la via di trasduzione del segnale delle proteine appartenenti alla famiglia NFAT possono essere selezionati dal tecnico del settore utilizzando saggi enzimatici come descritto in J. Aramburu et al. *Science* 1999, 285, 2129-1133.

- 5 La molecola attiva potrà essere legata al rivestimento anfifilico direttamente, ad esempio mediante un gruppo carbossilico presente sul polimero anfifilico, o indirettamente, ad esempio mediante un linker, con qualsiasi tipo di legame chimico noto nello stato della tecnica.

Il linker potrà avere un legame reversibile con detta molecola attiva, come ad esempio
10 un legame disolfuro, o irreversibile.

Esempi di linker idonei sono il 2,2-(etilendiossi)bis(etilammina) (EDBE), PEG, PEG eterobifunzionale, diammino-PEG, etilendiammina, altri spaziatori omo- o etero-bifunzionali di uso comune per la sintesi in fase solida.

La Figura 14 esemplifica uno schema di reazione generale di coniugazione di un
15 peptide al nanostrutto tramite il linker EDBE-PDP.

Composto bio-compatibile

In una forma di realizzazione dell'invenzione, oltre alle molecole sopra descritte sulla superficie del rivestimento anfifilico dei nanostrutti potrà essere presente anche un
20 composto bio-compatibile finalizzato a modulare la biodisponibilità e/o biocompatibilità dei costrutti dell'invenzione. Tale composto è legato alla nanoparticella attraverso detto rivestimento anfifilico.

Il composto sarà preferibilmente coniugato al rivestimento anfifilico con linker idonei come descritto al paragrafo precedente. Un esempio composto bio-compatibile è il
25 PEG, mentre un esempio di coniugazione è tramite il linker EDBE seguendo lo stesso schema di reazione e i reagenti illustrati in Figura 14.

Passaggio b) del metodo

I nanostrutti come sopra descritti potranno essere predisposti in soluzioni o
30 sospensioni alle concentrazioni volute per essere utilizzati nel passaggio b) del

metodo.

Tale passaggio prevede di porre in contatto i nanocostrutti sopra descritti, ad esempio in soluzione o sospensione, con una cellula eucariotica animale (ad esempio di mammifero, preferibilmente umana). Detta cellula eucariotica potrà essere scelta tra
5 una cellula del sistema immunitario, ad esempio una DC, un neutrofilo o un macrofago, un linfocita, una cellula del sistema nervoso, ad esempio un neurone, cellule tumorali, cellule endoteliali.

Nanocostrutto per uso nel trattamento di una malattia associata a un'alterazione
10 funzionale di una proteina localizzata nel citosol

Sono anche oggetto della presente invenzione i nanocostrutti sopra descritti in cui detta molecola è una molecola con attività farmacologica per uso nel trattamento di una malattia associata a un evento o un processo molecolare localizzato nel citosol della cellula.

15 Detta molecola potrà essere qualsiasi molecola che abbia un'attività farmacologica legata alla sua interazione con un target terapeutico localizzato nel citosol della cellula. Una lista esemplificativa ma non limitativa include molecole con attività antivirale come ad esempio enfuvirtide, molecole con attività antinfiammatoria come ad esempio un peptide atto a inibire selettivamente la via di trasduzione del segnale delle proteine
20 appartenenti alla famiglia NFAT, curcumina, anticorpi, farmaci antitumorali, oligonucleotidi per terapia genica, altre molecole ad attività antiinfiammatoria.

In una specifica forma di realizzazione dell'invenzione, detta molecola con attività farmacologica è un peptide consistente o comprendente la sequenza amminoacidica Val Ile Val Ile Thr (VIVIT).

25 In particolare detto nanocostrutto potrà essere usato nel trattamento di una malattia associata ad una disfunzione e/o disregolazione di una proteina appartenente alla famiglia NFAT come ad esempio le malattie infiammatorie. Queste malattie includono, ma non sono limitate a: artrite reumatoide, malattia infiammatoria intestinale, rigetto di trapianto allogenico o xenogenico, sepsi, anemia aplastica, psoriasi, edema, lupus
30 eritematoso, diabete di tipo I, asma, fibrosi polmonare, sclerodermia, dermatomiosite,

sindrome di Sjogren, malattia di Kawasaki, tiroidite di Hashimoto, anemia emolitica autoimmune, trombocitopenia idiopatica, glomerulonefrite cronica, sclerosi multipla, fibrosi cistica, epatite cronica recidivante, cirrosi biliare primaria, rinite allergica, congiuntivite allergica, dermatite atopica, malattia di Crohn, colite ulcerosa, 5 colite/sindrome infiammatoria intestinale, tiroidite autoimmune, malattie da immunodeficienza acquisita, morbo di Alzheimer, morbo di Parkinson, tumori.

Composizioni farmaceutiche

La presente invenzione riguarda anche una composizione farmaceutica comprendente 10 i nanocostrutti sopra descritti e/o uno o più eccipienti farmaceuticamente accettabili, per uso nel trattamento di uno stato infiammatorio.

Il termine eccipiente farmaceuticamente accettabile, indica un eccipiente, adiuvante, veicolante, solvente, diluente, agente attivo, agente isotonico, agente addensante o emulsionante, conservante, legante solido, lubrificante e simili, come idonei per l'uso in 15 una composizione farmaceutica. Il Remington's Pharmaceutical Sciences, sedicesima edizione, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980) descrive vari eccipienti utilizzati nella formulazione di composizioni farmaceuticamente accettabili e le tecniche note per la loro preparazione.

Alcuni materiali esemplificativi che possono servire come eccipienti farmaceuticamente 20 accettabili includono, ma non sono limitati a, scambiatori ionici, alluminio, stearato di alluminio, lecitina, proteine di siero quali siero albumina umana, sostanze tampone (fosfato, acido sorbico o sorbato di potassio), miscele parziali di gliceridi di acidi grassi saturi vegetali, acqua, sale o elettroliti quali solfato di protamina, fosfato di sodio idrogeno, fosfato di potassio idrogeno, cloruro di sodio, sali di zinco, silice colloidale, 25 trisilicato di magnesio, polivinil pirrolidone, poliacrilati, cere, tessuto grasso, zuccheri quali lattosio, glucosio e saccarosio; amidi quali amido di mais e amido di patata; cellulosa e suoi derivati quali sodio carbossimetil cellulosa, etil cellulosa e acetato di cellulosa; polvere di tragacanto; malto; gelatina; talco; eccipienti quali burro di cacao e cera per supposte, oli quali olio di arachidi, olio di semi di cotone, olio di girasole, olio di 30 sesamo, olio di oliva, olio di mais e olio di soia; glicoli quali propilenglicole o

polietilglicole; esteri quali etil oleato e etil laurato; agar; agenti tamponanti quali idrossido di magnesio e idrossido di alluminio, acido alginico, acqua priva di pirogeno, soluzione salina isotonica, soluzione di Ringer; alcol etilico e soluzioni saline tamponate con fosfato così come altri lubrificanti compatibili non tossici quali sodio
5 laurilsolfato e stearato di magnesio, così come agenti coloranti, agenti rilascianti, agenti di rivestimento, dolcificanti, aromi ed agenti profumanti, conservanti ed antiossidanti possono essere anch'essi presenti nella composizione secondo il giudizio di chi prepara la formulazione.

Le composizioni farmaceutiche qui descritte, possono anche comprendere almeno un
10 principio attivo diverso dalle nanoparticelle e noto essere utile nel trattamento delle malattie infiammatorie, come ad esempio farmaci corticosteroidi quali il prednisone e il desametasone, farmaci citotossici quali azatioprina e ciclofosfamide, derivati da batteri o funghi quali rapamicina, FK506, ciclosporina.

Le concentrazioni degli ulteriori uno o più principi attivi nella composizione potranno
15 essere facilmente stabilite dagli esperti del settore sulla base delle concentrazioni normalmente utilizzate.

Le composizioni possono essere somministrate per via orale, parenterale, endovenosa, aerosol, rettale, transdermica, sottocutanea, intracisternale, intramuscolare, vaginale, intraperitoneale, topica, perlinguale e intranasale e secondo
20 tutte le vie di somministrazione note al tecnico del settore ed idonee ai fini della presente invenzione.

Le composizioni per somministrazione orale possono prendere la forma di soluzioni o sospensioni liquide o polveri. Le composizioni potranno essere presentate in forma di dosaggio unitario in modo da facilitare il dosaggio.

25 Forme di dosaggio solido per somministrazione orale includono capsule, compresse, pillole, polveri e granuli. In tali forme solide il o i principi attivi sono miscelati con almeno un eccipiente o veicolante inerte farmaceuticamente accettabile come, ad esempio, citrato di sodio o di calcio fosfato e/o riempitivi o estensivi (quali amidi, lattosio, saccarosio, glucosio, mannitolo, e acido silicico); leganti (quali, ad esempio,
30 carbossimetilcellulosa, alginati, gelatina, polivinilpirrolidone, saccarosio); umettanti (es.

glicerolo); agenti disintegranti (quali agar-agar, carbonato di calcio, amido di patate o tapioca, acido alginico, certi silicati e carbonato di sodio); agenti ritardanti (es. paraffina); acceleratori di assorbimento (quali composti di ammonio quaternario); agenti umidificanti (quali, ad esempio, acido cetilico e monostearato di glicerolo);
5 assorbenti (quali caolino e argilla di bentonite); lubrificanti (quali talco, stearato di calcio, stearato di magnesio, polietilenglicoli solidi, sodio laurilsolfato) e loro miscele.

Nel caso di capsule, compresse e pillole, la forma di dosaggio potrà comprendere anche agenti tamponanti.

Le composizioni solide come sopra indicate possono essere anche impiegate per
10 riempire capsule di gelatina rigida o morbida utilizzando eccipienti come lattosio o zucchero di latte come anche polietilenglicoli di alto peso molecolare e simili. Le forme a dosaggio solido di compresse, confetti, capsule, pillole, e granuli si possono preparare con rivestimenti quali rivestimenti enterici ed altri agenti di rivestimento noti nella tecnica delle formulazioni farmaceutiche. Potranno opzionalmente essere
15 formulate in modo da rilasciare l'ingrediente attivo o gli ingredienti attivi solamente o preferenzialmente in certe parti del tratto intestinale, opzionalmente in maniera ritardata.

Forme liquide idonee alla somministrazione orale includono, ma non sono limitate a, emulsioni, gel, microemulsioni, soluzioni, sospensioni, sciroppi ed elisir
20 farmaceuticamente accettabili e potranno contenere diluenti comunemente utilizzati nello stato della tecnica. Le forme liquide orali possono quindi includere un idoneo veicolo acquoso o non acquoso con tamponi, agenti sospendenti e disperdenti, emulsionanti, solventi, coloranti, aromi e simili.

Ad esempio, potranno includere acqua o altri solventi, agenti solubilizzanti ed
25 emulsionanti quali alcol etilico, alcol isopropilico, etil carbonato, etil acetato, alcol benzilico, benzil benzoato, propilenglicole, 1,3-butilenglicole, dimetilformammide, oli (in particolare oli di semi di cotone, di noci di terra, di mais, di germe, di olive di casto e di sesamo), glicerolo, alcol tetraidrofurfurilico, polietilenglicoli ed esteri di acidi grassi di sorbitano e loro miscele. Oltre a diluenti inerti, le composizioni orali potranno includere
30 anche adiuvanti come agenti umettanti, agenti emulsionanti e sospendenti, agenti

dolcificanti, aromatizzanti e profumanti.

Le forme liquide potranno essere anche preparazioni iniettabili, ad esempio, sospensioni acquose o oleaginose sterili iniettabili e potranno essere formulate secondo la tecnica nota utilizzando agenti disperdenti, umettanti e sospendenti idonei.

- 5 Le preparazioni iniettabili sterili potranno essere anche una soluzione, sospensione o emulsione sterile iniettabile in un diluente o solvente parenteralmente accettabile atossico, ad esempio, come soluzione in 1,3-butandiolo. Tra i veicoli e solventi accettabili che possono essere utilizzati vi sono acqua, soluzione di Ringer, U.S.P. e soluzione di cloruro di sodio isotonica. Inoltre, sono convenzionalmente utilizzati come
10 mezzi solventi o di sospensione oli fissati sterili. Inoltre, acidi grassi come l'acido oleico sono utilizzati nelle preparazioni iniettabili.

Potranno anche essere presenti conservanti ed altri additivi quali antimicrobici, antiossidanti, agenti chelanti e gas inerti (Mack (1982) Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ma Edizione).

- 15 Le formulazioni iniettabili potranno essere sterilizzate, ad esempio, mediante filtrazione attraverso un filtro che trattiene i batteri o incorporando agenti sterilizzanti sotto forma di composizioni sterili solide che possono essere sciolte o disperse in acqua sterile o altri mezzi sterili iniettabili prima dell'uso.

- Le composizioni della presente invenzione potranno essere formulate anche per
20 somministrazione topica in forma di unguenti, paste, lozioni, gel, polveri, soluzioni, spray, inalanti, gocce oftalmiche o auricolari, o cerotti. Il componente attivo (o i componenti) è mescolato in condizioni sterili con un veicolante farmaceuticamente accettabile e qualsiasi conservante o tampone necessario secondo la necessità. Cerotti transdermici potranno essere utilizzati per fornire un rilascio controllato delle
25 composizioni qui descritte. Potranno anche essere utilizzati esaltatori di assorbimento per aumentare il flusso del composto attraverso la pelle. La velocità di rilascio potrà essere controllata fornendo una membrana a controllo di velocità o disperdendo il composto in una matrice polimerica o in un gel.

- Il dosaggio può variare in funzione dell'età e delle condizioni generali del
30 paziente, della natura e della gravità della patologia o disturbo e della via e tipo di

somministrazione. Il dosaggio dovrà quindi tener conto della particolare condizione da trattare, della severità della condizione da trattare, dell'età, del peso e delle condizioni fisiche generali del particolare paziente così come di altre medicine che il paziente sta assumendo, come è ben noto agli esperti del settore. Inoltre, è evidente che detto
5 quantitativo efficace può essere all'occorrenza abbassato o aumentato secondo le risposte del paziente trattato e/o secondo la valutazione del medico che prescrive i composti della presente invenzione.

Il termine "forma di dosaggio unitario" si riferisce ad un'unità fisica discreta contenente dosaggi unitari per soggetti umani, ciascuna dosaggio unitario contenendo una
10 quantità di materiale attivo predeterminata calcolata per produrre l'effetto terapeutico desiderato, in associazione con un eccipiente farmaceutico idoneo. Tipiche forme di dosaggio unitario includono fiale, siringhe, flaconi monodose della composizione liquida, o pillole, compresse, capsule o simili nel caso di composizioni solide.

Il nanocostrutto può essere somministrato in forma farmaceutica a rilascio
15 convenzionale, modificato (prolungato, ritardato o ripetuto), parenterale a largo volume, parenterale a piccolo volume, a dose singola o dose multipla.

Il prodotto farmaceutico contenente il nanocostrutto potrà essere anche destinato ad un uso veterinario tramite somministrazione per via orale, intramammaria e cutanea.

Infine il nanocostrutto nelle sue varie formulazioni potrà anche essere utilizzato per
20 scopi di ricerca.

Tipicamente composizioni in forma solida possono contenere una quantità di nanocostrutti compresa tra 50 e 1000 mg per singola dose, preferibilmente da 200 a 500 mg, composizioni in forma liquida possono contenere una quantità di nanocostrutti
25 compresa tra 10 e 200 mg per ml di composizione, preferibilmente da 40 a 100 mg per ml di composizione.

Metodo di preparazione

E' oggetto della presente invenzione anche un metodo per la preparazione dei
30 nanocostrutti qui descritti comprendente i seguenti passaggi:

- a) predisporre una soluzione/sospensione di nanoparticelle inorganiche con un rivestimento esterno di un polimero anfifilico attivato tramite linker;
- b) aggiungere a detta soluzione/sospensione una o più molecole attive lasciandola reagire con detto linker.

5

Di seguito sono descritti in dettaglio i vari passaggi del metodo:

Nel passaggio a) è predisposta una soluzione/sospensione di nanoparticelle inorganiche o composite (nucleo inorganico con un primo rivestimento organico) come sopra descritte.

- 10 Il successivo rivestimento anfifilico sarà preferibilmente ottenuto dalla condensazione del polisobutilene-alt-maleico anidride e dodecilammina.

Il costruito così ottenuto è attivato con un linker di coniugazione, come ad esempio il 2,2 - (etilendiossi) bis (etilammina) (EDBE).

- 15 Nel passaggio b), una o più molecole attive sono aggiunte a detta soluzione/sospensione attivata facendole reagire secondo lo schema di reazione riportato in modo dettagliato in Figura 14.

La molecola attiva che è coniugata sarà preferibilmente un peptide atto ad inibire selettivamente la via di trasduzione del segnale delle proteine appartenenti alla famiglia NFAT.

- 20 Tra ciascun passaggio del metodo potranno essere previsti uno o più ulteriori passaggi di lavaggio e/o concentrazione. I passaggi di lavaggio e concentrazione saranno eseguiti come noto al tecnico del settore.

- 25 La presente invenzione è stata fin qui descritta con riferimento ad alcune sue forme di realizzazione. E' da intendersi che possano esistere altre forme di realizzazione che afferiscono al medesimo nucleo inventivo tutte rientranti nell'ambito di protezione delle rivendicazioni qui di seguito riportate.

ESEMPI

1.1 Protocollo di preparazione dei nanostrutture coniugati con il peptide VIVIT

5 Nanoparticelle inorganiche disponibili in commercio (es. AC Diagnostics, Inc.) rivestite con un tensioattivo idrofobico a catena lunga (es. magnetite rivestita di acido oleico o oleilammina) con dimensioni uniformi che possono variare tra 3 e 50 nm, sono state rivestite con un polimero anfifilico, ottenuto per condensazione di poliisobutilene-anidride maleica e dodecilammina (PMA) come descritto in C.-A. J. Lin et al. *Small*
10 2008, 3, 334-341. Il PMA è disciolto in cloroformio a una concentrazione 0.5 M e aggiunto (110 μ l) alla dispersione di nanoparticelle anch'esse in cloroformio (a una concentrazione iniziale di 10 mg in 1.0 ml), la miscela è quindi omogeneizzata e il solvente viene poi evaporato a pressione ridotta. Il solido risultante è risospeso in tampone borato di sodio a pH 12 per ottenere una dispersione stabile e omogenea di
15 nanoparticelle (MYTS), eventualmente avvalendosi dell'uso di ultrasuoni (sonicatore). Le MYTS sono state concentrate e lavate due volte con acqua distillata come ben noto agli esperti del settore. La soluzione contenente MYTS è fatta reagire con 2,2-(etilendiossi)-bis-(etilammina) (EDBE) 0.05 M (3 μ l) in presenza di 1-etil-3-(3-dimetilamminopropil) carbodiimide cloridrato (EDC) 0.1 M (8 μ l) per almeno 1.5 ore.
20 Dopo aver lavato più volte, le nanoparticelle sono lasciate in agitazione per 4 ore in presenza di N-succinimidil-3-[2-piridilditio]-propionato (SPDP) (300 μ l a una concentrazione di 10 mg/ml), quindi la miscela è concentrata e lavata due volte con acqua, ottenendo MFN1. Infine, il peptide con sequenza NH₂-CGGGKMAGPVIVITGPHEE-COOH (SEQ ID NO:1) (13 μ l a una concentrazione 1
25 mg/ml) e PEG-SH (con peso molecolare di circa 500 Da, 10 μ l a una concentrazione 10 mg/ml) sono aggiunti alla miscela. La miscela è agitata per 2 ore a temperatura ambiente e la sospensione di nanoparticelle (MYTS) è successivamente concentrata. La procedura di coniugazione del peptide è schematizzata in Figura 1.
Il surnatante è analizzato mediante UV e l'assorbanza è letta a 343 nm per
30 determinare la concentrazione di piridina-2-tione rilasciata allo scopo di determinare la

quantità di peptide/PEG associato sulle nanoparticelle MYTS. Le nanoparticelle funzionalizzate con il peptide ed il PEG sono poi lavate due volte con acqua e la concentrazione finale è determinata mediante misura UV a confronto con una retta di calibrazione.

5

1.2 Protocollo di preparazione dei nanocostrutti coniugati con l'antivirale enfuvirtide

Nanoparticelle inorganiche disponibili in commercio (es. AC Diagnostics, Inc.) rivestite con un tensioattivo idrofobico a catena lunga (es. magnetite rivestita di acido oleico o oleilammina) con dimensioni uniformi che possono variare tra 3 e 50 nm, sono state
10 rivestite con un polimero anfifilico, ottenuto per condensazione di poliisobutilene-anidride maleica e dodecilammina (PMA) come descritto in C.-A. J. Lin et al. *Small* 2008, 3, 334-341. Il PMA è disciolto in cloroformio a una concentrazione 0.5 M e aggiunto (110 µl) alla dispersione di nanoparticelle anch'esse in cloroformio (a una
15 concentrazione iniziale di 10 mg in 1.0 ml), la miscela è quindi omogeneizzata e il solvente viene poi evaporato a pressione ridotta. Il solido risultante è risospeso in tampone borato di sodio a pH 12 per ottenere una dispersione stabile e omogenea di nanoparticelle (MYTS), eventualmente avvalendosi dell'uso di ultrasuoni (sonicatore). Le MYTS sono state concentrate e lavate due volte con acqua distillata come ben noto
20 agli esperti del settore. La soluzione contenente MYTS è fatta reagire con 2,2-(etilendiossi)-bis-(etilammina) (EDBE) 0.05 M (3 µl) in presenza di 1-etil-3-(3-dimetilamminopropil) carbodiimide cloridrato (EDC) 0.1 M (8 µl) per almeno 1.5 ore. Dopo aver lavato più volte, le nanoparticelle sono trattate con enfuvirtide (SEQ ID NO:6) (5 g sciolto in acqua a una concentrazione di 1 mg/ml) per 2 ore, quindi la
25 miscela è concentrata e lavata due volte con acqua.

1.3 Protocollo di preparazione dei nanocostrutti coniugati con un fluoroforo organico

Una soluzione di fluoresceinammina 1.0 M (0.5 ml in DMSO) è aggiunta a una
30 soluzione di PMA 0.5 M in CHCl₃ (5 ml). La miscela è fatta reagire sotto agitazione per

una notte, ottenendo una soluzione di MYTS. Questa soluzione (63 μ l) è aggiunta alla soluzione di MYTS (4.6 mg in CHCl_3), la miscela viene poi resa omogenea e il solvente evaporato a pressione ridotta. Si aggiunge tampone sodio borato (SBB, pH 12, 10 ml) e si concentra la sospensione di nanoparticelle che viene concentrata in tubi Amicon (cutoff 100 kDa) tramite centrifugazione a 3500 rpm (1 ora). Le nanoparticelle fluorescenti sono lavate 2 volte diluendo con SBB e concentrate (ogni ciclo di centrifugazione ha una durata di circa 20 minuti a 3500 rpm) fino ad un volume finale di 200 μ l.

10 **1.4 Protocollo di preparazione di crema A/O contenente nanocostrutti coniugati con un fluoroforo organico o meno**

120 μ L di una sospensione di nanoparticelle MYTS o MYTS-FITC (40 μ g/ml, H_2O) sono stati incorporati in circa 60 mg di una crema base commerciale a fase continua lipofila (es. Essex, Schering-Plough S.p.A.) e poi aggiunte, mediante diluizioni progressive, fino a 600 mg totali di crema.

2. Sperimentazione in modelli biologici

20 **2.1 Esperimenti per verificare la capacità dei nanocostrutti di diffondere nello spazio citosolico di DC**

Al fine di valutare se i nanocostrutti della presente invenzione fossero in grado di raggiungere il citosol della cellula, è stata eseguito un test con le DC. In particolare DC derivate dal midollo osseo di un topo sono state incubate per cinque ore *in vitro* con i nanocostrutti preparati come descritto nell'esempio 1 e misurata la loro capacità di diffondere nello spazio citosolico mediante TEM (TEM sta per microscopia elettronica a trasmissione). Si è osservato che in parte penetrando direttamente la membrana cellulare e in parte sfuggendo alla compartimentalizzazione convenzionale mediante endosomi, sono in grado di diffondere nello spazio citosolico (Figura 1). La proteina bersaglio Cn è essenzialmente localizzata nel citosol, la capacità di arrivare nel citosol

è quindi fondamentale per il trasporto attivo del peptide con sequenza VIVIT alla proteina bersaglio.

2.2 Inibizione della via di trasduzione del segnale di NFAT *in vitro*

5 I nanocostrutti preparati come descritto nell'esempio 1 inibiscono il percorso di segnalazione NFAT *in vitro*.

Al fine di valutare se nanocostrutti fossero in grado di inibire la via di trasduzione del segnale di NFAT, sono stati eseguiti i seguenti esperimenti *in vitro*. Dopo l'esposizione a LPS, le DC derivate dal midollo osseo sono in grado di produrre diverse citochine infiammatorie, tra cui IL-2 e TNF α . IL-2 è strettamente NFAT-dipendente, mentre la produzione di TNF α è NF-kB-dipendente e NFAT-indipendente. Pertanto IL-2 e TNF α sono dei validi marcatori rispettivamente della via di attivazione di NFAT e NF-kB. Dopo due ore di pre-trattamento con i nanocostrutti ottenuti come descritto nell'esempio 1, le DC derivate dal midollo osseo sono state stimulate con LPS e la quantità di citochine rilasciate misurate con metodo ELISA 18 ore più tardi. Come mostrato in Figura 2, i nanocostrutti bloccano completamente IL-2 ma non la produzione di TNF α , indicando che queste nanoparticelle sono capaci di inibire selettivamente e in modo efficiente *in vitro* la via di trasduzione del segnale di NFAT in cellule del sistema immunitario innato.

20

2.3 Inibizione della via di trasduzione del segnale di NFAT *in vivo*

Topi mutanti (ottenuti da laboratori di Ronald H. Schwartz, NIH Bethesda) sono stati utilizzati per questo esperimento. In questo modello murino, la proteina GFP è inserita nel secondo esone del gene IL-2, quindi ha la stessa regolazione di IL-2. Come detto in precedenza, IL-2 è un marcatore di attivazione NFAT. Se i topi geneticamente modificati per IL-2/GFP sono trattati con LPS, una percentuale significativa di neutrofili GFP+ (cellule Ly6G+) può essere misurata nella milza due ore dopo il trattamento. Per verificare se i nanocostrutti della presente invenzione fossero in grado di inibire la via del segnale di NFAT *in vivo*, topi mutanti sono stati iniettati endovena con i nanocostrutti come preparati all'esempio 1 due ore prima dell'iniezione di LPS. Come

30

mostrato in Figura 3, il pretrattamento con i nanocostrutti ha un forte impatto sulla capacità dei neutrofili di produrre GFP in maniera NFAT-dipendente, indicando che i nanocostrutti sono in grado di inibire la via di trasduzione del segnale di NFAT *in vivo*.

5 **2.4. Inibizione della formazione di edema in maniera NFAT-dipendente in un modello di infiammazione indotta da LPS *in vivo*.**

La formazione di edema è uno dei primi passi nella generazione del processo infiammatorio ed è un processo fondamentale per l'accumulo locale di mediatori infiammatori. Il gonfiore locale è rilevante anche per il trasporto dell'antigene libero ai
10 linfonodi drenanti. Gli antigeni presenti nei tessuti infiammati vengono trasportati ai linfonodi in due fasi successive. Nella prima fase di arrivo, gli antigeni in forma libera entrano nei vasi linfatici afferenti e raggiungono il linfonodo drenante. Nella seconda fase, più tardiva, gli antigeni vengono trasportati associati alle DC. L'aumentata pressione interstiziale dovuta alla formazione dell'edema spinge una parte del fluido
15 interstiziale nei vasi linfatici afferenti e favorisce l'ingresso dell'antigene libero nei vasi linfatici afferenti stessi e l'arrivo dell'antigene libero ai linfonodi drenanti.

In studi precedenti, abbiamo dimostrato che il gene *Ptges1*, espresso dalle DC in seguito all'esposizione a LPS, è regolato da NFAT. *Ptges1* è una proteina chiamata prostaglandina (PG) E sintasi microsomiale 1 (mPGES-1). mPGES-1 insieme alla
20 ciclo-ossigenasi-2 (COX-2) e alla fosfolipasi A2 (cPLA2), coordina un processo di biosintesi che conduce alla produzione di PGE2, uno dei più versatili prostanoidi coinvolti nella regolazione di molte risposte fisiologiche e fisiopatologiche, tra cui la formazione di edema locale nel processo infiammatorio attraverso la vasodilatazione. Gli inventori della presente invenzione hanno osservato che la formazione di edema
25 indotto da LPS è DC- e NFAT-dipendente. Quindi le DC, grazie alla regolazione della formazione dell'edema attraverso NFAT in seguito all'esposizione a LPS e grazie alla produzione di PGE2 regolano l'arrivo dell'antigene libero ai linfonodi drenanti. Pertanto, il percorso NFAT/mPGES-1 rappresenta un possibile bersaglio per terapie anti-infiammatorie.

Per valutare se le nanoparticelle della presente invenzione fossero in grado di inibire in vivo la formazione di edema LPS-indotta, i topi sono stati pretrattati o meno con i nanocostrutti dell'esempio 1 o FK506 come controllo sub-cute per 2 ore prima dell'iniezione di LPS nella zampa. Come mostrato in Figura 4, la formazione di edema NFAT-dipendente indotto da LPS è stata fortemente inibita dai nanocostrutti della presente invenzione, confermando che queste nanoparticelle possono in modo efficiente inibire *in vivo* l'attivazione di NFAT mediata da Cn.

2.5 Inibizione dello sviluppo di artrite infiammatoria nel modello murino di artrite ad anticorpi anti-collagene di tipo II /LPS indotta

L'artrite reumatoide (AR) è una malattia sistemica autoimmune debilitante, cronica, caratterizzata da una reazione infiammatoria immunologica del tessuto mesenchimale e della sinovia accompagnata da sinovite poliarticolare. Nel tempo, porta alla progressiva distruzione delle strutture articolari e periarticolari. NFAT è sostanzialmente attivo in cellule ematopoietiche e mesenchimali in articolazioni infiammate e recentemente è stato dimostrato che le isoforme NFATc2 e c3 hanno un ruolo nella regolazione della simmetria e dell'intensità della sinovite in modelli murini di artrite in cui il processo infiammatorio è linfocita-(immunità adattativa) indipendente. Ciò suggerisce un ruolo del tutto nuovo delle molecole NFAT nell'immunità innata rilevante per la patogenesi dell'artrite reumatoide. Per verificare se i nanocostrutti della presente invenzione fossero in grado di inibire lo sviluppo di artrite infiammatoria, è stato utilizzato un modello di artrite indotta da anticorpo anti-collagene di tipo II/LPS. In particolare, 6 topi C57BL6 sono stati trattati al giorno -1, 0, +1, +3, +6, +9, + 12 con i nanocostrutti dell'esempio 1. Come mostrato in Figura 5, i nanocostrutti inibiscono lo sviluppo dell'artrite in modo molto efficiente.

2.6 Inibizione del rigetto del trapianto di cute

Per verificare se i nanocostrutti della presente invenzione fossero in grado d'inibire il rigetto del trapianto, è stato usato un modello di trapianto di cute. Normalmente, cute maschile trapiantata in topi femmina viene respinta in circa tre settimane nel 90-100%

dei topi. Pertanto, i topi di sesso femminile sono stati trapiantati con lembi di cute maschile e trattati ogni tre giorni con i nanocostrutti dell'esempio 1 a partire dal primo giorno precedente al trapianto. Lo stato del trapianto è stato ispezionato ogni giorno. Dopo quattro settimane, i trapianti cutanei sono stati accettati nel 90% dei topi femmina
5 trattati con i nanocostrutti portanti il peptide VIVIT, mentre sono stati rigettati nell'80% dei topi trattati con i nanocostrutti di controllo (Figura 6). Questo esperimento indica che i nanocostrutti VIVIT possono inibire in modo efficace risposte immunitarie contro antigeni minori di istocompatibilità *in vivo*.

10 **2.7 Esperimenti comparativi d'inibizione della via di trasduzione del segnale di NFAT *in vitro***

Le DC producono IL-2 in maniera NFAT-dipendente se stimolate con LPS. Per valutare l'efficacia del peptide VIVIT, DC derivate da midollo osseo sono state trasdotte con una sequenza codificante il peptide VIVIT fuso con la proteina GFP, mediante l'utilizzo di
15 un vettore retrovirale.

Come mostrato in Figura 8, il peptide VIVIT espresso all'interno della cellula era in grado di bloccare completamente l'espressione dell'IL-2, mentre non era in grado di bloccare l'espressione del TNF- α , citochina prodotta dalle cellule dendritiche in risposta a LPS in maniera NFAT-indipendente.

20 Per ottenere il blocco farmacologico della funzione di NFAT nelle cellule dell'immunità innata attraverso una procedura che potesse essere utilizzata in vivo e che non prevedesse l'infezione o la trasfezione delle cellule, abbiamo proceduto analizzando diversi possibili sistemi di delivery per identificare un sistema in grado di trasferire il peptide VIVIT nel citosol della cellula dove l'attività di NFAT deve essere bloccata.

25 Poiché le DC sono cellule fagocitiche abbiamo, come prima cosa, utilizzato il peptide non modificato assumendo che esso potesse raggiungere il citosol della cellula una volta entrato nel compartimento endosomiale. Sono state, quindi, effettuate delle co-culture di DC con il peptide VIVIT, e l'inibizione di NFAT è stata analizzata misurando la produzione di IL-2 in seguito a stimolazione con LPS. Come mostrato nella Figura 9,
30 l'utilizzo del peptide VIVIT libero non modificato non ha consentito di interferire con

l'attività di NFAT. È stato quindi valutato un peptide VIVIT modificato a cui è stata attaccata una coda idrofobica di 11 Arginine. Era stato, infatti, descritto in letteratura che questa modificazione poteva consentire l'ingresso all'interno delle cellule. Tuttavia anche questa modifica non ha dato il risultato atteso e non è stato possibile osservare
5 nessuna inibizione del pathway di NFAT indotto nelle DC dall'LPS (Figura 9).

Sono stati utilizzati liposomi a base fosfolipidica e ottenuti dei preparati di liposomi con sequenze VIVIT incluse. Tali preparati sono stati incubati con le DC prima della stimolazione con LPS. Anche questo sistema, però, non si è mostrato efficace nell'inibire la funzione di NFAT all'interno delle cellule (Figura 10). Per giunta
10 presentava l'ulteriore svantaggio riguardante l'impossibilità di determinare il loading del principio attivo (il peptide VIVIT) il che avrebbe potuto portare a incongruenze dei risultati ad ogni preparazione.

Poiché le formulazioni liposomiche non avevano mostrato alcuna efficacia nel trasferire il peptide VIVIT all'interno delle DC, abbiamo analizzato nanoparticelle magnetiche
15 come nuovo sistema di delivery. Il peptide VIVIT è stato quindi coniugato con il linker descritto in Figura 11A a nanoparticelle costituite di un core magnetico di magnetite cristallina di circa 8 nm di diametro. Come precedentemente descritto per le formulazioni liposomiche, le nanoparticelle direttamente coniugate con il peptide VIVIT sono state incubate con le DC prima che queste venissero stimolate con LPS. Anche in
20 questo caso non è stato possibile osservare nessuna inibizione del pathway di NFAT indotto da LPS nelle DC (Figura 11B).

2.8 Esperimenti per verificare la capacità dei nanocostrutti coniugati al PEG di diffondere nello spazio citosolico di cellule dendritiche

25 5 milioni di DC derivate da midollo osseo sono state piastrate in terreno completo in piastre da 100mm e incubate per 5 ore con nanoparticelle MYTS (25 µg/ml). Le DC sono quindi state staccate, lavate con PBS e fissate con glutaraldeide al 2.5%. Le cellule sono state post fissate in tetrossido di osmio all'1,5% e successivamente disidratate in scala ascendente di alcool ed incluse in epon.

I campioni sono stati tagliati al microtomo e colorati con acetato di uranile e citrato di piombo. Le sezioni sono quindi state misurate al TEM (Figura 13).

2.9 Esperimenti per verificare la capacità dei nanostrutti coniugati all'antivirale enfuvirtide di diffondere nello spazio citosolico di cellule neuronali

5

Topi nudi balb/c sono stati iniettati endovena con una soluzione contenente il solo farmaco antiretrovirale Enfuvirtide (noto per essere scarsamente permeabile attraverso la BBB) marcato con il fluorocromo AlexaFluor660 (AF660), oppure l'enfuvirtide (sempre marcato con AF660) coniugato alle nanoparticelle (MYTS). Dopo 1 ora, durante la quale i topi sono stati mantenuti addormentati supini con un magnete applicato a livello del cranio, i campioni dei cervelli isolati dai topi trattati con MYTS-enfuvirtide o enfuvirtide libero sono stati criosezionati. Successivamente, è stato eseguito uno staining dei neuroni con la sonda fluorescente NeuroTrace (la quale colora la sostanza Nissl, abbondante nelle cellule neuronali e composta dall'RNA ribosomiale associato al reticolo endoplasmatico). Sono stati anche marcati i nuclei delle cellule nervose con DAPI ed è stato osservato il segnale dell'AF660 associato al farmaco, coniugato o meno alle nanoparticelle, al microscopio confocale. I risultati mostrano un accumulo del farmaco fluorescente nei neuroni solo nel caso del farmaco coniugato alle MYTS (Figura 12).

10

15

20

2.10 Esperimenti per verificare la capacità di una crema contenente nanostrutti coniugati a molecola fluorescente di diffondere attraverso la cute *in vivo*

25

Dispersioni ad alta concentrazione di nanoparticelle marcate con fluoroforo e non (MYTS-FITC e MYTS, rispettivamente), sono state incorporate in una quantità circa doppia di crema base e poi aggiunte al resto della crema base a diluizioni successive, mescolando fino alla completa omogeneizzazione. Le suddette preparazioni sono state applicate per tre giorni consecutivi sulla cute di topi C57BL/6 precedentemente rasati (area di 1 cm²). I topi sono stati sacrificati ed è stata prodotta una sospensione unicellulare dalla regione di cute trattata. Le cellule sono poi state analizzate al FACS

per determinare l'uptake in cellule di origine ematopoietica (CD45+) e non (CD45-). Come si può notare dalla figura le nanoparticelle vengono inglobate da entrambi i gruppi di cellule.

5

DESCRIZIONE DELLE SEQUENZE

Tabella delle sequenze

SEQ ID NO:1	CGGGKMAGPVIVITGPHEE
SEQ ID NO:2	<i>CGGVIVIT</i>
SEQ ID NO:3	CGGGKMAGPHPVIVITGPHEE
SEQ ID NO:4	CGGGMAGPVIVITGPHEE
SEQ ID NO:5	VIVIT
SEQ ID NO:6	YTSLIHSLIEESQNQQEKNE QELLELDKWASLWNWF
SEQ ID NO:7 (sequenza controllo)	CGGGKMAGPPHIVEETGPHVI

10

RIVENDICAZIONI

1. Metodo di trasporto di una molecola attiva nel citosol della cellula comprendente i seguenti passaggi:
 - a) predisporre un nanocostrutto comprendente una nanoparticella inorganica con un rivestimento a base di polimero anfifilico e una molecola attiva legata a tale particella attraverso detto rivestimento anfifilico;
 - b) porre detto nanocostrutto in contatto con detta cellula.

2. Metodo secondo la rivendicazione 1 in cui la nanoparticella inorganica è un metallo o un ossido metallico.

3. Metodo secondo la rivendicazione 2 in cui la nanoparticella è costituita di Au, Ag, Fe, Mn, oppure di γ -Fe₂O₃, Fe₃O₄, MnFe₂O₄, CoFe₂O₄, MnO, TiO₂, SiO₂, CeO₂ o quantum dots scelti tra CdSe, CdS, CdSe/ZnS.

4. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 3 in cui detto polimero anfifilico è costituito da copolimeri a blocchi.

5. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 4 in cui il polimero anfifilico è ottenuto dalla condensazione del polisobutilene-alt-maleico anidride e dodecilammina (PMA).

6. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 5 in cui detta molecola attiva è legata al rivestimento anfifilico anche mediante un linker a legame reversibile o irreversibile.

7. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 6, in cui detto linker è reversibile e comprende un ponte disolfuro.

8. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 7 in cui detta molecola attiva è scelta tra un oligopeptide o polipeptide, un saccaride, oligosaccaride o polisaccaride, una sequenza di DNA, RNA, siRNA, miRNA, un polimero sintetico o una molecola farmacologicamente attiva.

5

9. Metodo secondo la rivendicazione 8 in cui la molecola attiva è un peptide scelto tra SEQ ID NO: 6 (enfuvirtide), peptidi che favoriscono la penetrazione di sostanze nel nucleo (nuclear localization sequenze), o un peptide comprendente la sequenza SEQ ID NO: 5.

10

10. Metodo secondo la rivendicazione 9 in cui la sostanza attiva è un peptide avente SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5.

15

11. Nanocostrutto comprendente una nanoparticella inorganica con un rivestimento esterno a base di polimero anfifilico e una molecola con attività farmacologica legata a detta nanoparticella attraverso il polimero anfifilico per uso nel trattamento di una malattia associata a un evento o processo molecolare localizzato nel citosol della cellula.

20

12. Nanocostrutto secondo la rivendicazione 11 in cui la nanoparticella inorganica è un metallo o un ossido metallico.

25

13. Nanocostrutto secondo le rivendicazioni 11 o 12 in cui la nanoparticella è costituita di Au, Ag, Fe, Mn, oppure di γ -Fe₂O₃, Fe₃O₄, MnFe₂O₄, CoFe₂O₄, MnO, TiO₂, SiO₂, CeO₂, un quantum dots scelto tra CdSe, CdS, CdSe/ZnS.

30

14. Nanocostrutto secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 11 a 13 in cui detto polimero anfifilico è costituito da copolimeri a blocchi.

15. Nanocostrutto secondo la rivendicazione 14 in cui il polimero anfifilico è ottenuto

dalla condensazione del polisobutilene-alt-maleico anidride e dodecilammina (PMA).

16. Nanocostrutto secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 11 a 15 in cui detta molecola attiva è legata al rivestimento anfifilico anche mediante un linker a legame
5 reversibile o irreversibile.
17. Nanocostrutto secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 11 a 16, in cui detto linker è reversibile e comprende un ponte disolfuro.
- 10 18. Nanocostrutto secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 11 a 17 in cui detta molecola attiva è scelta tra un oligopeptide o polipeptide, un saccaride, oligosaccaride o polisaccaride, una sequenza di DNA, RNA, siRNA, miRNA o polimero sintetico o una molecola farmacologicamente attiva.
- 15 19. Nanocostrutto secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 11 a 18 in cui la molecola attiva è un peptide scelto tra SEQ ID NO: 6 (enfuvirtide), peptidi che favoriscono la penetrazione di sostanze nel nucleo (nuclear localization sequence), o un peptide comprendente la sequenza SEQ ID NO: 5.
- 20 20. Nanocostrutto secondo la rivendicazione 19 in cui la sostanza attiva è un peptide avente SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5.
21. Nanocostrutto secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 11 a 20 comprendente un secondo composto bio-compatibile, legato alla nanoparticella attraverso il polimero
25 anfifilico.
22. Nanocostrutto secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 11 a 21 in cui le dimensioni di dette nanoparticelle sono comprese tra 5 e 100 nanometri.
- 30 23. Nanocostrutto secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 11 a 22 per uso nel

trattamento di una malattia associata ad un'alterazione funzionale di una proteina localizzata nel citosol o nel nucleo della cellula.

24. Nanocostrutto secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 19 o 20 per uso in un
5 trattamento di inibizione selettivamente della via di trasduzione del segnale delle proteine appartenenti alla famiglia NFAT.

25. Nanocostrutto secondo la rivendicazione 24 in cui detta malattia è uno stato infiammatorio.

10

26. Nanocostrutto secondo la rivendicazione 25 in cui detta malattia è scelta tra: artrite reumatoide, malattia infiammatoria intestinale, rigetto di trapianto allogenico o xenogenico, sepsi, anemia aplastica, psoriasi, edema, lupus eritematoso, diabete di tipo I, asma, fibrosi polmonare, sclerodermia, dermatomiosite, sindrome di Sjogren,
15 malattia di Kawasaki, tiroidite di Hashimoto, anemia emolitica autoimmune, trombocitopenia idiopatica, glomerulonefrite cronica, sclerosi multipla, fibrosi cistica, epatite cronica recidivante, cirrosi biliare primaria, rinite allergica, congiuntivite allergica, dermatite atopica, malattia di Crohn, colite ulcerosa, colite/sindrome infiammatoria intestinale, tiroidite autoimmune, malattie da immunodeficienza acquisita,
20 morbo di Alzheimer, morbo di Parkinson, tumori.

27. Composizione farmaceutica comprendente un nanocostrutto secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 11 a 25 e uno o più eccipienti per uso nel trattamento di una malattia o di uno stato infiammatorio.

25

28. Composizione secondo la rivendicazione 27 in cui la malattia è scelta tra: artrite reumatoide, malattia infiammatoria intestinale, rigetto di trapianto allogenico o xenogenico, sepsi, anemia aplastica, psoriasi, edema, lupus eritematoso, diabete di tipo I, asma, fibrosi polmonare, sclerodermia, dermatomiosite, sindrome di Sjogren,
30 malattia di Kawasaki, tiroidite di Hashimoto, anemia emolitica autoimmune,

trombocitopenia idiopatica, glomerulonefrite cronica, sclerosi multipla, fibrosi cistica, epatite cronica recidivante, cirrosi biliare primaria, rinite allergica, congiuntivite allergica, dermatite atopica, malattia di Crohn, colite ulcerosa, colite/sindrome infiammatoria intestinale, tiroidite autoimmune, malattie da immunodeficienza acquisita, morbo di Alzheimer, morbo di Parkinson, tumori.

29. Composizione farmaceutica secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 27 o 28 idonea per somministrazione orale, endovenosa, intramuscolare, sottocutanea, transdermica, nasale, vaginale, rettale o intraperitoneale.

10

30. Metodo per la preparazione di un nanocostrutto secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 19 a 26 comprendente i seguenti passaggi:

- a) predisporre una soluzione/sospensione di nanoparticelle inorganiche con un rivestimento esterno di un polimero anfifilico attivato tramite linker;
- b) aggiungere a detta soluzione/sospensione una o più molecole attive lasciandola reagire con detto linker.

15

31. Metodo secondo la rivendicazione 30 caratterizzato dal fatto che il polimero anfifilico è attivato tramite un linker che crea un legame reversibile o irreversibile.

20

32. Metodo secondo la rivendicazione 31 in cui detto legame reversibile è ottenuto secondo lo schema della Figura 14.

CLAIMS

1. Method of transport of an active molecule in a cell cytosol, comprising the following steps:
 - a) prearranging a nanoconstruct comprising an inorganic nanoparticle with an amphiphilic polymer-based coating and an active molecule bound to said particle through said amphiphilic coating;
 - b) contacting said nanoconstruct with said cell.
2. The method according to claim 1, wherein the inorganic nanoparticle is a metal or a metal oxide.
3. The method according to claim 2, wherein the nanoparticle is comprised of Au, Ag, Fe, Mn, or of γ -Fe₂O₃, Fe₃O₄, MnFe₂O₄, CoFe₂O₄, MnO, TiO₂, SiO₂, CeO₂ or quantum dots selected from CdSe, CdS, CdSe/ZnS.
4. The method according to any one of the claims 1 to 3, wherein said amphiphilic polymer is comprised of block copolymers.
5. The method according to any one of the claims 1 to 4, wherein the amphiphilic polymer is obtained by condensation of poly(isobutylene-*alt*-maleic anhydride) and dodecylamine (PMA).
6. The method according to any one of the claims 1 to 5, wherein said active molecule is bound to the amphiphilic coating also by a linker with a reversible or irreversible bond.
7. The method according to any one of the claims 1 to 6, wherein said linker is reversible and comprises a disulphide bridge.

8. The method according to any one of the claims 1 to 7, wherein said active molecule is selected from an oligopeptide or polypeptide, a saccharide, oligosaccharide or polysaccharide, an DNA, RNA, siRNA, miRNA sequence, a synthetic polymer or a pharmacologically active molecule.

5

9. The method according to claim 8, wherein the active molecule is a peptide selected from Ac-Tyr-Thr-Ser-Leu-Ile-His-Ser-Leu-Ile-Glu-Glu-Ser-Gln-Asn-Gln-Gln-Glu-Lys-Asn-Glu-Gln-Glu-Leu-Leu-Glu-Leu-Asp-Lys-Trp-Ala-Ser-Leu-Trp-Asn-Trp-Phe-NH₂ (enfuvirtide), peptides favoring substance entry in the nucleus (nuclear localization sequences), or a peptide comprising the sequence Val-Ile-Val-Ile-Thr (V-I-V-I-T).

10

10. The method according to claim 9, wherein the active substance is a peptide having SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5,6.

15

11. A nanoconstruct comprising an inorganic nanoparticle with an amphiphilic polymer-based external coating and a molecule with pharmacological activity bound to said nanoparticle through the amphiphilic polymer, for use in the treatment of a disease associated to a molecular event or process localized in the cell cytosol .

20

12. The nanoconstruct according to claim 11, wherein the inorganic nanoparticle is a metal or a metal oxide.

25

13. The nanoconstruct according to claims 11 or 12, wherein the nanoparticle is comprised of Au, Ag, Fe, Mn, or of γ -Fe₂O₃, Fe₃O₄, MnFe₂O₄, CoFe₂O₄, MnO, TiO₂, SiO₂, CeO₂, [or or] a quantum dots selected from CdSe, CdS, CdSe/ZnS.

14. The nanoconstruct according to any one of the claims 11 to 13, wherein said amphiphilic polymer is comprised of block copolymers.

30

15. The nanoconstruct according to claim 14, wherein the amphiphilic polymer is

obtained by condensation of poly(isobutylene-*alt*-maleic anhydride) and dodecylamine (PMA).

16. The nanoconstruct according to any one of the claims 11 to 15, wherein said active
5 molecule is bound to the amphiphilic coating also by a linker with a reversible or irreversible bond.

17. The nanoconstruct according to any one of the claims 11 to 16, wherein said linker is reversible and comprises a disulphide bridge.

10

18. The nanoconstruct according to any one of the claims 11 to 17 wherein said active molecule is selected from an oligopeptide or polypeptide, a saccharide, oligosaccharide or polysaccharide, an DNA, RNA, siRNA, miRNA sequence or a synthetic polymer or a pharmacologically active molecule.

15

19. The nanoconstruct according to any one of the claims 11 to 18, wherein the active molecule is a peptide selected from Ac-Tyr-Thr-Ser-Leu-Ile-His-Ser-Leu-Ile-Glu-Glu-Ser-Gln-Asn-Gln-Gln-Glu-Lys-Asn-Glu-Gln-Glu-Leu-Leu-Glu-Leu-Asp-Lys-Trp-Ala-Ser-Leu-Trp-Asn-Trp-Phe-NH₂ (enfuvirtide), peptides favoring substance entry in the
20 nucleus (nuclear localization sequences), or a peptide comprising the sequence Val-Ile-Val-Ile-Thr (V-I-V-I-T).

20. The nanoconstruct according to claim 19, wherein the active substance is a peptide having SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6.

25

21. The nanoconstruct according to any one of the claims 11 to 20, comprising a second biocompatible compound, bound to the nanoparticle through the amphiphilic polymer.

30 22. The nanoconstruct according to any one of the claims 11 to 21, wherein the sizes

of said nanoparticles are comprised between 5 and 100 nanometers.

23. The nanoconstruct according to any one of the claims 11 to 22 for use in the treatment of a disease associated to a functional alteration of a protein localized in the
5 cell cytosol or nucleus.

24. The nanoconstruct according to any one of the claims 19 or 20 for use in a treatment for selectively inhibiting the signal transduction pathway of the proteins belonging to the NFAT family.
10

25. The nanoconstruct according to claim 24, wherein said disease is an inflammatory state.

26. The nanoconstruct according to claim 25, wherein said disease is selected from:
15 rheumatoid arthritis, inflammatory bowel disease, allogeneic or xenogeneic transplantation rejection, sepsis, aplastic anemia, psoriasis, edema, lupus erythematosus, type I diabetes, asthma, pulmonary fibrosis, scleroderma, dermatomyositis, Sjogren's syndrome, Kawasaki disease, Hashimoto's thyroiditis, autoimmune hemolytic anemia, idiopathic thrombopenia, chronic glomerulonephritis,
20 multiple sclerosis, cystic fibrosis, chronic relapsing hepatitis, primary biliary cirrhosis, allergic rhinitis, allergic conjunctivitis, atopic dermatitis, Crohn's disease, ulcerative colitis, colitis/inflammatory bowel syndrome, autoimmune thyroiditis, acquired immunodeficiency diseases, Alzheimer disease, Parkinson disease, tumors.

27. A pharmaceutical composition comprising a nanoconstruct according to any one of the claims 11 to 25 and one or more excipients for use in the treatment of a disease or of an inflammatory state.
25

28. The composition according to claim 27, wherein the disease is selected from:
30 rheumatoid arthritis, inflammatory bowel disease, allogeneic or xenogeneic

transplantation rejection, sepsis, aplastic anemia, psoriasis, edema, lupus erythematosus, type I diabetes, asthma, pulmonary fibrosis, scleroderma, dermatomyositis, Sjogren's syndrome, Kawasaki disease, Hashimoto's thyroiditis, autoimmune hemolytic anemia, idiopathic thrombopenia, chronic glomerulonephritis,
5 multiple sclerosis, cystic fibrosis, chronic relapsing hepatitis, primary biliary cirrhosis, allergic rhinitis, allergic conjunctivitis, atopic dermatitis, Crohn's disease, ulcerative colitis, colitis/inflammatory bowel syndrome, autoimmune thyroiditis, acquired immunodeficiency diseases, Alzheimer disease, Parkinson disease, tumors.

10 29. The pharmaceutical composition according to any one of the claims 27 or 28 suitable for oral, intravenous, intramuscular, subcutaneous, transdermal, nasal, vaginal, rectal or intraperitoneal administration.

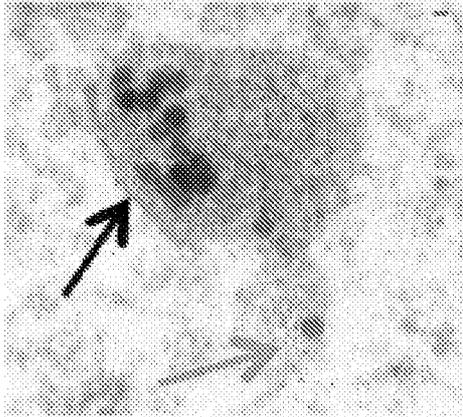
15 30. A method for the preparation of a nanoconstruct according to any one of the claims 19 to 26, comprising the following steps:

- a) prearranging a solution/suspension of inorganic nanoparticles with an external coating of an amphiphilic polymer activated by a linker;
- b) adding to said solution/suspension one or more active molecules, letting it react with said linker.

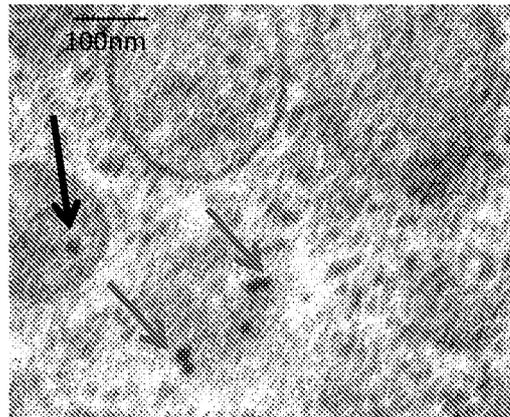
20

31. The method according to claim 30, characterized in that the amphiphilic polymer is activated by a linker creating a reversible or irreversible bond.

25 32. The method according to claim 31, wherein said reversible bond is obtained according to the scheme of Figure 14.



90 min.



5 ore

FIGURA 1

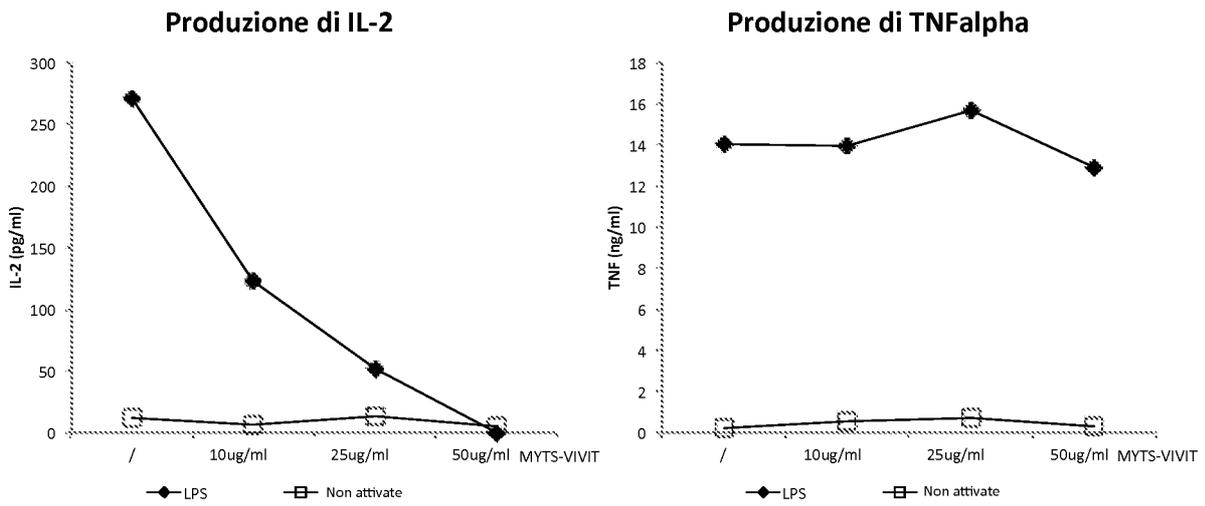


FIGURA 2

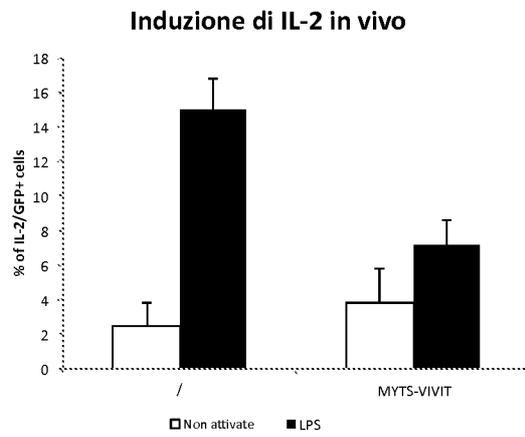


FIGURA 3

Formazione dell' EDEMA

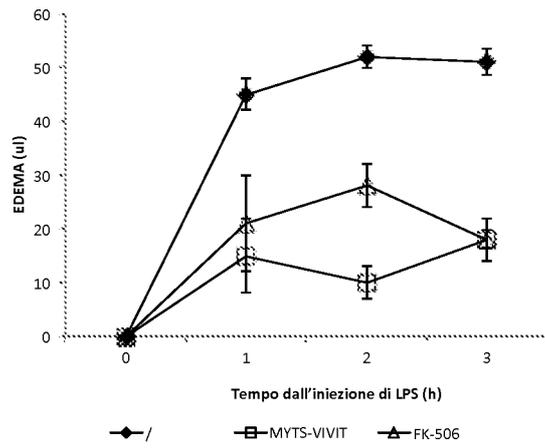


FIGURA 4

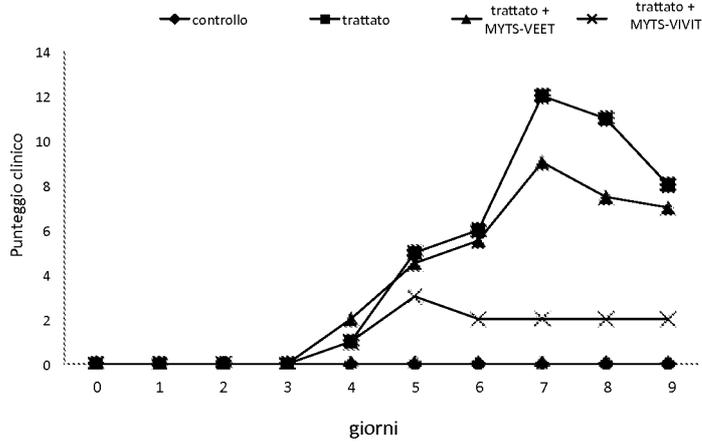


FIGURA 5A

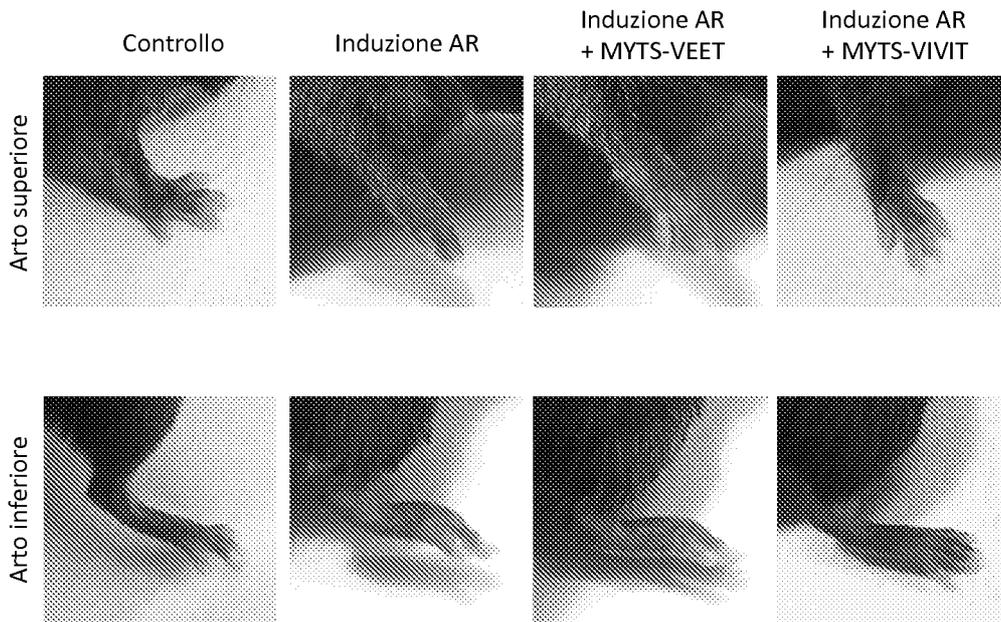


FIGURA 5B

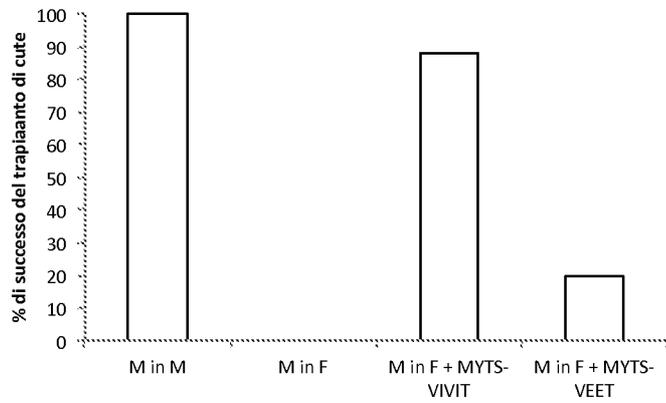
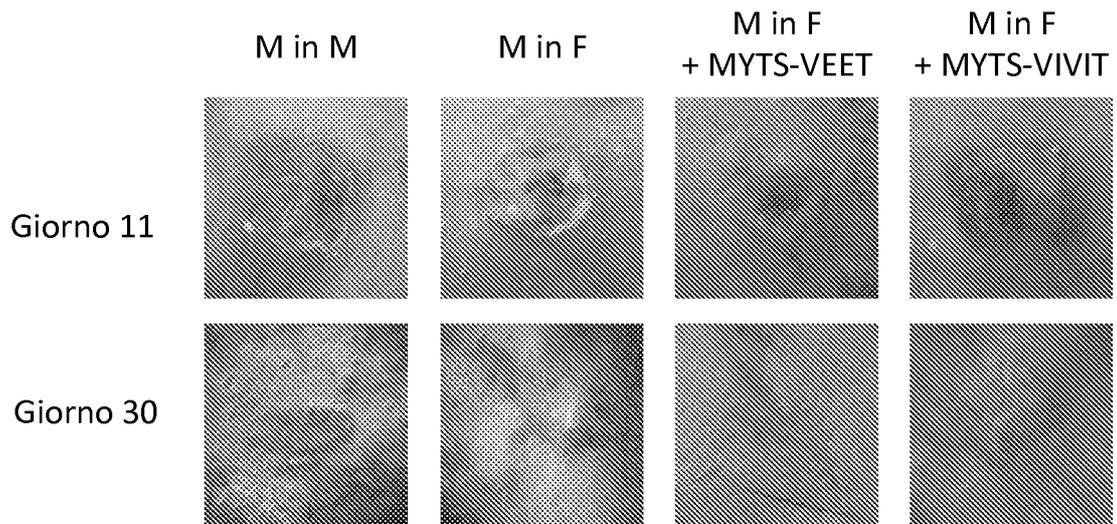


FIGURA 6

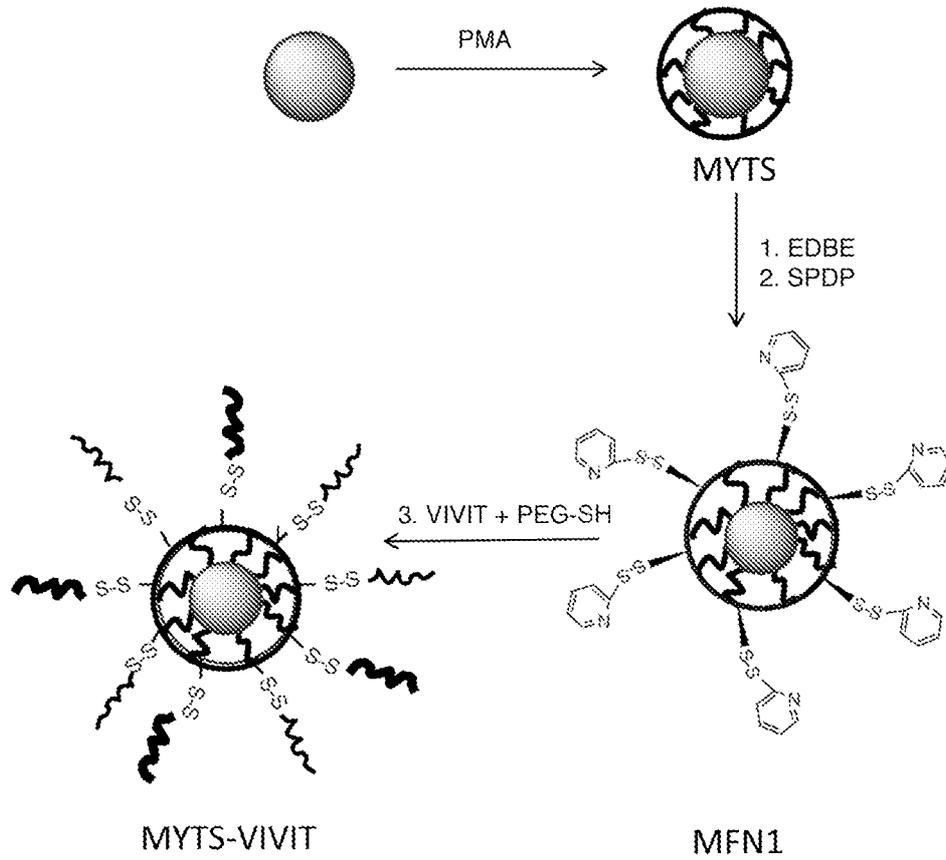


FIGURA 7

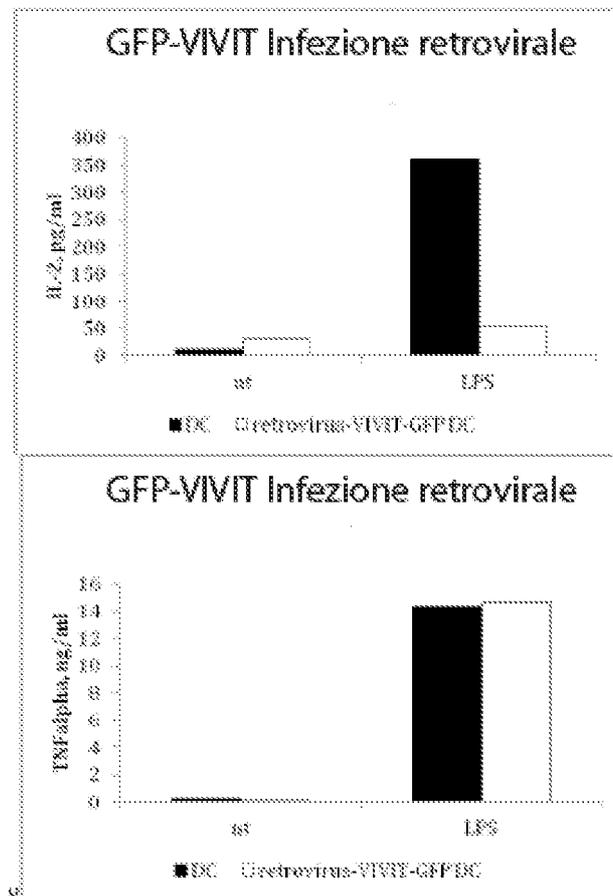


FIGURA 8

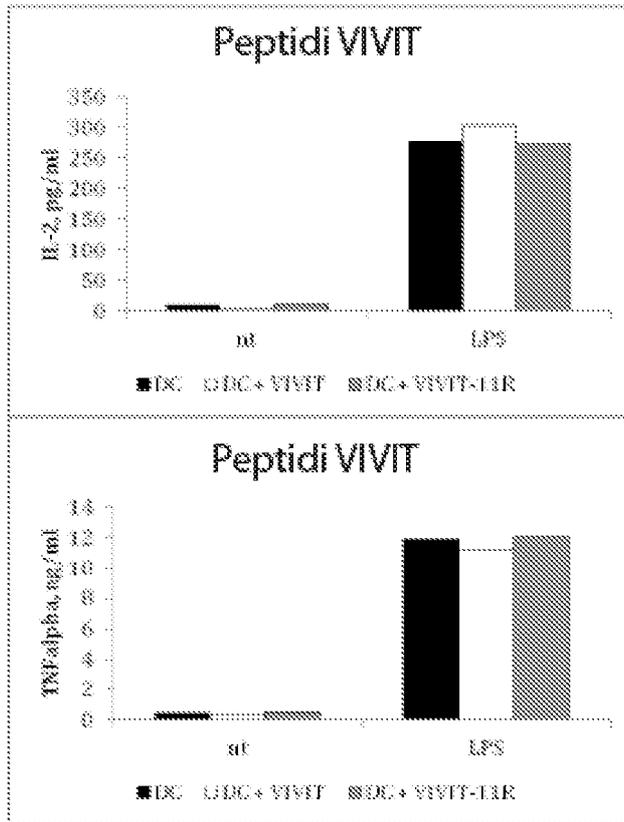


FIGURA 9

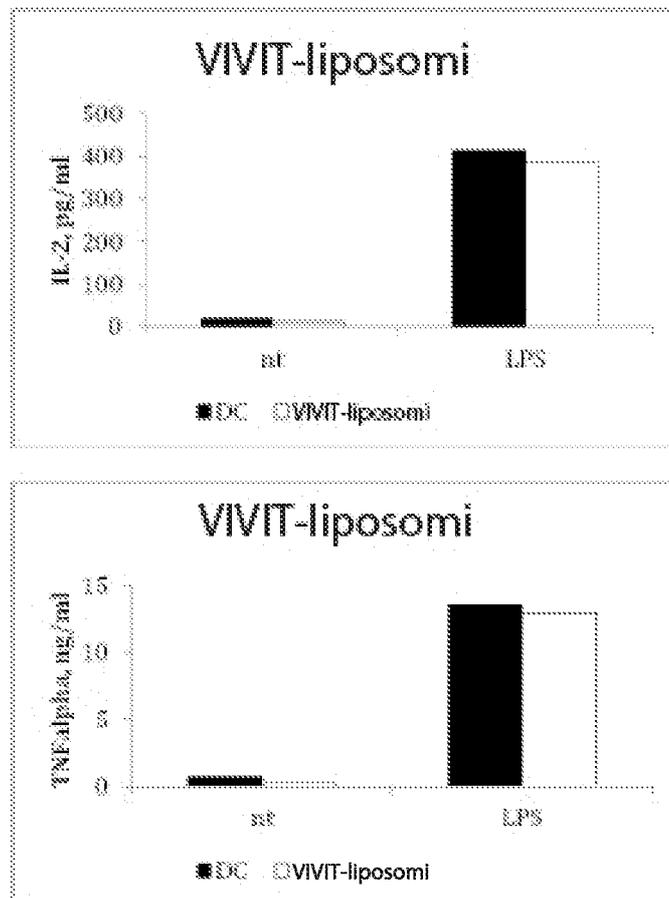


FIGURA 10

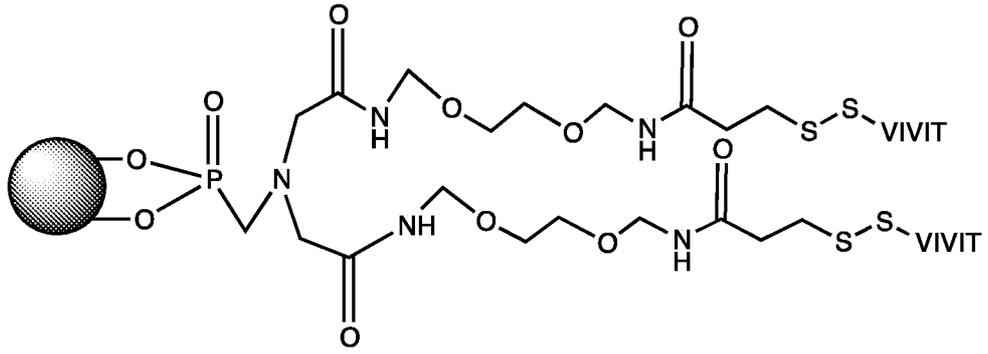


FIGURA 11A

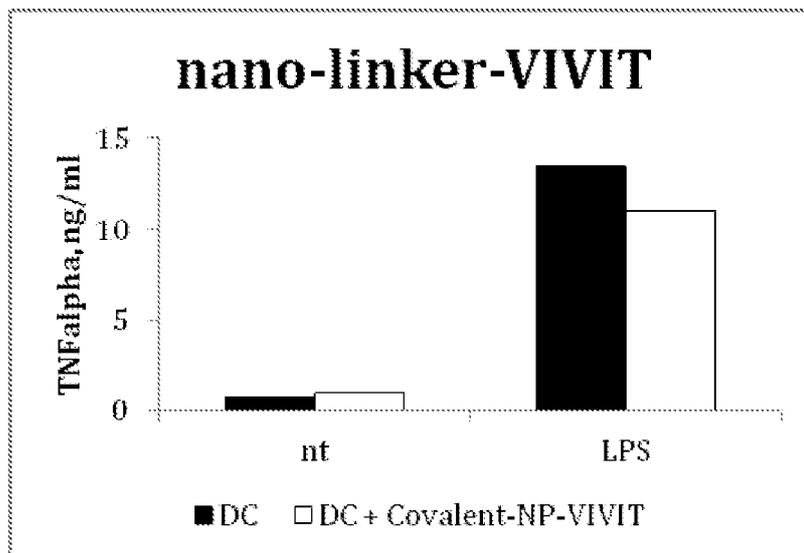
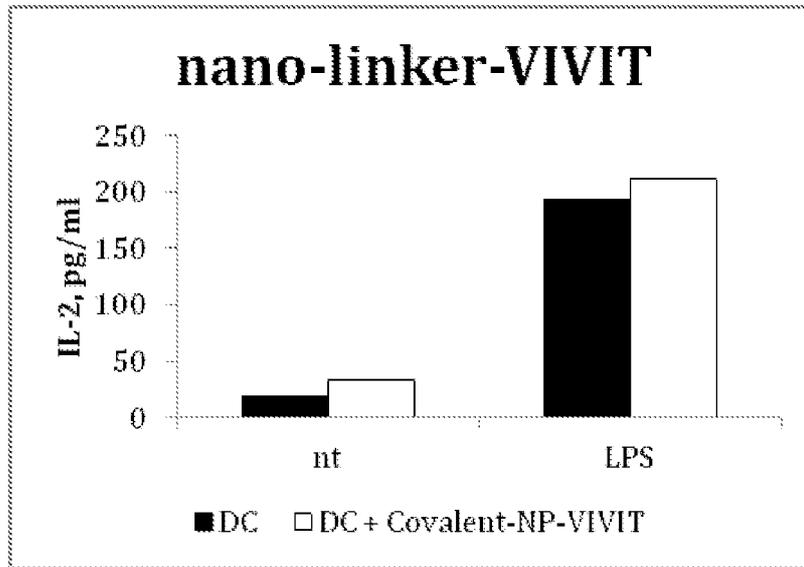


FIGURA 11B

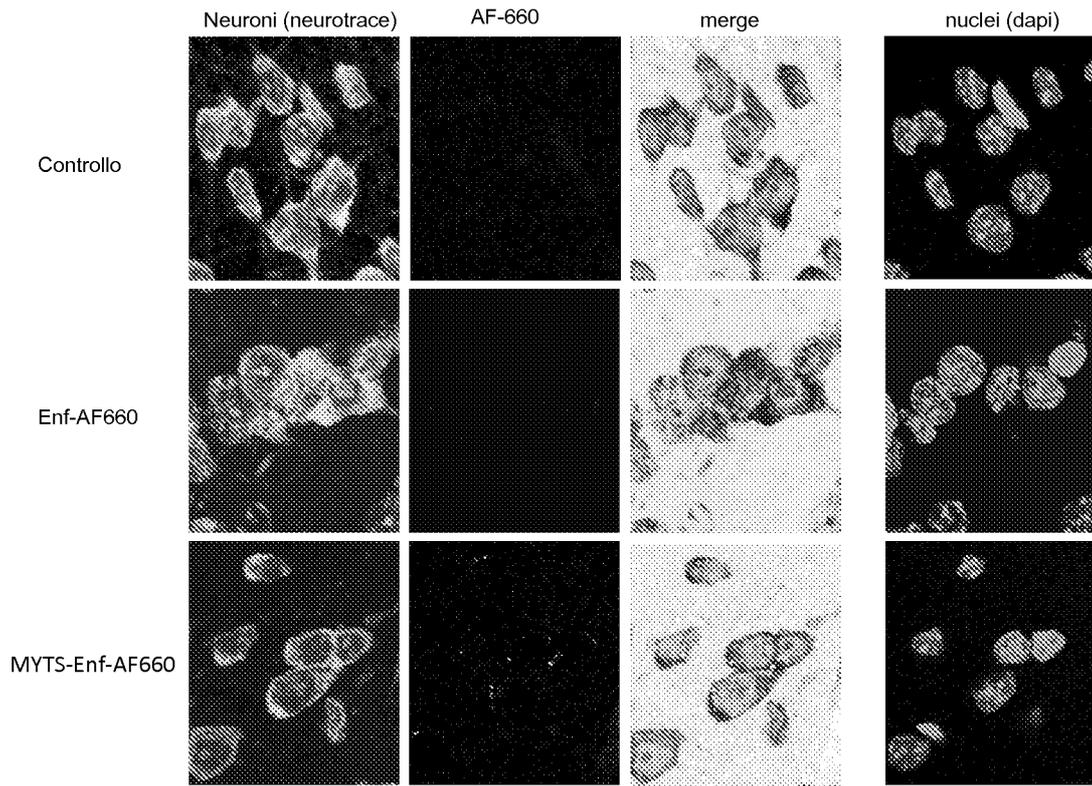


FIGURA 12

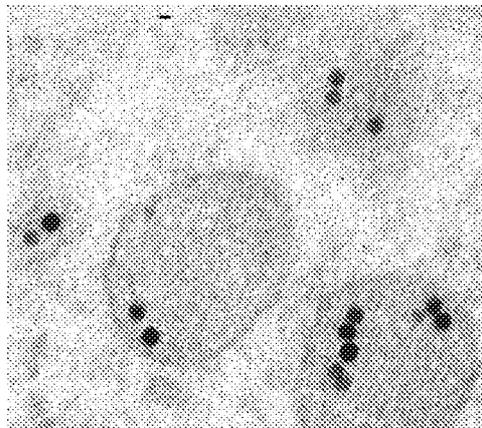


FIGURA 13

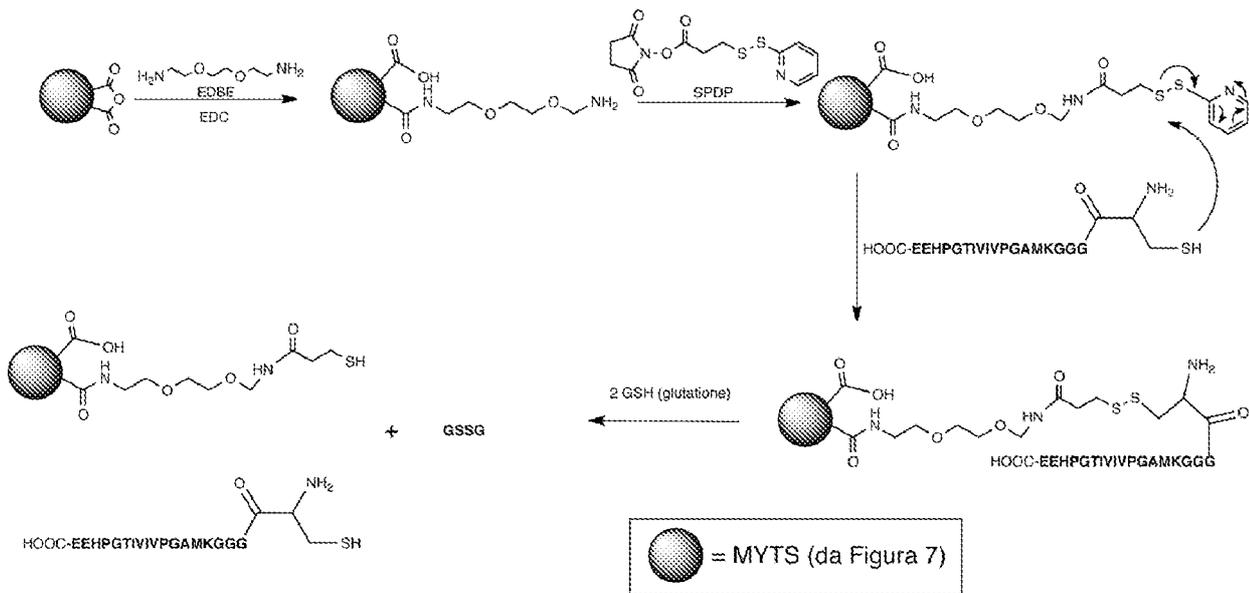


FIGURA 14

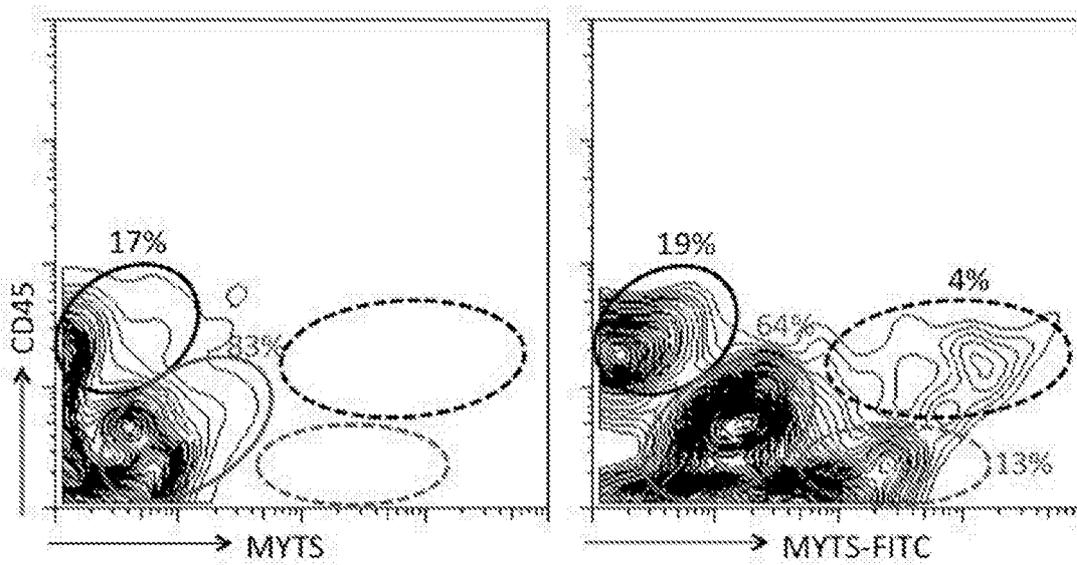


FIGURA 15