



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA NUMERO	102007901547494
Data Deposito	03/08/2007
Data Pubblicazione	03/02/2009

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	F		

Titolo

PREPARAZIONE DI MICRO- O NANOSISTEMI RIVELABILI IN AMBIENTI BIOLOGICI A BASE DI OSSIDI INORGANICI A POROSITA CONTROLLATA PER IL VEICOLAMENTO DI SOSTANZE BIOLOGICAMENTE ATTIVE O ATTIVABILI

Preparazione di micro- o nanosistemi rivelabili in ambienti biologici a base di ossidi inorganici a porosità controllata per il veicolamento di sostanze biologicamente attive o attivabili.

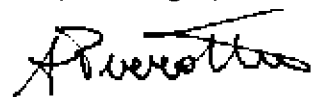
Campo dell'invenzione

La presente invenzione è relativa ad un procedimento per la preparazione di un sistema multifunzionale che impiega un ossido inorganico a porosità controllata che trasporta una specie biologicamente attiva di varia natura (farmaco) o attivabile (profarmaco) e nel contempo supporta sulla superficie esterna una funzione capace di rivelare la presenza del sistema nei fluidi biologici o nelle cellule (tracciante) ed una funzione (targeting) capace di essere riconosciuta da particolari tessuti biologici.

La figura 1 mostra una rappresentazione schematica dell'invenzione.

Background dell'invenzione

In tempi relativamente recenti i ricercatori MOBIL hanno introdotto la famiglia di setacci molecolari mesoporosi denominata m41s. La fase denominata MCM-41 è il membro della famiglia M41S caratterizzato da una disposizione esagonale regolare di mesopori dal diametro uniforme. Essi vengono sintetizzati utilizzando dei tensioattivi cationici come agenti strutturanti (C. T. Kresge, M.E. Leonowicz, W.J. Roth, J. C Vartuli, J. S. Beck, *Nature* ,359, (1992), 710-712; J.S. Beck, J.C. Vartuli, V.J. Roth, M.E. Leonowicz, C.T. Kresge, K.D. Schmitt, C.T.W. Chu, D.H. Olson, E.W. Sheppard, S.B. Mc Cullen, J.B. Higgins and J.L. Schlenker, *J. Am. Chem. Soc.* 114 (1992) 10834). Sono stati ottenuti materiali mesoporosi mediante l'utilizzo di tensioattivi anionici (Q. Huo, D.I. Margolese, U. Cielsa, P. Feng, T.E. Gier, P. Sieger, R. Leon,

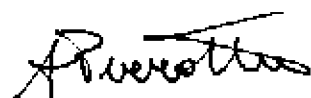


P.M. Petroff, F. Schüth, G.D. Stucky, *Nature*, 1994, 368, 317) e neutri come le alchilamine a catena lunga [P.T. Tanev, T.J. Pinnavaia, *Science*, 1995, 267, 865] e gli ossidi di polietilene [G. Attard, J.C. Glyde, C.G. Göltner, *Nature*, 1995, 378, 366; S.A. Bagshaw, E. Prouzet and T.J. Pinnavaia, *Science*, 1995, 269, 1242; D. Zhao, J. feng, Q. Huo, N. Melosh, G.H. Fredrickson, B.F. Chmelka, G.D. Stucky, *Science*, 1998, 279, 548; D. Zhao, Q. Hou, J. Feng, B.F. Chmelka, G.D. Stucky, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, 120, 6024]. Il diametro dei mesopori può essere variato da approssimativamente 20 a circa 100 Å in dipendenza dal tensioattivo o degli additivi impiegati nella sintesi. Gli alluminosilicati di tipo MCM-41 sono stati considerati sin dalla loro scoperta come la naturale estensione delle zeoliti ed immediatamente si è definito come loro naturale settore di applicazione la catalisi o i processi di separazione di substrati stericamente impediti troppo voluminosi per diffondere negli stretti micropori delle zeoliti. La scoperta delle silici mesoporose ordinate ha aperto però anche la possibilità di nuovi sviluppi ad esempio nella sintesi "host-guest" di materiali nanostrutturati. Siti attivi ad alta definizione sono stati creati per innesto di complessi metallocene su silici mesoporose. Le strategie sintetiche offerte dalla chimica dei processi sol-gel in sinergia con la capacità dei tensioattivi di autoorganizzarsi in mesofasi liquido-cristalline rappresentano un codice modulare che consente di sviluppare materiali innovativi dalle architetture complesse che costituiscono il substrato ideale nella progettazione di un materiale strutturato nanofunzionale. La ibridizzazione di un precursore inorganico consente infatti la progettazione e lo sviluppo di materiali multifunzionali innovativi dalla struttura articolata e dalle molteplici proprietà. Sono stati ottenuti materiali ibridi organici-inorganici legando covalentemente dei gruppi chimicamente attivi alla struttura



inorganica dei materiali mesoporosi mediante innesto post-sintetico oppure mediante condensazione simultanea di reagenti silossanici ed organo-silossanici, questi ultimi provvisti di un legame Si-C non idrolizzabile. La sintesi di materiali mesoporosi idrofobici per rimozione simultanea del tensioattivo strutturante e modificazione della superficie esterna è stata ottenuta trattando del materiale MCM-41 non calcinato con trialchilclorosilani. Recentemente è stata riportata la preparazione di silicati ed alluminosilicati mesoporosi secondo differenti metodi di sintesi e la loro modificazione chimica di superficie. Il volume dei pori tipico dei materiali a porosità regolare attivati può essere utilizzato per immobilizzare ospiti molecolari di struttura o genere anche molto differenti tra loro. Tra le varie applicazioni possibili sembrano essere molto promettenti quelle riguardanti le molecole biologicamente attive con particolare riferimento al rilascio controllato dei farmaci.

Gli enzimi e le proteine possono essere adsorbiti sulla superficie idrossilata di ossidi inorganici attivati o sulle pareti dei pori funzionalizzate dei materiali ibridi a porosità regolare. Le silici mesoporose di tipo MCM-41 sono state studiate nella immobilizzazione di farmaci antiinfiammatori non steroidei provvisti sulla molecola del gruppo funzionale acido carbossilico. Il confinamento nella matrice può essere basato sul fisisorbimento della molecola oppure mediante ancoraggio chimico, ad esempio, sulla superficie della silice opportunamente funzionalizzata. [M. Vallet-Regi, A. Ramila, R.P. Del Real, and J. Perez pariente, *Chem. Mater.*, 2001, (13), 308; G.Cavallaro, P. Pierro F.S. Palumbo, F. Testa, L. Pasqua, R. Aiello *Drug Delivery* 11, 41-46, 2004; B. Munoz, A. Ramila, J. Perez Pariente, I. Diaz, and M. Vallet Regi, *Chem. Mater.*, 2003, 15 500; A. Ramila, B. Munoz, J. Perez Pariente, M. Vallet-Regi, *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 26 (2003) 1199; C. Tourné-Péteihl, D. Brunel, S. Bégu, B.



Chiche, F. Fajula, D.A. Lerner J.M. Devoisselle, *New. J. Chem.*, 27 (2003) 1415]. In quest'ultimo caso [*New. J. Chem.*, 27 (2003) 1415] l'ibuprofen è stato legato covalentemente alla superficie di una silice mesoporosa di tipo MCM-41. Il legame estereo è stato realizzato utilizzando il gruppo carbossilico dell'ibuprofen nell'apertura dell'anello epossidico del 3-glicidossipropilsilano innestato sulla superficie della silice. Un simile sistema basato su un profarmaco implica il vantaggio dovuto all'attivazione enzimatica del rilascio mediante la rottura del legame estereo ad opera delle esterasi in vivo.

Il peptide pentagastrina, un attivatore della secrezione gastrica, è stato introdotto in una silice mesoporosa sintetizzata utilizzando un tensioattivo del tipo Tween-80 per adsorbimento dalla soluzione [C. Tourné-Péteihl, D.A. Lerner, C. Charnay, L. Nicole, S. Bégu, J.M. Devoisselle, *ChemPhysChem*, 3 (2003) 281]. Recentemente è stato messo a punto un sistema per il rilascio controllato di farmaci basato su nanosfere di silice mesoporosa di tipo MCM-41. Sono stati utilizzati dei *caps* chimicamente rimovibili costituiti da nanocristalli di solfuro di cadmio per trattenere diverse tipologie di farmaci e neurotrasmettitori all'interno del framework mesoporoso [C. Lai, B.G. Trewyn, D.M. Jeftinija, K. Jeftinija, S. Xu, S. Jeftinija, V.S. Lin, *J. Am. Chem. Soc.*, 125 (2003) 4451].

L'invenzione e la utilizzazione di materiali e sistemi su scala nanometrica è in via di rapido sviluppo solo da pochi anni. Approcci nanotecnologici rivolti, non solo al rilascio controllato di farmaci ma anche, all'*imaging* molecolare ed agli impieghi come *biomarkers* e biosensori sono stati proposti recentemente. Diverse sperimentazioni riguardano l'utilizzo di materiali a base di silice. Nel 1999 sono stati brevettate delle silici vetrose che incorporano molecole biologiche come sistemi per il rilascio



controllato di farmaci [U.S. Patent, n. 5.874.109, 1999]. Il sistema Therasphere® è un nuovo sistema terapeutico, commercializzato dalla MDS Nordion, utilizzato come radioterapico locale nel carcinoma epatico. E' costituito da microsfele insolubili di vetro parzialmente costituite da un β emettitore da introdurre mediante l'arteria epatica.

Il direccionamento attivo di un farmaco su un particolare tessuto può essere basato sul riconoscimento di un gruppo funzionale che si lega ad una molecola prescelta (target).

L'acido folico può essere impiegato nel direccionamento attivo di un farmaco. I recettori dell'acido folico infatti, costituiscono un utile target nel veicolamento attivo di farmaci antitumorali.

1) Essi sono infatti sovraregolati in molte tipologie di cancro nell'uomo includendo i tumori maligni coloretale, delle ovaie, del cervello, del rene, del seno, dei polmoni e delle cellule mieloidi, consentendo alle cellule neoplastiche, in caso di disponibilità limitata, un approvvigionamento competitivo.

2) L'accesso ai recettori folato nei tessuti normali che lo esprimono viene seriamente limitato dal suo posizionamento sulla faccia esterna della membrana apicale dell'epitelio polarizzato.

3) La densità dei recettori folato sembra aumentare con l'avanzamento della malattia. Sebbene il meccanismo del trasporto dell'acido folico nelle cellule da parte del recettore folato non sia conosciuto con precisione risulta evidente che i coniugati del folato sono assunti dalle cellule dei mammiferi attraverso un processo di endocitosi mediato dai recettori. I meccanismi di endocitosi riguardano particelle di dimensione limite vicine ai 100 nm. Successivamente alla coniugazione al recettore folato sulla

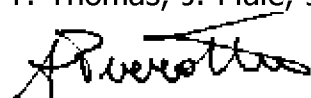


superficie della cellula tumorale, i coniugati del folato indipendentemente dalle dimensioni sono internalizzati e condotti ai compartimenti intracellulari chiamati endosomi. Gli endosomi contenenti i coniugati del folato presentano valori di pH intorno a 5 a causa di un processo chiamato acidificazione degli endosomi che è responsabile della dissociazione del coniugato dai recettori [Y. Lu, P.S.Low, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 54 (2002) 675]

Il targeting sui recettori del folato può essere impiegato per il rilascio intracellulare di agenti terapeutici macromolecolari [K.Kono, M.Liu, J.M.J. Frechèt, *Bioconjugate Chem.*, 1999, 10, 1115] ma anche farmaci che non richiedono rilascio intracellulare possono essere veicolati ai tessuti neoplastici. Pertanto i tumori di difficile trattamento terapeutico secondo i metodi classici possono essere raggiunti specificamente utilizzando dei coniugati agente terapeutico-acido folico.

Allo scopo di sfruttare la peculiarità della sovraespressione dei recettori dell'acido folico quest'ultimo è stato coniugato sia a farmaci a basso peso molecolare che a complessi macromolecolari come mezzo di direccionamento delle molecole legate alle cellule neoplastiche. Sono stati preparati dei sistemi basati su polietere recanti residui folato sulla superficie esterna come modelli di trasportatori attivi di farmaci con potenziale specificità nei confronti delle cellule tumorali [K.Kono, M.Liu, J.M.J. Frechèt, *Bioconjugate Chem.*, 1999, 10, 1115].

Un nanosistema per il rilascio di farmaci che consente un rilascio intracellulare ed allo stesso tempo è provvisto di proprietà di imaging è stato ottenuto legando covalentemente l'acido folico, la fluorescina ed il metotressato alla superficie del nucleo etilendiamminico di un dendrimero a base di poliammidoammina [A. Quintana, E. Raczka, L. Piehler, I. Lee, A. Myc, I. Mayoros, A.K. Patri, T. Thomas, J. Mulè, J.R.



Baker Jr, *Pharm. Res.* 19 (2002) 1310]. Recentemente sono stati preparati e caratterizzati coniugati folato-ciclodestrina [P. Caliceti, S. Salmaso, A. Semenzato, T. Carofiglio, R. Fornasier, M. Fermeiglia, M. Ferrone, and S. Pricl, *Bioconjugate Chem.*, 2003, 14, 899]. La coniugazione dell'acido folico alle macromolecole ha prodotto sistemi che in quasi tutte le situazioni d'impiego hanno mostrato di rilasciare il farmaco in vitro sulle cellule tumorali che esprimono i recettori dell'acido folico. Il targeting macromolecolare mediato dall'acido folico ha comunque prodotto in vivo soltanto risultati parziali a causa dei problemi connessi con la penetrazione dei tumori solidi da parte delle macromolecole. Tuttavia esistono esempi in cui il veicolamento a mezzo del folato ha significativamente migliorato i risultati di una terapia basata su vettori macromolecolari, portando in molti casi ad una guarigione definitiva.

Sono state sintetizzate delle nanoparticelle di silice mesoporosa utilizzando nanoparticelle di oro come temprante successivamente rimosse usando cianuro di sodio. Esse sono state usate successivamente come carriers di farmaci nello studio del rilascio di fluoresceina isotiocianato (FITC), usato come modello in vitro (Liu Y., Miyoshi H., Nakamura M., (*Colloids Surf B Biointerfaces*. 2007 Mar 12; 17420116)

-E' stato preparato un nuovo vettore composto da nanoparticelle di silice mesoporosa coniugate con FITC. Esso è stato studiato nella internalizzazione cellulare utilizzando cellule staminali mesenchimali di midollo osseo umano e cellule 3T3-L1 ai fini di valutarne le potenzialità nella rivelazione della distribuzione delle cellule staminali che è fondamentale per il loro uso terapeutico (*The FASEB Journal Express Article* doi:10.1096/fj.05-4288fje Published online October 17, 2005)



-Nel documento FR 2794115 un sol di silice costituito da nanoparticelle di dimensione media tra 3 e 50 nm è stato trattato in superficie mediante innesto o adsorbimento di una molecola organica o mediante doping utilizzando almeno una sostanza dopante. Dette particelle sono state monodisperse in fase liquida e sono presenti in concentrazione maggiore o uguale del 10 % .

-Nel documento USP 6548264 è rivendicato un nuovo metodo per preparare nanoparticelle il cui core è avvolto in un guscio di silice. Le nanoparticelle vengono preparate per precipitazione da reagenti dissolti nel compartimento acquoso di una emulsione acqua-in-olio. Un silicato reattivo viene aggiunto per rivestire di silice il core delle nanoemulsioni. Le particelle rivestite di silice sono inoltre funzionalizzate secondo diversi metodi allo scopo di essere impiegate, ad esempio, come dye-doped particles, particelle metalliche, particelle di semiconduttori, particelle magnetiche e particelle contenenti molecole di farmaco.

Il core delle nanoparticelle che hanno un diametro medio inferiore al micron e preferibilmente compreso tra 1 e 100 nm oppure tra 2 e 10 nm può essere magnetico ed includere un metallo scelto nel gruppo costituito da magnetite, maegmite e grigite. In altri casi il core può includere un pigmento che può essere il permanganato di potassio, il dicromato di potassio, il solfato di nichel il cloruro di cobalto, il cloruro di ferro (III) ed il nitrato di rame. Allo stesso modo può includere un dye come il Ru/Bpy, Eu/Bpy e simili o un metallo come Ag o Cd. Il guscio di silice che riveste le nanoparticelle può essere derivatizzato con un gruppo funzionale come una proteina (ad es. un anticorpo); un acido nucleico (ad es. un oligonucleotide); biotina o streptavidina. Dunque il metodo proposto dall'invenzione può essere usato per produrre nanoparticelle rivestite di silice derivatizzate con proteine che



contengano un metallo come la magnetite, maegmite o grigite. In un'altra accezione l'invenzione costituisce un metodo di identificazione di cellule che esprimano una molecola particolare. In questo caso una pluralità di cellule tra cui almeno una parte di esse esprimano la molecola particolare è miscelata con una pluralità di nanoparticelle rivestite di silice in condizioni tali che alle nanoparticelle è consentito di legare specificamente le cellule che esprimono la determinata molecola. Il gruppo funzionale può essere un anticorpo che lega specificamente la molecola prescelta. In un'altra variazione le particelle rivestite di silice sono fluorescenti. La nanoparticella è solida preferibilmente priva di pori ma per alcune applicazioni può anche essere resa porosa degradando il rivestimento della nanoparticella con un agente corrosivo ed eventualmente ricostituendolo con la silice. In generale le forme solide sono da preferirsi se è necessario isolare le forme solide dall'ambiente esterno mentre quelle porose sono da preferirsi quando è necessario aumentare l'area superficiale del rivestimento in contatto con l'ambiente esterno. Il core può essere composto da qualunque sostanza compatibile con il rivestimento allo scopo di soddisfare ai particolari requisiti di applicazione della particella. Ad esempio laddove la particella debba essere magnetica il core è costituito di un metallo magnetico e le particelle possono essere impiegate in applicazioni quali la separazione/purificazione di cellule, l'imaging diagnostico. Il core può essere anche composto da una miscela di differenti sostanze. Ad esempio laddove sia richiesto produrre una particella magnetica e dye-doped il core può essere costituito sia da un metallo magnetico che da un sale inorganico utile come pigmento. Il core può avere dimensioni qualsiasi a patto che esse siano inferiori a quelle della nanoparticella desiderata. Per determinate applicazioni il core deve preferibilmente avere un diametro compreso tra 1 e circa



200 nm. Ad esempio, poiché le particelle di dimensioni inferiori a 100 nm possono essere escluse dagli animali mentre quelle di diametro superiore sono trattenute soprattutto nel fegato e nella milza, laddove siano preferite applicazioni diagnostiche e terapeutiche e sia desiderato che le particelle non siano trattenute nel soggetto il core deve essere sufficientemente piccolo da poter essere racchiuso in una particella di dimensioni inferiori ai 100 nm. Il rivestimento può essere costituito da un polimero (ad esempio polistirene, polietilene, polivinilcloruro, polimeri acrilici), un polisaccaride come il destano, un ossido inorganico come l'allumina o la silice o miscele delle stesse. La silice è preferita in molte applicazioni poiché essa è relativamente inerte in molti ambienti, è biocompatibile, previene l'agglomerazione con altre nanoparticelle in una dispersione e può essere prontamente derivatizzata con molti gruppi funzionali. Il rivestimento può essere costituito da uno strato che riveste il core ad esempio di silice ed uno che riveste il primo strato. Il secondo può essere ad esempio composto da un materiale biodegradabile ad esempio uno zucchero o un polimero, impregnato di un farmaco. Se introdotti in un organismo animale il materiale biodegradabile può essere dissolto ed il farmaco diffondere gradualmente. Il rivestimento può essere composto da 3, 4, 5 o più strati separati. I gruppi funzionali possono essere derivatizzati sul rivestimento. Essi possono essere una qualunque funzione chimica o biologica che possa essere attaccata alla nanoparticella attraverso il rivestimento ad esempio, una o più proteine come gli anticorpi (monoclonali, policlonali, enzimi, biotina, streptavidina molecole di acidi nucleici, chemosensori, come sonde fluorescenti e gruppi biochimici come ammine e carbossilati.

Il documento USP 6548264 descrive un sistema non basato su un ossido a porosità ordinata ma una tipologia generale di nanoparticelle costituita da un guscio di silice o



altro materiale che racchiude un core di varia natura e composizione. La porosità è eventualmente ricavata nel guscio con metodi chimici. Laddove sul guscio sia prevista la funzionalizzazione essa è finalizzata all'interazione specifica basata sul riconoscimento di una specie particolare in una miscela ed alla separazione. Laddove i sistemi siano impregnati di un farmaco, essi lo rilasciano in seguito all'erosione di un ulteriore strato erodibile creato sul guscio eventualmente precedentemente reso poroso.

- Il documento US 6319715 rivendica una metodologia per implementare il rilascio di molecole di acido nucleico alle cellule in vitro mediante la formazione di un complesso acido nucleico-agente transfettante-nanoparticella. Il metodo prevede l'incubazione di nanoparticelle di silice con l'acido nucleico. I complessi nanoparticelle-acido nucleico sono lasciati sedimentare sulle cellule. Il rilascio del materiale genetico sulle cellule è effettuato mediante agenti di transfezione standard. Il requisito essenziale delle nanoparticelle è che esse siano prive di tossicità cioè biocompatibili, che siano capaci di associarsi reversibilmente con gli acidi nucleici o i complessi degli acidi nucleici e che sedimentino in mezzo acquoso così da aumentare la concentrazione degli acidi nucleici alla superficie delle cellule. E' preferibile che esse non si aggregino cioè che siano per lo più monodisperse.

Il documento US6319715 non prevede però l'impiego di ossidi inorganici a porosità regolare di elevato volume poroso ove possa essere introdotta la specie terapeutica. Inoltre il documento citato descrive un rilascio passivo ove la prossimità tra particelle e cellule sia indotta da un processo di sedimentazione senza l'impiego di alcuna funzione direzionante.



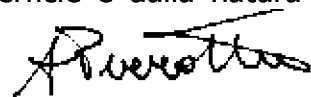
- Il documento US 2003/203206 descrive una metodologia di preparazione di silici mesoporosi esagonali capaci di un rilascio controllato di una sostanza incorporata all'interno di essa. Essa è provvista all'apertura dei pori di un gruppo funzionale organico foto-dimerizzabile a chiudere l'ingresso degli stessi. La sostanza attiva incorporata può essere rilasciata ove e quando necessario in seguito a sdoppiamento fotoindotto del dimero.

Il documento US 2003/203206 descrive dunque un sistema per il trasporto di sostanze biologicamente attive in una matrice di silice mesoporosa provvista di un sistema per il controllo della diffusione delle stesse sostanze ma non in grado di veicolarsi su particolari tessuti attraverso un meccanismo di riconoscimento.

- Il documento WO01/12846 è relativo ad un metodo per la preparazione di supporti caricati con biomolecole costituito dalle fasi di a)attivazione della superficie del supporto per mezzo di un silano includente un gruppo amminico;
b) caricamento della superficie attivata del supporto con biomolecole c)trattamento del supporto caricato con una soluzione acida, basica o neutra.

Il metodo può, ad esempio essere utilizzato nella preparazione di sonde analitiche in serie. In questo metodo i gruppi amminici presenti successivamente al caricamento della biomolecola che potrebbero generare interazioni indesiderate nel mezzo in cui il supporto carico è utilizzato, sono rimosse selettivamente dalla superficie senza compromissione della parte carica della superficie. In qualunque situazione in cui dei gruppi amminici liberi devono essere rimossi selettivamente dalla superficie dell'ossido metallico carico di biomolecole è applicabile il metodo della invenzione.

Il valore di pH della soluzione, con cui il supporto carico può essere trattato, dipende sostanzialmente dal tipo di biomolecola attaccata alla superficie e dalla natura del



legame (covalente o adsorbimento). I supporti preparati secondo il metodo dell'invenzione sono molto utili a scopi diagnostici per esempio nelle sonde analitiche. Per esempio sono molto adatte a questo scopo le serie o microserie prive di gruppi amminici liberi. Le serie possono comprendere differenti biomolecole in differenti punti consentendo la rivelazione di analiti multipli. Generalmente un analita è una sostanza, normalmente una biomolecola, che può essere rivelata a causa della sua capacità di interagire specificamente con un dato reagente. Un campione che comprende un analita è posto a contatto con un supporto carico preparato secondo il metodo descritto nell'invenzione. L'analita è lasciato reagire con la biomolecola che è attaccata alla superficie del supporto. L'avvenuta interazione può essere seguita mediante un mezzo di rivelazione.

Il documento WO 01/12846 descrive un sistema basato su una superficie ove siano innestate o adsorbite biomolecole o differenti tipi di biomolecole in differenti "spots" in grado di riconoscere altre specie in una miscela, inoltre non prevede trasporto di alcun agente terapeutico ed il riconoscimento è finalizzato alla rivelazione.

Il brevetto italiano CS2005A00003 descrive un sistema realizzato a partire da ossidi inorganici a porosità regolare. Il controllo della porosità si effettua in fase di sintesi mediante l'impiego di un qualunque tensioattivo o secondo un meccanismo di imprinting" molecolare. Gli ossidi possono essere provvisti di una o più funzioni introdotte direttamente durante la sintesi del materiale o mediante una procedura di grafting post-sintetico. Le funzioni introdotte sono utilizzabili per l'ancoraggio di molecole o particelle di varia natura e dimensioni sulla superficie esterna del



materiale mesoporoso. Tale molecola o particella, genericamente indicate come **funzione targeting** è deputata al riconoscimento molecolare e a tale scopo possono essere impiegate molecole biologicamente attive o implicate in meccanismi di riconoscimento cellulare, peptidi o di anticorpi. La funzionalizzazione che impiega la funzione targeting è indirizzata alla sola superficie esterna utilizzando il materiale tal quale non ancora sottoposto a processi estrattivi che renderebbero accessibile ai reagenti la regione interna dei pori. I pori vengono infatti resi disponibili per estrazione dopo l'ancoraggio della funzione targeting ed il volume poroso ottenuto dopo i processi estrattivi è utilizzabile per il drug-loading ed il trasporto di sostanze biologicamente attive o attivabili da rilasciare nel sito di interesse. Possono in principio essere trasportati molecole, atomi, ioni di genere e dimensioni molto varie quali farmaci antitumorali, antinfiammatori, ormoni, peptidi, frammenti di DNA . Con l'espressione biologicamente attivabile è da intendersi un qualunque tipo di profarmaco.

Descrizione dell'invenzione

L'invenzione è stata realizzata a partire da ossidi inorganici a porosità regolare. Il controllo della porosità si effettua in fase di sintesi mediante l'impiego di un qualunque tensioattivo o secondo un meccanismo di "imprinting" molecolare. Gli ossidi possono essere provvisti di una o più funzioni introdotte direttamente durante la sintesi del materiale o mediante una procedura di grafting post-sintetico. Le funzioni introdotte sono utilizzabili per l'ancoraggio di molecole o particelle di varia natura e dimensioni sulla superficie esterna del materiale mesoporoso. Tale molecola o particella sarà genericamente indicate come **funzione tracciante** e/o **funzione**



targeting nel presente documento laddove non specificato se essa sarà deputata al riconoscimento molecolare nel primo caso ed alla rivelazione del sistema nel fluido biologico. Tra le possibili coniugazioni della superficie esterna, la funzione tracciante sarà una specie ancorata che avrà la funzione di rivelare la presenza del sistema nei fluidi per la funzione targeting sarà previsto l'impiego di molecole biologicamente attive o implicate in meccanismi di riconoscimento cellulare, peptidi o di anticorpi. La funzionalizzazione che impiega la funzione **funzione tracciante** e/o **funzione targeting** è indirizzata alla sola superficie esterna utilizzando il materiale tal quale non ancora sottoposto a processi estrattivi che renderebbero accessibile ai reagenti la regione interna dei pori.

L'introduzione della funzione avviene in via preliminare anteriormente alla rimozione del tensioattivo dai pori ed alla immobilizzazione della sostanza attiva.

L'ancoraggio della funzione **funzione tracciante** e/o **funzione targeting** limita drasticamente le condizioni operative applicabili successivamente per la rimozione del tensioattivo. Esse devono essere infatti compatibili con la stabilità chimica e/o l'attività biologica dei gruppi introdotti. Il volume poroso reso disponibile dai processi estrattivi è utilizzabile per il drug-loading ed il trasporto di sostanze biologicamente attive o attivabili da rilasciare nel sito di interesse. Possono in principio essere trasportati molecole, atomi, ioni di genere e dimensioni molto varie quali farmaci antitumorali, antinfiammatori, ormoni, peptidi, frammenti di DNA . Con l'espressione biologicamente attivabile è da intendersi un qualunque tipo di profarmaco. La molecola, atomo, ione o materiale sarà genericamente indicata con la parola **sostanza attiva** laddove non specificato nel presente documento.



In definitiva i sistemi sviluppati nel presente documento differiscono da quelli presentati nel Brevetto Italiano CS2005A00003 perché in questo caso i sistemi presentati precedentemente vengono completati con l'introduzione della funzione tracciante in presenza o in assenza della funzione targeting.

L'approccio alla sintesi, funzionalizzazione e *drug-loading* dei nano- e microsistemi modulari è del tutto innovativo e le condizioni operative da scegliere sono da valutare sulla base dello specifico problema in esame.

A titolo di esempio sono sviluppate delle considerazioni generali che possono servire da linee guida operative e di programmazione nello sviluppo di un micro- o nanosistema modulare.

- 1) La molecola targeting è legata alla funzione chimica mediante legame covalente o ionico.
- 2) La specie con attività di tracciante è legata alla funzione chimica mediante legame covalente o ionico.
- 3) L'inclusione del farmaco è realizzata per adsorbimento nei pori del materiale. Oppure il farmaco viene ancorato covalentemente alla silice per mezzo di una opportuna derivatizzazione.
- 4) Il sistema deve presentare un'elevata affinità per l'adsorbimento delle molecole ospiti.
- 5) Il rilascio può essere diffusivo a lento profilo o modulato da variazioni di pH in ambienti nei quali il pH è differente dal mezzo di somministrazione del sistema.



6) Le funzioni chimiche sono ottenute utilizzando reagenti di tipo aminopropil trietossisilano o ogni alcossido di silicio parzialmente idrolizzabile. Essi sono presenti soprattutto sulla superficie esterna della silice per motivi di ingombro sterico ma anche all'interno dei pori. Infatti nel caso di materiali ottenuti secondo il metodo di funzionalizzazione post-sintesi, benchè la modificazione sia condotta su materiali con i pori pieni, la silice ibrida raggiunge le pareti interne per migrazione del reagente attraverso le micelle e successiva condensazione sulle pareti di silice.

6) La procedura di estrazione del tensioattivo dai pori successiva alla funzionalizzazione della superficie esterna deve essere compatibile col mantenimento dell'attività biologica della funzione targeting e con l'attività della funzione tracciante prescelta. Essa può essere condotta in acqua a temperatura ambiente o di poco superiore oppure in un solvente non lesivo della funzione tracciante e/o della funzione targeting oppure in un estrattore soxleth a temperatura moderata. Il drug-loading è possibile anche in presenza parziale o totale del tensioattivo, potendo fungere esso stesso da mezzo disperdente e veicolante. La scelta degli elementi che costituiscono un sistema modulare, matrice, funzionalizzazione, funzione tracciante, funzione targeting, farmaco, rientra nella fase di progettazione del sistema, ed è basata su considerazioni di ordine farmacologico, biologico, chimico-fisico. Nella stessa fase di progettazione rientrano la conoscenza delle cinetiche di adsorbimento del farmaco nel sistema dal solvente scelto per il drug-loading e di rilascio del farmaco dal sistema nel fluido di somministrazione, nei fluidi attraversati e nel fluido di rilascio.

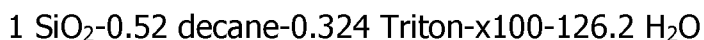
PARTE SPERIMENTALE



Esempi di sintesi di ossidi a porosità regolare semplici o funzionalizzati.

Procedura A) Sintesi di un composito silico-micellare.

Viene utilizzato il tensioattivo Triton X100 e tetraetilortosilicato (Aldrich). Il materiale è stato preparato da una miscela di sintesi della seguente composizione molare:



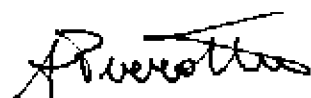
La fase organica in cui è dissolto il TEOS viene lentamente aggiunta alla soluzione del tensioattivo in acqua. Il sistema è invecchiato a temperatura ambiente per 8 giorni sotto lenta agitazione. Successivamente la fase organica viene rimossa e la sospensione risultante filtrata, lavata e seccata a 80°C.

Procedura B) Sintesi di una 3-amminopropil silice mesoporosa; Funzionalizzazione post-sintetica della silice mesoporosa ottenuta dalla procedura A

3g di silice mesoporosa ottenuta secondo la procedura A preventivamente attivata per 2h in stufa a 120°C sono sospesi in 25 ml di toluene anidro. Sono successivamente aggiunti 5ml di APTES e la sospensione è posta a rifluire per 7h. Il solido viene successivamente filtrato e lavato con tetraidrofurano.

Procedura C) Sintesi di una 3-amminopropilsilice mesoporosa fluorescente.

1,42 g di APTES (0,0064 moli) e 0.004 g (0.0103 mmoli) g di fluoresceina isotiocianato (FITC) vengono agitati in etanolo (3 ml) a temperatura ambiente per 24 ore. Quindi alla soluzione viene aggiunta una sospensione ottenuta miscelando 700



mg di silice mesoporosa A in 2,5 ml di etanolo. La miscela viene agitata per due giorni a temperatura ambiente.

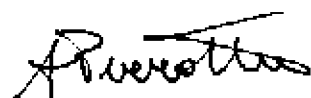
Procedura D) Sintesi di una 3-amminopropilsilice mesoporosa fluorescente.

0.004 (0.0103 mmoli) g di fluoresceina isotiocianato (FITC) sono stati introdotti in una sospensione ottenuta miscelando 700 mg di silice mesoporosa ammino-propilica (B) in 5,5 ml di etanolo. La miscela è stata agitata per due giorni a temperatura ambiente.

Esempio di ancoraggio dell'acido folico alla amminopropilsilice mesoporosa ed alla APS-FITC.

Procedura E) A 15 ml di dimetilsolfossido sono aggiunti 0,25 ml di trietilammina e 0,5 g di acido folico. A dissoluzione completata si aggiungono 3 ml di nitrometano e 3,6 g di amminopropilsilice mesoporosa fluorescente o no ottenuta secondo la procedura B, C oppure D preventivamente attivato in stufa a 110 °C per 2h. Infine si aggiungono 2,27 mmoli di diisopropilcarbodiimmide oppure dicicloesilcarbodiimmide. La miscela è posta in condizioni di agitazione moderata per 120h in assenza di luce.

Procedura F) A 15 ml di dimetilsolfossido sono aggiunti 0,25 ml di trietilammina e 0,5 g di acido folico. A dissoluzione completata si aggiungono 3 ml di nitrometano e 3,6 g di amminopropilsilice mesoporosa ottenuta secondo la procedura B, C, oppure D preventivamente attivato in stufa a 110 °C per 2h. La miscela è posta in condizioni di agitazione moderata per 120h in assenza di luce.



RISULTATI

Le microsfere di silice mesoporosa sono state ottenute da emulsioni bifasiche secondo una metodologia di sintesi riportata recentemente (L. Pasqua, F. Testa, R. Aiello, *Stud. Surf. Sci. Catal.* 158, 2005, 557). In questo caso è stato utilizzato il decano come fase organica. La procedura di sintesi è finalizzata a produrre particelle di silice mesoporosa con diametro e morfologia controllate, un importante parametro nel campo del targeting di farmaci in relazione alla sospensibilità del materiale in acqua e nei fluidi biologici. Il materiale risultante è stato ibridizzato per produrre sistemi potenzialmente utili per il targeting di farmaci. A questo scopo sono stati introdotti sulla silice dei gruppi amminopropilici liberi ed un tracciante di fluorescenza ottenuto per coniugazione dell'amminopropiltrietossilano con la fluoresceina isotiocianato prima dell'estrazione del tensioattivo. La funzionalizzazione della silice mesoporosa è stata completata con l'ancoraggio covalente dell'acido folico un ligando recettore-specifico capace di essere riconosciuto da tessuti specifici.

La figura 2 mostra il diffrattogramma di raggi X su polveri del materiale mesoporoso tal quale ottenuto dal sistema bifasico decano-acqua. Il materiale tal quale mostra la struttura mesoporosa bimodale attesa

I dati ottenuti dalla diffrazione di raggi X su polveri del materiale tal quale evidenziano che le proprietà della regione interfacciale influenzano la chimica del tensioattivo. La presenza di due picchi nel diffrattogramma di raggi X mostra che durante l'assemblaggio del materiale si formano micelle di diametro differente. Il diffrattogramma del materiale calcinato (non mostrato) evidenzia la presenza di due elementi riflettenti principali. Una certa coesistenza di due sistemi templanti costituiti



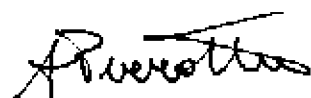
da micelle con diametro differente è in accordo con l'isoterma di adsorbimento-desorbimento del materiale calcinato che è un'isoterma di tipo IV reversibile. Questa presenta un tratto di adsorbimento di azoto che corrisponde a condensazione capillare anche a pressioni relative più alte dove può essere osservata un'isteresi (See Fig.3b). La formazione di micelle di diametro eterogeneo può essere spiegata in termini di inclusione di solvente nel core idrofobico delle micelle. Il materiale calcinato ha una superficie specifica (BET) di $924 \text{ m}^2/\text{g}$, un volume poroso a $P/P_0=0.9$ of $0.53 \text{ cm}^3/\text{g}$ ed una perdita di massa totale intorno al 50%.

La micrografia SEM del materiale MSM (Figura 1b) mostra che sono state ottenute sfere regolari di circa 1 micron di diametro.

Le microsfeere di silice mesoporosa sono state modificate sulla superficie esterna, prima dell'estrazione del tensioattivo, allo scopo di fornire alle particelle una funzione tracciante in grado di rivelarne la presenza così da poterne seguire l'interazione con le cellule tumorali valutandone preliminarmente le potenzialità d'impiego nel rilascio localizzato di farmaci.

L'isotiocianato di fluoresceina isomero I, usato come marcatore di fluorescenza, è stato legato covalentemente in etanolo all'amminopropiltrietossisilano (APTES). L'alcolossido di silicio fluorescente è stato successivamente innestato a temperatura ambiente alla superficie esterna delle microsfeere di silice mesoporosa usando il materiale prima dell'estrazione del tensioattivo per produrre il materiale FITC-MSM.

L'acido folico, un legando recettore-specifico, capace di essere riconosciuto da tessuti specifici è stato successivamente legato ai gruppi amminici liberi della silice FITC-MSM in DMSO utilizzando la diisopropilcarbodiimmide come agente condensante per produrre il materiale FOL-FITC-MSM. Il materiale FOL-FITC-MSM è stato



caratterizzato per diffrazione di raggi X su polveri ed adsorbimento desorbimento di azoto. La diffrazione di raggi X su polveri dei materiali FITC-MSM e FOL-FITC-MSM (non mostrata) mostra una riflessione singola a basso ordine che evidenzia una riorganizzazione della silice durante la condensazione del FITC e la sospensione in etanolo. Entrambi i campioni mostrano un diffrattogramma a riflessione singola e l'intensità della riflessione decresce ulteriormente dopo l'ancoraggio dell'acido folico.

La figura 3 (a, b e c) mostra gli spettri DRFT-IR del materiale MSM tal quale, materials, del materiale FITC-MSM e FOL-FITC-MSM. Il primo presenta un contributo del tensioattivo molto importante nella regione intorno a 2900 cm^{-1} mentre il secondo presenta vibrazioni nella regione $1020\text{-}1560\text{ cm}^{-1}$, come atteso per i derivati della tiourea, ma mostra vibrazioni dovute al tensioattivo di ridotta intensità probabilmente a causa della prolungata esposizione ad etanolo durante la funzionalizzazione col FITC. Tale esposizione probabilmente rimuove parzialmente il tensioattivo come conferma, peraltro, l'analisi termogravimetrica che mostra una diminuzione della perdita totale che si riduce dal 48,62% per il campione MSM al 25,8% nel caso del corrispondente materiale. Lo spettro DRIFT del materiale FOL-FITC-MSM (Figura 2 c) mostra le vibrazioni tipiche dell'acido folico.

Gli spettri ^{29}Si - e ^{13}C -NMR (not shown) dimostrano senza ambiguità la variazione del supporto e l'adsorbimento delle molecole organiche. Il materiale mesoporoso iniziale è caratterizzato da tre ^{29}Si -NMR line; la linea a -110 ppm dovuta ai gruppi $\text{Si}(\text{OSi})_4$, la linea a -101 ppm dovuta ai gruppi SiOH , mentre quella a -91 ppm dovuta ai gruppi $\text{Si}(\text{OH})_2$. L'innesto dei gruppi amminopropilici è mostrato dallo spettro ^{13}C -NMR. Infatti i chemical shifts a 10.4, 26.2 e 43.1 ppm sono dovuti agli atomi di carbonio Si-CH_2 -, $-\text{CH}_2$ - e $-\text{CH}_2\text{-NH}_2$ rispettivamente. Il legame covalente tra l'acido

folico ed il gruppo amminopropilico è stato dimostrato in una pubblicazione precedente (L. Pasqua, F. Testa, R. Aiello, S. Cundari, J. B. Nagy, *Microporous and Mesoporous Materials* 103, 2007, 166). La figura 4a mostra l'isoterma di adsorbimento-desorbimento di azoto del materiale FOL-FITC-MSM dopo l'estrazione con solvente. La curva è una isoterma non reversibile di tipo IV con un'ampia isteresi compresa tra il punto di chiusura dell'isteresi per l'azoto e la pressione relativa di 0.8.

Il diametro medio dei pori è considerevolmente aumentato se confrontato con l'isoterma del materiale calcinato MSM (Figure 4b).

I trattamenti chimici effettuati sul materiale durante gli ancoraggi del FITC, dell'acido folico e le estrazioni del tensioattivo probabilmente hanno indotto un parziale collasso della struttura che ha prodotto mesopori più larghi.

Le sospensioni di FITC-MSM e FOL-FITC-MSM in acqua rimangono stabili per mesi.

La procedura di sintesi A consente di ottenere dei materiali mesoporosi ordinati che una volta attivati possiedono una superficie specifica intorno ai $1000 \text{ m}^2/\text{g}$ e di notevole volume poroso. La funzionalizzazione post-sintesi viene effettuata sul composito silico-micellare, non sottoposto alla rimozione del tensioattivo in modo da indirizzare la modifica sulla superficie esterna delle particelle. Il reagente funzionalizzante può migrare attraverso la micella e condensare sulle pareti interne dei pori come già dimostrato in letteratura per alcuni tipi di silici mesoporose.

RIVENDICAZIONI

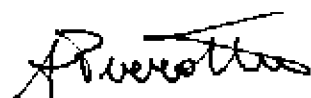
1) Micro- o nanosistema per il trasporto attivo di molecole, atomi o ioni aventi un effetto biologico sull'organismo umano/animale oppure essendo biologicamente attivabili (profarmaco), mirato al rilascio localizzato in compartimenti biologici di interesse terapeutico, costituito da una matrice a base di ossidi inorganici a porosità regolare e controllata caratterizzato dal fatto che alla matrice sono accoppiate selettivamente sulla superficie esterna una sostanza tracciante (tracciante) che rivela la presenza del sistema nei fluidi biologici e una sostanza deputata al direccionamento ed al riconoscimento molecolare (targeting) e nei pori una sostanza biologicamente attiva o attivabile.

2) Micro o nano-sistema, secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che la matrice è una matrice a base di ossidi inorganici a porosità controllata secondo un meccanismo di "imprinting molecolare" .

3) Micro o nano-sistema, secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che la matrice è una matrice a base di ossidi inorganici a porosità controllata mediante l'impiego di un qualunque tensioattivo.

4) Micro o nano-sistema, secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che la sostanza tracciante e la sostanza deputata al direccionamento (targeting) ed al riconoscimento molecolare sono accoppiate alla superficie esterna della matrice direttamente o mediante un gruppo funzionale.

5) Micro o nano-sistema, secondo la rivendicazione 3 caratterizzato dal fatto che il gruppo funzionale è prodotto sulla matrice durante la sintesi o per innesto post-sintetico mediante reagenti del tipo 3-amminopropiltrimetossisilano, 3-



amminopropiltriectossisilano, 4-amminobutil-dimetil metossisilano, 3-[2-(2-aminoetilammino) etilammino]-propiltrimetossisilano, 3-(2-amminoetilammino)propilmetildimetossisilano e qualunque altro silano recante la funzione amminica. 3-mercaptopropiltrimetossisilano, 3-glicidossipropiltrialcossisilano, 3-tiocianatopropiltrialcossisilano, 3-cianopropiltrialcossisilano, 3-cloropropiltrialcossisilano, alliltriectossisilano e che la molecola tracciante e la molecola targeting sono legate direttamente o attraverso spaziatori di opportuna reattività quali diammine, dioli, amminoalcoli.

6) Micro o nano-sistema, secondo la rivendicazione 1 in cui la sostanza tracciante è la fluoresceina isotiocianato.

7) Micro o nano-sistema, secondo la rivendicazione 1 in cui la sostanza tracciante è la tetrametil-rodamina isotiocianato.

8) Micro o nano-sistema, secondo la rivendicazione 1 in cui la sostanza tracciante è la 7-ammino,4-metil curarina 3 acido acetico

9) Micro o nano-sistema, secondo la rivendicazione 1 in cui la sostanza tracciante è la allofocianina.

10) Micro o nano-sistema, secondo la rivendicazione 1 in cui la sostanza tracciante è una qualunque specie in grado di rivelare la presenza del sistema nei fluidi biologici

11) Micro o nano-sistema, secondo la rivendicazione 1 in cui la rivelabilità è indotta dalla proteina verde fluorescente (GFP).

12) Sistema costituito secondo la rivendicazione 1 in cui la molecola targeting è l'acido folico.



- 13)** Micro o nano-sistema, secondo la rivendicazione 1 in cui la sostanza targeting è un peptide.
- 14)** Micro o nano-sistema, secondo la rivendicazione 1 in cui la sostanza targeting è un anticorpo.
- 15)** Micro o nano-sistema, secondo la rivendicazione 1 in cui la sostanza targeting è un glicoside.
- 16)** Micro o nano-sistema, secondo la rivendicazione 1 in cui la sostanza targeting è un glucide.
- 17)** Micro o nano-sistema, secondo la rivendicazione 1 in cui la sostanza targeting è una proteina.
- 18)** Micro o nano-sistema, secondo la rivendicazione 1 in cui la sostanza biologicamente attiva è un qualunque tipo di farmaco.
- 19)** Micro o nano-sistema, secondo la rivendicazione 1 in cui la sostanza biologicamente attivabile è un qualunque tipo di profarmaco.
- 20)** Micro o nano-sistema, secondo la rivendicazione 1 in cui la sostanza biologicamente attiva è costituita da materiale genetico.
- 21)** Micro o nano-sistema, secondo la rivendicazione 1 in cui la sostanza attiva è un radionuclide.
- 22)** Processo per la preparazione di un micro o nano-sistema costituito da una matrice a base di ossidi inorganici a porosità regolare secondo una qualsiasi rivendicazione precedente caratterizzato dal fatto che la matrice è ottenuta da sistemi di sintesi costituiti da emulsioni in cui due fasi forniscono, nella regione di



confine tra le stesse fasi, i reagenti per l'ottenimento di un composito funzionalizzato oppure non funzionalizzato.

23) Processo per la preparazione di un micro o nano-sistema, secondo la rivendicazione 16, caratterizzato dal fatto che il composito è un composito silico-micellare.

24) Processo per la preparazione di un micro o nano-sistema costituito secondo le rivendicazioni 16 e 17 caratterizzato dal fatto che la fase sovrastante è costituita dal tetraalcossisilano e dal trialcossialchilsilano recante la funzione o dal solo tetraalcossisilano puri (procedura C) o disciolti in un solvente organico e la fase inferiore è costituita da un tensioattivo in acqua o in un solvente o in una miscela dei due che costituisce un sistema bifasico con il solvente utilizzato nella fase sovrastante.

25) Processo per la preparazione di un micro o nano-sistema secondo la rivendicazione 18 caratterizzato dal fatto che il tensioattivo sia un tensioattivo neutro appartenente alla famiglia degli ossidi di polietilene o polipropilene.

26) Processo per la preparazione di un micro o nano-sistema secondo la rivendicazione 17 caratterizzato dal fatto che la fonte di silice è un tetraalcossi silano del tipo tetrametilortosilicato, tetraetilortosilicato, tetrapropilortosilicato, tetrabutylortosilicato.

27) Processo per la preparazione di un micro o nano-sistema secondo la rivendicazione 16 caratterizzato dal fatto che la funzionalizzazione avviene mediante sintesi diretta di una 3-amminopropil silice mesoporosa .



28) Processo per la preparazione di un micro o nano-sistema costituito secondo la rivendicazione 16 caratterizzato dal fatto che il processo di ancoraggio dell'acido folico, quale sostanza targeting, può avvenire mediante l'impiego o non di un agente condensante nel seguente modo:

1) A 15 ml di dimetilsolfossido sono aggiunti 0,25 ml di trietilammina e 0,5 g di acido folico. A dissoluzione completata si aggiungono 3 ml di nitrometano e 3,6 g di amminopropilsilice mesoporosa ottenuta secondo la procedura B, C oppure D preventivamente attivato in stufa a 110 °C per 2h. Infine si aggiungono 2,27 mmoli di diisopropilcarbodiimmide oppure dicicloesilcarbodiimmide. La miscela è posta in condizioni di agitazione moderata per 120h in assenza di luce.

2) A 15 ml di dimetilsolfossido sono aggiunti 0,25 ml di trietilammina e 0,5 g di acido folico. A dissoluzione completata si aggiungono 3 ml di nitrometano e 3,6 g di amminopropilsilice mesoporosa ottenuta secondo la procedura B, C oppure D preventivamente attivato in stufa a 110 °C per 2h. La miscela è posta in condizioni di agitazione moderata per 120h in assenza di luce.

29) Processo per la preparazione di un micro o nano-sistema secondo la rivendicazione 18 caratterizzato dal fatto che il loading dei farmaci nei pori della matrice avviene dopo rimozione parziale delle micelle di tensioattivo.

30) Processo per la preparazione di un micro o nano-sistema secondo le rivendicazioni 22 e 23 caratterizzato dal fatto che il loading dei farmaci avviene direttamente sul sistema dopo la coniugazione con la sostanza direzionante e la sostanza tracciante.



31) Processo per la preparazione di un micro o nano-sistema secondo le rivendicazioni 22 e 23 caratterizzato dal fatto che il farmaco è trattenuto sulla superficie della matrice per fisisorbimento o mediante interazioni di vario genere con i gruppi su di essa presenti.

32) Processo per la preparazione di un micro o nano-sistema secondo le rivendicazioni 22 e 23 caratterizzato dal fatto il farmaco viene legato covalentemente o elettrostaticamente ai gruppi presenti sulla superficie della matrice o su di essa prodotti mediante procedure che impiegano reagenti del tipo 3-amminopropiltrimetossisilano, 3-mercaptopropiltrimetossisilano, 3-glicidossipropiltrialcossisilano, 3-tiocianatopropiltrialcossisilano, 3-cianopropiltrialcossisilano, 3-cloropropiltrialcossisilano ed ogni alcossido di silicio parzialmente idrolizzabile.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "P. Verotta", located at the bottom right of the page.

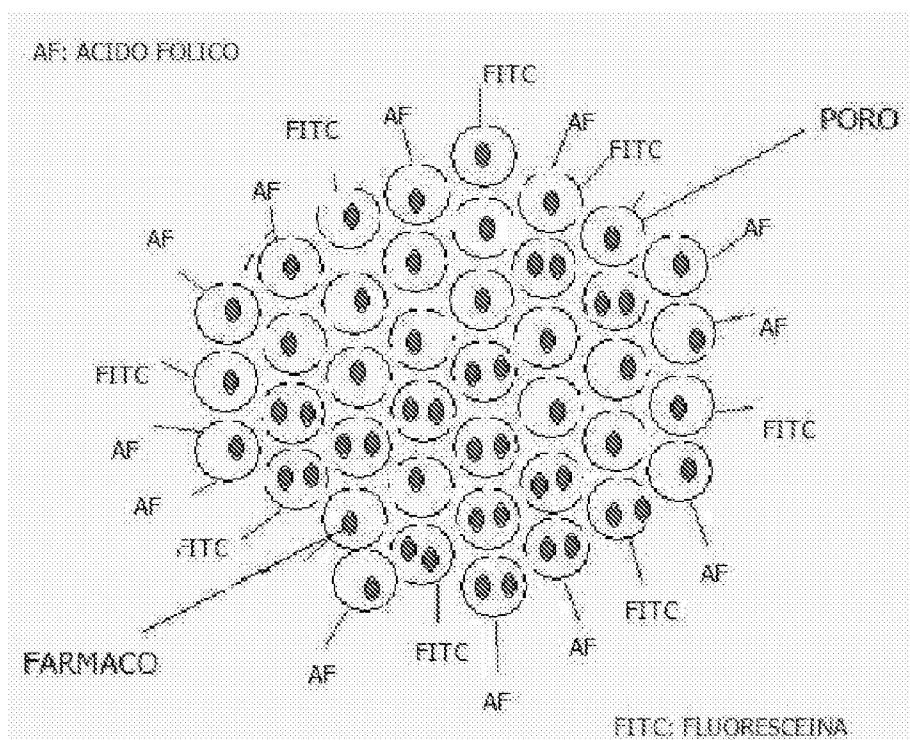


Figura 1. Rappresentazione schematica del sistema per il veicolamento di farmaci.

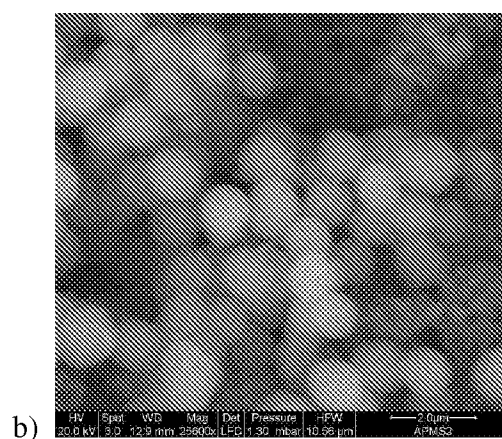
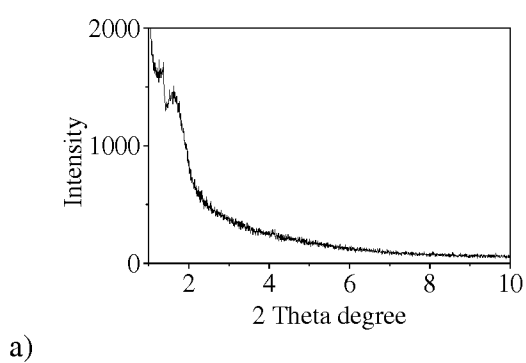


Fig. 2. Diffrattogramma di raggi X su polveri del materiale MSM tal quale (a); micrografia SEM dello stesso campione (b).

Arreola

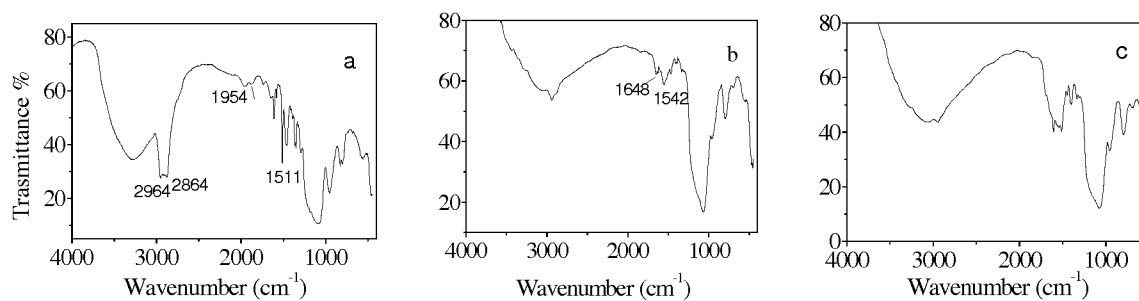


Fig. 3. Spettri DRIFT dei materiali MSM (a), FITC-MSM (b), FOL-FITC-MSM (c).

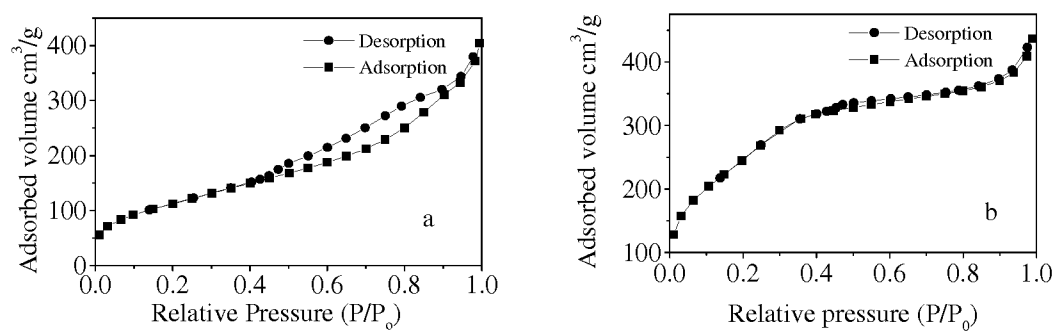


Fig. 4. Isotherme di adsorbimento-desorbimento di N_2 dei materiali FOL-FITC-MSM (a) e MSM calcinato(b).

Arreola