

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102021000032393
Data Deposito	23/12/2021
Data Pubblicazione	23/06/2023

Classifiche IPC

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	9	51

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	9	127

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	47	50

Titolo

METODO PER LA PREPARAZIONE DI NANOPARTICELLE POLIMERICHE IBRIDE PER IL RILASCIO DI FARMACI OLIGONUCLEOTIDICI NELLE TERAPIE FARMACOLOGICHE A SCOPO RIGENERATIVO, CURATIVO E PREVENTIVO

11914M Descrizione del brevetto per invenzione industriale avente per titolo:

FM/mc **“METODO PER LA PREPARAZIONE DI NANOPARTICELLE POLIMERICHE IBRIDE PER IL RILASCIO DI FARMACI OLIGONUCLEOTIDICI NELLE TERAPIE FARMACOLOGICHE A SCOPO RIGENERATIVO, CURATIVO E PREVENTIVO”**

a nome : **1. POLITECNICO DI TORINO (75%);**

2. UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TORINO (25%)

con sede in: 1. Corso Duca degli Abruzzi, 24 - 10129 Torino;

2. Via Verdi, 8 - 10124 Torino

* * *

L'invenzione ha per oggetto nanoparticelle ibride costituite da un componente polimerico che incapsula liposomi cationici e/o lipoplessi comprendenti un lipide cationico ed eventualmente un lipide helper.

Stato della tecnica

I farmaci a base di acidi nucleici sono difficili da somministrare perché:

- a) Degradano facilmente a contatto con i fluidi biologici per idrolisi catalizzata da nucleasi;
- b) Non si accumulano nei tessuti target anche quando sono rilasciati localmente o raggiungono il sito desiderato, a causa della carica negativa, che impedisce l'internalizzazione dell'agente oligonucleotidico da parte delle cellule;
- c) A differenza dei comuni farmaci a base di “small molecules”, che possono essere semplicemente rilasciati ai tessuti target, i farmaci a base di acidi nucleici richiedono un rilascio intracellulare efficace.

Per la soluzione del problema del rilascio di farmaci oligonucleotidici sono

state proposte diverse nanotecnologie che comprendono: (i) nanoparticelle lipidiche, (ii) nanoparticelle polimeriche, (iii) nanoparticelle inorganiche, (iv) tecnologia con nanoaghi, (v) vettori virali.

Le nanoparticelle lipidiche utilizzate per il rilascio di oligonucleotidi (ad es. miRNA, siRNA, mRNA) combinano diverse tipologie di lipidi per ottenere le caratteristiche desiderate.

Ad esempio, vengono ampiamente utilizzati i lipidi cationici a pH fisiologico, che sono in grado di complessare efficacemente gli agenti oligonucleotidici. Tuttavia, essi spesso generano effetti tossici sulle cellule. Sono state prodotte anche nanoparticelle lipidiche cationiche in grado di incapsulare agenti oligonucleotidici e altri farmaci, quali doxorubicina (Sci. Rep. 6, 2016 <https://doi.org/10.1038/SREP35223>) e paclitaxel [Cancer Med. 6 (2017) 651–661]. US10555910 descrive nanoparticelle lipidiche specifiche per inibitori di mRNA.

Tuttavia, il principale svantaggio è rappresentato dalle citotossicità dei lipidi cationici, e dalle loro interazioni non specifiche con le proteine del siero, cosa che rende le particelle altamente instabili. La citotossicità è legata all'attivazione del sistema immunitario con l'attivazione del complemento e dei pathway di coagulazione e la stimolazione della produzione di citochine.

Questa problematica è stata attenuata grazie all'introduzione di particelle lipidiche neutre a base di lipidi ionizzabili, che assumono una carica positiva solo a pH leggermente acido (permettendo la complessazione con l'RNA), mentre sono neutre a pH fisiologico, risultando maggiormente biocompatibili. Generalmente vengono utilizzati lipidi con funzionalità amminiche con una costante di dissociazione acida (pKa) di circa ~6.5. Le nanoparticelle si ottengono tramite un rapido miscelamento dei lipidi sciolti in etanolo con soluzioni acquose di agente

oligonucleotidico in acqua a basso pH (pH 4), che può in parte degradare l'agente incapsulato. Le nanoparticelle così prodotte hanno una bassa carica superficiale a condizioni fisiologiche, sono non citotossiche e non immunogeniche. Generalmente le nanoparticelle lipidiche a base di lipidi ionizzabili a basso pH contengono anche (i) un lipide helper, che permette una migliore formazione dei liposomi e promuove l'interazione con la membrana cellulare, (ii) colesterolo che permette una migliore integrazione dei diversi componenti lipidici grazie alla sua funzione adiuvante e (iii) un lipide pegilato, che limita l'opsonizzazione da parte delle proteine del siero e la clearance reticoloendoteliale. Tuttavia, la presenza del coating di polietilenglicole (PEG) ha lo svantaggio di inibire le interazioni con le cellule target ed il rilascio intracellulare. Questo problema può essere superato utilizzando lipidi pegilati con catena acilica corta C14 che *in vivo* vengono rapidamente rilasciati [Pharmaceutics. 11 (2019). <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS11080360>].

La composizione relativa in lipide ionizzabile, lipide helper, colesterolo e lipide pegilato influenza l'efficacia delle nanoparticelle lipidiche e necessita di una ottimizzazione per ogni applicazione e modalità di somministrazione. Inoltre, sono molto importanti i tipi di lipide scelti, la dimensione, la carica superficiale, in quanto influenzano il comportamento delle nanoparticelle lipidiche in vivo.

In particolare sono stati progettati e sintetizzati più di 300 lipidi ionizzabili identificando la relazione tra struttura e attività [Nat. Nanotechnol. 2019 1412. 14 (2019) 1084–1087]. L'attività della particella è stata correlata con la costante di dissociazione acida del lipide cationico ionizzabile il cui valore ottimale è risultato pari a $pK_a \approx 6.4$. Deviazioni da questo pK_a anche di solo 0.5 unità hanno determinato una riduzione dell'efficacia fino a 100 volte.

Nel 2018 La Food and Drug Administration (FDA) e la commissione europea

(EC) hanno approvato Patisiran (ALN-TTR02), una tipologia di nanoparticella lipidica (ionizzabile a basso pH) a rilascio di short interfering RNA (siRNA) per il trattamento di polineuropatie indotte da amiloidosi ereditaria.

L'esempio più recente di nanoparticelle lipidiche a rilascio di molecole di RNA è rappresentato dai vaccini per il Covid-19 BioNTech/Pfizer e Moderna, che rilasciano uno specifico acido ribonucleico (mRNA).

L'impiego di nanoparticelle lipidiche è tuttavia limitato da problemi di stabilità in ambiente biologico/soluzione acquosa con conseguente scarsa stabilità allo stoccaggio: si rende pertanto necessario il loro congelamento e l'utilizzo di agenti eccipienti stabilizzanti (ad es. saccarosio).

Un ulteriore problema delle particelle lipidiche è il rilascio non specifico degli agenti oligonucleotidici o l'accumulo sistemico di tali agenti. Per funzionalizzare superficialmente le particelle e garantire un'azione mirata, sono preferibili agenti lipidici pre-modificati con un ligando per il targeting cellulare, per evitare funzionalizzazioni post-preparazione che possono essere critiche a causa della limitata stabilità delle particelle lipidiche. Pertanto, per ogni funzionalizzazione superficiale, occorre ottimizzare il processo di preparazione, limitandone la versatilità.

Sono state proposte nanoparticelle polimeriche cationiche per il rilascio di agenti oligonucleotidici, utilizzando frequentemente la polietilenimina (PEI). E' possibile ottenere particelle a base di PEI, a basso e alto peso molecolare, con struttura del polimero sia lineare sia ramificata [Polyethylenimines for siRNA and miRNA delivery in vivo, Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol. 5 (2013) 484–501]. I principali svantaggi sono la citotossicità e la bassa efficienza di trasfezione. La combinazione del PEI con il PEG o polilisina (PL) ne riduce la

citotossicità. Un'alternativa è rappresentata dalle particelle di chitosano (EP 2397123) che tuttavia necessitano di un pH acido per la preparazione che può degradare l'agente oligonucleotidico ed hanno una bassa efficienza di trasfezione.

Sono stati proposti anche dendrimeri a base di poliamidoamine (PMAM), polimeri iper-ramificati biodegradabili che hanno elevata efficacia di trasfezione e possono incapsulare farmaci idrofilici e idrofobici. Lo svantaggio principale è legato a potenziali effetti citotossici [Mater. Today. 18 (2015) 565–572]. Sono anche state descritte micelle polimeriche costituite da polimeri con blocchi idrofilici e blocchi idrofobici che permettono di incapsulare agenti con diverse caratteristiche di bagnabilità superficiale.

Sono state anche descritte nanoparticelle polimeriche ibride che contengono un componente polimerico idrofobo quale acido poli(lattico-co-glicolico), acido polilattico, policaprolattone; etc.), che tipicamente forma il *core* della nanoparticella, e un componente polimerico o lipidico cationico, che forma uno *shell* esterno alla nanoparticella. Sono prodotte attraverso un processo di nanoprecipitazione che permette la deposizione del componente cationico sulla superficie della particella, complessato con l'agente oligonucleotidico. E' possibile co-incapsulare agenti idrofobici nel core della particella ibrida. Essendo esposto superficialmente, l'oligonucleotide viene rilasciato velocemente. Inoltre la disposizione dei componenti rende complessa la funzionalizzazione superficiale della nanoparticella finalizzata alla medicina di precisione.

Sono state anche preparate nanoparticelle ibride polimero sintetico – componente cationico (US 9549901) in grado di incapsulare oligonucleotidi e altri agenti idrofobici, attraverso un processo di doppia emulsione (acqua in olio in acqua). In questo caso, il componente cationico complessato con l'agente

oligonucleotidico forma il core della nanoparticella, mentre il polimero sintetico viene esposto sulla parte superficiale della nanoparticella. La funzionalizzazione superficiale di queste nanoparticelle può essere effettuata attraverso varie strategie. Tuttavia, il processo di formazione delle nanoparticelle è laborioso ed impiega molto tempo, perché consiste in due step di emulsione; inoltre facendo uso di agenti surfattanti di limitata biocompatibilità sono necessari lavaggi ripetuti. Infine utilizza elevati volumi. Nel complesso l'implementazione a livello industriale di questa tecnologia di formazione di nanoparticelle polimeriche ibride a doppia emulsione risulta complessa.

US 8193334 descrive la preparazione di nanoparticelle polimeriche ibride mediante due step: inizialmente sono preparate micelle inverse a base di un componente anfifilico (ad es. lipidico), contenenti acidi nucleici, in un solvente organico miscibile con l'acqua (es. il tetraidrofurano, THF). In questo solvente è solubilizzato in seguito il polimero sintetico. Questa soluzione viene gocciolata in acqua ottenendo la nanoprecipitazione della miscela di polimero sintetico e micelle inverse contenenti acidi nucleici. L'efficacia di incapsulamento riportata, in particolare di siRNA, è del 18-30%. Per la funzionalizzazione superficiale delle nanoparticelle, si descrive l'utilizzo del componente anfifilico (es. lipidico) e del componente polimerico funzionalizzati, in quanto entrambi potrebbero essere esposti superficialmente dalle nanoparticelle.

I principali metodi per la formazione di nanoparticelle polimeriche a rilascio di oligonucleotidi sono descritti nella review pubblicata in J. Control. Release, 313 (2019) 80–95. La stessa review descrive anche nanoparticelle inorganiche ottenute da materiali inorganici tra cui oro, fosfato di calcio, silice e ossidi di ferro, materiali biocompatibili e di dimensione e morfologia controllabili.

Le nanoparticelle (NP) a base di ossido di ferro (Fe_3O_4) sono comunemente utilizzate come agenti di contrasto per la risonanza magnetica (MRI). Inoltre, combinate con componenti cationici, permettono di incapsulare agenti oligonucleotidici.

Le NP di silice e le NP di silice mesoporosa (MSP) sono nanostrutture a base di silice che possiedono un'elevata biocompatibilità e stabilità. Possono incapsulare agenti oligonucleotidici ed altri farmaci ed essere funzionalizzate in superficie con molecole specifiche per un rilascio mirato alle cellule target.

Le nanoparticelle di oro (Au NP) sono state utilizzate per la somministrazione di farmaci in virtù della loro biocompatibilità, facilità di funzionalizzazione e della possibilità di ottenerle nelle dimensioni e forme desiderate. La superficie delle Au-NP è tipicamente funzionalizzata con gruppi tiolici o amminici per consentire l'intrappolamento degli agenti oligonucleotidici.

Le nanoparticelle di fosfato di calcio (CaP NP), utilizzate da circa 40 anni per incapsulare e rilasciare materiale oligonucleotidico, sono economiche, non tossiche, bioriassorbibili e facilmente sintetizzabili. Lo svantaggio di queste nanoparticelle consiste nella bassa efficacia di incapsulamento (10-20%) e nella difficoltà di co-incapsulare altri tipi di farmaci.

Lo svantaggio principale di alcune nanoparticelle inorganiche consiste nella non degradabilità e nella possibilità di accumulo *in vivo*, e conseguenti possibili effetti collaterali a lungo termine. Un limite comune a tutte le nanoparticelle inorganiche è la limitata efficacia di incapsulamento.

L'uso di vettori virali, derivati ad esempio da Retrovirus, Lentivirus, Adenovirus, Herpes virus e altri, per la veicolazione di oligo- o poli-nucleotidi offre vantaggi legati all'efficacia di trasfezione cellulare ma presenta problemi di

sicurezza per il paziente, per i rischi di reazioni infiammatorie o di oncogenesi (per i vettori virali il cui contenuto si integra con il genoma della cellula ospite). Inoltre, i vettori virali non permettono un'azione mirata, anche se possono mostrare una maggiore selettività verso alcune tipologie di cellule.

DESCRIZIONE DELL'INVENZIONE

Si è ora trovato che è possibile ottenere nanoparticelle polimeriche ibride versatili a rilascio di farmaco, capaci di incapsulare efficacemente agenti oligonucleotidici (da soli o in combinazione con farmaci anche idrofobici), attraverso un processo veloce, semplice, efficiente e scalabile.

Le nanoparticelle polimeriche ibride dell'invenzione sono biocompatibili e possono essere funzionalizzate facilmente sulla loro superficie attraverso un processo veloce, semplice e versatile che permette di adattare a diverse esigenze della medicina di precisione. Le nanoparticelle dell'invenzione permettono di proteggere il farmaco incapsulato dalla degradazione e di veicolarlo efficacemente alle cellule desiderate grazie ad una funzionalizzazione superficiale specifica.

Questi ed altri vantaggi sono raggiunti secondo l'invenzione da nanoparticelle ibride costituite da un componente polimerico che incapsula liposomi cationici e/o lipoplessi comprendenti un lipide cationico ed eventualmente un lipide helper, in cui la fase polimerica costituisce almeno l'80% in peso rispetto del materiale complessivo costituente le nanoparticelle.

Le nanoparticelle dell'invenzione sono ottenute per nanoprecipitazione della soluzione polimerica (eventualmente contenente farmaci idrofobici) in una dispersione acquosa di lipoplessi e/o liposomi incapsulanti agenti oligonucleotidici e/o farmaci idrofobici, esponendo in superficie la fase polimerica.

Questo permette di proteggere efficacemente gli agenti oligonucleotidici

dalla degradazione e di rilasciarli in maniera sostenuta e controllata nel tempo. Inoltre, la presenza del polimero sintetico sulla superficie delle nanoparticelle ne permette un'efficace e versatile funzionalizzazione e conferisce stabilità durante il periodo di stoccaggio del sistema.

Le nanoparticelle possono essere conservate per almeno un mese in sospensione acquosa e trasportate senza l'ausilio di agenti stabilizzanti, utilizzando una temperatura di 4°C. In alternativa le nanoparticelle possono essere congelate e scongelate all'uso recuperando le loro caratteristiche in sospensione acquosa mediante l'aggiunta di opportuni agenti crioprotettori. Oppure le nanoparticelle possono essere liofilizzate e la sospensione ricostituita prima dell'uso, conservando le proprie caratteristiche fisicochimiche e funzionali sempre con l'aggiunta di crioprotettori.

Le nanoparticelle hanno inoltre una stabilità in vivo che va da alcuni giorni a settimane, a seconda della loro composizione chimica, permettendone un rilascio controllato, sostenuto e totale dei principi attivi incapsulati.

La preparazione delle nanoparticelle comprende la nanoprecipitazione di una soluzione polimerica in una dispersione di liposomi cationici o lipoplessi, tipicamente per gocciolamento di una soluzione polimerica in solventi organici miscibili in acqua in una dispersione acquosa di liposomi o lipoplessi sotto agitazione. I solventi organici miscibili con l'acqua vengono evaporati in un evaporatore rotante sotto vuoto.

La nanoprecipitazione può essere vantaggiosamente effettuata in un dispositivo microfluidico.

La preparazione non necessita di additivi potenzialmente tossici ed il processo di produzione ha un'elevata efficienza (resa > 95%). I volumi di solventi

necessari per la preparazione sono limitati, favorendo la scalabilità del processo.

Le nanoparticelle polimeriche ibride a base di polimeri sintetici e componenti lipidici combinano le caratteristiche di entrambi: la biomimeticità dei componenti lipidici e la stabilità e versatilità dei polimeri sintetici. Le nanoparticelle ibride oggetto dell'invenzione rappresentano una nuova piattaforma per la medicina di precisione, in quanto sono capaci di incapsulare efficacemente oligonucleotidi (grazie ai componenti cationici lipidici), eventualmente in combinazione con farmaci idrofobici o a limitata idrofilicità (grazie al componente polimerico) e di rilasciarli alle cellule target grazie ad una funzionalizzazione superficiale specifica. Le condizioni di processo sono blande e quindi preservano la funzionalità degli agenti oligonucleotidici. Il profilo di rilascio degli oligonucleotidici e di eventuali altri farmaci co-incapsulati è più controllato e sostenuto rispetto alle nanoparticelle lipidiche. Le particelle ibride permettono quindi di diminuire la tossicità sistemica degli agenti terapeutici, migliorandone il rilascio e richiedendo un numero minore di somministrazioni rispetto ad esempio alle nanoparticelle lipidiche. Inoltre, la superiore stabilità rispetto alle nanoparticelle lipidiche ne permette lo stoccaggio in sospensione ad una temperatura di 2-8°C per almeno 30 giorni, senza variare le loro caratteristiche fisicochimiche (inclusa l'efficacia di incapsulamento), evitando fenomeni di degradazione degli agenti oligonucleotidici incapsulati.

La versatilità del processo garantisce ampi utilizzi per soddisfare diverse esigenze terapeutiche, ad esempio nel trattamento dei tumori, nella medicina rigenerativa cardiovascolare, epatica e renale e nei vaccini a mRNA.

Le nanoparticelle dell'invenzione differiscono da quelle descritte in US 8193334, sia per quanto riguarda l'efficacia incapsulamento di oligonucleotidi (>95% e con valori fino al 99%, molto maggiore rispetto al 18-30% riportato in

US 8193334) sia per la possibilità di incapsulare non solo agenti oligonucleotidici ma anche composti idrofobici o con moderata idrofilicità. E' inoltre del tutto diverso il processo di preparazione: secondo la presente invenzione, la nanoprecipitazione della soluzione di polimero sintetico avviene sulla dispersione che contiene i lipoplessi preformati, permettendo al polimero sintetico di ricoprirli. Il metodo dell'invenzione è quindi più veloce (ha uno step in meno), è più efficace e permette di ottenere particelle che espongono esternamente il polimero sintetico.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Il componente polimerico utilizzato per la preparazione delle nanoparticelle dell'invenzione può essere un polimero singolo o una miscela di più polimeri.

I componenti polimerici sono scelti fra:

(i) poliesteri quali acido poli(lattico-co-glicolico) (PLGA), acido poliglicolico (PGA), acido polilattico (PLA), policaprolattone (PCL), poli(lattide-co-caprolattone) (PLCL);

(ii) poliesteri della classe dei poli(idrossialcanoati), come ad esempio il poli(idrossibutirrato) (PHB) e il copolimero poli(idrossibutirrato-co-idrossivalerato) (PHBHV);

(iii) poli(propilen ossido) (PPO);

(iv) polimeri e copolimeri che contengono gruppi metacrilato come ad esempio poli(metil metilacrilato) (PMMA), poli(etil metacrilato) (PEMA) e poli(butil metacrilato) (PBMA);

(v) poli(cianoacrilati);

(vi) copolimeri comprendenti come blocchi costituenti i polimeri (i) e/o (ii) e/o (iii) e/o (iv) e/o (v), il poli(etilen glicole) PEG e/o il (polietilen ossido) PEO;

(vii) poliuretani o altri copolimeri di sintesi che contengono i polimeri

precedenti come blocchi costituenti; viii) polimeri naturali come zeina, cellulosa, lignina e amido;

ix) polimeri naturali modificati per renderli insolubili in acqua (ad esempio butilgliceril pectina).

Il copolimero acido poli(lattico-co-glicolico) è ampiamente utilizzato per la sua biocompatibilità e biodegradabilità.

Il lipide cationico comprende una testa idrofila contenente gruppi ammonici, gruppi amminici primari, secondari o terziari, gruppi guanidinici, derivati amminoacidici.

Esempi di lipidi cationici comprendono [2-(2,3-didodecilossipropil)-idrossietil] ammonio bromuro (DE), 1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilammonio propano (DOTMA), 1,2-dioleilossi-3-[trimetilammonio]-propano (DOTAP), dimetil-dioctadecil ammonio bromuro (DDAB), cetil-trimetil ammonio bromuro (CTAB); derivati cationici del colesterolo, 2,3-dioleilossi-N-[2-(spermicarboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanamino trifluoroacetato (DOSPA), bis-guanidinio-tren-colesterolo (BGTC).

Le percentuali in peso del lipide cationico rispetto al totale delle nanoparticelle possono variare da 1 a 20%.

Il lipide helper è costituito da uno o più fosfolipidi scelti fra fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, colesterolo e loro derivati. Le percentuali in peso del lipide helper rispetto al lipide cationico possono variare da 0 a 50%

Le dimensioni delle nanoparticelle possono variare da 80 a 500 nm.

Un aspetto preferito dell'invenzione è costituito da nanoparticelle di lipoplessi comprendenti un polinucleotide scelto tra microRNA, siRNA, RNA messaggero, DNA plasmidico e oligonucleotidi antisense. L'efficacia di

incapsulamento dei polinucleotidi è superiore al 95%.

In alternativa o in aggiunta ai polinucleotidi, le nanoparticelle possono contenere anche farmaci idrofobici dispersi nei liposomi cationici o nel polimero.

Nelle nanoparticelle dell'invenzione, il polimero può essere funzionalizzato con uno o più ligandi quali anticorpi, frammenti di anticorpo che si legano all'antigene (Fab), aptameri, peptidi, carboidrati, piccole molecole o una combinazione dei precedenti.

L'invenzione sarà ora descritta in maggior dettaglio negli esempi che seguono e nelle figure allegate.

DESCRIZIONE DELLE FIGURE

Figura 1. Analisi DLS delle nanoparticelle di PLGA/DE-DOPE/NegmiR e DE-DOPE/NegmiR in acqua Milli-Q.

Figura 2. Analisi cryoTEM delle nanoparticelle di PLGA/DE-DOPE/NegmiR.

Figura 3. Efficacia di incapsulamento di miRNA delle nanoparticelle PLGA/DE-DOPE/NegmiR e DE-DOPE/NegmiR.

Figura 4. Stabilità allo stoccaggio in acqua Milli-Q a 4°C delle nanoparticelle di PLGA/DE-DOPE/NegmiR, valutata tramite analisi DLS.

Figura 5. Stabilità allo stoccaggio in acqua Milli-Q e PBS a 4°C delle nanoparticelle di PLGA/DE-DOPE/NegmiR, valutata tramite analisi DLS.

Figura 6. Stabilità allo stoccaggio in acqua Milli-Q e DMEM+FBS a 4°C delle nanoparticelle di PLGA/DE-DOPE/NegmiR, valutata tramite analisi DLS.

Figura 7. Rilascio di miRNA (NegmiR) dalle nanoparticelle di PLGA/DE-DOPE/NegmiR, valutata tramite analisi fluorimetrica Qubit, in condizioni dinamiche a 37°C in acqua Milli-Q.

Figure 8. Analisi citofluorimetrica di fibroblasti cardiaci atriali umani adulti AHCF (controllo) e cellule AHCF trattate con nanoparticelle polimeriche ibride a base di PLGA-Cy5. I pannelli a sinistra riportano la fluorescenza delle cellule (asse y) su forward scatter cellulare (asse x). Il pannello di destra riporta la fluorescenza delle cellule (asse x) sulla conta cellulare (asse y).

Figure 9. L'immagine a sinistra mostra l'espressione di miR-1 intracellulare dopo la trasfezione con PLGA/DE-DOPE/miRNA rispetto al controllo (cellule AHCF non trasfettate) a 48 ore dalla trasfezione. L'immagine a destra mostra l'espressione del target di miR-1 (Twf-1) a 48 ore dalla trasfezione rispetto al controllo (cellule AHCF non trasfettate).

Figura 10. Diametro idrodinamico, potenziale zeta ed efficacia di incapsulamento delle nanoparticelle di PLGA/DE-DOPE/miRNA caricate con NegmiR e miRcombo. L'analisi DLS è stata effettuata in acqua Milli-Q.

Figura 11. Stabilità delle nanoparticelle di PLGA/DE-DOPE/miRcombo in mezzo di coltura DMEM-FBS valutata tramite analisi DLS.

Figura 12. Stabilità delle nanoparticelle di PLGA/DEDOPE/miRcombo in acqua Milli-Q a 4°C valutata tramite analisi DLS.

Figura 13. Rilascio *in vitro* di miRcombo in acqua Milli-Q e in PBS, in condizioni dinamiche a 37°C.

Figura 14. Vitalità cellulare tramite saggio della resazurina condotto su cellule AHCF trattate con le nanoparticelle di PLGA/DE-DOPE/miRNA (contenenti negmiR o miRcombo) a 24, 48 e 72 ore dalla trasfezione. Le cellule ($5,5 \times 10^3$) sono state trattate con le nanoparticelle di PLGA/DE-DOPE/miRNA (contenenti negmiR o miRcombo, 25 nM finale). I valori sono riportati rispetto al controllo (cellule AHCF non trasfettate).

Figure 15. Saggio Live/Dead condotto su cellule AHCF trattate con le nanoparticelle di PLGA/DE-DOPE/miRNA (contenenti negmiR o miRcombo) a 72 ore dalla trasfezione. Le cellule ($5,5 \times 10^3$) sono state trattate con le nanoparticelle di PLGA/DE-DOPE/miRNA (contenenti negmiR o miRcombo, 25 nM finale).

Figure 16. Valutazione dell'espressione dei singoli microRNA (miR-1, miR-133, miR-208 e miR-499) in cellule AHCF trattate con le nanoparticelle di PLGA/DE-DOPE/miRNA (contenenti negmiR o miRcombo) a 48 ore dalla trasfezione tramite Droplet Digital PCR. I livelli di espressione dei singoli microRNA sono riportati in fold-change rispetto al controllo negmiR.

Figura 17. Efficacia di riprogrammazione diretta cardiaca tramite valutazione dell'espressione della TNNT2 in cellule AHCF trattate con miRcombo utilizzando DhamfaFECT®/miRNA e PLGA/DE-DOPE/miRNA a 15 giorni dalla trasfezione tramite Droplet Digital PCR. I livelli di espressione della TNNT2 sono relativi all'espressione di GAPDH (utilizzato come gene interno house-keeper).

ESEMPIO 1: preparazione di nanoparticelle

Sono stati utilizzati il polimero PLGA e i lipidi 2-(2,3-didodecilossipropil)-idrossietil ammonio bromuro (DE, cationico) e L- α -dioleolifosfatidiletanolamina (DOPE) come lipide helper. Il metodo è comunque applicabile a qualunque altro tipo di polimero e altre combinazioni di lipidi mantenendo un contenuto di polimero > 80 wt.%.

Il PLGA viene solubilizzato in acetone (1 mg/mL). 1 mL di lipoplessi DE-DOPE/miRNA è stato posto in una provetta di vetro e agitato (ca. 900-1000 rpm). Quindi, la soluzione di PLGA iniziale, diluita a una concentrazione pari a 127 μ g/mL, è stata gocciolata nella sospensione di lipoplessi sotto agitazione magnetica e il sistema è stato lasciato in agitazione per 30 min. Successivamente il

sistema è stato versato in un becher sotto agitazione fino a completa evaporazione dell'acetone. In questo modo, si è ottenuto un volume di 1 mL di nanoparticelle a base di PLGA/DE-DOPE/miRNA. Come miRNA inizialmente sono stati incapsulati NegmiR e miR-1. Successivamente, sono stati incapsulati 4 miRNA contemporaneamente (miRcombo: miR-1, 133, 208, 499). Si possono incapsulare con lo stesso metodo siRNA, ottenendo analoghe caratteristiche dimensionali, di potenziale zeta ed efficacia di incapsulamento come per i miRNA. Per oligonucleotidi più grandi come gli mRNA, occorre ottimizzare il rapporto N/P tra i gruppi amminici lipidici e i gruppi fosfato dell'mRNA.

Le nanoparticelle di PLGA/DE-DOPE/miRNA vengono funzionalizzate in superficie con un ligando specifico per i fibroblasti cardiaci adulti umani patologici. Il ligando utilizzato è l'anticorpo monoclonale Anti-DDR2 in grado di legare il recettore DDR2 maggiormente espresso nei fibroblasti cardiaci rispetto alle altre cellule del tessuto cardiaco. La funzionalizzazione viene effettuata tramite *click chemistry*, nello specifico attraverso la cicloadizione di Huisgen azide-alchino catalizzata dal rame, Cu(I). La reazione di funzionalizzazione comprende quattro steps:

- 1) la funzionalizzazione del polimero PLGA tramite la reazione delle carbodimmidi con il PEG modificato con un'azide (PEG-N₃), ottenendo il PLGA-PEG-N₃ (oppure l'utilizzo di un copolimero commerciale PLGA-PEG-N₃);

- 2) la formazione delle nanoparticelle PLGA-PEG-N₃/DE-DOPE/miRNA tramite nanoprecipitazione;

- 3) la funzionalizzazione dell'anticorpo con il propargile-PEG-NHS (NHS: N-idrossisuccinimide), ottenendo la molecola propargile-PEG-anticorpo;

- 4) la coniugazione delle molecole di propargile-PEG-anticorpo, dotate di un

gruppo alchino, con i gruppi azide esposti dalle nanoparticelle PLGA-PEG-N₃/DE-DOPE/miRNA.

Questo tipo di funzionalizzazione può essere applicato anche per altri scopi terapeutici, cambiando il tipo di anticorpo, o utilizzando diversi tipi di ligandi (ad es, peptidi, aptameri).

ESEMPIO 2: caratterizzazione delle nanoparticelle

a) Dimensioni idrodinamiche e potenziale Z

Le nanoparticelle ibride PLGA/DE-DOPE/miRNA in acqua Milli-Q mostrano una dimensione idrodinamica di 153 nm significativamente inferiore a quella dei lipoplessi di DE-DOPE/NegmiR (372 nm) preparati come controllo. Il potenziale Z assume un valore negativo di -28 mV per le nanoparticelle PLGA/DE-DOPE/miRNA per la presenza del PLGA in superficie. I lipoplessi DE-DOPE/NegmiR hanno un potenziale Z positivo (40 mV) (Figura 1).

L'analisi DLS delle nanoparticelle di PLGA/DE-DOPE/miRNA in diversi mezzi ha mostrato risultati simili che sono riportati in Tabella 1. Ciò dimostra la stabilità delle nanoparticelle a contatto con mezzi differenti.

Tabella 1. Analisi DLS delle nanoparticelle PLGA/DE-DOPE/NegmiR in diversi mezzi di sospensione (PBS: tampone fosfato salino; Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)+ Foetal Bovine Serum (FBS): mezzo di coltura con siero fetale bovino)

PLGA/DE-DOPE/miRNA NP	Size (nm)	PDI	Z-potential (mV)
Milli-Q water	153 ± 33	0.25 ± 0.04	-28 ± 2
PBS	161 ± 53	0.20 ± 0.02	-31 ± 3
DMEM+FBS	172 ± 52	0.26 ± 0.04	-28 ± 2

b) Analisi morfologica delle nanoparticelle

Le immagini CryoTEM (Figura 2) mostrano zone a diversa densità che

suggeriscono la deposizione del PLGA a ricoprire i lipoplessi. Le dimensioni sono nanometriche e le particelle sono separate tra loro e non formano aggregati.

c) Efficacia di incapsulamento di oligonucleotidi (miRNA), EE %

L'efficacia di incapsulamento di un miRNA modello (NegmiR) è risultata del 99% per le nanoparticelle di PLGA/DE-DOPE/NegmiR e per i lipoplessi di DE-DOPE/NegmiR (Figura 3). Questo dato è stato ricavato analizzando i surnatanti dopo il processo di nanoprecipitazione con la tecnica fluorimetrica Qubit.

d) Resa di formazione delle nanoparticelle ibride

La resa del processo di produzione (calcolata valutando il peso delle nanoparticelle prodotte rispetto al peso dei materiali usati nel processo) è risultata del $97\pm 1\%$ per le nanoparticelle polimeriche ibride di PLGA/DE-DOPE/NegmiR.

e) Stabilità allo stoccaggio in sospensione a 4°C in acqua Milli-Q

Il diametro idrodinamico e il potenziale Z si mantengono stabili fino ad almeno 28 giorni di incubazione a 4°C in sospensione in acqua Milli-Q (Figura 4).

f) Stabilità allo stoccaggio a 37°C in acqua Milli-Q e PBS fino a 48 h

Lo studio di stabilità effettuato per 48 h a 37°C ha mostrato una buona stabilità colloidale per le nanoparticelle di PLGA/DE-DOPE/miRNA in acqua Milli-Q, mentre l'incubazione in soluzione di PBS ha portato ad un leggero aumento di dimensioni e PDI a 48 h anche se non significativo (Figura 5). Il potenziale zeta mantiene un valore negativo in acqua Milli-Q (-23 mV) rimanendo costante, mentre la presenza del PBS determina una leggera diminuzione del potenziale zeta alle 48h (-32 mV) (Figura 5). Pertanto in questo caso sono state ipotizzate interazioni tra gli ioni presenti nella soluzione e le nanoparticelle, che influiscono sulla dimensione a 48 h. Inoltre, come suggerito dai valori di deviazione standard (SD) riportati, l'interazione con gli ioni delle sospensioni di nanoparticelle di PLGA/DE-

DOPE/miRNA in PBS ha probabilmente influenzato la ripetibilità delle analisi DLS.

g) Stabilità allo stoccaggio a 37°C in acqua Milli-Q e DMEM+FBS fino a 48 h

Infine, sono state osservate lievi variazioni della dimensione media e del potenziale zeta delle nanoparticelle di PLGA/DE-DOPE/miRNA dopo la loro incubazione per 48 ore in mezzo di coltura cellulare (DMEM+FBS), rispetto all'incubazione in acqua Milli-Q (Figura 6). La dimensione idrodinamica media iniziale delle nanoparticelle di PLGA/DE-DOPE/miRNA in DMEM+FBS era di 172 nm ed è aumentata fino a 260 nm dopo 48 ore di incubazione. Il potenziale zeta delle nanoparticelle in DMEM+FBS è aumentato a -10 mV, rimanendo stabile per l'intero periodo dello studio (Figura 6). Queste variazioni potrebbero essere il risultato di un'interazione della superficie delle NP con le proteine del siero. Tuttavia, anche in virtù dei valori di PDI (0.25-0.26) misurati dopo 48 ore di incubazione è stato riscontrato che le nanoparticelle di PLGA/DE-DOPE/miRNA mantengono una buona stabilità colloidale in DMEM+FBS.

Le nanoparticelle di PLGA/DE-DOPE/ negmiR in condizioni statiche non rilasciano il miRNA a 37°C in acqua Milli-Q, mostrando una protezione dell'agente oligonucleotidico. In condizioni dinamiche a 37°C invece, le nanoparticelle di PLGA/DE-DOPE/negmiR hanno mostrato un rilascio graduale con un valore di rilascio pari al 73% dopo 24 h, ottenendo un rilascio totale dopo 7 giorni (Figura 7). Al contrario le particelle di DE-DOPE/negmiR hanno un rilascio completo in 24 ore in condizione statiche (dati non riportati). Il profilo ottenuto in Figura 7 riflette le ben note proprietà del PLGA come materiale in grado di proteggere il farmaco dalla degradazione e di assicurare una cinetica di rilascio controllata.

h) Saggi di efficacia *in vitro*: uptake, citotossicità, espressione di miRNA-1 e downregolazione del target (Twf1).

Il miRNA viene rilasciato efficacemente nelle cellule come dimostrato dai saggi cellulari (usando fibroblasti cardiaci atriali umani adulti, AHCFs) con la valutazione dell'efficienza di uptake cellulare di nanoparticelle polimeriche ibride fluorescenti contenenti PLGA marcato con Cianina-5 (analisi in citofluorimetria). Dopo 24 ore dall'inizio del trattamento di trasfezione, il 99% delle cellule è risultato positivo per la Cianina-5, evidenziando l'efficacia di internalizzazione cellulare delle nanoparticelle (Figura 8).

Ulteriori test cellulari sono stati effettuati trasfettando per 24 ore le cellule AHCFs con le nanoparticelle polimeriche ibride incapsulanti il miR-1 oppure il controllo negmiR. Al fine di un confronto nelle prestazioni, le stesse cellule sono state trasfettate con le particelle lipidiche di DE-DOPE/miRNA. Valutata tramite Droplet Digital PCR (ddPCR), l'espressione di miR-1 è aumentata significativamente utilizzando i due tipi di nanoparticelle caricate con miR-1 (lipidiche o ibride), rispetto ai controlli (Figura 9: immagine a sinistra). Inoltre la downregolazione di Twf1 è risultata paragonabile per i due casi sperimentali di trasfezione con particelle lipidiche o ibride a rilascio di miR-1 (Figura 9: immagine a destra).

i) Incapsulamento di miRcombo: dimensioni idrodinamiche e potenziale-Z

Infine, sono stati incapsulati 4 miRNA (miRcombo) nelle nanoparticelle ibride, valutandone le caratteristiche fisicochimiche. L'incapsulamento di miRcombo non altera le dimensioni idrodinamiche, il potenziale-Z, il PDI e l'efficacia di incapsulamento delle nanoparticelle, rispetto al caso di incapsulamento

di un singolo miRNA, come mostrato dai dati riportati in Tabella 2.

Tabella 2. Caratteristiche delle nanoparticelle di PLGA/DE-DOPE/miRcombo valutate tramite analisi DLS.

Nanoparticelle	Size (nm)	PDI	Z-potential (mV)	EE %
PLGA/DE-DOPE/miRcombo	177 ± 18	0.28 ± 0.02	-41 ± 2	99.0 ± 0.2

In Figura 10 sono confrontate le proprietà delle particelle ibride incapsulanti un solo miRNA (NegmiR) con quelle delle nanoparticelle ibride incapsulanti miRcombo (4 miRNA con dose totale pari al contenuto di NegmiR delle altre particelle) che mostrano chiaramente le stesse caratteristiche di diametro idrodinamico, potenziale Z e PDI.

j) Analisi DLS delle nanoparticelle di PLGA/DE-DOPE/miRcombo incubate in DMEM+FBS

La stabilità in mezzo di coltura (DMEM+FBS) delle nanoparticelle di PLGA/DEDOPE/miRcombo è simile a quella delle nanoparticelle di PLGA/DE-DOPE/negmiR (Figura 11). Dopo 48h di incubazione sono state osservate lievi variazioni della dimensione media delle nanoparticelle di PLGA/DE-DOPE/miRcombo. La dimensione idrodinamica media iniziale delle nanoparticelle di PLGA/DE-DOPE/miRcombo in DMEM+FBS era di 167 nm ed è aumentata fino a 275 nm dopo 48 ore di incubazione. Inoltre, si è osservato un ulteriore aumento del diametro idrodinamico dopo 7 giorni (410 nm) per la possibile formazione di una corona proteica. Il potenziale zeta delle nanoparticelle in DMEM+FBS è risultato di -10 mV (quindi superiore al valore assunto in acqua Milli-Q) rimanendo stabile per l'intero periodo dello studio. Questa variazione potrebbe essere il risultato di un'interazione della superficie delle NP con le proteine del siero. Infine, i valori

di PDI dopo 48 ore di incubazione sono risultati stabili, riscontrando quindi che le nanoparticelle di PLGA/DE-DOPE/miRcombo mantengono una buona stabilità colloidale in DMEM+FBS durante il periodo di trasfezione (24 ore) e la possibilità di eseguire trasfezioni *in vitro* anche fino a 48 h.

k) Stabilità delle nanoparticelle polimeriche ibride contenenti miRcombo in condizioni di stoccaggio (4°C, acqua Milli-Q).

Il diametro idrodinamico e il potenziale zeta delle nanoparticelle di PLGA/DE-DOPE/miRcombo si mantengono stabili fino a 28 giorni di incubazione a 4°C in acqua Milli-Q (Figura 12)

Il rilascio in condizioni dinamiche in acqua Milli Q di miRcombo *in vitro* a 37°C viene completato in 168 ore (7 giorni) in analogia al rilascio di NegmiR (Figura 7, Figura 13). Dopo 24 ore, il rilascio è di circa il 75% ed aumenta poi lentamente fino a 7 giorni.

In condizioni fisiologiche invece (PBS), il rilascio è più graduale, raggiungendo il 90% dopo 192 ore (8 giorni), probabilmente a causa dell'adsorbimento superficiale di cationi dal PBS, i quali contribuiscono a rallentare il rilascio dei miRNA (carichi negativamente).

l) Biocompatibilità

Le nanoparticelle caricate con il miRcombo oppure con negmiR sono inoltre biocompatibili con le cellule AHCF, come dimostra il saggio della resazurina condotto fino a 72 ore dall'inizio della trasfezione (Figura 14).

Il saggio Live/Dead effettuato su cellule AHCF dopo 24 ore di trasfezione con nanoparticelle caricate con negmiR o miRcombo (alla stessa dose utilizzata nei test di biocompatibilità) e successiva coltura cellulare fino a 72 ore ha mostrato una vitalità cellulare del 95% (Figura 15).

Inoltre il miRcombo viene rilasciato efficacemente nelle cellule come dimostrato dai saggi cellulari con la valutazione della presenza dei singoli microRNA tramite analisi ddPCR a 48 ore dalla trasfezione (Figura 16).

La valutazione dell'espressione del marcatore cardiaco TNNT2 a 15 giorni di coltura (tramite analisi ddPCR) ha mostrato l'efficacia della somministrazione del miRcombo tramite le nanoparticelle ibride di PLGA/DE-DOPE/miRNA, in quanto ha evidenziato il transdifferenziamento cellulare mediato dal miRcombo. Il transdifferenziamento è più elevato rispetto al trasfettante commerciale Dharmafect (Figura 17).

Variando il rapporto N/P dei complessi lipidici è possibile incapsulare mRNA nella prospettiva di “vaccini a mRNA polimerici ibridi”.

RIVENDICAZIONI

1. Nanoparticelle ibride costituite da un componente polimerico che incapsula liposomi cationici e/o lipoplessi comprendenti un lipide cationico ed eventualmente un lipide helper, in cui il componente polimerico costituisce almeno l'80% in peso rispetto del materiale complessivo costituente le nanoparticelle.
2. Nanoparticelle secondo la rivendicazione 1 in cui il componente polimerico è un polimero singolo o una miscela di più polimeri.
3. Nanoparticelle secondo la rivendicazione 1 o 2 in cui il componente polimerico è scelto fra poliesteri, poli(idrossialcanoati), polipropilenossidi, polimeri o copolimeri metacrilici, policianoacrilati, poliuretani, loro copolimeri con PEG e/o con (polietilen ossido), polimeri naturali eventualmente modificati.
4. Nanoparticelle secondo la rivendicazione 3 in cui i polimeri sono scelti fra acido poli(lattico-co-glicolico), acido poliglicolico, acido polilattico, policaprolattone, poli(lattide-co-caprolattone), poli(idrossibutirrato), copolimero poli(idrossibutirrato-co-idrossivalerato), poli(propilen ossido), poli metil metilacrilato, polietilmetacrilato, polibutilmetacrilato, zeina, cellulosa, lignina, amido, butilgliceril pectina.
5. Nanoparticelle secondo una qualunque delle rivendicazioni da 1 a 4 in cui il lipide cationico è costituito da una testa idrofila avente gruppi ammonici, gruppi amminici primari, secondari o terziari, gruppi guanidinici, derivati amminoacidici.
6. Nanoparticelle secondo la rivendicazione 5 in cui il lipide cationico è scelto fra [2-(2,3-didodecilossipropil)-idrossietil] ammonio bromuro, 1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilammonio propano, 1,2-dioleoilossi-3-[trimetilammonio]-propano, dimetil-diocetadecil ammonio bromuro, cetil-trimetil ammonio bromuro; derivati cationici del colesterolo, 2,3-dioleilossi-N-[2-(spermicarboxamido)etil]-

N,N-dimetil-1-propanamino trifluoroacetato, bis-guanidinio-tren-colesterolo.

7. Nanoparticelle secondo una o più delle rivendicazioni da 1 a 6 in cui il lipide helper è costituito da uno o più fosfolipidi scelti fra fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, colesterolo e loro derivati.

8. Nanoparticelle secondo una o più delle rivendicazioni da 1 a 4 in cui i lipoplessi includono polinucleotidi quali: microRNA, siRNA, mRNA, DNA plasmidico e oligonucleotidi antisenso.

9. Nanoparticelle secondo la rivendicazione 8 caratterizzate da un'efficacia di incapsulamento di polinucleotidi superiore al 95%.

10. Nanoparticelle secondo una o più delle rivendicazioni da 1 a 9 in cui i liposomi cationici o la fase polimerica comprendono anche farmaci idrofobici.

11. Nanoparticelle secondo una o più delle rivendicazioni da 1 a 10 in cui il polimero è funzionalizzato con uno o più ligandi.

12. Nanoparticelle secondo la rivendicazione 11 in cui il ligando è un anticorpo, un frammento di anticorpo che si lega all'antigene (Fab), un aptamero, un peptide, un carboidrato, piccole molecole o una combinazione dei precedenti.

13. Metodo per la preparazione delle nanoparticelle delle rivendicazioni 1-12 che comprende la nanoprecipitazione di una soluzione polimerica in una dispersione di liposomi cationici o lipoplessi secondo la rivendicazione 1.

14. Metodo secondo la rivendicazione 13 in cui la nanoprecipitazione avviene per gocciolamento di una soluzione polimerica in solventi organici miscibili in acqua in una dispersione acquosa di liposomi o lipoplessi sotto agitazione.

15. Metodo secondo la rivendicazione 13 in cui la nanoprecipitazione per contatto di una soluzione polimerica in solventi organici miscibili in acqua con una dispersione acquosa di liposomi o lipoplessi avviene in un dispositivo

microfluidico.

16. Metodo secondo le rivendicazioni 13-15, in cui l'oligonucleotide viene incapsulato nelle nanoparticelle con un'efficienza $> 95\%$.

17. Nanoparticelle ottenibili con il metodo delle rivendicazioni 13-16.

18. Nanoparticelle ibride delle rivendicazioni da 1 a 12 o 17 per uso in medicina rigenerativa, nella riprogrammazione cellulare, nel trattamento di tumori e come veicolo per vaccini.

Milano, 23 dicembre 2021

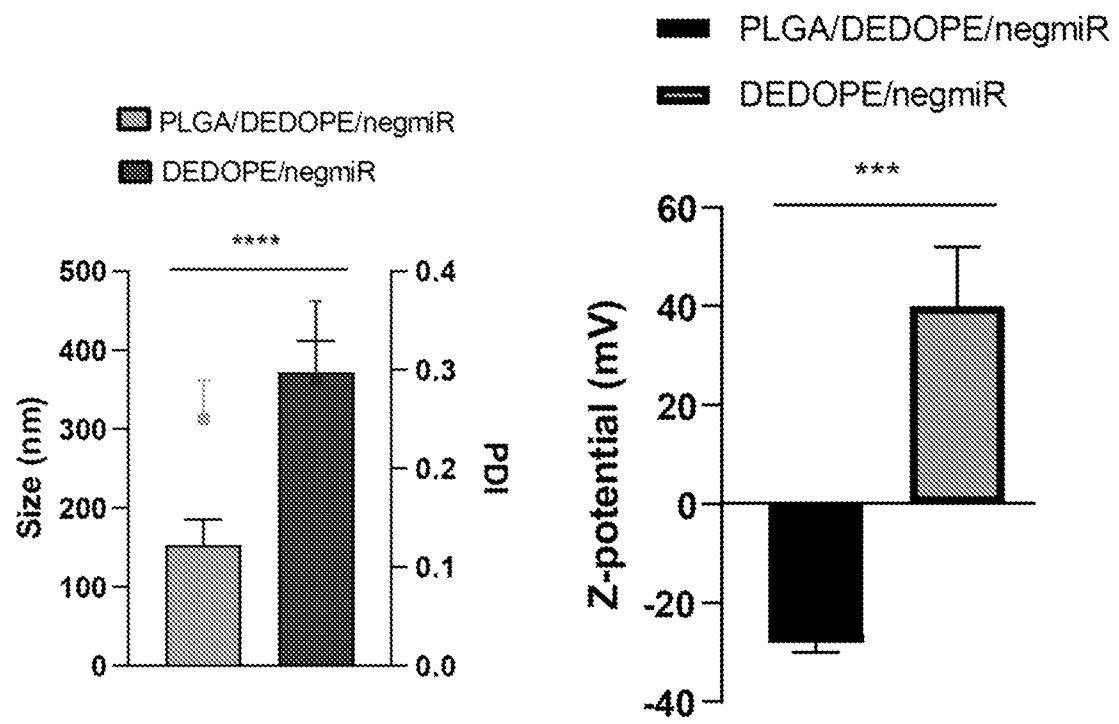


Figura 1

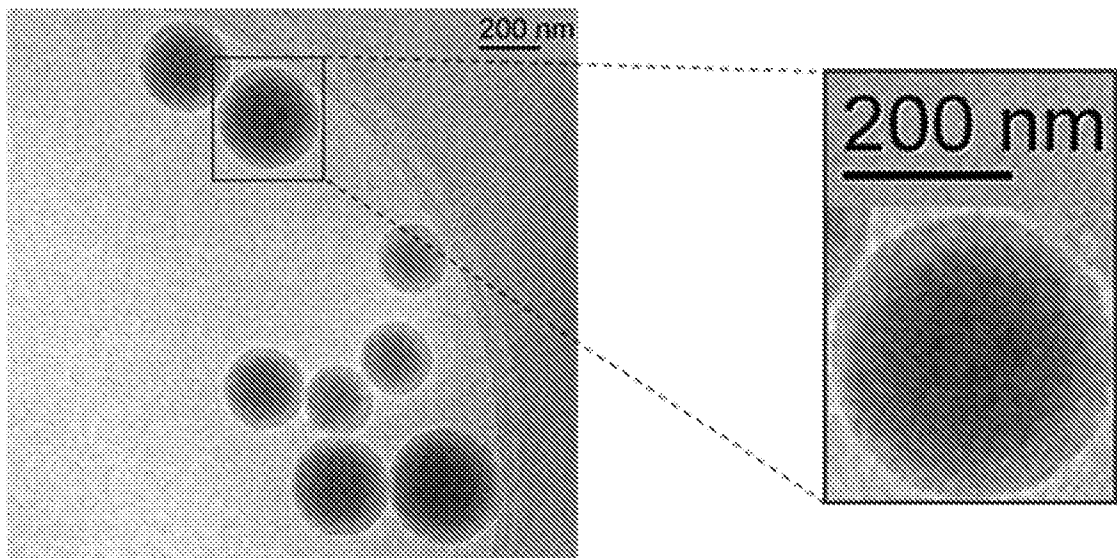


Figura 2

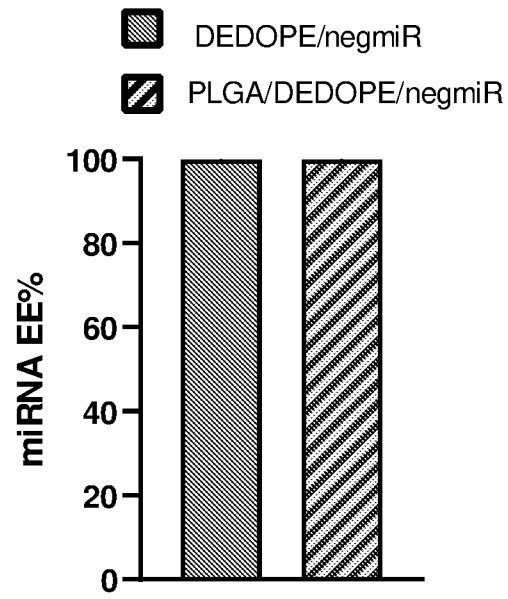


Figura 3

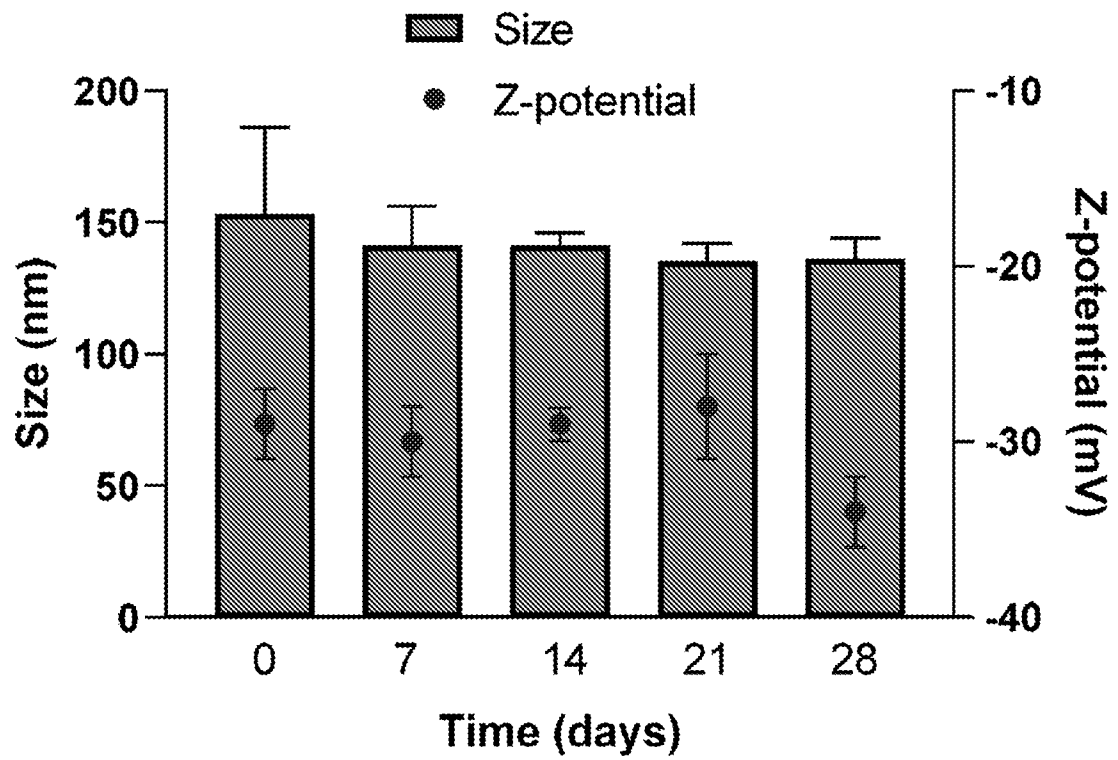


Figura 4

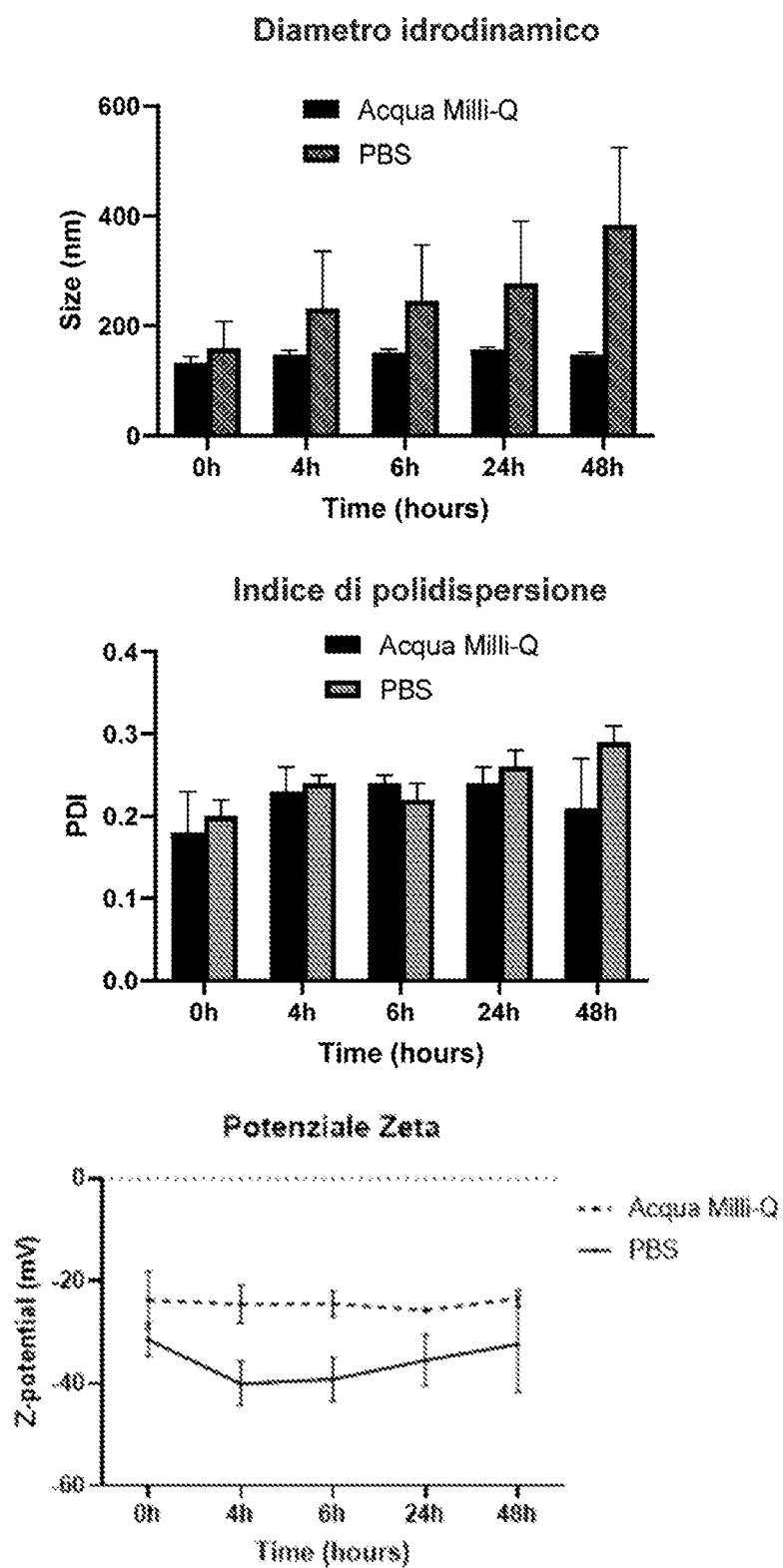


Figura 5

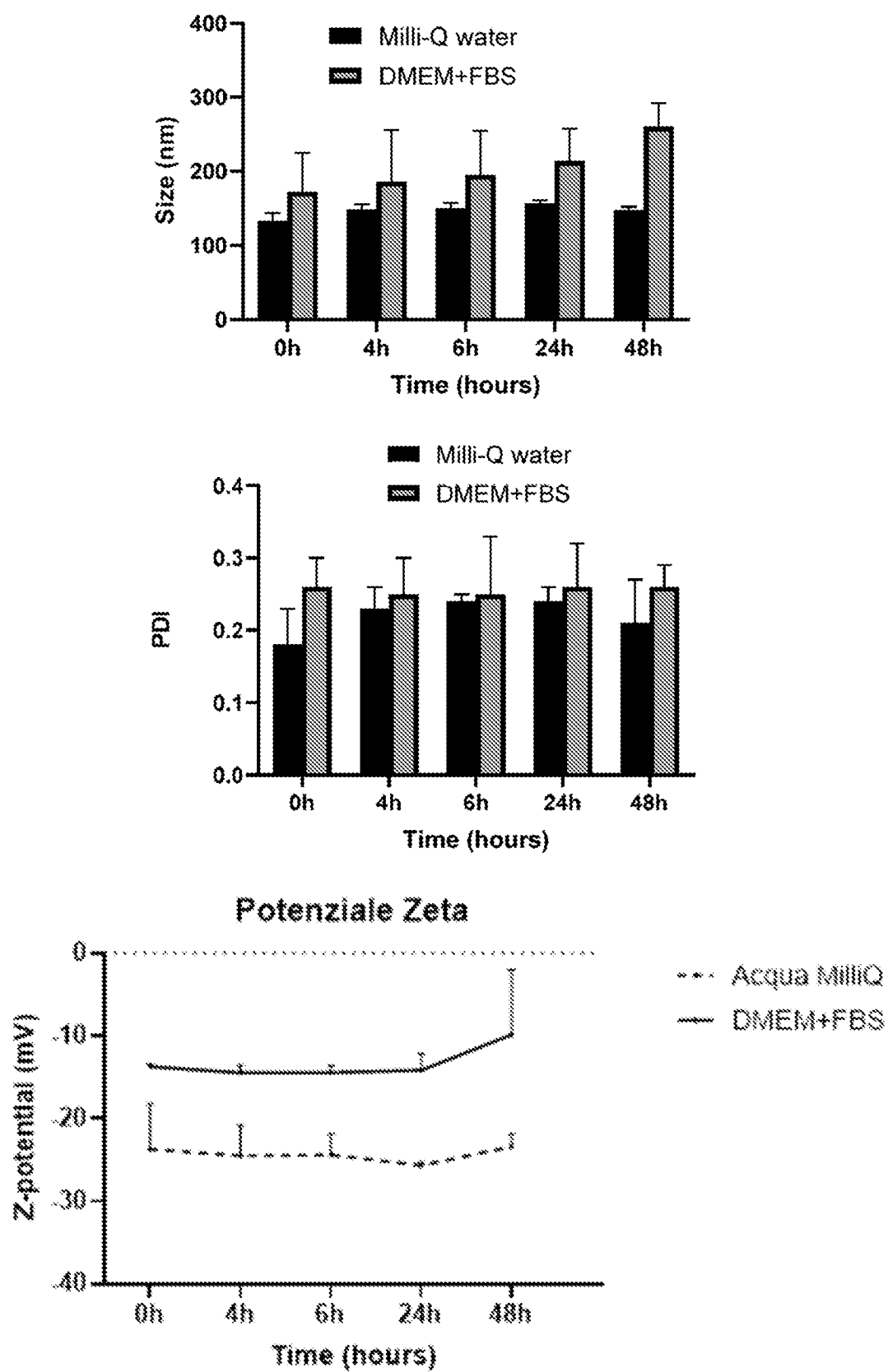


Figura 6

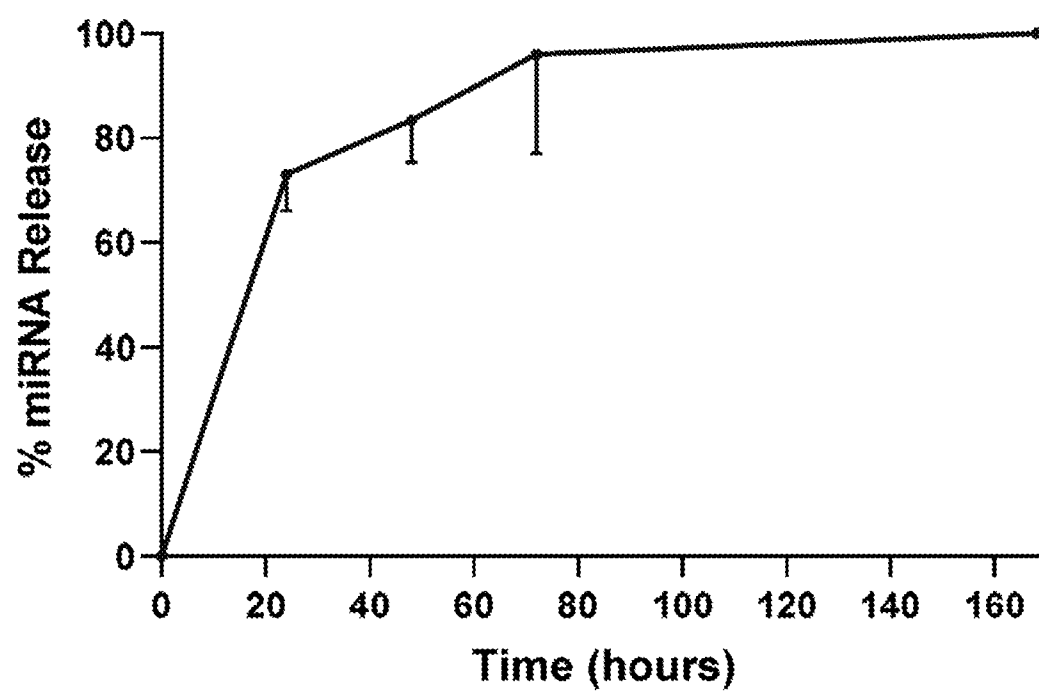


Figura 7

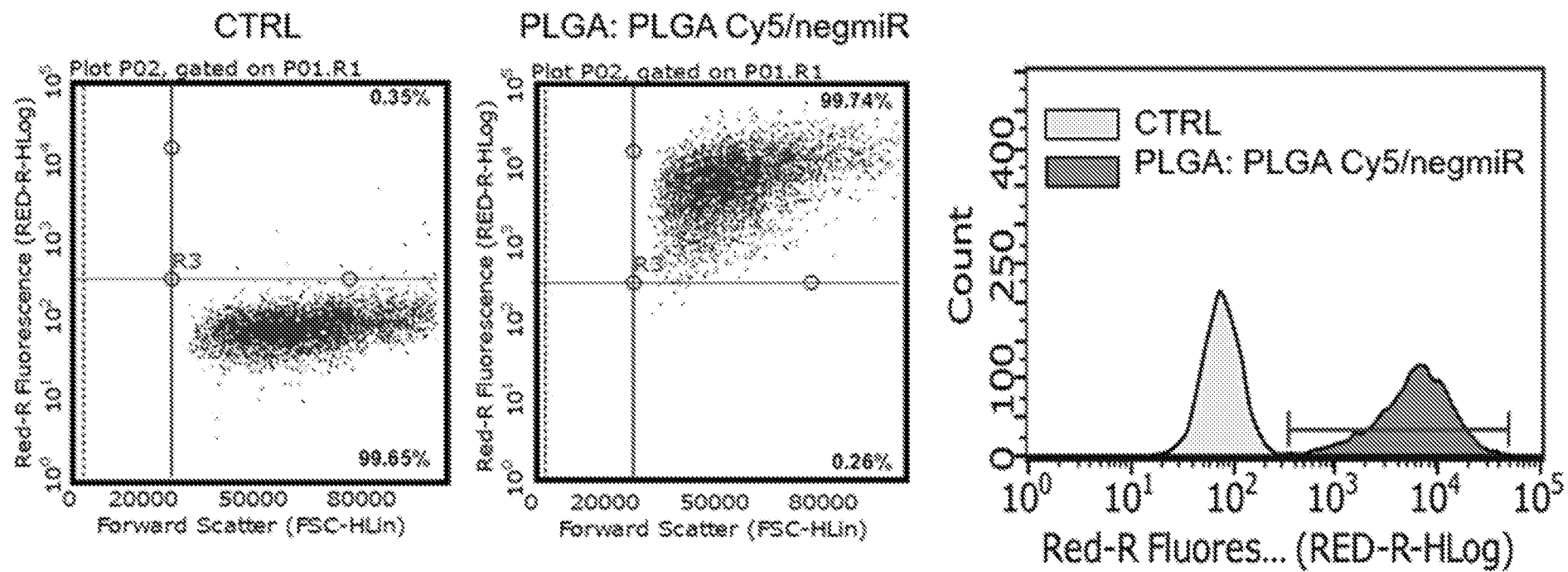


Figure 8

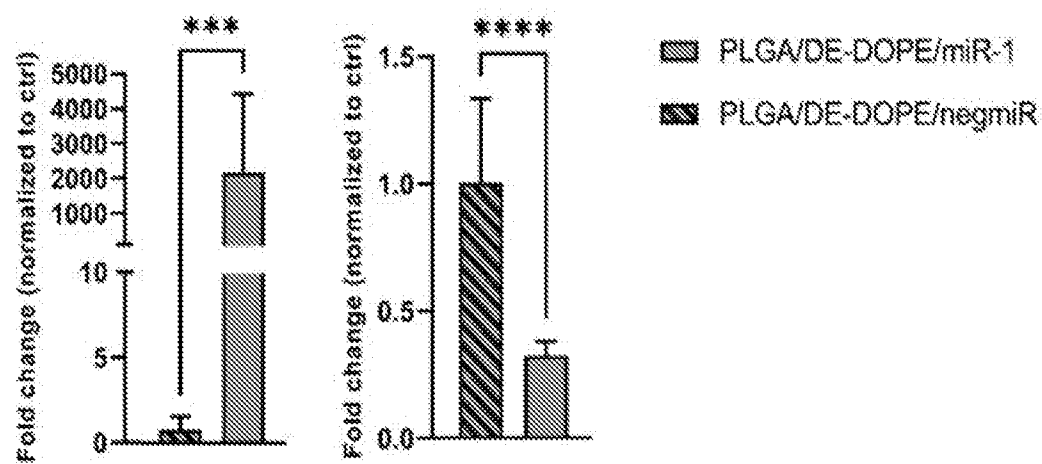


Figure 9

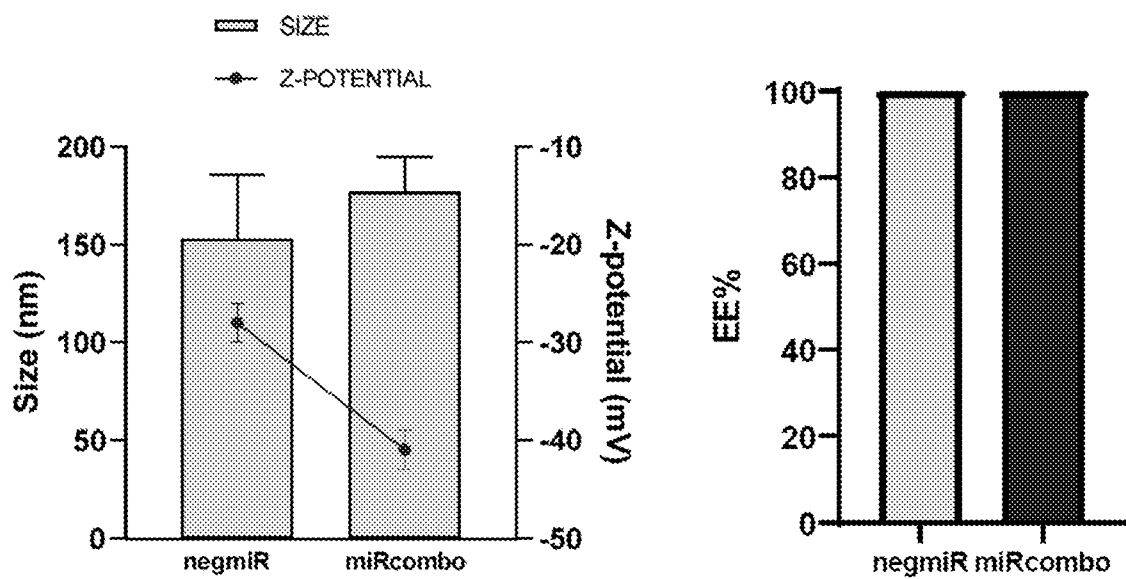


Figure 10

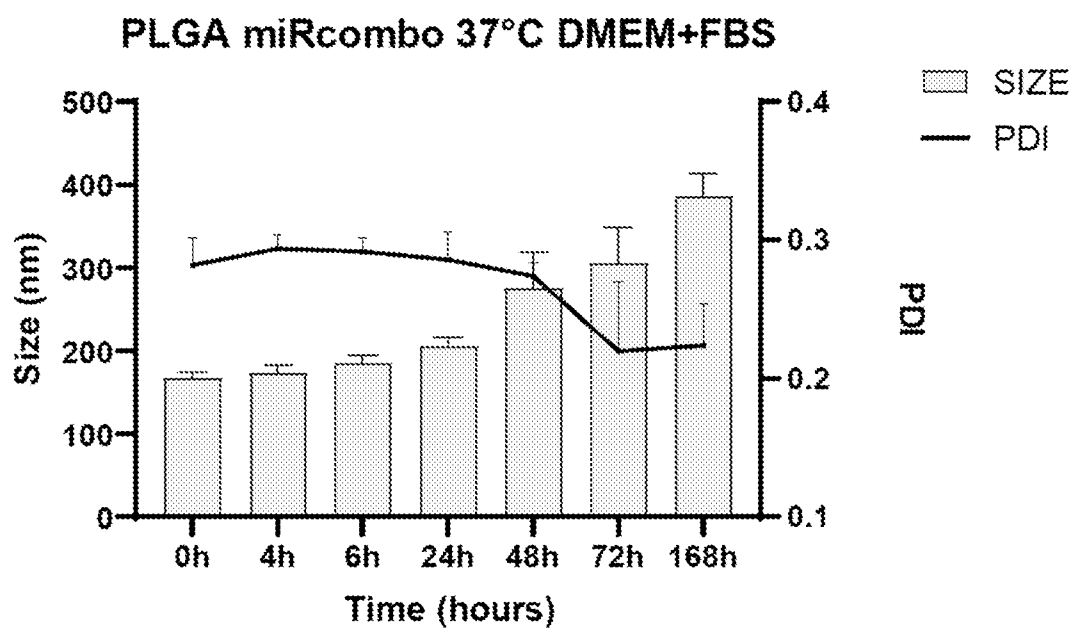


Figura 11

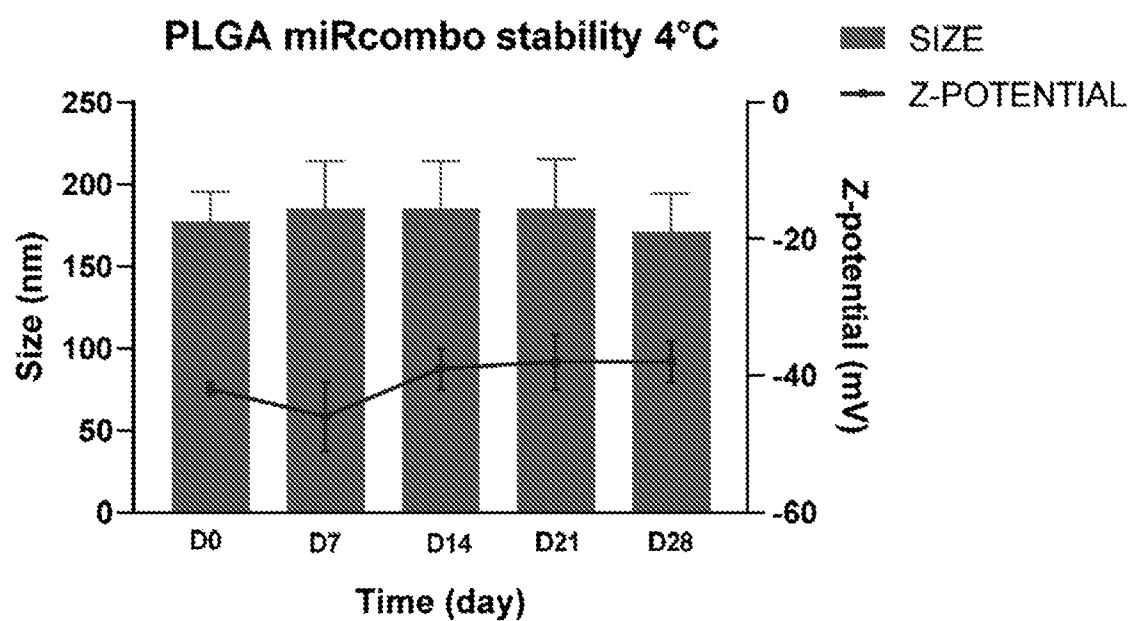


Figura 12

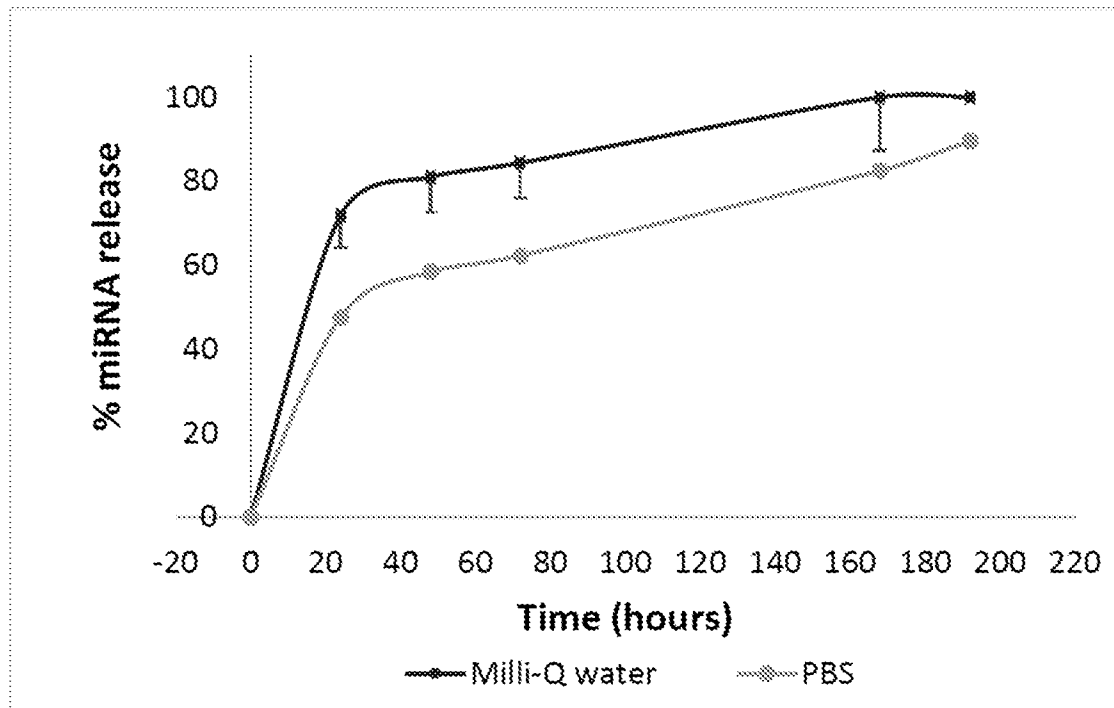


Figura 13

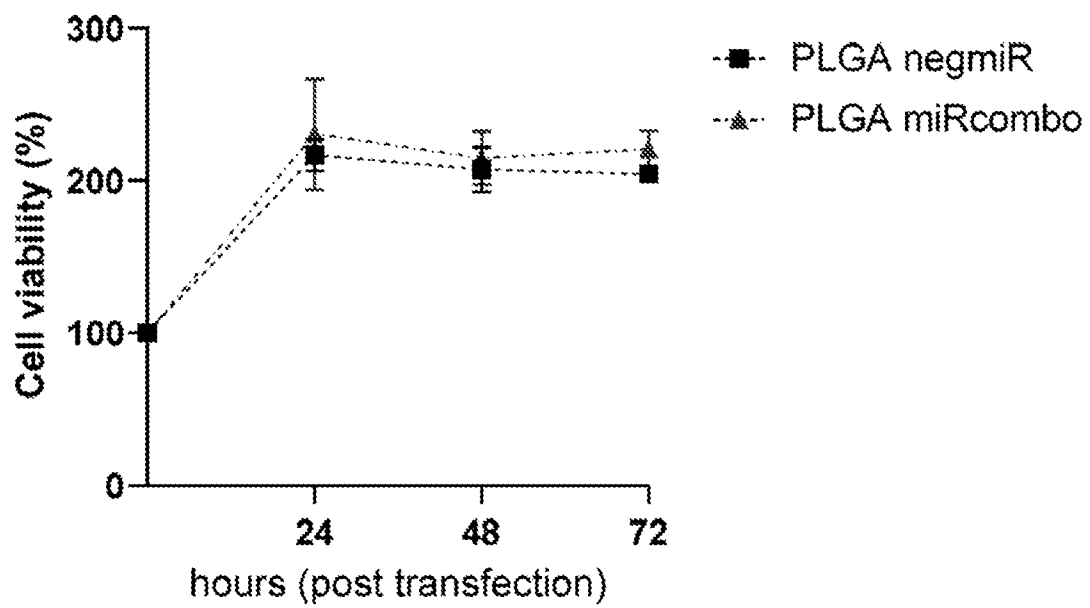


Figure 14

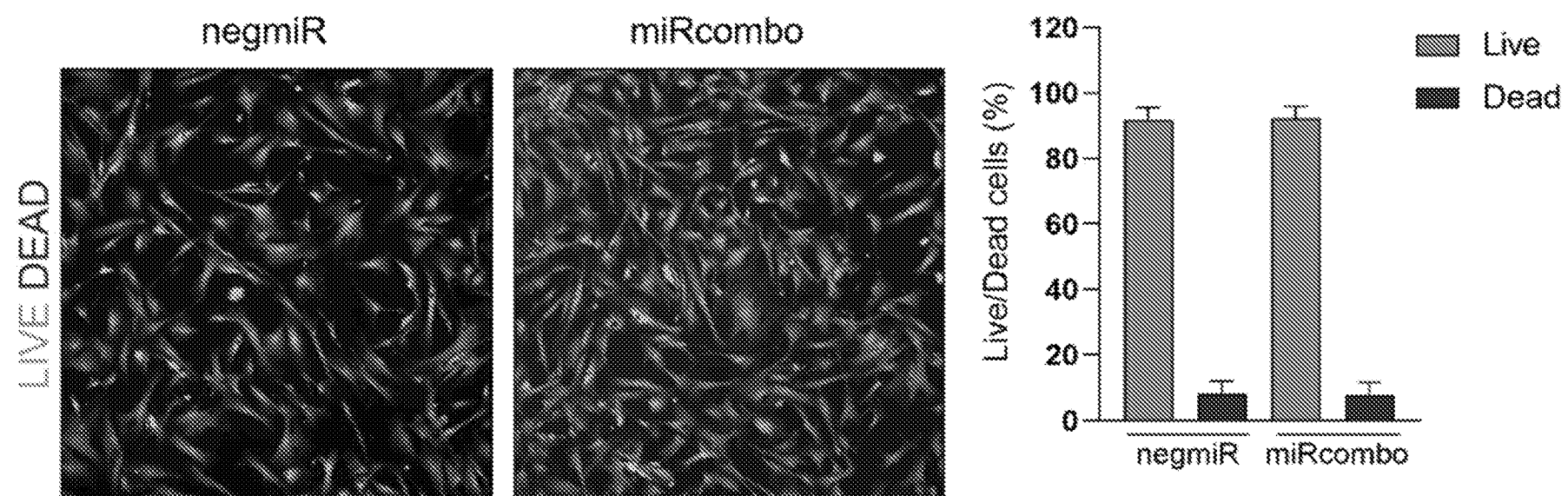


Figure 15

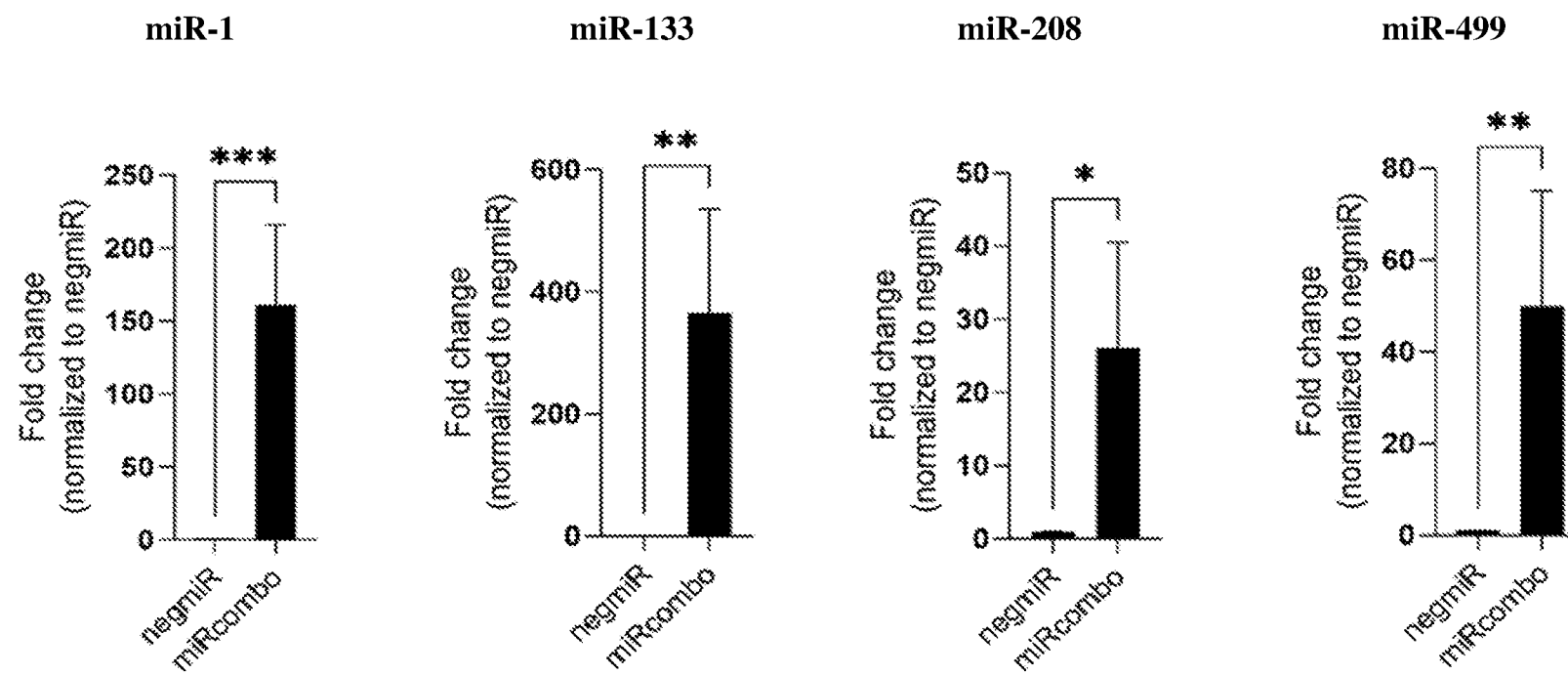


Figure 16

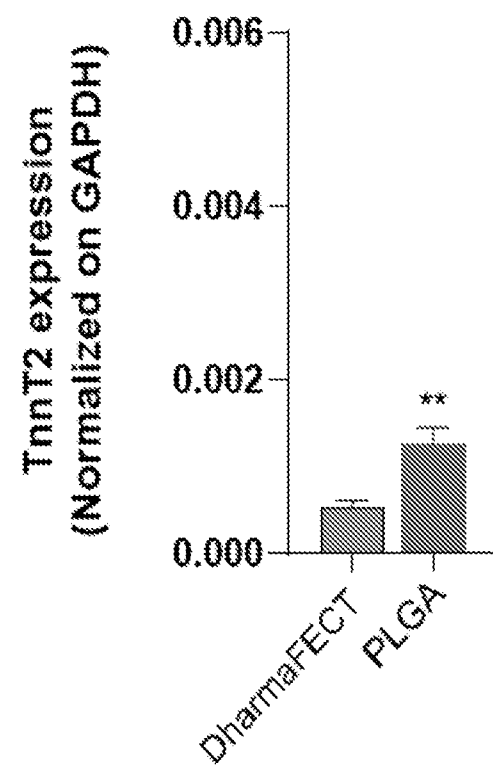


Figure 17