

# ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102012902077714A1

Publication Date

20140214

Applicant

FONDAZIONE ISTITUTO ITALIANO DI TECNOLOGIA

Title

DISPOSITIVO E METODO PER DETERMINARE LA CINETICA DI  
DISSOLUZIONE DI NANOPARTICELLE COLLOIDALI

## DESCRIZIONE

del brevetto per invenzione industriale dal titolo:

“DISPOSITIVO E METODO PER DETERMINARE LA CINETICA DI DISSOLUZIONE DI NANOPARTICELLE COLLOIDALI”

di FONDAZIONE ISTITUTO ITALIANO DI TECNOLOGIA

di nazionalità italiana

con sede: VIA MOREGO 30

GENOVA (GE)

Inventori: POMPA Pier Paolo, SABELLA Stefania, CINGOLANI

Roberto

\* \* \*

La presente invenzione è relativa a un dispositivo e a un metodo per determinare la cinetica di dissoluzione di nanoparticelle colloidali in corrispettivi ioni di derivazione in una soluzione, e a un relativo metodo per valutare in vitro la tossicità delle stesse nanoparticelle colloidali.

Le nanoparticelle (da qui in seguito, anche indicate come NP) sono particelle formate da aggregati atomici o molecolari con un diametro dell'ordine dei nanometri.

Una particolare classe di NP, quella delle nanoparticelle colloidali costituite da metalli e ossidi metallici, è utilizzata sempre più frequentemente nel campo biomedicale per via delle sue proprietà chimico-fisiche particolarmente vantaggiose. Queste nanoparticelle possono

essere infatti utilizzate come nanosensori di marcatori tumorali per una più rapida ed efficace diagnosi di tumori e come agenti di contrasto nella diagnostica per immagine in vivo. Vi sono inoltre vari esempi di nanoparticelle colloidali funzionalizzate con diversi ligandi o caricate con diversi tipi di farmaci che vengono impiegate come vettori farmaceutici per il rilascio mirato e controllato di farmaci antitumorali.

Più in particolare, sono di notevole interesse per usi biomedici i Quantum Dots (QD), le nanoparticelle di ossido di ferro (IONP), le nanoparticelle di oro (AuNP) e le nanoparticelle di argento (AgNP), le cui caratteristiche e utilizzi biomedici sono descritti di seguito.

I Quantum Dots (QD) sono nanocristalli colloidali costituiti da metalli semiconduttori. Essi presentano delle proprietà ottiche ed elettriche che possono essere controllate dalla dimensione nanometrica. I QD sono delle nanoparticelle fluorescenti, il cui spettro di emissione in fluorescenza presenta un'intensità maggiore se paragonata a quella di fluorofori fluorescenti convenzionali. Presentano una elevata fotostabilità, uno spettro di emissione molto selettivo e una banda di assorbimento molto ampia. Per applicazioni biomedicali, le suddette caratteristiche spettrali rendono i QD fluorofori eccellenti per effettuare imaging ottico intracellulare con elevati tempi di analisi

(in inglese, "long-term in vivo imaging"). Le proprietà ottiche dei QD sono determinate dalla peculiare composizione chimica delle nanoparticelle, in quanto costituite da un nucleo (core) di materiali semiconduttori appartenenti ai gruppi 12 e 16 della tavola periodica (CdSe, CdTe, e ZnS) o ai gruppi 13 e 15 (InP e GaN). I processi di sintesi per i QD possono essere mediati sia da fasi acquose sia da fasi organiche e diverse sono le opzioni sintetiche che permettono l'ottenimento di molte dimensioni e forme di QD (core-shell, QD solubili in acqua ricoperti da diverse molecole, ecc.). I QD sono costituiti da metalli pesanti e per essi si è dimostrata una notevole citotossicità in vitro e in vivo. E' noto che il rilascio di ioni cadmio porta a fenomeni di tossicità che sono fortemente correlati alla tossicità dello ione.

Le nanoparticelle di ossido di ferro (IONP) fanno parte della classe delle NP ossido metalliche. In particolare, le IONP sono nanoparticelle di ossido di ferro con proprietà ferromagnetiche. Le IONP possono essere ottenute mediante diverse procedure di sintesi e in diverse dimensioni, tuttavia per applicazioni biomedicali sono utilizzate nanoparticelle di dimensioni più piccole date le proprietà superparamagnetiche di queste ultime. Infatti, solo le nanoparticelle di piccole dimensioni presentano un notevole magnetismo esclusivamente in presenza di un campo

magnetico. In assenza di esso, non sono accoppiati fenomeni di magnetismo residuo data la presenza di un solo e singolo dominio di Weiss. Le IONP vengono ampiamente utilizzate come fluorofori e nuovi agenti di contrasto per MRI (imaging a risonanza magnetica), come nuovi vettori anticancro in terapie basate sull'ipertermia e come nuovi farmaci per il rilascio controllato e intelligente dei farmaci e terapie geniche. Anche per le IONP le procedure di sintesi permettono la produzione di numerose varianti di nanoparticelle presentanti una notevole varietà di ligandi sulla superficie. Alcune formulazioni ricoperte da destrani sono approvate dalla FDA come agenti di contrasto per MRI. Tipicamente, le IONP rilasciano ioni ferrosi che sono dei naturali ligandi intracellulari. Essi vengono metabolizzati da una proteina intracellulare specializzata, la ferritina, che ne controlla il bilancio intracellulare. Storicamente queste NP non sono ritenute citotossiche, tuttavia, un eccesso nel rilascio di tale ione può portare ad effetti molto tossici nella cellula.

Le nanoparticelle di oro (AuNP) rappresentano una classe ampissima di nanoparticelle prodotte in diverse dimensioni che vanno da nanoclusters (pochi atomi di oro e dimensioni inferiori a 1-3 nm) a dimensioni nell'intervallo da 100 a 200 nm. Inoltre possono avere diverse forme (nanosfere, nanocubi, nanotriangoli, nanocilindri, ecc.) e

diversi ligandi sulla superficie (molecole di polietilglicole, DNA, proteine, peptidi, farmaci, molecole fotosensibili, ecc.). Le applicazioni biomedicali per le nanoparticelle di oro sono numerose e vanno da sensoristica per diagnostica (rivelazione selettiva di bersagli tumorali quali DNA, microRNA, proteine, cellule, ecc.), a farmaci per la terapia del cancro, trattamenti anticancro basati sull'ipertermia, fino ad applicazioni industriali come catalizzatori, sensori ecc. Le AuNP possono assorbire o fare scattering della luce incidente con una specifica lunghezza d'onda producendo un fenomeno definito risonanza plasmonica di superficie (localised surface plasmon resonance, o LSPR). Il picco di LSPR può essere controllato fino a lunghezze d'onda nella regione "near-IR" (800-1100 nm). Essendo questa una regione trasparente per i tessuti organici, questa caratteristica appare di fondamentale importanza se si pensa all'utilizzo di queste NP come nuovi agenti di contrasto. Tipicamente l'oro in bulk (su macroscala) è ritenuto biocompatibile e per molto tempo si è ritenuto che le NP non fossero tossiche per semplice paragone con l'oro in bulk. Tuttavia, nell'ultimo decennio, un'ampia letteratura scientifica ha dimostrato che le NP di oro sono citotossiche, genotossiche e mutageniche sia in vitro sia in vivo.

Le nanoparticelle di argento (AgNP) possiedono delle

proprietà ottiche, elettriche e termiche uniche e, per questa ragione, vengono attualmente incorporate in numerosi prodotti commerciali che variano dal fotovoltaico ai sensori chimici e biologici. Altri esempi di applicazioni includono gli inchiostri conduttivi, colle e riempitivi, nei quali le nanoparticelle di argento sono ampiamente utilizzate per la loro alta conduttività elettrica e per la loro stabilità. Vi è inoltre un grande interesse nell'utilizzare le nanoparticelle di argento come componente funzionale di sensori. Queste nanoparticelle sono infatti straordinariamente efficienti nell'assorbire e nel diffondere la luce e, al contrario degli altri coloranti e pigmenti a base organica, presentano un colore che varia e dipende strettamente dalla loro dimensione e forma. Questa forte interazione tra le nanoparticelle di argento e la luce incidente è dovuta principalmente agli elettroni di conduzione presenti sulla superficie metallica, i quali subiscono un fenomeno di oscillazione collettiva se eccitati da una sorgente luminosa ad una specifica lunghezza d'onda. Meglio conosciuta come risonanza dei plasmoni di superficie (SPR), questa oscillazione produce un inusuale e forte fenomeno di diffusione ed assorbimento. Un'altra proprietà ottica unica è che l'SPR delle nanoparticelle sferiche di argento può essere modulato da 400 nm (viola) fino a 530 nm (verde)

cambiando semplicemente la loro dimensione. Spostamenti più pronunciati nel picco di surface plasmon resonance (SPR) (fino alla regione del vicino IR nello spettro) possono essere ottenuti producendo nanoparticelle di argento con forma bastoncellare o a placca. In aggiunta a queste specifiche caratteristiche ottiche, recentemente le AgNP sono state ampiamente impiegate in diversi tipi di rivestimenti, tessuti, tastiere, apparati medicamentosi e dispositivi biomedici data la loro spiccata capacità antibatterica. Tuttavia, nonostante l'abbondante presenza di AgNP sul mercato mondiale, molte delle relazioni tra proprietà antibatteriche ed effetti citotossici non sono note. Questo punto è fortemente preoccupante considerando il grado di commercializzazione di prodotti contenenti nanoparticelle di argento.

Per l'utilizzo in campo biomedico, pertanto, le nanoparticelle devono essere caratterizzate in modo completo e approfondito sia da un punto di vista chimico-fisico, sia da un punto di vista tossicologico.

Questa caratterizzazione deve avvenire sia nella fase in cui vengono prodotte le nanoparticelle (in inglese "as supplied"), sia nella fase in cui vengono formulate (cioè nei mezzi biologici e nelle soluzioni disperdenti impiegate nelle applicazioni biomediche *in vivo*, in inglese "as dispersed"). Le proprietà chimico-fisiche delle

nanoparticelle nei mezzi biologici e nelle soluzioni disperdenti impiegate nelle applicazioni biomediche in vivo possono essere infatti molto diverse da quelle "as supplied". Occorre infatti tener conto delle proprietà all'interfaccia e degli effetti indotti da fenomeni di adsorbimento/assorbimento aspecifico di biomacromolecole quali proteine, zuccheri, peptidi, ecc. contenuti nei liquidi biologici (plasma, siero, succo gastrico, saliva, etc.). Queste proprietà guidano l'interazione delle nanoparticelle con le cellule (ad esempio, l'efficienza di internalizzazione cellulare che varia con le dimensioni delle nanoparticelle), l'interazione delle nanoparticelle con i compartimenti cellulari, la stabilità intracellulare delle nanoparticelle stesse (ad esempio, uno specifico rivestimento può preservare o accelerare la degradazione delle nanoparticelle), la maggiore o minore biopersistenza nel plasma o in altri liquidi biologici (ad esempio, nanoparticelle coniugate a molecole di polietilglicoli possono essere parzialmente non riconosciute dal sistema immunitario e quindi presentare un'emivita nel sangue più duratura).

Sia la caratterizzazione chimico-fisica, sia la valutazione della tossicità delle nanoparticelle in ambiente biologico sono di difficile determinazione per i seguenti motivi.

Innanzitutto, le peculiari proprietà chimico-fisiche, come la dimensione, la forma, la carica, l'area e la topografia superficiale sono difficili da misurare nei liquidi biologici e/o *in vivo* data la loro repentina variabilità.

Inoltre, i saggi biologici vengono tipicamente condotti seguendo le normali metodiche impiegate per piccole molecole solubili, e, pertanto, nella maggior parte dei casi, risultano inadeguati e/o non standardizzati per la misura dell'effetto citotossico delle nanoparticelle.

Ancora, le proprietà ottiche delle nanoparticelle interferiscono talvolta con i saggi di citossicità.

Infine, diversi tipi di nanoparticelle sono provvisti di rivestimenti (coatings) che conferiscono loro proprietà particolari, e il cui comportamento chimico-fisico non è sempre prevedibile.

La tossicità sull'uomo e sull'ambiente delle NP può tra l'altro essere dovuta più semplicemente al contenuto di un elemento tossico oppure, in modo più complesso, alla trasformazione di un elemento normalmente non tossico in un componente tossico in seguito all'interazione delle nanoparticelle con cellule, tessuti o liquidi biologici.

E' pertanto sentita la necessità nel settore di disporre di dispositivi e metodi che consentano di effettuare test di stabilità (ovvero di dissoluzione o

disgregazione) di un'ampia gamma di nanoparticelle colloidali in ambienti controllati, vale a dire in condizioni di temperatura, solvente e pH che mimino gli ambienti dei diversi compartimenti del corpo umano (ad esempio, bolo gastrico o intestinale) o cellulare (ad esempio, ambiente lisosomiale, endosomiale, citoplasmatico, ecc.), e che permettano la misurazione nel tempo della concentrazione degli ioni in cui la nanoparticella si dissolve quando è incubata in questi ambienti (cinetica di rilascio).

E' inoltre sentita la necessità nel settore di disporre di dispositivi e metodi che consentano di valutare la tossicità delle stesse nanoparticelle colloidali in ambienti controllati in vitro e in vivo. L'effetto tossico delle nanoparticelle è correlato alla cinetica di dissoluzione delle stesse in quanto dipende dalla cinetica di rilascio dello ione di derivazione (per es.,  $\text{Au}^{+3+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ , ecc.), il quale esercita la specifica tossicità intracellulare nei vari tessuti e/o organelli bersaglio (ad esempio lisosomi) da cui diffonde.

Per valutare la stabilità (o dissoluzione o disgregazione) di prodotti e formulazioni farmaceutici tradizionali, è noto utilizzare dispositivi che permettono di determinare la cinetica di rilascio dei principi attivi contenuti nelle formulazioni farmaceutiche, come ad esempio

suppositori, granulati, compresse, capsule, soluzioni iniettabili a base di microcapsule, liposomi ecc.

Questi dispositivi comprendono tipicamente tre componenti:

- un contenitore per la soluzione dissolvente;
- un componente per alloggiare la formulazione farmaceutica da dissolvere, che permette di disperdere la molecola dissolvente solubile nella soluzione dissolvente trattenendo la formulazione farmaceutica durante la fase di dissoluzione; e
- un dispositivo di campionamento della soluzione dissolvente in cui è stata disiolta la formulazione farmaceutica.

Il contenitore per la soluzione dissolvente ("vessel") è tipicamente un grosso bicchiere di volume variabile da 250 mL a 1 L. I "vessels" possono essere collegati in serie o in parallelo e sono in generale in numero di 6 o 12 per analisi su più canali.

Il componente per alloggiare la formulazione farmaceutica da dissolvere è invece costituito alternativamente da cestello ("basket"), paletta ("palette") o cella di flusso ("flow cell"), a seconda del tipo di formulazione farmaceutica che si vuole analizzare.

Il dispositivo di campionamento può funzionare secondo due modalità: "open loop" o "closed loop".

Nei sistemi "open loop" si preleva manualmente o mediante una pompa, ad intervalli di tempo regolari, un volume noto di soluzione dissolvente e, successivamente, la molecola rilasciata ivi contenuta, viene rilevata e quantificata mediante strumentazione opportuna (ad esempio spettroscopi UV-visibile, HPLC, spettroscopia di emissione atomica a plasma accoppiato induttivamente (ICP-AES), ecc.).

I sistemi "closed loop" (con ricircolo) sono invece usati soprattutto nel caso di dissolutori con celle di flusso e quando si analizzano concentrazioni molto basse di principio attivo poco solubile. Il segnale rilevato viene accumulato nel tempo, in quanto la soluzione dissolvente si arricchisce nel tempo della molecola rilasciata. In questo caso, il sistema di rivelazione è integrato nella macchina. Attualmente esistono solo dissolutori con spettroscopio UV-visibile integrato.

Per lo studio della dissoluzione di nanoparticelle colloidali, i sistemi basati sull'uso di cestelli o palette sarebbero del tutto inadatti a separare la nanoparticella dallo ione di derivazione.

Il sistema a cella di flusso sarebbe inoltre difficilmente adattabile a questo utilizzo, a causa dei seguenti svantaggi.

Innanzi tutto, questi sistemi implicano una campionatura solo una volta che la dissoluzione è stata completata.

Inoltre, l'utilizzo di una membrana da dialisi nei sistemi a celle di flusso presenta una serie di problemi legati al fatto che la membrana può saturarsi con aggregati di nanoparticelle che possono formarsi durante la dissoluzione in agenti acidi dando così delle occlusioni. In questa situazione, la velocità di diffusione degli ioni rispecchia la velocità di diffusione attraverso la membrana e non quella di rilascio della nanoparticella.

La dialisi, poi, è un processo molto lungo (anche della durata di giorni) e potrebbe alterare o sfalsare i tempi di cinetica di rilascio. Inoltre i tempi operativi del saggio sarebbero eccessivamente lunghi.

Ancora, la cella di flusso è bloccata a monte e a valle da filtri e biglie al fine di trattenere ed evitare la dispersione della formulazione che si sta dissolvendo. Nel caso di nanoparticelle, non è detto che i sistemi filtranti inseriti (generalmente superiori a 0.1  $\mu\text{m}$ ) siano

sufficienti a bloccarne il passaggio.

Un ulteriore problema è dato dal fatto che, data la bassa concentrazione in cui generalmente le nanoparticelle vengono prodotte, sarebbe auspicabile il modello "closed loop". Tuttavia, al momento, non vi sono modelli "closed loop" equipaggiati di sistemi di rivelazione del tipo ICP-AES (spettroscopia di emissione atomica a plasma accoppiato induttivamente) adatti alle nanoparticelle.

Infine, i materiali costituenti la cella di flusso sono spesso inadatti all'uso con nanoparticelle a causa dell'adesione aspecifica di nanoparticelle sulle pareti con conseguente precipitazione delle stesse.

US6004822 descrive un dispositivo per determinare la solubilità di composti chimici in un solvente. Il dispositivo comprende un primo e un secondo compartimento, che sono in comunicazione fluidica e separati da una membrana che impedisce il passaggio di composto non disciolto. Un sistema di due pistoni è fornito per indurre il passaggio della soluzione di solvente e soluto da un compartimento all'altro.

Questo dispositivo presenta numerosi svantaggi che lo rendono inapplicabile ai test di stabilità di nanoparticelle colloidali.

Innanzitutto la determinazione della solubilità avviene in condizioni di equilibrio, cioè a saturazione in seguito alla formazione di un corpo di fondo. E' evidente che queste condizioni non possono in alcun modo mimare le condizioni che sussistono in soluzioni biologiche all'interno di organi o cellule umane. In una situazione che riproduca un ambiente biologico, il rapporto tra quantità di nanoparticelle e solvente sarà molto inferiore rispetto alle condizioni di saturazione. Anche volendo raggiungere le condizioni di saturazione, l'elevato consumo di nanoparticelle per i test avrebbe come risultato uno spreco eccessivo e un costo proibitivo del saggio.

Inoltre, le condizioni di dissoluzione in un ambiente biologico non sono nemmeno lontanamente riproducibili nel dispositivo di US6004822, infatti la dissoluzione del soluto nella soluzione è indotta mediante il passaggio forzato attraverso un filtro in un sistema a flusso laminare (la comunicazione tra i due contenitori avviene a mezzo di un capillare).

Inoltre, il tipo di membrana utilizzata nel dispositivo descritto in US6004822 permetterebbe il passaggio delle nanoparticelle e non consentirebbe la separazione degli ioni di derivazione in modo da poterne

determinare la concentrazione nel tempo.

Ancora, i materiali da cui sono formate le pareti dei compartimenti del dispositivo descritto in US6004822 sono di un polimero polimetil metacrilato, un materiale che indurrebbe l'adsorbimento delle nanoparticelle e la precipitazione delle stesse o formazione di film metallici sulla parete.

Non esistono pertanto ad oggi metodi e dispositivi che consentano di determinare la cinetica di dissoluzione di nanoparticelle colloidali in liquidi acquosi o biologici e valutare in vitro la tossicità delle stesse.

Uno scopo della presente invenzione è pertanto di fornire un dispositivo per determinare la cinetica di dissoluzione di nanoparticelle colloidali in corrispettivi ioni di derivazione in una soluzione che risolva almeno uno degli inconvenienti sopra citati in modo semplice ed economico.

Il suddetto scopo è raggiunto dalla presente invenzione in quanto relativa ad un dispositivo come definito nella rivendicazione 1.

La presente invenzione è altresì relativa a un metodo per determinare la cinetica di dissoluzione di nanoparticelle colloidali in corrispettivi ioni di derivazione in una soluzione come definito nella

rivendicazione 12.

Per una migliore comprensione della presente invenzione viene descritta nel seguito una preferita forma di attuazione, a puro titolo di esempio non limitativo e con riferimento ai disegni allegati, nei quali:

- la figura 1 è una rappresentazione schematica di un dispositivo per determinare la cinetica di dissoluzione di nanoparticelle colloidali in corrispettivi ioni di derivazione in una soluzione secondo la presente invenzione;

- la figura 2 è un grafico che illustra le curve della cinetica di rilascio di corrispondenti ioni da diverse nanoparticelle in soluzione di buffer citrato a pH 4.5 (soluzione che mima il pH dell'ambiente lisosomiale) e in soluzioni acquose a pH neutro a 37°.

Con riferimento alla figura 1, è indicato con 1 un dispositivo per determinare la cinetica di dissoluzione di nanoparticelle colloidali 2 in corrispettivi ioni di derivazione 3 in una soluzione 4.

Il dispositivo 1 comprende essenzialmente:

- un compartimento di dissoluzione 5 alimentabile con la soluzione 4 e con le nanoparticelle colloidali 2;
- un compartimento di analisi 6 separato dal compartimento di dissoluzione 5;
- una membrana filtrante 7 che separa il compartimento

di dissoluzione 5 dal compartimento di analisi 6, è selettivamente permeabile allo ione di derivazione 3 ed è atta a filtrare la soluzione 4;

- mezzi di compressione 8 attivabili per indurre il passaggio della soluzione 4 dal compartimento di dissoluzione 5 al compartimento di analisi 6 attraverso la membrana filtrante 7; e

- un dispositivo di determinazione 9 della quantità dello ione di derivazione 3.

Vantaggiosamente, il dispositivo 1 comprende anche mezzi di miscelazione 10 che sono associati al compartimento di dissoluzione 5, sono atti a miscelare detta soluzione 4, e sono distinti dai mezzi di compressione 8.

Nella fattispecie illustrata, i mezzi di miscelazione 10 possono comprendere un apparecchio 16 in grado di generare un campo magnetico rotante e un'ancoretta 17 che si trova sul fondo del compartimento di dissoluzione 5 e ruota sotto l'influenza del campo magnetico rotante.

Preferibilmente, i mezzi di miscelazione 10 e i mezzi di compressione 8 sono azionabili indipendentemente gli uni dagli altri.

I mezzi di compressione 8 comprendono preferibilmente un pistone 15 mobile all'interno del compartimento di dissoluzione 5 per comprimere la soluzione 4 e indurne il

passaggio dal compartimento di dissoluzione 5 attraverso la membrana filtrante 7 al compartimento di analisi 6.

Il dispositivo 1 comprende preferibilmente un iniettore 11 atto ad alimentare le nanoparticelle colloidali 2 al compartimento di dissoluzione 5. L'iniettore 11 può essere graduato e alimentare con precisione quantità determinate di nanoparticelle 2.

Il dispositivo 1 comprende preferibilmente mezzi di riscaldamento 12 associati al compartimento di dissoluzione 5. I mezzi di riscaldamento 12 hanno la funzione di mantenere la temperatura a 37°C per riprodurre le condizioni di un liquido biologico, o eventualmente di facilitare la dissoluzione delle nanoparticelle colloidali 2 ad altre temperature. I mezzi di riscaldamento 12 possono ad esempio comprendere una piastra riscaldante posta a contatto del fondo inferiore del compartimento di dissoluzione. I mezzi di riscaldamento 12 possono essere integrati nell'apparecchio 16 in grado di generare un campo magnetico rotante.

Il dispositivo di determinazione 9 della quantità di ione di derivazione 3 può preferibilmente comprendere un apparecchio per cromatografia, un apparecchio per elettroforesi, un apparecchio per ICP-AES (spettroscopia di emissione atomica a plasma accoppiato induttivamente) o un apparecchio per ICP-MS (spettrometria di massa a plasma

accoppiato induttivamente).

Per prelevare un campione di detta soluzione filtrata 14 da detta membrana filtrante 7 e contenuta in detto compartimento di analisi 6 si può preferibilmente fornire il dispositivo 1 di un dispositivo di prelievo 13, ad esempio una siringa eventualmente automatizzata.

La membrana filtrante 7 ha preferibilmente pori inferiori a 10 nm, più preferibilmente inferiori a 2 nm, ancor più preferibilmente inferiori a 1 nm.

Preferibilmente, la membrana filtrante 7 può comprendere polietilsulfone (PES), cellulosa rigenerata, polivinildenfluoruro (PVDF), poliacrilonitrile (PAN) o acetato di cellulosa (CA).

Le membrane filtranti 7 utilizzate nel dispositivo 1 secondo l'invenzione sono membrane per ultrafiltrazione, che permettono una separazione meccanica di molecole da una soluzione che contiene soluti di diverse dimensioni eventualmente in un'altra fase (liquida o aeriforme).

Il materiale da cui è costituita la membrana filtrante 7 dovrà essere tale da evitare l'aggregazione di nanoparticelle, in modo da prevenire l'occlusione dei pori della stessa. Esistono diverse modifiche di tali materiali che permettono di aumentare l'idrofilia della superficie e la capacità di recupero del soluto.

Anche il compartimento di dissoluzione 5 è

preferibilmente costituito da un materiale che previene l'adesione delle nanoparticelle 2 e la conseguente precipitazione e/o la formazione di film metallici sulle pareti. Nella fattispecie illustrata il compartimento di dissoluzione è formato da policarbonato.

In uso, il dispositivo 1 implementa un metodo per determinare la cinetica di dissoluzione di nanoparticelle colloidali 2 in corrispettivi ioni di derivazione 3 in una soluzione.

In una prima fase a), una certa quantità delle nanoparticelle colloidali 2 viene disiolta nella soluzione 4 in un primo ambiente, costituito dal compartimento di dissoluzione 5.

In una fase successiva b), la soluzione 4 è compressa mediante il pistone 15 per indurne il passaggio a un secondo ambiente, costituito dal compartimento di analisi 6, che è distinto dal primo ambiente, costituito dal compartimento di dissoluzione 5. La pressione esercitata dal pistone 15 permette di ridurre notevolmente i tempi di separazione dello ione di derivazione 3.

Lo ione di derivazione 3 è separato selettivamente in una fase c) grazie al passaggio della soluzione 4 attraverso la membrana filtrante 7 indotto dalla pressione generata dal pistone 15.

In una fase d), viene poi determinata la quantità

dello ione di derivazione 3.

Le fasi b), c) e d) sono ripetute a intervalli di tempo successivi (fase e)), in modo da poter costruire una curva della concentrazione degli ioni di derivazione 3 in funzione del tempo.

Vantaggiosamente, il metodo comprende inoltre la fase f) di agitare la soluzione 4, distinta dalla fase b) di comprimere.

La fase f) ha lo scopo di miscelare la soluzione 4 nel compartimento di dissoluzione 5 prima della fase b) di compressione.

Il metodo può preferibilmente prevedere anche una fase g) di riscaldare la soluzione 4.

Il metodo può preferibilmente comprendere anche una fase h) di azionare mezzi di compressione 8 per svolgere la fase b), e una fase i) di azionare mezzi di miscelazione 10 per svolgere la fase f); le fasi h) e i) sono svolte indipendentemente l'una dall'altra.

In uso, il dispositivo 1 implementa preferibilmente un metodo per valutare in vitro la tossicità di una nanoparticella colloidale 2 che comprende il metodo descritto sopra.

La tossicità intracellulare può infatti essere indirettamente correlata alla maggiore o minore capacità delle NP di dissolvere in ioni tossici all'interno di

opportuni compartimenti cellulari come ad esempio i lisosomi.

Le nanoparticelle colloidali 2 della presente invenzione sono preferibilmente quantum dots, nanoparticelle ossido metalliche o nanoparticelle metalliche. Preferibilmente, le nanoparticelle metalliche sono nanoparticelle di oro e nanoparticelle di argento.

### **Esempi**

A titolo di esempio, vengono illustrati nella figura 2 i risultati di un esperimento eseguito mediante il dispositivo 1 e secondo il metodo della presente invenzione, in cui sono state costruite diverse curve di rilascio di ioni provenienti da diverse nanoparticelle. Le curve rappresentano rispettivamente la cinetica di rilascio di ioni ferro da nanoparticelle di  $Fe_2O_3$  a pH 4.5, la cinetica di rilascio di ioni cadmio da quantum dots di CdSe a pH 4.5, la cinetica di rilascio di ioni cadmio da quantum dots rivestiti da polimero a pH 4.5, la cinetica di rilascio di ioni oro da nanoparticelle di oro in ambiente acquoso a pH acido (pH 4.5) e la cinetica di rilascio di ioni oro da nanoparticelle di oro in ambiente acquoso a pH neutro (pH 7.4).

Come si può osservare dalle curve, la cinetica del rilascio cambia a seconda del nucleo (core) e della sua stabilità in ambiente acido o neutro, della dimensione

della nanoparticelle (15 nm per le AuNP e 10 nm per le IONP) e della presenza o assenza di un rivestimento (coating) maggiormente resistente a pH acidi.

Inoltre, studi di tossicità in vitro e in vivo hanno dimostrato una chiara correlazione tra la tossicità indotta dal trattamento con i suddetti nanomateriali e la loro relativa curva di stabilità, ovvero nanoparticelle presentanti cinetiche di rilascio più veloci risultano essere anche le più tossiche.

Da un esame delle caratteristiche del metodo e del dispositivo 1 secondo la presente invenzione sono evidenti i vantaggi che essa consente di ottenere.

In particolare, grazie al fatto che i mezzi di miscelazione 10 sono associati al compartimento di dissoluzione 5 e distinti dai mezzi di compressione 8, è possibile selettivamente scegliere la regione di soluzione 4 dove miscelare e la regione di soluzione 4 dove comprimere.

Inoltre, il fatto che i mezzi di miscelazione 10 e i mezzi di compressione 8 siano azionabili indipendentemente gli uni dagli altri permette di esercitare la pressione sulla soluzione 4 a intervalli di tempo successivi, inducendo così la separazione dello ione di derivazione 3, senza influenzare la miscelazione delle nanoparticelle 2 nella soluzione 4 e quindi il loro livello di dissoluzione.

La determinazione della quantità di ione di derivazione 3 che passa nel compartimento di analisi 6 a diversi intervalli di tempo è pertanto più affidabile ed è una rappresentazione fedele della dissoluzione delle nanoparticelle 2 nella soluzione 4 che mima l'ambiente biologico.

La presenza dei mezzi di compressione 8 permette di ridurre notevolmente i tempi di separazione dello ione di derivazione 3, avendo come risultato un saggio molto più rapido dei saggi basati sulla dialisi.

L'eventuale disposizione di un iniettore 11 permette di aggiungere comodamente le nanoparticelle 2 in una quantità ben determinata.

Il dispositivo di prelievo 13 per prelevare un campione della soluzione filtrata 14 dal compartimento di analisi 6 permette di collegare il dispositivo 1 a un diverso dispositivo di determinazione 9 della quantità dello ione di derivazione 3 permettendo di adattare il dispositivo 1 all'analisi di diversi tipi di nanoparticelle 2.

Il metodo di determinazione della cinetica di dissoluzione di nanoparticelle colloidali 2 secondo l'invenzione permette di determinare un parametro chimico-fisico (stabilità/dissoluzione in ambienti controllati) di nanoparticelle colloidali 2 in tempi brevi e con elevata

accuratezza.

Il metodo è inoltre molto flessibile e può essere adattato per determinare la stabilità di un'ampia gamma di nanoparticelle 2 in soluzioni 4 molto diverse (acquose, mezzi cellulari, liquidi biologici, ecc.).

Ancora, il metodo permette di riprodurre disparati ambienti biologici in modo estremamente simile alla realtà, variando il pH, la composizione e la temperatura della soluzione 4 in cui vengono disciolte le nanoparticelle 2.

Il metodo per valutare in vitro la tossicità di una nanoparticella colloidale 2 secondo la presente invenzione fornisce una misura accurata, affidabile e veloce della tossicità intracellulare di nanoparticelle che rilasciano ioni tossici (o ioni che in elevate quantità diventano tossici nei compartmenti cellulari) poiché non necessita dell'utilizzo di colture cellulari. Le colture cellulari implicano infatti un notevole dispendio di tempo, lavoro e materiali, e sono influenzate da una notevole variabilità biologica e spesso soggette a contaminazioni che costringono a ripetere l'esperimento su nuove colture.

Infine, sia il dispositivo che il metodo secondo l'invenzione permettono un'elevata automatizzazione e un'analisi su larga scala ("high through-put").

Risulta infine chiaro che al metodo e al dispositivo 1 descritti e illustrati possono essere apportate modifiche e

varianti che non escono dall'ambito di protezione definito dalle rivendicazioni.

In particolare, il dispositivo 1 può essere concepito in un singolo modulo o può essere realizzato mediante l'aggiunta di "n" moduli in parallelo, permettendo così un'analisi multicanale di "n" tipi di nanoparticelle (o della stessa nanoparticella in n condizioni ambientali) in relazione al numero di moduli presenti nel dispositivo. Ciò permette di abbattere notevolmente i costi e i tempi di lavoro per effettuare il test, rappresentando un aspetto molto vantaggioso data la diversità di nanoparticelle presenti nei laboratori e nel settore industriale.

## RIVENDICAZIONI

1. Dispositivo (1) per determinare la cinetica di dissoluzione di nanoparticelle colloidali (2) in corrispettivi ioni di derivazione (3) in una soluzione (4), comprendente:

- un compartimento di dissoluzione (5) alimentabile con detta soluzione (4) e con dette nanoparticelle colloidali (2);
  - un compartimento di analisi (6) separato da detto compartimento di dissoluzione (5);
  - una membrana filtrante (7) che separa detto compartimento di dissoluzione (5) da detto compartimento di analisi (6), è selettivamente permeabile allo ione di derivazione (3) ed è atta a filtrare detta soluzione (4);
  - mezzi di compressione (8) attivabili per indurre il passaggio di detta soluzione (4) da detto compartimento di dissoluzione (5) a detto compartimento di analisi (6) attraverso detta membrana filtrante (7); e
  - un dispositivo di determinazione (9) della quantità di detto ione di derivazione (3);
- caratterizzato dal fatto di comprendere inoltre mezzi di miscelazione (10) associati a detto compartimento di dissoluzione (5), atti a miscelare detta soluzione (4) e distinti dai detti mezzi di compressione (8).

2. Dispositivo secondo la rivendicazione 1, in cui

detti mezzi di miscelazione (10) e detti mezzi di compressione (8) sono azionabili indipendentemente gli uni dagli altri.

3. Dispositivo secondo la rivendicazione 1 o 2, comprendente inoltre un iniettore (11) atto ad alimentare dette nanoparticelle colloidali (2) a detto compartimento di dissoluzione (5).

4. Dispositivo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 3, comprendente inoltre mezzi di riscaldamento (12) associati a detto compartimento di dissoluzione (5).

5. Dispositivo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 4, in cui detto dispositivo di determinazione (9) della quantità di detto ione di derivazione (3) è selezionato dal gruppo costituito da un apparecchio per cromatografia, un apparecchio per elettroforesi, un apparecchio per ICP-AES e un apparecchio per ICP-MS.

6. Dispositivo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 5, comprendente inoltre un dispositivo di prelievo (13) per prelevare un campione di soluzione filtrata (14) da detta membrana filtrante (7) e contenuta in detto compartimento di analisi (6).

7. Dispositivo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 6, in cui detta membrana filtrante

(7) ha pori di dimensioni inferiori a 10 nm.

8. Dispositivo secondo la rivendicazione 7, in cui detta membrana filtrante (7) ha pori di dimensioni inferiori a 2 nm.

9. Dispositivo secondo la rivendicazione 8, in cui detta membrana filtrante (7) ha pori di dimensioni inferiori a 1 nm.

10. Dispositivo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 9, in cui detta membrana filtrante (7) comprende un materiale selezionato dal gruppo costituito da polietilsulfone (PES), cellulosa rigenerata, polivinildenfluoruro (PVDF), poliacrilonitrile (PAN) e acetato di cellulosa (CA).

11. Dispositivo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 10, in cui detto compartimento di dissoluzione (5) è formato da policarbonato.

12. Metodo per determinare la cinetica di dissoluzione di nanoparticelle colloidali (2) in corrispettivi ioni di derivazione (3) in una soluzione (4) comprendente le fasi di:

a) disciogliere una certa quantità di dette nanoparticelle colloidali (2) in detta soluzione (4) in un primo ambiente;

b) comprimere detta soluzione (4) per indurne il passaggio a un secondo ambiente distinto da detto primo ambiente;

c) separare selettivamente lo ione di derivazione (3);  
d) determinare la quantità di detto ione di derivazione (3);

e) ripetere le fasi b), c) e d) a intervalli di tempo successivi;

il metodo essendo caratterizzato dal fatto di comprendere inoltre la fase f) di agitare detta soluzione (4), distinta dalla fase b) di comprimere.

13. Metodo secondo la rivendicazione 12, comprendente inoltre una fase g) di riscaldare detta soluzione (4).

14. Metodo secondo la rivendicazione 12 o 13, comprendente inoltre una fase h) di azionare mezzi di compressione (8) per svolgere la fase b) e una fase i) di azionare mezzi di miscelazione (10) per svolgere la fase f), essendo le fasi h) e i) svolte indipendentemente l'una dall'altra.

15. Metodo per valutare in vitro la tossicità di una nanoparticella colloidale (2) comprendente il metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 12 a 14.

16. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 12 a 15, in cui dette nanoparticelle colloidali (2) sono selezionate dal gruppo costituito da quantum dots, nanoparticelle ossido metalliche e nanoparticelle metalliche.

p.i.: FONDAZIONE ISTITUTO ITALIANO DI TECNOLOGIA

**Rinaldo PLEBANI**

TITLE: DEVICE AND METHOD FOR DETERMINING THE DISSOLUTION KINETICS OF COLLOIDAL NANOPARTICLES

CLAIMS

1. A device (1) for determining the dissolution kinetics of colloidal nanoparticles (2) into respective derivation ions (3) in a solution (4) comprising:

- a dissolution compartment (5) feedable with said solution (4) and with said colloidal nanoparticles (2);

- an analysis compartment (6) separate from said dissolution compartment (5);

- a filtering membrane (7) which separates said dissolution compartment (5) from said analysis compartment (6), is selectively permeable to the derivation ion (3) and is adapted to filter said solution (4);

- compressing means (8) actuatable so as to induce the passage of said solution (4) from said dissolution compartment (5) to said analysis compartment (6) through said filtering membrane (7); and

- a determination device (9) for determining the amount of said derivation ion (3);

characterised by also comprising mixing means (10) associated to said dissolution compartment (5), adapted to mix said solution (4), and distinct from said compressing means (8).

2. The device according to claim 1, wherein said

mixing means (10) and said compressing means (8) are actuatable independently of one another.

3. The device according to claim 1 or 2, also comprising an injector (11) adapted to feed said colloidal nanoparticles (2) to said dissolution compartment (5).

4. The device according to any of claims 1 to 3, also comprising heating means (12) associated to said dissolution compartment (5).

5. The device according to any of claims 1 to 4, wherein said determination device (9) for determining the amount of said derivation ion (3) is selected from the group consisting of a chromatography apparatus, an electrophoresis apparatus, an ICP-AES apparatus and an ICP-MS apparatus.

6. The device according to any of claims 1 to 5, also comprising a sampling device (13) for sampling a sample of filtered solution (14) filtered by said filtering membrane (7) and contained in said analysis compartment (6).

7. The device according to any of claims 1 to 6, wherein said filtering membrane (7) has pores of size smaller than 10 nm.

8. The device according to claim 7, wherein said filtering membrane (7) has pores of size smaller than 2 nm.

9. The device according to claim 8, wherein said filtering membrane (7) has pores of size smaller than 1 nm.

10. The device according to any of claims 1 to 9, wherein said filtering membrane (7) comprises a material selected from the group consisting of polyethylsulfone (PES), regenerated cellulose, polyvinylidenefluoride (PVDF), polyacrylonitrile (PAN) and cellulose acetate (CA).

11. The device according to any of claims 1 to 10, wherein said dissolution compartment (5) is formed by polycarbonate.

12. A method for determining the dissolution kinetics of colloidal nanoparticles (2) into respective derivation ions (3) in a solution (4) comprising the steps of:

a) dissolving a certain amount of said colloidal nanoparticles (2) in said solution (4) in a first environment;

b) compressing said solution (4) to induce the passage thereof to a second environment distinct from said first environment;

c) selectively separating the derivation ion (3);

d) determining the amount of said derivation ion (3);

e) repeating steps b), c) and d) at subsequent time intervals;

the method being characterised by also comprising the step f) of stirring said solution (4), distinct from step b) of compressing.

13. The method according to claim 12, also comprising

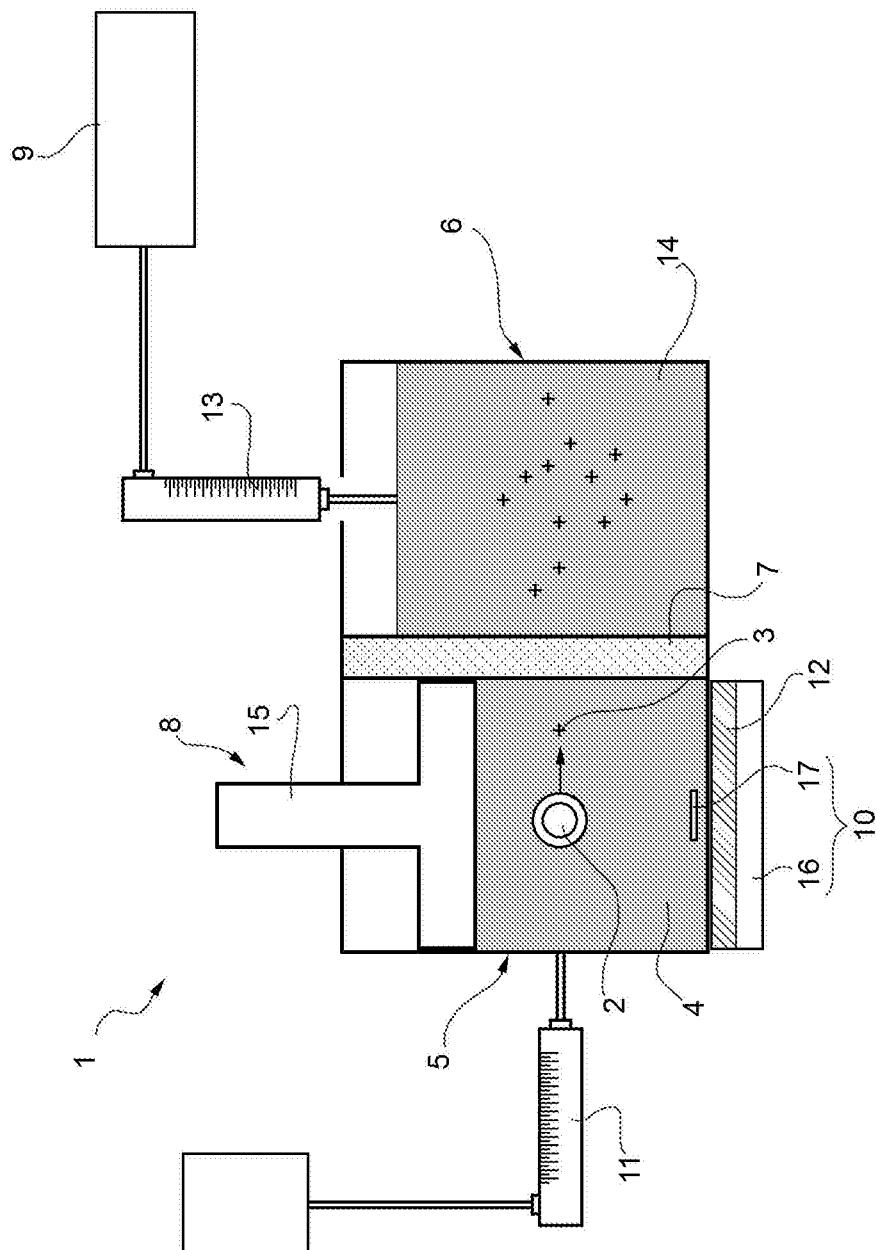
a step g) of heating said solution (4).

14. The method according to claim 12 or 13, also comprising a step h) of actuating compressing means (8) to perform step b), and a step i) of actuating mixing means (10) to perform step f), steps h) and i) being performed independently of one another.

15. A method for evaluating the toxicity of a colloidal nanoparticle (2) in vitro comprising the method according to any of claims 12 to 14.

16. The method according to any of claims 12 to 15, wherein said colloidal nanoparticles (2) are selected from the group consisting of quantum dots, metal oxide nanoparticles and metal nanoparticles.

FIG. 1



p.i.: FONDAZIONE ISTITUTO ITALIANO DI TECNOLOGIA  
Rinaldo PLEBANI  
(Iscrizione Albo nr. 358/BM)

FIG. 2

