

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102012902091796A1

Publication Date

20140412

Applicant

CONSORZIO INTERUNIVERSITARIO NAZIONALE PER LA SCIENZA E TECNOLOGIA

Title

NANOPARTICELLE POLIMERICHE A BASE DI MATRICI
POLI(AMIDOAMMINICHE) BIODEGRADABILI RETICOLATE MEDIANTE
FUNZIONALITA' COVALENTI SUSCETTIBILI DI ATTACCO IDROLITICO

9875 M Descrizione del brevetto per invenzione industriale avente per titolo:

FM/mc **“NANOPARTICELLE POLIMERICHE A BASE DI MATRICI POLI(AMIDOAMMINICHE) BIODEGRADABILI RETICOLATE MEDIANTE FUNZIONALITÀ COVALENTI SUSCETTIBILI DI ATTACCO IDROLITICO”**

a nome : **CONSORZIO INTERUNIVERSITARIO NAZIONALE PER LA SCIENZA E TECNOLOGIA DEI MATERIALI**

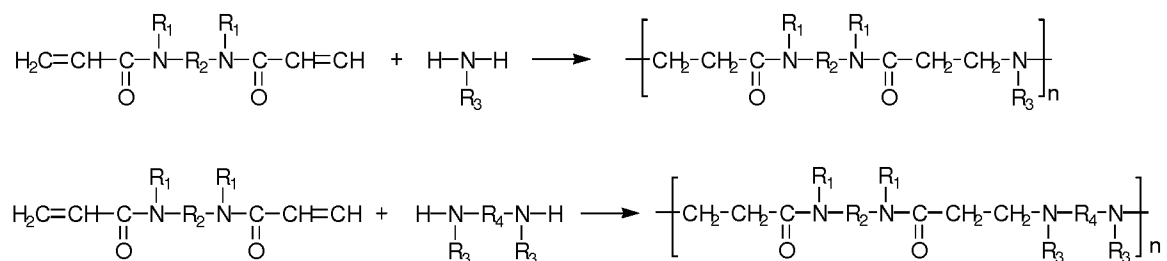
con sede in: Firenze

* * *

La presente invenzione riguarda nanosistemi a base di matrici poli(ammidoamminiche) biodegradabili reticolate mediante funzionalità covalenti suscettibili di attacco idrolitico diretto e/o mediato da enzimi ed il processo di preparazione degli stessi.

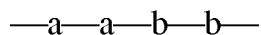
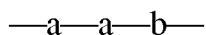
Stato della tecnica

Le poli(ammidoammine) (PAA) sono una classe di polimeri di sintesi ottenuti per poliaddizione di tipo Michael di monoammine primarie o diammine secondarie alifatiche con bisacrilammidi (Schema).



Schema: Sintesi delle PAA

Le PAA sono caratterizzate dalla presenza di gruppi ammidici (a) e amminici terziari (b) disposti regolarmente lungo la catena polimerica secondo le sequenze:



Le PAA presentano proprietà che le rendono interessanti per uso biomedico, quali la flessibilità strutturale con possibilità di introdurre funzioni aggiuntive in modo da creare strutture “su misura” per ogni possibile applicazione, l'idrosolubilità, la biodegradabilità e la biocompatibilità, la non immunogenicità e l'assenza di tossicità dei prodotti di degradazione. Inoltre le caratteristiche acido-base sono modulabili a seconda della struttura delle ammine di partenza e dei sostituenti ionici presenti su uno o ambedue i monomeri, dando luogo a PAA con caratteristiche basiche o anfoteriche. Le PAA sono capaci di formare per interazione ionica complessi con proteine o peptidi di polarità prevalente opposta. Nel caso di PAA anfoteriche è possibile modulare la forza acida e basica in modo tale che il polimero passi da uno stato prevalentemente anionico ad uno prevalentemente cationico per modeste variazioni di pH, con conseguente variazione di volume e rilascio di eventuali sostanze. Una review delle applicazioni biomediche delle PAA è riportata in *Macromol. Rapid Commun.* 2002, 23, 332-355. Le PAA sono state in particolare proposte come veicoli per farmaci, in particolare chemioterapici (WO 95/ 05200).

La tecnologia del “drug delivery” riveste sempre maggior importanza ai fini del miglioramento dell'efficacia dei trattamenti farmacologici. Sono oggi disponibili diverse tecnologie in grado di controllare le caratteristiche farmacocinetiche e di rilascio dei farmaci e migliorarne l'indice terapeutico. Tra queste, una delle più promettenti è quella dei materiali nano-strutturati a base di polimeri biodegradabili, dendrimeri, nanotubi di carbonio, sistemi

micellari o idrogel, sistemi liposomiali, nanoparticelle inorganiche (nanoparticelle di metalli nobili, oro in particolare). La varietà delle strutture chimiche degli agenti farmacologici (molecole organiche, proteine, acidi nucleici, immunoglobuline, complessi metalloorganici, carboidrati, etc) pone sempre nuovi problemi di tipo formulativo ed è pertanto particolarmente sentita l'esigenza di nuovi sistemi di "drug delivery" che siano adattabili alle diverse classi di farmaci e che possano essere allo stesso tempo di agevole preparazione a partire da materiali facilmente disponibili, non tossici e poco costosi.

Descrizione dell'invenzione

Si è ora trovato un processo per la preparazione di nanoparticelle a base di poliammidoammine comprendente le seguenti fasi:

- Preparazione di una soluzione acquosa di poliammidoammine aventi gruppi funzionali capaci di formare legami covalenti con agenti reticolanti bi- o poli-funzionali;
- Conversione della soluzione a) in un sistema colloidale;
- Trattamento del sistema colloidale b) con un agente reticolante di- o polifunzionale in grado di formare legami covalenti con i gruppi funzionali presenti sulle poliammidoammine;
- Recupero delle strutture colloidali ottenute al termine della reazione.

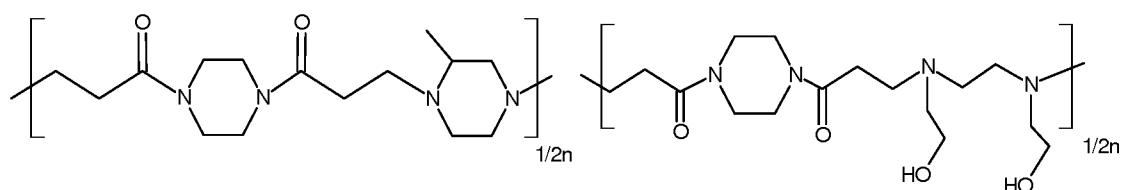
Le nanoparticelle così ottenute, utili in ambito biomedico e farmaceutico, in particolare per il caricamento e rilascio di agenti con attività biologica, costituiscono un ulteriore oggetto dell'invenzione.

Descrizione dettagliata dell'invenzione

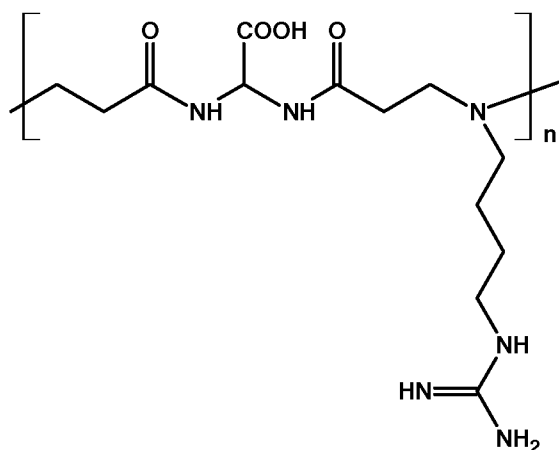
Le poliammidoammine impiegabili secondo l'invenzione possono

essere sia lineari che ramificate, contenenti gruppi disponibili per reticolazione covalente, quali gruppi amminici, ossidrilici, tiolici e carbossilici. Le strutture, le proprietà ed i metodi di preparazione delle poliammidoammine funzionalizzate sono riportate in *Macromol. Rapid Commun.* 2002, 23, 332-355 e nei riferimenti lì citati.

Esempi specifici di poliammidoammine funzionalizzate impiegabili secondo l'invenzione sono le poliammidoammine denominate ISA1 e AGMA1. Le strutture di tali poliammidoammine sono riportate di seguito:



ISA1



AGMA1

La preparazione di ISA1 è riportata ad esempio in *J. Drug Targeting* 1999, 6, 391-404.

AGMA1 è descritta nella domanda di Brevetto Italiano MI2004A000435, 2004 e in WO 2010099962.

La conversione della soluzione acquosa di poliammidoammina

funzionalizzata a dare particelle colloidali avviene per aggiunta di un non solvente oppure per variazione delle condizioni ambientali, in particolare temperatura e pH.

Esempi di non solventi sono acetone, etere etilico, etanolo, metanolo, solventi clorurati.

Gli agenti reticolanti (a due o più funzioni) contengono gruppi reattivi quali epossidi, aldeidi, esteri della N- idrossisuccinimide (NHS), immido esteri, maleimmide ed isocianati. Sono preferiti in particolare 1,4 butandiolo diglicidil etere (BDGE), polietilenglicole diglicidil etere (PEGDE), disulfosuccinimidil suberato, polietilenglicole disuccinimide estere, dimetil pimelimidato (DMP) e NHS-PEG-Maleimide.

Le PAA impiegate hanno peso molecolare (PM) maggiore di 10kDa e preferibilmente compreso tra 15 kDa e 30 kDa. Si impiegano soluzioni di PAA con concentrazioni superiori a 10mg/ml e preferibilmente comprese tra 15 e 25 mg. Il quantitativo di agente reticolante e le condizioni di reticolazione (temperatura, pH e tempo) variano in base alle caratteristiche chimiche delle PAA (tipo e numero di gruppi funzionali) e di reticolante impiegati. In generale, si preferiscono temperature inferiori a 80°C (preferibilmente compresi tra 50°C e 70°C), pH compresi tra 4 e 10 (preferibilmente compresi tra 5 e 9) e tempi di reazione di 2 ore, anche se in alcuni casi può essere necessario prolungare fino a 24 ore.

Il recupero delle strutture colloidali ottenute al termine della reazione può essere effettuato mediante allontanamento del non solvente oppure ripristinando le condizioni acquose di partenza per evaporazione di solventi organici oppure ricorrendo a processi di dialisi, diafiltrazione o simili.

Il processo dell'invenzione è stato impiegato con successo con diversi tipi di poliammidoammine ed agenti reticolanti, risultando versatile ed efficace in termini di resa ed isolamento dei nanosistemi.

Le nanoparticelle così preparate hanno un diametro medio variabile tra 80 a 500 nm (solitamente tra 100 e 250 nm) con indice di polidispersità (PI) compreso tra 0.11 e 0.25.

Le nanoparticelle dell'invenzione possono essere vantaggiosamente utilizzate per il caricamento e rilascio di agenti con attività biologica, in particolare di chemioterapici, proteine, peptidi, DNA, RNA. Il caricamento degli agenti attivi può avvenire per interazione elettrostatica, coacervazione o per reidratazione delle nanoparticelle recuperate.

L'impiego di PAA come sistemi a matrice nano strutturata appare versatile e adattabile alle diverse vie di somministrazione, con la possibilità di disperdere i sistemi in veicoli per applicazioni topiche, inalatorie o nella produzione di supporti (scaffolds) per l'ingegneria tissutale.

Tramite la tecnica descritta è possibile preparare dispositivi che possano essere realizzati con costi sostanzialmente contenuti, sia per quanto riguarda i costi di produzione che per quanto concerne i costi di gestione, con un procedimento semplice, sicuro ed affidabile.

L'invenzione è illustrata in maggior dettaglio nei seguenti esempi.

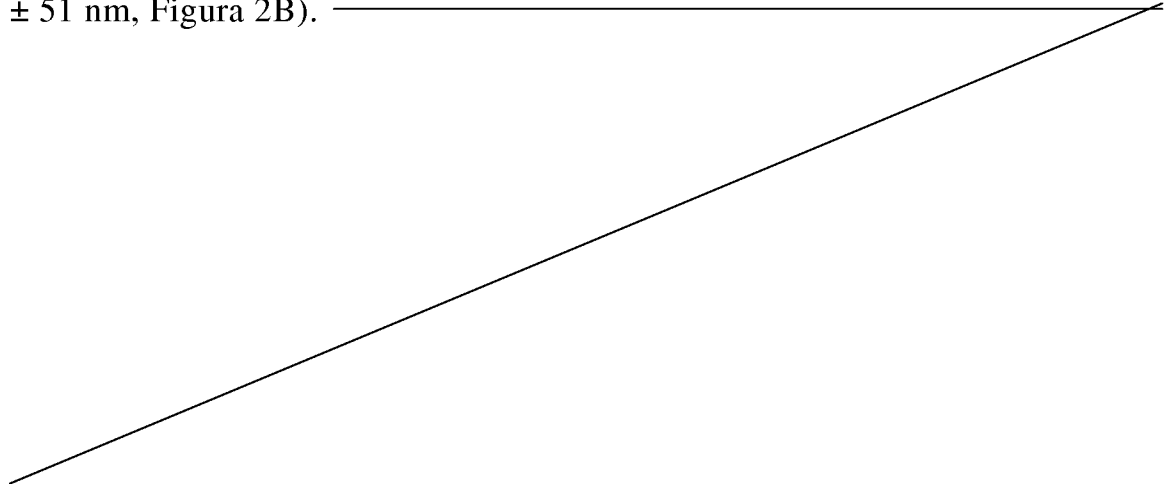
Esempio 1: Preparazione di nanoparticelle a base di ISA1

Una soluzione costituita da 30 mg di ISA1 in 2 ml di acqua deionizzata, addizionata di 10 µl di NaOH 10N, è stata gocciolata mediante una siringa munita di ago 22G in 40 ml di acetone e sono stati aggiunti 30 µl di 1,4 butandiolo diglicidil etere (BDGE). Dopo 15h sotto agitazione magnetica a

25°C, sono stati aggiunti 5 ml di acqua deionizzata e l'acetone è stato allontanato per evaporazione sotto cappa. La sospensione nanoparticellare risultante è stata analizzata mediante granulometria in sospensione con tecnica di diffusione dinamica della luce (*dynamic light scattering- DSL*) per ottenere la distribuzione dimensionale in volume (diametro medio: 389 ± 197 nm, Figura 1A) e numero percentuale (diametro medio: 152 ± 80 nm, Figura 1B).

Esempio 2: Preparazione di nanoparticelle a base di AGMA1

Una soluzione costituita da 30 mg di **AGMA1** in 2 ml di acqua deionizzata, addizionata di 10 μ l di NaOH 10N, è stata gocciolata mediante una siringa munita di ago 22G in 40 ml di acetone e sono stati aggiunti 30 μ l di 1,4 butandiolo diglicidil etere (BDGE). Dopo 15h sotto agitazione magnetica a 25°C, sono stati aggiunti 5 ml di acqua deionizzata e l'acetone è stato allontanato per evaporazione sotto cappa. La sospensione nanoparticellare risultante è stata filtrata con filtro in esteri misti di cellulosa a taglio dimensionale 1.2 μ m ed analizzata mediante granulometria in sospensione con tecnica di diffusione dinamica della luce (*dynamic light scattering*) per ottenere la distribuzione dimensionale in volume (diametro medio: 237 ± 114 nm, Figura 2A) e numero percentuale (diametro medio: 155 ± 51 nm, Figura 2B).



RIVENDICAZIONI

1. Un processo per la preparazione di nanoparticelle a base di poliammidoammine comprendente le seguenti fasi:

- Preparazione di una soluzione acquosa di poliammidoammine aventi gruppi funzionali capaci di formare legami covalenti con agenti reticolanti di- o poli-funzionali;

- Conversione della soluzione a) in un sistema colloidale;

- Trattamento del sistema colloidale b) con un agente reticolante di- o polifunzionale in grado di formare legami covalenti con i gruppi funzionali presenti sulle poliammidoammine;

- Recupero delle strutture colloidali ottenute al termine della reazione.

2. Un processo secondo la rivendicazione 1 in cui le poliammidoammine comprendono gruppi funzionali amminici, idrossi, tiolici, carbossilici.

3. Un processo secondo la rivendicazione 1 o 2 in cui le poliammidoammine sono scelte fra ISA 1 e AGMA 1.

4. Un processo secondo una qualunque delle rivendicazioni da 1 a 3 in cui l'agente reticolante è caratterizzato da due o più gruppi epossidi, aldeidici ed isocianati.

5. Un processo secondo una o più delle rivendicazioni da 1 a 4 in cui la conversione della soluzione a) in un sistema colloidale avviene per aggiunta di acetone come non-solvente.

6. Un processo secondo una o più delle rivendicazioni da 1 a 5 in cui recupero delle strutture colloidali ottenute al termine della reazione con l'agente reticolante avviene per allontanamento del non solvente o ripristino delle condizioni acquose di partenza mediante evaporazione, dialisi e/o

diafiltrazione.

7. Nanoparticelle a base di poliammidoammine reticolate colloidali ottenute dal processo delle rivendicazioni 1-6.

8. Uso dei complessi delle rivendicazioni 6 per il caricamento e rilascio di agenti con attività biologica.

9. Uso secondo la rivendicazione 8 in cui il caricamento è effettuato per interazione elettrostatica, coacervazione o per reidratazione delle nanoparticelle recuperate.

10. Uso secondo la rivendicazione 8 o 9 in cui gli agenti biologici sono chemioterapici, proteine, DNA, RNA.

Milano, 12 ottobre 2012

CLAIMS

1. A process for the preparation of nanoparticles based on polyamidoamines comprising the following steps:

- preparing an aqueous solution of polyamidoamines having functional groups able to form covalent bonds with bi- or poly-functional cross-linking agents;
- converting solution a) to a colloidal system;
- treating the colloidal system b) with a bi- or poly-functional cross-linking agent able to form covalent bonds with the functional groups present on the polyamidoamines;
- recovering the obtained colloidal structures after completion of the reaction.

2. A process according to claim 1 wherein polyamidoamines comprise functional amino, hydroxy, thiol, carboxylic groups.

3. A process according to claim 1 or 2 wherein polyamidoamines are selected from ISA 1 and AGMA 1.

4. A process according to any one of claims 1 to 3 wherein the cross-linking agent is characterized by two or more epoxide, aldehyde and isocyanate groups.

5. A process according to one or more of claims 1 to 4 wherein the conversion of solution a) to a colloidal system is carried out by addition of acetone as a non-solvent.

6. A process according to one or more of claims 1 to 5 wherein the recovery of the colloidal structures obtained after completion of the reaction with the cross-linking agent is carried out by removing the non-solvent or by

restoring the starting aqueous conditions by evaporation, dialysis and/or diafiltration.

7. Nanoparticles based on colloidal cross-linked polyamidoamines obtained by the process of claims 1-6.

8. The use of the complexes of claims 6 for carrying and delivering agents with biological activity.

9. The use according to claim 8 wherein the carrying is effected by electrostatic interaction, coacervation or by rehydration of the recovered nanoparticles.

10. The use according to claim 8 or 9 wherein the biological agents are chemotherapeutics, proteins, DNA, RNA.

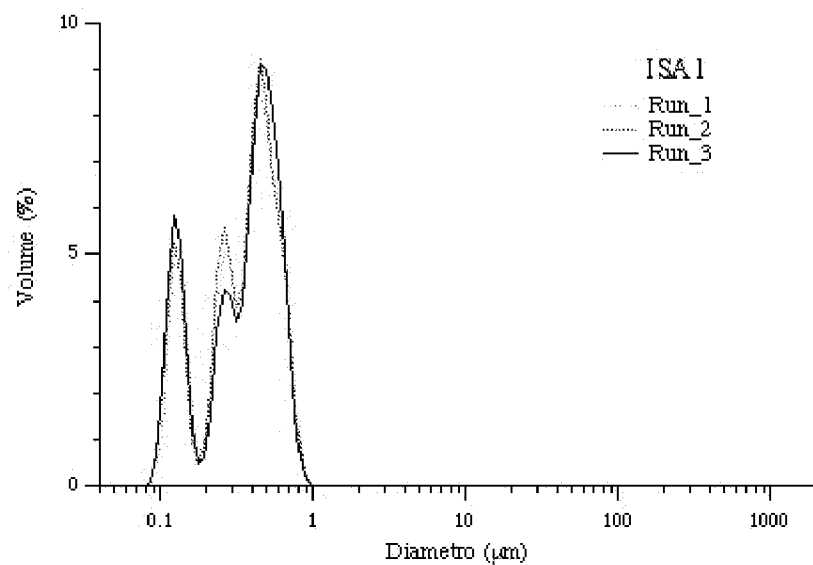


Figura 1A: Distribuzione dimensionale in volume percentuale delle nanoparticelle a base di ISA1

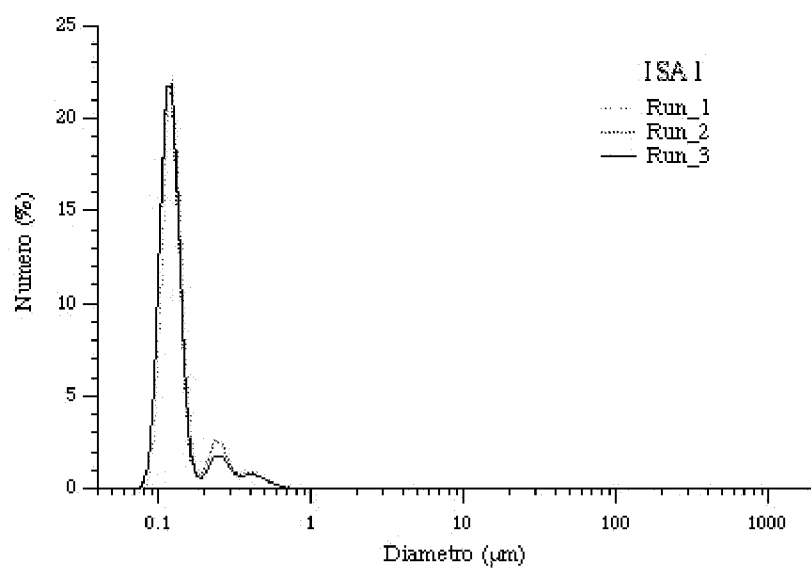


Figura 1B: Distribuzione dimensionale in numero percentuale delle nanoparticelle a base di ISA1

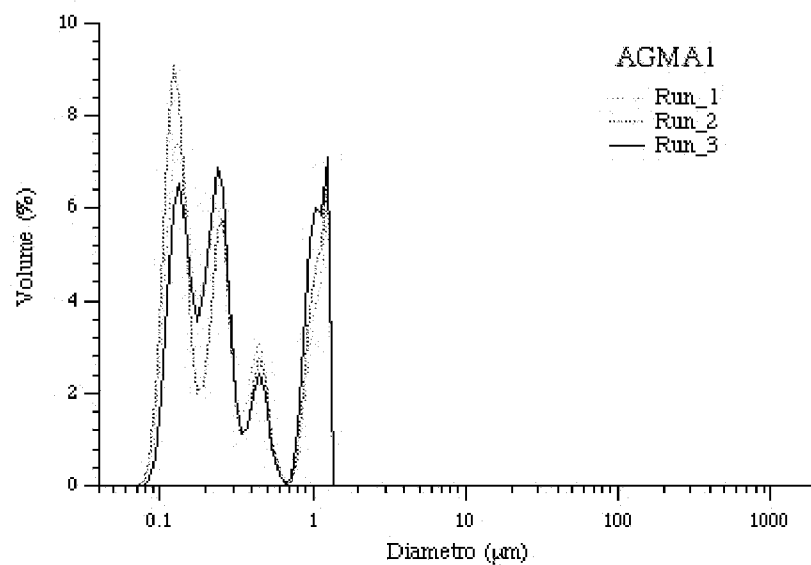


Figura 2A: Distribuzione dimensionale in volume percentuale delle nanoparticelle a base di AGMA1

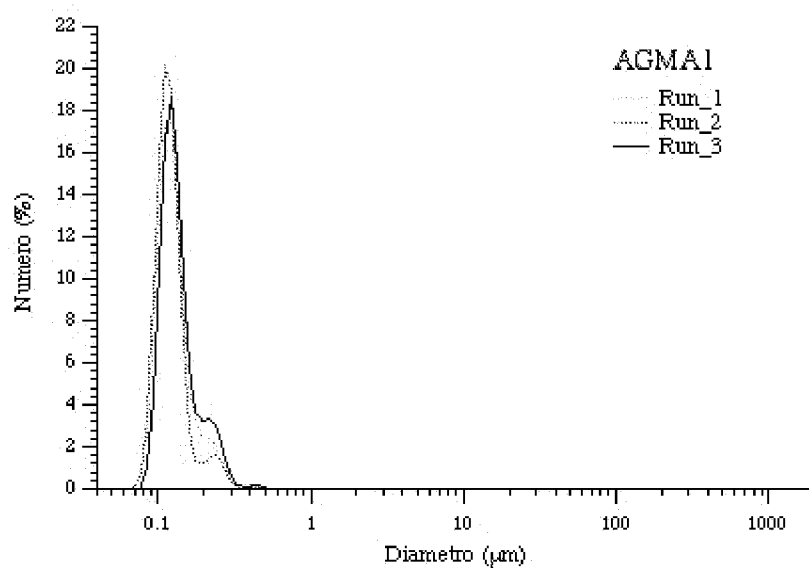


Figura 2B: Distribuzione dimensionale in numero percentuale delle nanoparticelle a base di AGMA1