

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102020000014908
Data Deposito	22/06/2020
Data Pubblicazione	22/12/2021

Classifiche IPC

Titolo

NANOPARTICELLE GLICOSILATE DI MUCINA COVALENTEMENTE RETICOLATE COME
SISTEMI PER LA VEICOLAZIONE ED IL RILASCIO DI FARMACI E BIOMOLECOLE

DESCRIZIONE

Annessa a domanda di brevetto per INVENZIONE INDUSTRIALE avente per titolo

“NANOPARTICELLE GLICOSILATE DI MUCINA COVALENTEMENTE RETICOLATE COME SISTEMI PER LA VEICOLAZIONE ED IL RILASCIO DI FARMACI E BIOMOLECOLE”

A nome: UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TORINO
Via Verdi, 8
10124 TORINO TO

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PAVIA
Via Strada Nuova 65
27100 PAVIA PV

POLITECNICO DI MILANO
Piazza Leonardo da Vinci, 32
20133 MILANO MI

CAMPO TECNICO

La presente invenzione ha per oggetto nanoparticelle glicosilate di mucina covalentemente reticolate e il loro uso per la veicolazione ed il rilascio di principi attivi, marcatori e/o biomolecole. Sono anche oggetto
5 dell'invenzione, le nanoparticelle glicosilate a base di mucina covalentemente reticolate comprendenti almeno un composto scelto tra un principio attivo, un marcatore e una biomolecola.

L'invenzione ha inoltre per oggetto un metodo per la preparazione di nanoparticelle glicosilate a base di mucina covalentemente reticolate,
10 opzionalmente comprendenti almeno un composto scelto tra un principio attivo, un marcatore e una biomolecola.

STATO DELL'ARTE

La tecnica farmaceutica si confronta con la difficoltà legata alla gestione di molecole idrofile ad alto peso molecolare, che diventano molto viscosi e quindi difficilmente somministrabili per via orale, inalatoria e/o iniettabile.

- 5 A titolo di esempio, i farmaci glicomimetici, ovvero i farmaci legati ai carboidrati, presentano dei problemi dal punto di vista farmacocinetico proprio per la presenza di carboidrati che, essendo altamente polari (alta densità di gruppi polari e alta idrofilia) sono assorbiti in modo limitato per via orale (bassa biodisponibilità). Inoltre, anche se somministrati per via
10 parenterale iniettiva, i farmaci glicomimetici ad oggi noti vengono velocemente eliminati attraverso la via renale.

- Alcuni casi di successo di farmaci glicomimetici noti sono Relenza e Zanamivir che inibiscono la neuraminidasi virale nel trattamento dell'influenza e molecole che promuovono l'inibizione dell'adesione virale
15 all'epitelio. Tuttavia, i carboidrati sono troppo idrofili per avere una buona biodisponibilità e la labilità dei legami glicosidici delle glicosidasi in vivo ne limitano l'applicazione dal punto vista farmaceutico.

- Per superare questi limiti sarebbe necessario sviluppare nanosistemi glicomimetici dotati di stabilità chimica e metabolica e capaci di mimare
20 l'attività biologica di specifici oligosaccaridi.

- Anche se in clinica non sono presenti nanosistemi glicosilati, in letteratura esistono diversi esempi di nanoparticelle glicosilate ed i nanomateriali più utilizzati sono nanoparticelle metalliche, nanotubi di carbonio, liposomi e dendrimeri (ad esempio, Kottari N. *et al.*, "Applications of
25 Glyconanoparticles as 'sweet' Glycobiological Therapeutics and Diagnostics". *Adv. Polym. Sci.* (2013), vol 254, p. 297–342).

- È quindi ancora molto sentita l'esigenza di nuovi nanosistemi glicomimetici che possano veicolare in maniera efficace l'assorbimento dei farmaci glicomimetici.

- 30 Un altro problema molto sentito nel settore farmaceutico è quello della resistenza agli antibiotici.

La resistenza antimicrobica (AMR) minaccia la prevenzione e il trattamento efficace di una gamma sempre crescente di infezioni causate da batteri.

5 Negli ultimi anni, il fenomeno della resistenza agli antibiotici ha raggiunto proporzioni tali da configurarsi come uno dei principali problemi di salute pubblica a livello globale. Si registra, infatti, lo sviluppo di resistenza verso tutte le classi di antibiotici finora introdotte nella pratica clinica e si assiste all'emergenza di un numero sempre crescente di batteri multiresistenti. L'individuazione di agenti antimicrobici innovativi, accanto ad una corretta
10 gestione di quelli già esistenti, appare quindi di primaria importanza. In questo scenario, tuttavia, le grandi aziende farmaceutiche abbandonano lo sviluppo di nuovi antimicrobici per i notevoli costi di sviluppo non commisurati ai ricavi successivi, in quanto i nuovi antimicrobici immessi sul mercato perdono rapidamente la loro efficacia a causa dello sviluppo dei
15 fenomeni di antibiotico resistenza, riducendone le revenue.

Il problema delle infezioni batteriche è anche legato alla formazione del cosiddetto biofilm batterico il quale rende ancora più difficile l'attività antibiotica dei farmaci noti.

Le mucine sono glicoproteine ad alto peso molecolare capaci di assumere
20 una conformazione estesa e di assemblarsi in un idrogel a protezione dell'epitelio mucoso. Uno strato di muco, di diverse centinaia di micrometri di spessore, è ottenuto in natura per espansione delle mucine precedentemente condensate all'interno di vescicole nelle cellule dell'epitelio mucoso, che vengono rilasciate al bisogno all'esterno delle
25 cellule stesse.

Le mucine sono inoltre capaci di fornire segnali biochimici sia ai batteri che alle cellule di mammifero, grazie alla presenza di oligosaccaridi (glicosilazione) che riconoscono una classe di recettori proteici denominati lectine. Le lectine controllano gli stadi iniziali di molte infezioni (interazione
30 ospite-patogeno) (Daniel Passos da Silva *et al.*, *Nature Communication* (2019) 10:2183, <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10201-4>), pertanto

possono essere considerate come potenziali targets terapeutici soprattutto nel caso di infezioni batteriche.

Infatti, le lectine ed in particolare la lectina di *Pseudomonas aeruginosa*, è coinvolta nella formazione e stabilizzazione del biofilm batterico.

- 5 L'interazione tra mucina e lectine è importante anche in ambito antitumorale (Hassan Lemjabbar-Alaouil et al. in *Advances in Cancer Research*, (2015) 126:305–344. doi:10.1016/bs.acr.2014.11.007).

Nella composizione della parte oligosaccaridica delle mucine è presente anche l'acido sialico, dove con detto termine si indicano i derivati N- e O-
10 sostituiti dell'acido neuramminico, cioè un monosaccaride e 9 atomi di carbonio. In particolare, è comune l'acido N-acetilneuramminico.

L'acido sialico legato a glicoproteine e gangliosidi è utilizzato da molti virus come recettore per l'ingresso nelle cellule umane e animali. Questi virus
15 includono importanti agenti patogeni umani e animali, come i virus dell'influenza, della parainfluenza, della parotite, i coronavirus, i norovirus, rotavirus e i virus tumorali del DNA.

Pertanto, risulta di particolare interesse la possibilità di veicolare principi attivi antivirali, quali ad esempio i farmaci retrovirali, tramite nanoparticelle stabili di mucina che possono interagire con i virus grazie alla presenza di
20 acido sialico.

In Yan H. *et al.* "Reversible Condensation of Mucins into nanoparticles", *Langmuir* (2018), vol. 34, p. 13615-13625, è descritto un processo reversibile di compattazione in vitro di mucina a nanoparticelle mediante l'aggiunta di glicerolo ad un solvente acquoso nel quale si trovano mucine purificate. Con questo processo si formano degli aggregati reversibili
25 grazie ad interazioni di tipo fisico. È inoltre indicata la possibilità di una parziale stabilizzazione con calcio e polilisina, che tuttavia porta alla formazione di nanoparticelle reversibili e non stabili in quanto le interazioni che si formano tra la mucina e calcio e polilisina sono di tipo ionico e non
30 covalente.

In “Protein nanoparticles as drug delivery carriers for cancer therapy”, Lohcharoenkal W. *et al.*, in *BioMed Research International* (2014), Article ID 180549, è indicata la preparazione di nanoparticelle di proteine, in particolare a base di albumina, che è una proteina con peso molecolare molto basso rispetto alla mucina e non è una glicoproteina.

Sono ad oggi disponibili varie formulazioni che comprendono nanoparticelle di albumina. Ad esempio, paclitaxel adsorbito su nanoparticelle di albumina è un farmaco approvato da FDA.

La sintesi di nanoparticelle di albumina è descritta anche in Kimura *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.*, (2018) vol 66, 382–390 (2018), dove si utilizza la desolvatazione in etanolo seguita da reticolazione con glutaraldeide per ottenere nanoparticelle opzionalmente caricate di derivati dell'antraciclina. Nonostante la presenza di alcuni studi sulla preparazione di nanoparticella di mucina o albumina, non è ancora stato reso disponibile un efficace sistema di veicolazione di principi attivi, marcatori o biomolecole soprattutto con riferimento al superamento delle problematiche qui discusse in relazione alla biodisponibilità dei farmaci glicomimetici quando somministrati per via orale o iniettiva e alla resistenza agli antibiotici.

DEFINIZIONI

Se non diversamente definito, tutti i termini dell'arte, notazioni e altri termini scientifici qui utilizzati sono destinati ad avere i significati comunemente compresi da coloro che sono esperti nella tecnica a cui questa descrizione appartiene. In alcuni casi, termini con significati comunemente compresi sono qui definiti per chiarezza e/o per pronto riferimento; l'inserimento di tali definizioni nella presente descrizione non deve quindi essere interpretata come rappresentativa di una differenza sostanziale rispetto a quanto è generalmente compreso nell'arte.

I termini “comprendente”, “avente”, “includente” e “contenente” sono da intendersi come termini aperti (cioè il significato “comprendente, ma non limitato a”) e sono da considerarsi come un supporto anche per termini

come “consistere essenzialmente di”, “consistente essenzialmente di”, “consistere di” o “consistente di”.

Con “farmaci glicomimetici” si intendono farmaci in cui i principi attivi (o molecole di varia natura) sono combinate con una o più molecole di monosaccaridi, in particolare con molecole di glucosio.

Con “glicosilazione” si intende il processo di combinazione di una o più molecole di glucosio (o di altri monosaccaridi) con molecole di natura diversa (che risultano perciò glicosilate).

Con il termine “acido sialico” si intende indicare i derivati N- e O- sostituiti dell’acido neuramminico, cioè un monosaccaride e 9 atomi di carbonio. In particolare, è preferito l’acido N-acetilneuramminico. Per “via parenterale” o “via parenterale iniettiva” si intendono le vie di somministrazione endovenosa, intramuscolare, sottocutanea, intraarteriosa, intraarticolare, intrasinoviale, intracardiaca e intratecale.

Per “via inalatoria” o “via di somministrazione inalatoria” si intende una modalità di somministrazione attraverso le vie respiratorie superiori, trachea, bronchi, fino a giungere a livello degli alveoli.

Con il termine “molecular imaging” si intende la visualizzazione, caratterizzazione e misurazione di processi biologici a livello molecolare o cellulare nell’uomo o in altri organismi viventi.

Il termine “one pot” si riferisce a due o più reazioni consecutive senza isolare il rispettivo oppure i rispettivi prodotti intermedi.

Il termine “eccipiente fisiologicamente accettabile” si riferisce a una sostanza priva di qualsiasi effetto farmacologico proprio e che non produce reazioni avverse quando somministrato ad un mammifero, preferibilmente a un essere umano. Eccipienti fisiologicamente accettabili sono ben noti nell’arte e sono descritti, ad esempio *nell’Handbook of Pharmaceutical Excipients, sixth edition* (2009), qui incorporato per riferimento.

Il termine “composizione” come utilizzato nel presente documento intende comprendere un prodotto comprendente gli ingredienti specificati nelle

quantità specificate, nonché qualsiasi prodotto che risulta, direttamente o indirettamente, dalla combinazione degli ingredienti specificati nelle quantità specificate. Con “farmaceuticamente accettabile” si intende che il vettore, il diluente o l'eccipiente devono essere compatibili con gli altri componenti della formulazione e non deleteri per il ricevente.

Con l'acronimo “PGM” si intende “*pig gastric mucin*”, ovvero la mucina gastrica porcina.

Con l'acronimo “NP” si intende “*nanoparticle*”, ovvero nanoparticella.

Con l'acronimo “NPs” si intende “*nanoparticles*”, ovvero nanoparticelle.

10 Con l'acronimo “NPs-MUCGli” si intendono le nanoparticelle covalentemente reticolate di mucina, preferibilmente mucina gastrica porcina oppure mucina submascellare bovina, dell'invenzione.

Con l'acronimo “NPs-MUCGli/cipro” si intendono le nanoparticelle covalentemente reticolate di mucina, preferibilmente mucina gastrica porcina oppure mucina submascellare bovina, dell'invenzione comprendenti ciprofloxacina.

15 Con l'acronimo “PGM Yan” si intendono gli aggregati nanoparticellari ottenuti in Yan H. *et al.* “Reversible Condensation of Mucins into nanoparticles”, *Langmuir* (2018), vol. 34, p. 13615-13625, a partire da mucina gastrica porcina nativa, ovvero estratta al momento.

20 Con gli acronimi “NPs PGM YAN” oppure “PGM Yan NPs” si intendono le nanoparticelle ottenute con le condizioni ottimali descritte in Yan H. *et al.* “Reversible Condensation of Mucins into nanoparticles”, *Langmuir* (2018), vol. 34, p. 13615-13625 (glicerolo 30% v/v /H₂O), utilizzando mucina gastrica porcina di tipo III commerciale al posto di quella nativa estratta al momento usata da Yan.

Per “biomolecole” si intendono acidi nucleici, peptidi, lipidi e fattori di crescita.

Per “marcatori” si intendono i fluorofori, come ad esempio fluoresceina isotiocianato, rosa bengala e fluorofori nel vicino infrarosso, come le cianine.

Per “mucina di tipo II” si intende una preparazione di mucina grezza gastrica porcina, ad esempio il prodotto n. M2378 del catalogo della Merck 2020 (CAS n. 84082-64-4).

5 Per “mucina di tipo III” si intende una polvere di mucina gastrica porcina parzialmente purificata preparata secondo il metodo descritto in Glenister, D.A. e salmone. K. Ecol microbico. in Health & Disease 1, 31, (1988) Questa mucina è ad esempio il prodotto n. M1778 del catalogo Merck 2020 (CAS n. 84082-64-4).

10 Con l’acronimo “BSM” si intende la mucina submascellare bovina, prodotto n. M3895 catalogo della Merck 2020 (CAS n. 84195-52-8).

Per “cross-linker” si intende “reticolante”.

Con il termine “[mucina]” si intende “concentrazione di mucina”.

Con il termine “[ciprofloxacina]” si intende “concentrazione di ciprofloxacina.

15 Con l’acronimo “PBS” si intende il tampone fosfato salino (dall’inglese *phosphate buffered saline*).

Con l’acronimo “FITC” si intende il composto “fluoresceina isotiocianato”.

20 Con l’acronimo “NPs-MUCGI/FITC” si intendono le nanoparticelle covalentemente reticolate di mucina gastrica porcina dell’invenzione comprendenti fluoresceina isotiocianato.

Con l’acronimo “PAMPA” ci si riferisce al saggio di permeabilità attraverso membrane artificiali parallele, dall’inglese: “*parallel artificial membrane permeability assay*”.

25 **SOMMARIO DELL’INVENZIONE**

In un primo aspetto l’invenzione riguarda nanoparticelle glicosilate di mucina covalentemente reticolate opzionalmente comprendenti almeno un composto scelto tra un principio attivo, un marcatore e una biomolecola, in cui le nanoparticelle presentano le catene oligosaccaridiche della mucina, 30 cioè la parte glicosilata della mucina, sulla superficie delle nanoparticelle.

Secondo un aspetto preferito, la mucina utilizzata per le nanoparticelle glicosilate covalentemente reticolate dell'invenzione è la mucina gastrica porcina (PGM) oppure la mucina submascellare bovina (BSM). Secondo un aspetto ulteriormente preferito, la mucina gastrica porcina è la mucina gastrica porcina di tipo III.

Le nanoparticelle dell'invenzione sono usate per la veicolazione ed il rilascio di principi attivi, marcatori e/o biomolecole. Preferibilmente, i principi attivi sono antibiotici e le nanoparticelle così caricate sono in grado di veicolare tali farmaci verso i batteri e/o il biofilm batterico, grazie al legame tra le lectine presenti nei batteri e gli oligosaccaridi della parte glicosidica della mucina disposti sulla superficie delle nanoparticelle.

Secondo un ulteriore aspetto preferito, i principi attivi sono antivirali e le nanoparticelle dell'invenzione così caricate sono in grado di veicolare tali farmaci verso i virus, eventualmente anche in presenza di muco, grazie alle loro caratteristiche di mucoadesività ed al legame dei virus con gli acidi sialici e con le lectine presenti nelle catene oligosaccaridiche della glicosilazione superficiale delle nanoparticelle.

Quando non sono caricate di principi attivi, le nanoparticelle dell'invenzione possono inibire l'interazione dei virus con alcuni recettori cellulari attraverso un meccanismo di competizione; ad esempio esse possono inibire l'interazione tra il virus *SARS-CoV-2* e i recettori ACE2 (*"Receptor recognition by novel coronavirus from Wuhan: an analysis based on decade-long structural studies of SARS"*, Yushun Wan, Jian Shang, Rachel Graham, Ralph S Baric, Fang Li. *Journal of Virology*, 2020; DOI: 10.1128/JVI.00127-20).

Se caricate con uno o più principi attivi antivirali, le nanoparticelle dell'invenzione mostrano sinergia di azione verso i virus perché possono rilasciare il principio attivo antivirale trasportato e contemporaneamente inibire i virus per competizione ai loro siti recettoriali. L'invenzione riguarda anche un processo per la preparazione di nanoparticelle glicosilate di

mucina covalentemente reticolate, che consente di ottenere le nanoparticelle con una reazione “one-pot”.

BREVE DESCRIZIONE DELLE FIGURE

- 5 L'invenzione verrà descritta qui di seguito con riferimento ad alcuni esempi, forniti a scopo esplicativo e non limitativo, ed illustrati nelle figure annesse.

La figura 1A riporta lo spettro UV-visibile (UV-vis) delle NPs-MUCGli ottenute nell'esempio 1 in confronto allo spettro UV-vis della PGM da sola,

- 10 la figura 1B riporta l'esemplificazione grafica delle NPs-MUCGli ottenute, in cui si può apprezzare la disposizione delle catene oligosaccaridiche sulla superficie delle nanoparticelle.

La figura 2A riporta le immagini TEM (microscopio a trasmissione elettronica) e nella figura 2B si può vedere l'analisi EDS a raggi X delle

- 15 NPs-MUCGli ottenute nell'esempio 1.

La figura 3 riporta l'analisi delle NPs-MUCGli ottenute nell'esempio 1 effettuata con la tecnica DLS (Dynamic Light Scattering).

La figura 4 riporta lo spettro UV-visibile (UV-vis) delle NPs-MUCGli/cipro ottenute nell'esempio 2 in confronto allo spettro UV-vis della PGM da sola

- 20 e della ciprofloxacina da sola.
- La figura 5 riporta l'immagine TEM (microscopio a trasmissione elettronica) delle NPs-MUCGli ottenute nell'esempio 2.

La figura 6 riporta gli spettri Uv-vis che mostrano i rilasci di ciprofloxacina nel tempo da NPs-MUCGli/cipro.

- 25 La figura 7 riporta gli spettri UV-vis di NPs-MUCGli/FITC ottenute nell'esempio 3, di FITC, di PGM e di NPs-MUCGli e NPs-MUCGli/FITC.

La figura 8 riporta le immagini TEM (microscopio a trasmissione elettronica) delle NPs-MUCGli/FITC ottenute nell'esempio 3.

- La figura 9 riporta le rette di taratura di ciprofloxacina (9A) e propanololo
- 30 (9B) per gli studi di permeabilità delle NPs-MUCGli/cipro PAMPA in assenza e presenza di un modello di muco (come descritto in Pacheco,

D.P., Butnarasu, C.S., Briatico Vangosa, F., Pastorino, L., Visai, L., Visentin, S., Petrini, P. “*Disassembling the complexity of mucus barriers to develop a fast screening tool for early drug discovery*” (2019) *Journal of Materials Chemistry B*, 7 (32), pp. 4940-4952).

- 5 La figura 10 riporta il rilascio % cumulativo attraverso PAMPA e PAMPA con muco.

La figura 11 è uno spettro UV relativo alla quantificazione dei glicani sulla superficie delle NPs-MUCGli con reattivo di PAS (esempio 5).

- 10 La figura 12 riporta gli spettri in fluorescenza della lectina concavalina A in presenza di concentrazioni crescenti di NPs-MUCGli.

La figura 13 riporta i dati della vitalità batterica su cellule a diversa densità con ciprofloxacina conservata a -20° C (A) e temperatura ambiente (B).

- 15 La figura 14 è relativa: (A) alla percentuale di vitalità batterica rispetto allo standard; (B) all'inibizione della crescita che è stata calcolata come differenza da ogni% rispetto alla vitalità del 100%, delle NPs-MUCGli, delle NPs-MUCGli/cipro dell'invenzione e della ciprofloxacina.

- 20 La figura 15 riporta l'internalizzazione cellulare e la distribuzione intracellulare di nanoparticelle NPs-MUCGli/FITC. Le nanoparticelle NPs-MUCGli/FITC sono stati incubate a una concentrazione di 25 µg/mL con cellule HaCat per 5 ore. Le membrane cellulari sono state colorate con calceina.

La figura 16 riporta il confronto UV-vis delle nanoparticelle descritte in Yan *et al.* (PGM Yan NPs), delle nanoparticelle ottenute con il metodo della domanda (NPs-MUCGli) e della PGM.

- 25 La figura 17 mostra un confronto delle immagini TEM: A) NPs-MUCGli ottenute dalla mucina gastrica porcina di tipo III con la metodica descritta nella presente domanda di brevetto; B) NPs PGM Yan ottenute dalla mucina gastrica porcina di tipo III con la metodica basata su glicerolo/H₂O descritta in letteratura da Yan *et al.*

La figura 18 riporta lo spettro UV-visibile (UV-vis) delle NPs-MUCGli ottenute nell'esempio 10 in confronto allo spettro UV-vis della BSM da sola.

La figura 19 mostra le immagini TEM (microscopio a trasmissione
5 elettronica) delle NPs-MUCGli ottenute nell'esempio 10.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

La presente invenzione ha come oggetto nanoparticelle glicosilate di mucina covalentemente reticolate in cui le catene oligosaccaridiche della
10 mucina, responsabili della glicosilazione, sono disposte sulla superficie delle nanoparticelle stesse.

Nella composizione della parte oligosaccaridica delle mucine è presente anche l'acido sialico, dove con detto termine si indicano i derivati N- e O-sostituiti dell'acido neuramminico, cioè un monosaccaride e 9 atomi di
15 carbonio. In particolare, è comune l'acido N-acetilneuramminico.

Le nanoparticelle glicosilate di mucina covalentemente reticolate secondo la presente invenzione presentano vantaggiosamente glicani in superficie, come dimostrato nella parte sperimentale (PAS test – esempio 5), sebbene in quantità inferiore rispetto alla mucina di partenza.

20 Le catene glicaniche presenti sulla superficie delle nanoparticelle glicosilate di mucina covalentemente reticolate della presente invenzione comprendono N-acetilgalattosamina, N-acetilglucosamina, fucosio, galattosio e/o acido sialico,

Sono quindi oggetto della presente invenzione nanoparticelle glicosilate di
25 mucina covalentemente reticolate, da sole o caricate con almeno un composto scelto tra un principio attivo, un marcatore e una biomolecola, in cui le catene oligosaccaridiche superficiali comprendono N-acetilgalattosamina, N-acetilglucosamina, fucosio, galattosio e/o acido sialico.

30 La glicosilazione, cioè l'aggiunta di carboidrati o zuccheri, è ampiamente diffusa in natura per funzionalizzare le molecole per il riconoscimento e la

segnalazione cellulare, che avviene anche grazie all'interazione tra gli oligosaccaridi e le lectine. Nel caso delle nanoparticelle glicosilate di mucina covalentemente reticolate della presente invenzione, le catene oligosaccaridiche sono presenti naturalmente sulla mucina e quindi non
5 devono essere aggiunte separatamente mediante un procedimento di sintesi. Tali catene oligosaccaridiche si dispongono sulla superficie delle nanoparticelle e quindi sono disponibili all'interazione con le lectine presenti ad esempio sui batteri e all'interazione con i virus, grazie agli acidi sialici e alle lectine presenti nelle catene oligonucleotidiche stesse, a cui si
10 possono legare i virus, in particolare il virus dell'influenza, della parainfluenza, della parotite, i coronavirus, i norovirus, rotavirus e i virus tumorali del DNA.

La capacità di inglobare una buona quantità di principi attivi e di veicarli a lectine batteriche e a virus rende le nanoparticelle secondo la presente
15 invenzione carrier adatti per principi attivi antibatterici e/o antivirali che possono essere trasportati direttamente nel sito dell'infezione batterica e/o virale e lì rilasciati. Ciò consente di rendere i principi attivi antibatterici e/o antivirali più disponibili proprio nello specifico sito d'azione e, in tal modo, contribuire al superamento delle resistenze batteriche e/o virali

20 Le lectine sono inoltre implicate nella formazione del biofilm batterico, aggregazione complessa di microrganismi contraddistinta dalla secrezione di una matrice adesiva e protettiva, che rende i batteri ancora più resistenti all'attacco degli antibiotici.

Le nanoparticelle glicosilate di mucina covalentemente reticolate
25 dell'invenzione possono quindi interferire con le lectine che formano il biofilm e rilasciare in maniera mirata l'antibiotico, contribuendo, anche in questo modo, al superamento delle resistenze batteriche.

Inoltre, le nanoparticelle glicosilate di mucina covalentemente reticolate dell'invenzione presentano un'attività mucoadesiva, che permette di
30 raggiungere gli aggregati batterici riuscendo così a rilasciare l'antibiotico nel sito d'azione ed inibire la formazione del biofilm.

Pertanto, le nanoparticelle glicosilate di mucina covalentemente reticolate dell'invenzione, che sono biocompatibili e che non presentano attività immunogenica, possono essere utilizzate come veicoli per il trasporto di principi attivi, marcatori e/o biomolecole, in quanto riescono a raggiungere
5 i loro siti bersaglio grazie alla glicosilazione superficiale, come dimostrato nella parte sperimentale (interazione con la lectina concavalina A).

Le nanoparticelle di mucina covalentemente reticolate della presente invenzione sono inoltre utilizzabili per il trattamento di patologie in cui si ha una sovra-produzione di muco, quali la fibrosi cistica e la bronchietasi.
10 Vantaggiosamente, le nanoparticelle glicosilate di mucina covalentemente reticolate secondo la presente invenzione agiscono come carrier (vettori di trasporto) ed essendo mucoadesive favoriscono il rilascio dell'almeno un principio attivo, marcatore e/o biomolecola trasportati al sito desiderato. Dette nanoparticelle infatti si sciolgono nel muco, rilasciando l'almeno un
15 composto scelto tra un principio attivo, un marcatore e una biomolecola direttamente nel sito target.

Le nanoparticelle glicosilate di mucina covalentemente reticolate dell'invenzione sono quindi in grado di rilasciare il principio attivo direttamente a contatto con i virus anche in presenza di uno spesso strato
20 di muco, che può ostacolare il rilascio dei principi attivi ai siti di infezione virale.

Questo aspetto è quindi particolarmente vantaggioso in caso di infezioni virali che portano ad una eccessiva produzione di muco nelle vie respiratorie, quale ad esempio l'infezione causata dal virus SARS-CoV-2
25 (Sindrome Respiratoria Acuta Grave-CoronaVirus-2 – denominazione secondo *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV)).

Le nanoparticelle di mucina covalentemente reticolate secondo la presente invenzione comprendenti marcatori trovano vantaggioso impiego nel molecular imaging per la visualizzazione di proteine presenti sulla
30 superficie dei neuroni.

L'invenzione ha quindi come oggetto le nanoparticelle glicosilate di mucina covalentemente reticolate come sopra definite per l'uso come veicoli di almeno un composto scelto tra un principio attivo, un marcatore e una biomolecola.

- 5 Le nanoparticelle glicosilate di mucina covalentemente reticolate dell'invenzione rappresentano dei nanosistemi multifunzionali glicomimetici (vettori glicomimetici) in grado di inglobare buone quantità di principi attivi, marcatori e/o biomolecole: l'efficienza di intrappolamento di queste sostanze compresa tra il 70% e 95%.
- 10 Il rilascio completo dei principi attivi, marcatori e/o biomolecole dalle nanoparticelle glicosilate di mucina covalentemente reticolate dell'invenzione avviene dopo 24 ore (dato calcolato in vitro, via dialisi e centrifugazione), in quanto non c'è un legame covalente che deve essere scisso tra il principio attivo caricato e le nanoparticelle dell'invenzione.
- 15 Le nanoparticelle glicosilate di mucina covalentemente reticolate dell'invenzione presentano un diametro particellare medio compreso tra 100 e 400 nanometri (nm), preferibilmente tra 150 e 300 nm e ancora più preferibilmente di circa 250 nm. Il diametro medio particellare delle nanoparticelle dell'invenzione è stato misurato tramite microscopio a
- 20 trasmissione elettronica (TEM) e confermato anche con metodiche DLS (Dynamic Light Scattering).

L'invenzione ha quindi come oggetto nanoparticelle glicosilate di mucina covalentemente reticolate in cui le catene oligosaccaridiche della mucina, responsabili della glicosilazione, sono disposte sulla superficie delle

25 nanoparticelle stesse, comprendenti almeno un composto scelto tra un principio attivo, un marcatore e una biomolecola.

Con il termine "comprendenti" si intende che le nanoparticelle incapsulano almeno un composto scelto tra un principio attivo, un marcatore e una biomolecola.

- 30 Principi attivi di particolare interesse che possono essere caricati dalle nanoparticelle glicosilate di mucina covalentemente reticolate

dell'invenzione sono gli antibiotici. Antibiotici particolarmente preferiti sono scelti tra gli antibiotici appartenenti alla classe degli aminoglicosidi, delle cefalosporine, dei chinoloni, delle lincosamidi, dei macrolidi, dei nitroimidazoli, delle penicilline, dei sulfamidici, delle tetracicline e/o dei peptidi. Tra gli antibiotici chinolonici è particolarmente preferita la ciprofloxacina.

Altri principi attivi di particolare interesse che possono essere caricati dalle nanoparticelle glicosilate di mucina covalentemente reticolate dell'invenzione sono i principi attivi antivirali.

Principi attivi antivirali di particolare interesse sono scelti tra i principi attivi anti virus influenzali, anti virus erpetici, anti virus epatici, anti HIV e/o anti virus della famiglia Poxviridae. Sono anche di particolare interesse i principi attivi anti virus SARS-CoV-2 (comunemente detto Covid-19): in particolare è preferito il principio attivo remdesivir oppure le miscele di principi attivi antivirali, quali ad esempio lopinavir/ritonavir, darunavir/ritonavir e darunavir e cobicistat.

Ulteriori principi attivi di particolare interesse che possono essere caricati dalle nanoparticelle glicosilate di mucina covalentemente reticolate dell'invenzione sono i principi attivi antitumorali.

Principi attivi antitumorali di particolare interesse sono scelti tra gli agenti alchilanti, gli antimetaboliti, gli antibiotici antitumorali, gli inibitori della topoisomerasi, gli agenti differenziati e/o i farmaci che stimolano il sistema immunitario.

Marcatori di particolare interesse che possono essere caricati dalle nanoparticelle glicosilate di mucina covalentemente reticolate dell'invenzione sono i fluorofori. Fluorofori particolarmente preferiti sono fluoresceina isotiocianato, rosa bengala e/o i fluorofori nel vicino infrarosso, come le cianine.

Biomolecole di particolare interesse che possono essere caricati dalle nanoparticelle glicosilate di mucina covalentemente reticolate dell'invenzione sono acidi nucleici, peptidi, lipidi e/o fattori di crescita.

Deve anche essere sottolineato come le catene zuccherine che formano la glicosilazione superficiale delle nanoparticelle di mucina covalentemente reticolate dell'invenzione, possano anche essere modificate, in modo da inserire nuovi tipi di zuccheri in dette catene zuccherine. Ad esempio, i

5 glicani superficiali delle nanoparticelle dell'invenzione possono anche essere funzionalizzati con α -L-fucosio e/o uno o più composti della classe delle lectine, quale ad esempio la concavalina A, la emoagglutinina (HA), la neuraminidasi (NA), lectina A (LecA) e/o lectina B (LecB) trovando così applicazione per l'uso nella vaccinazione mucosale e nel trattamento delle

10 infezioni virali. Con l'inserimento del α -L-fucosio possono essere riconosciuti i batteri (es. *helicobacter pylori*) o alcuni virus e rilasciare quindi il principio attivo antibatterico o antivirale direttamente al target (Steven L. Taylor et al. *Trends in Microbiology*, February 2018, Vol. 26, No. 2 <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.09.011>).

15 Sono quindi un oggetto della presente invenzione nanoparticelle glicosilate di mucina covalentemente reticolate, in cui le catene oligosaccaridiche della mucina, responsabili della glicosilazione, sono disposte sulla superficie delle nanoparticelle stesse, opzionalmente comprendenti almeno un composto scelto tra un principio attivo, un

20 marcatore e una biomolecola, in cui gli oligosaccaridi della mucina sono ulteriormente funzionalizzati, ad esempio con α -L-fucosio e/o uno o più composti della classe delle lectine, quale ad esempio la concavalina A, la emoagglutinina (HA), la neuraminidasi (NA), lectina A (LecA) e/o lectina B (LecB).

25 In letteratura sono descritti nanosistemi glicosilati che prevedono un processo di funzionalizzazione superficiale delle nanoparticelle con carboidrati. Detto processo di glicosilazione è un processo chimico complesso, che richiede diversi passaggi di sintesi, rendendo complesso e/o non economico il trasferimento su scala industriale del processo di

30 sintesi.

In contrasto, le nanoparticelle glicosilate di mucina covalentemente reticolate della presente invenzione sono ottenute secondo un metodo di preparazione “one-pot” che permette di ottenere dette nanoparticelle di mucina direttamente funzionalizzate, sulla superficie esterna, con gli oligosaccaridi presenti nella mucina di partenza, opzionalmente comprendenti almeno un composto scelto tra un principio attivo, un marcatore e una biomolecola.

Forma quindi un altro oggetto della presente invenzione un metodo “one-pot” per la preparazione di nanoparticelle glicosilate di mucina covalentemente reticolate, che comprende i seguenti passaggi:

- a) ottenimento di una soluzione, preferibilmente una soluzione salina, di mucina;
- b) regolazione del pH della soluzione ottenuta nel passaggio precedente ad un pH compreso tra 7,5 e 9,5, preferibilmente tra 8 e 9 e ancora più preferibilmente a pH 8,5;
- c) desolvatazione di mucina effettuata tramite l’aggiunta di un solvente alcolico, preferibilmente etanolo, alla soluzione direttamente ottenuta nel passaggio b);
- d) aggiunta di un reticolante, preferibilmente glutaraldeide, alla soluzione direttamente ottenuta nel passaggio c).

Secondo un aspetto preferito la glutaraldeide è aggiunta alla velocità di una goccia al secondo. La reazione avviene a temperatura ambiente.

Dopo l’aggiunta del reticolante, si mantiene l’agitazione per un tempo compreso tra 4 e 48 h, preferibilmente per 12-24 h.

Le nanoparticelle così ottenute in soluzione possono essere facilmente purificate, preferibilmente sono purificate per centrifugazione.

Il metodo sopra descritto può quindi comprendere un ulteriore passaggio di purificazione delle nanoparticelle di mucina ottenute, preferibilmente un passaggio di purificazione per centrifugazione.

Le nanoparticelle purificate dell’invenzione possono essere liofilizzate per ottenere la forma in polvere.

Il metodo sopra descritto può quindi comprendere un ulteriore passaggio di liofilizzazione delle nanoparticelle di mucina purificate.

In una forma preferita, il metodo è basato su mucine commerciali derivanti dallo stomaco di maiale, ovvero è utilizzata mucina gastrica porcina (Pig gastrin mucina – PGM), oppure il metodo è basato su mucina submascellare bovina (BSM). Secondo un aspetto ulteriormente preferito, la mucina gastrica porcina è mucina gastrica porcina di tipo III.

Secondo un aspetto preferito, il reticolante utilizzato nel metodo dell'invenzione è glutaraldeide in quanto è un composto privo di tossicità, tuttavia altri reticolanti covalenti e poco tossici possono essere parimenti utilizzati.

Secondo un altro aspetto preferito, la soluzione di mucina del passaggio a) è una soluzione di NaCl.

Secondo un ulteriore aspetto preferito, il solvente alcolico, preferibilmente etanolo, è aggiunto a goccia a goccia.

Il metodo sopra descritto può quindi comprendere un passaggio in cui il solvente alcolico, preferibilmente etanolo, è aggiunto a goccia a goccia.

Vantaggiosamente, il metodo secondo la presente invenzione permette di ottenere nanoparticelle di mucina covalentemente reticolate direttamente glicosilate, senza dover ricorrere a successive funzionalizzazioni delle nanoparticelle con oligosaccaridi.

Una volta ottenute le nanoparticelle di mucina glicosilate è possibile ulteriormente funzionalizzare le catene oligosaccaridiche esterne, ad esempio con α -L-fucosio e/o uno o più composti della classe delle lectine, quale ad esempio la concavalina A, la emoagglutinina (HA), la neuraminidasi (NA), lectina A (LecA) e/o lectina B (LecB).

Sono quindi anche oggetto dell'invenzione le nanoparticelle di mucina glicosilate covalentemente reticolate ottenibili con il metodo "one-pot" di preparazione sopra descritto.

Secondo un ulteriore aspetto preferito, il metodo "one-pot" dell'invenzione per la preparazione di nanoparticelle di mucina, può essere utilizzato per

la produzione di nanoparticelle glicosilate di mucina covalentemente reticolate comprendenti almeno un composto scelto tra un principio attivo, un marcatore e una biomolecola.

Detto metodo "one-pot" per la preparazione di nanoparticelle glicosilate di mucina covalentemente reticolate comprendenti almeno un composto scelto tra un principio attivo, un marcatore e una biomolecola, oltre ai passaggi da a) a d) sopra descritti, comprende ulteriormente il passaggio a') tra il passaggio a) e il passaggio b):

a') aggiunta alla soluzione ottenuta nel passaggio a) di almeno un composto scelto tra un principio attivo, un marcatore e una biomolecola.

Forma quindi un altro oggetto della presente invenzione un metodo "one-pot" per la preparazione di nanoparticelle glicosilate di mucina covalentemente reticolate comprendenti almeno un composto scelto tra un principio attivo, un marcatore e una biomolecola, che comprende i seguenti passaggi:

- a) ottenimento di una soluzione, preferibilmente una soluzione salina, di mucina;
 - a') aggiunta alla soluzione ottenuta nel passaggio a) di almeno un composto scelto tra un principio attivo, un marcatore e una biomolecola;
 - b) regolazione del pH della soluzione ottenuta nel passaggio precedente ad un pH compreso tra 7,5 e 9,5, preferibilmente tra 8 e 9 e ancora più preferibilmente a pH 8,5;
 - c) desolvatazione di mucina effettuata tramite l'aggiunta di un solvente alcolico, preferibilmente etanolo, alla soluzione direttamente ottenuta nel passaggio b);
 - d) aggiunta di un reticolante, preferibilmente glutaraldeide, alla soluzione direttamente ottenuta nel passaggio c).
- Secondo un aspetto preferito la glutaraldeide è aggiunta alla velocità di una goccia al secondo. La reazione avviene a temperatura ambiente.

Dopo l'aggiunta del reticolante, si mantiene l'agitazione per un tempo compreso tra 4 e 48 h, preferibilmente per 12-24 h.

Le nanoparticelle così ottenute in soluzione possono essere facilmente purificate, preferibilmente sono purificate per centrifugazione.

- 5 Il metodo sopra descritto può quindi comprendere un passaggio ulteriore di purificazione delle nanoparticelle di mucina ottenute, preferibilmente un passaggio di purificazione per centrifugazione.

Le nanoparticelle purificate dell'invenzione possono essere liofilizzate per ottenere la forma in polvere.

- 10 Il metodo sopra descritto può quindi comprendere un ulteriore passaggio di liofilizzazione delle nanoparticelle di mucina purificate.

In una forma preferita, il metodo è basato su mucine commerciali derivanti dallo stomaco di maiale , ovvero è utilizzata mucina gastrica porcina (Pig gastrin mucina – PGM); oppure il metodo è basato su mucina submascellare bovina (BSM). Secondo un aspetto ulteriormente preferito, la mucina gastrica porcina è mucina gastrica porcina di tipo III.

- 15 Secondo un aspetto preferito, il reticolante utilizzato nel metodo dell'invenzione è glutaraldeide in quanto è un composto privo di tossicità, tuttavia altri reticolanti covalenti e poco tossici possono essere parimenti utilizzati.

Secondo un aspetto preferito, la soluzione di mucina del passaggio a) è una soluzione di NaCl.

Secondo un ulteriore aspetto preferito, il solvente alcolico, preferibilmente etanolo, è aggiunto a goccia a goccia.

- 25 Il metodo sopra descritto può quindi comprendere un passaggio in cui il solvente alcolico, preferibilmente etanolo, è aggiunto a goccia a goccia.

Vantaggiosamente, il metodo secondo la presente invenzione permette di ottenere nanoparticelle di mucina covalentemente reticolate direttamente glicosilate, comprendenti almeno un composto scelto tra un principio attivo, un marcatore e una biomolecola, senza dover ricorrere a successive funzionalizzazioni con oligosaccaridi.

- 30

Una volta ottenute le nanoparticelle di mucina glicosilate covalentemente reticolate è possibile ulteriormente funzionalizzare le catene oligosaccaridiche esterne, ad esempio con α -L-fucosio e/o uno o più composti della classe delle lectine, quale ad esempio la concavalina A, la
5 emoagglutinina (HA), la neuraminidasi (NA), lectina A (LecA) e/o lectina B (LecB).

Sono quindi oggetto dell'invenzione le nanoparticelle di mucina glicosilate comprendenti almeno un composto scelto tra un principio attivo, un marcatore e una biomolecola, ottenute con il metodo "one-pot" di
10 preparazione sopra descritto.

Formulazioni farmaceutiche contenenti le nanoparticelle di mucina glicosilate covalentemente reticolate, opzionalmente comprendenti almeno un composto scelto tra un principio attivo, un marcatore e una biomolecola qui descritte possono essere preparate usando un eccipiente
15 fisiologicamente accettabile che è considerato sicuro ed efficace e può essere somministrato a un individuo senza causare effetti biologici indesiderabili o interazioni indesiderate.

Le nanoparticelle di mucina glicosilate covalentemente reticolate della presente invenzione possono essere formulate per la somministrazione
20 per via orale, inalatoria e/o parenterale. Esse infatti sono purificabili e liofilizzabili e questo permette di ottenerne delle soluzioni sterili, utili ad esempio per la preparazione di formulazioni per aerosol e iniettabili. Quando ad esempio utilizzate per la vaccinazione mucosale, le nanoparticelle di mucina glicosilate covalentemente reticolate
25 dell'invenzione possono essere formulate in forma orale.

L'invenzione è di seguito illustrata tramite esempi sperimentali, che non sono da considerare limitanti per lo scopo dell'invenzione.

ESEMPI

Esempio 1

30 Preparazione di nanoparticelle di mucina gastrica porcina glicosilate covalentemente reticolate (NPs-MUCGli).

Sono stati pesati 50 mg di mucina gastrica porcina (PGM), di tipo III commerciale (Sigma Aldrich Partially purified powder, Cas Number 84082-64-4). La mucina di tipo III è una polvere di mucina gastrica porcina parzialmente purificata preparata secondo il metodo descritto in Glenister,
5 D.A. e salmone. K. Ecol microbico. in Health & Disease 1, 31, (1988). Poi sono stati aggiunti 2 ml di NaCl 10 mM. Si è lasciato sotto agitazione per 4 ore, titolando il pH a 8,5 con NaOH 0,1 mM. Si sono aggiunti 8 ml di etanolo 1 gtt/sec. Quindi si sono aggiunti 90 µl di glutaraldeide all'8% in acqua milli-q (agente reticolante) e si è lasciato in agitazione per 24 ore.

- 10 Le nanoparticelle ottenute in soluzione sono state purificate per centrifugazione: sono state trasferite in un falco e sono stati effettuati 5 cicli di centrifugazione: 1) 1000 rpm x 5 min; 2) 2000 rpm x 5 min; 3) 4000 rpm x 5 min; 4) 4000 rpm x 15 min; 5) 4000 rpm x 15 min.

- 15 Il surnatante è stato rimosso ad ogni passaggio ed è stato sostituito con 1 ml di acqua fresca milli- dopo ogni ciclo di centrifugazione.

Dalla centrifugazione è stato ottenuto un solido che è stato risolubilizzato in soluzione acquosa.

- Le NPs-MUCGli sono state liofilizzate per ottenere la forma in polvere: il campione è stato diviso in tre aliquote da 2 mL in tre diverse provette
20 Eppendorf® e posto in azoto liquido fino a completo congelamento. Il pallone è stato quindi collegato a un liofilizzatore da tavolo (HETO LyoLab3000) dotato di frigorifero, centrifuga a vuoto e pompa a vuoto per mantenere la temperatura a -56 ° C per un periodo di 8 ore. Le NPs-MUCGli sono state risospese in 2 ml di acqua milli-q e confrontata con il
25 campione originale attraverso uno studio UV-Vis (figura 1A) e TEM e si osserva che le nanoparticelle mantengono le loro caratteristiche (figura 2A).

Caratterizzazione delle nanoparticelle NPs-MUCGli

- Dopo la sintesi delle NPs-MUCGli è stato condotto uno studio UV-vis: 100
30 µL di NPs-MUCGli sono stati diluiti a 1 ml con acqua milli-q (900 µL). Lo spettro è stato misurato a 25 ° C nell'intervallo 200-400 nm (figura 1A).

Le nanoparticelle sintetizzate sono state caratterizzate via TEM (modello JEOL 3010-UHR) (figura 2A).

Attraverso un'analisi qualitativa di microanalisi a raggi X EDS, è stato anche determinato che C, N e O sono gli unici elementi che compongono le NPs-MUCGli (figura 2B). Le dimensioni delle NPs-MUCGli risultano essere comprese tra 200-300 nm.

Un'ulteriore caratterizzazione è stata effettuata con la tecnica del Dynamic Light Scattering (DLS) sono state confermate le dimensioni ottenute tramite TEM. L'esperimento è stato condotto a diversi valori di pH (figura 3).

Esempio 2

Preparazione di nanoparticelle covalentemente reticolate di mucina gastrica porcina glicosilate caricate con ciprofloxacina (NPs-MUCGli/cipro).

Le NPs-MUCGli/cipro sono state sintetizzate con lo stesso metodo di desolvatazione usato per le NPs-MUCGli dell'esempio 1. Per questa preparazione, 50 mg di PGM tipo III sono stati solubilizzati in 2,0 ml di una soluzione di NaCl da 10 mM. Alla risultante soluzione opalescente sono stati aggiunti 3 mg di ciprofloxacina e si è incubato per 4 ore. La soluzione risultante è stata titolata a pH 8,5 con una soluzione NaOH 0,1 mM. Quindi, sono stati continuamente aggiunti 8,0 ml di etanolo a temperatura ambiente e sotto vigorosa agitazione. È possibile osservare l'inizio della formazione delle nanoparticelle per precipitazione. La portata di etanolo è stata regolata a 1gtt/sec. Dopo il processo di desolvatazione, sono stati aggiunti 90 µl di glutaraldeide all'8% (in acqua milli-q) per indurre la reticolazione delle particelle, che è stata completata dopo aver lasciato in agitazione la sospensione per 24 ore.

Le NPs-MUCGli/cipro risultanti sono state purificate come descritto nell'esempio 1.

Le NPs-MUCGli/cipro mantengono le loro proprietà per una settimana di conservazione a 4°C. Le NPs-MUCGli/cipro sono state liofilizzate per

ottenere la forma in polvere con la stessa tecnica descritta nell'esempio 1. Le NPs-MUCGli/cipro sono state quindi risospese in 3 ml di acqua milli-q e confrontate con il campione originale attraverso uno studio UV-Vis (figura 4).

5 Efficienza di incapsulamento delle NPs-MUCGli/cipro.

Per quantificare l'esatta quantità di ciprofloxacina incapsulata nelle NPs-MUCGli/cipro, è stato condotto uno studio UV sui supernatanti raccolti durante la fase di purificazione delle NPs-MUCGli/cipro. 100 µL di surnatante sono stati prelevati e diluiti a 1 ml con acqua milli-q (900 µL); lo
10 spettro è stato nuovamente misurato nell'intervallo 200-400 nm al massimo di assorbanza a 323 nm.

Sostituendo questo valore nella curva di calibrazione della ciprofloxacina, è stata determinata la concentrazione di ciprofloxacina (µg/mL).

Pertanto, in 1 ml, la massa di ciprofloxacina (µg) era la stessa della sua
15 concentrazione ([ciprofloxacina]
(µg/ml) x 1 ml).

Quindi è stata calcolata la massa di ciprofloxacina nella soluzione di surnatanti: il valore di massa è stato moltiplicato per il volume di surnatanti raccolti e diviso per 100 µL. Questa quantità è stata sottratta al farmaco
20 inizialmente aggiunto (3 mg) e la massa di ciprofloxacina incapsulata è stata determinata in 700 ug/mL.

Caratterizzazione delle nanoparticelle NPs-MUCGli/cipro

Le NPs-MUCGli/cipro sono state caratterizzate via UV-vis (figura 4).

Le NPs-MUCGli/cipro.sintetizzate sono state caratterizzate via TEM
25 (modello JEOL 3010-UHR) (figura 5). Le dimensioni risultano analoghe a quelle della NPs-MUCGli, ovvero il diametro particellare è di 200 nm.

Rilascio di ciprofloxacina dalle NPs-MUCGli/cipro

Le NPs-MUCGli/cipro sono state sintetizzate come descritto sopra. Quindi sono state quantificate le concentrazioni di ciprofloxacina e mucina, come
30 sopra descritto. Per quantificare la mucina, sono stati raccolti e diluiti 100 ml di campione a 1 ml con acqua milli-q (900 µL); lo spettro è stato

misurato a 25° C nell'intervallo 200-400 nm. L'assorbanza è stata misurata a 256 nm e sostituita nella curva di calibrazione.

Al contrario, per determinare la concentrazione di ciprofloxacina ([ciprofloxacina]), i supernatanti sono stati raccolti durante la purificazione; 100 µL sono stati prelevati e diluiti a 1 ml con acqua milli-q (900 µL); lo spettro è stato misurato a 25° C nell'intervallo 200-400 nm. L'assorbanza è stata misurata a 323 nm e sostituita nella curva di calibrazione.

Sono state determinate le seguenti concentrazioni:

[mucina] = 369 µg/mL

[ciprofloxacina] = 76,8 µg/mL

Pertanto, è stata preparata una soluzione di mucina e ciprofloxacina, al fine di avere le stesse concentrazioni come nelle NPs-MUCGli/cipro. Per preparare una soluzione in cui la concentrazione di mucina è 369 µg / mL e la concentrazione di ciprofloxacina è 76,8 µg/mL, sono stati pesati 1,5 mg di PGM tipo III su una bilancia analitica e diluiti a un volume finale di 4 mL con 10 mM PBS. Quindi, sono stati aggiunti 0,3 mg di ciprofloxacina e la soluzione è stata miscelata con un vortex.

L'esperimento è stato condotto utilizzando una membrana Spectra/Por 1® con le caratteristiche seguenti:

- Cut/off peso molecolare (Molecular Weight Cut-Off): 6-8 kD
- Larghezza piana (Flat Width): 23 mm
- Diametro (Diameter): 14,6 mm
- Volume/altezza (Volume/Length): 1,7 mL/cm

Ogni membrana è stata riempita con 1 mL di soluzione di NPs-MUCGli/cipro o soluzione di mucina e ciprofloxacina, e chiuso con clip per dialisi.

Ogni 5, 10, 15, 30 minuti, 1 ora, 2 ore, 4 ore, 6 ore e 24 ore, sono stati prelevati 200 µL di terreno recettoriale e sostituiti con la stessa quantità di PBS fresco. I campioni sono stati trasferiti in un Eppendorf® e diluiti a 1 mL (800 µL) con PBS 10 mM ed è stato condotto uno studio UV-vis nell'intervallo 200-400 nm. Per quantificare la concentrazione di

ciprofloxacina, l'assorbanza è stata misurata a 323 nm e sostituita nella curva di calibrazione. Dopo aver calcolato la concentrazione ($\mu\text{g}/\text{mL}$), è stata determinata la massa di ciprofloxacina. La tabella 1 mostra la quantificazione delle NPs-MUCGli/cipro, dove con l'abbreviazione "abs" si intende l'assorbanza.

In figura 6 vengono riportati gli spettri UV-vis ottenuti durante il monitoraggio del rilascio di ciprofloxacina.

Tabella 1

Tempo	Abs	Concentrazione($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Massa in 1 mL (μg)	Massa Totale (μg)
5 min	0,0145	0,221	9,94	70,72
10 min	0,0148	0,221	9,96	141,55
15 min	0,0158	0,222	10,01	212,70
30 min	0,0157	0,222	9,99	283,79
1 h	0,0297	0,236	10,63	359,36
2 h	0,0405	0,247	11,12	438,40
4 h	0,0327	0,239	10,76	514,93
6 h	0,0362	0,243	10,92	592,59
24 h	0,032	0,239	10,73	668,9

Esempio 3

Preparazione di nanoparticelle di mucina gastrica porcina glicosilate covalentemente reticolate caricate con fluoresceina isotiocianato (NPs-MUCGli/FITC).

- 15 Le NPs-MUCGli/FITC sono state sintetizzate con lo stesso metodo di desolvatazione delle NPs-MUCGli dell'esempio 1.

50 mg di PGM tipo III sono stati solubilizzati in 2,0 ml di una soluzione di NaCl da 10 mM. Alla risultante soluzione opalescente sono stati aggiunti 3 mg di FITC e incubati per 4 ore. La soluzione risultante è stata titolata a pH 8,5 con una soluzione NaOH 0,1mM. Quindi sono stati continuamente
5 aggiunti 8,0 mL di etanolo a temperatura ambiente e sotto vigorosa agitazione. È stato possibile osservare l'inizio della formazione delle nanoparticelle. La quantità di etanolo è stata regolata a 1 gtt/ sec. Dopo il processo di desolvatazione, sono stati aggiunti 90 µL di glutaraldeide all'8% (in acqua milli-q) per indurre la reticolazione delle particelle, che è
10 stata completata dopo aver agitato la sospensione per 24 ore.

Le nanoparticelle vengono purificate con il metodo descritto nell'esempio 1 precedenti.

Caratterizzazione delle NPs-MUCGli/FITC

Le NPs-MUCGli/FITC sono state inizialmente caratterizzate mediante
15 spettroscopia UV-Vis. Questo spettro è stato confrontato con quello di PGM, FITC, NPs-MUCGli e NPs-MUCGli/FITC (figura 7).

Grazie alla microscopia elettronica a trasmissione siamo stati in grado di monitorare la morfologia delle NPs-MUCGli/FITC: le immagini TEM del campione mostrano che le NPs-MUCGli/FITC sono sferiche (figura 8).
20 Dalle immagini TEM abbiamo stabilito che la dimensione media delle NPs-MUCGli/FITC è $314,2 \pm 43,21$ nm.

Esempio 4

Studi di permeabilità delle NPs-MUCGli/cipro PAMPA in assenza e presenza di un modello di muco (come descritto in Pacheco, D.P.,
25 Butnarasu, C.S., Briatico Vangosa, F., Pastorino, L., Visai, L., Visentin, S., Petrini, P. “*Disassembling the complexity of mucus barriers to develop a fast screening tool for early drug discovery*” (2019) *Journal of Materials Chemistry B*, 7 (32), pp. 4940-4952).

L'esperimento è stato condotto su un sistema di piastre PAMPA
30 preverniciato Corning® da 96 pozzetti. La porosità della membrana artificiale è di $0,45 \mu\text{m}$ e il diametro interno è di 6,4 mm. La diffusione del

farmaco attraverso la membrana PAMPA è stata valutata sia in assenza che in presenza di muco; è stato anche studiato la diffusione del propranololo, come standard, poiché è classificato come farmaco ad alta permeabilità.

- 5 Quindi, prima dei test di rilascio del farmaco, è stato condotto uno studio di permeabilità usando la formula tradizionale (equazione 1 – eq. 1):

Eq. 1

$$Pe = \frac{-\ln \left[1 - \frac{CA(t)}{C_{equilibrium}} \right]}{A \left(\frac{1}{V_D} + \frac{1}{V_A} \right) t}$$

- 10 dove Pe è la permeabilità effettiva in unità di cm/s, A = area del filtro effettiva, V_D = volume del pozzo del donatore (200 µL), V_A = volume del pozzo dell'accettore (300 µL), t = tempo (i) di incubazione, C_A (t) = concentrazione del composto nel pozzo dell'accettore al momento t, C_D (t) = concentrazione del composto nel pozzo del donatore al momento t e

15

Eq.2

$$C_{equilibrium} = [C_D(t)V_D + C_A(t)V_A] / (V_D + V_A)$$

Innanzitutto, sono state preparate 200 µM di soluzioni all'1% v/v di DMSO di:

- 20 - propranololo - 200 µM

Una soluzione madre di 2 mM è stata preparata solubilizzando 2,4 mg di propranololo in 40 µL di DMSO, diluito a un volume finale di 4 mL con 10 mM di PBS (3960 µL). Quindi 400 µL della soluzione madre sono stati diluiti a 4 ml con PBS 10 mM (3600 µL).

- 25 - ciprofloxacina - 200 µM

Una soluzione madre di 2 mM è stata preparata solubilizzando 2,7 mg di ciprofloxacina in 40 µL di DMSO, diluita a un volume finale di 4 ml con 10 mM di PBS (3960 µL). Quindi 400 µL della soluzione madre sono stati diluiti a 4 ml con PBS 10 mM (3600 µL).

Successivamente, il compartimento del donatore è stato riempito con 200 μL di soluzione farmacologica mentre il compartimento dell'accettore è stato riempito con 300 μL di PBS da 10 mM. Dopo 5 ore, le soluzioni sono state raccolte dai compartimenti del donatore e dell'accettore e analizzate
5 tramite fluorescenza con un fluorimetro Fluorog Jobin Yvon.

L'emissione di propranololo è stata misurata a 350 nm (emissione λ) dopo eccitazione a 289 nm (eccitazione λ); lo spettro è stato valutato tra 310 nm e 500 nm, con slit 3-4.

L'emissione di ciprofloxacina è stata misurata a 418 nm (emissione λ)
10 dopo eccitazione a 272 nm (eccitazione λ); lo spettro è stato valutato tra 290 nm e 500 nm, con slit 3-4 (figura 9).

Le intensità sono state sostituite nelle curve di calibrazione (figura 9) per determinare le concentrazioni di ciprofloxacina e propranololo (ng/mL).

Nella tabella 2 sono riportati i dati relativi alle condizioni utilizzate per
15 ottenere i dati di permeabilità.

Tabella 2

Concentrazioni di propranololo							
	Vd (mL)	Ca (t) (M)	Va (mL)	C0 (M)	A (cm ²)	t (s)	Ceq (M)
6,60E-06	0,2	2,01E-06	0,3	2,00E-04	0,3	18000	3,85E-06
Concentrazioni di ciprofloxacina							
Cd(t) (M)	Vd (mL)	Ca (t) (M)	Va (mL)	C0 (M)	A (cm ²)	t (s)	Ceq (M)
7,74E-05	0,2	5,70E-06	0,3	2,00E-04	0,3	18000	3,44E-05

La massa incapsulata era 782 μg (0,782 mg); considerando il volume totale (10 mL), la concentrazione di ciprofloxacina nelle nanoparticelle è
20 stata determinata in 78,2 μg / mL (0,0782 mg/mL).

Pertanto, abbiamo preparato una soluzione con la stessa concentrazione di farmaco libero al fine di confrontare la cinetica. Una soluzione madre di 2 mM è stata preparata solubilizzando 2,7 mg di ciprofloxacina in 40 μ L di DMSO, diluita a un volume finale di 4 ml con 10 mM di PBS (3960 μ L).

5 Quindi 472 μ L della soluzione madre sono stati diluiti a 4 ml con 10 mM di PBS (3528 μ L).

Come controllo, è stata preparata una soluzione da 200 μ M di propranololo come descritto nel capitolo precedente.

Il giorno dopo aver depositato il muco nel compartimento del donatore, è stato inumidito con 10 μ L di acqua milli-q per equilibrare l'idrogel e abbiamo aspettato 1 ora. Quindi, 200 μ L di soluzione farmacologica sono stati aggiunti nel compartimento donatore mentre il compartimento dell'accettore è stato riempito con 300 microlitri di PBS 10 mM. Infine, tutte le soluzioni sono state raccolte dagli scomparti degli accettori ogni 15 minuti, 30 minuti, 1 ora, 2 ore, 4 ore, 6 ore e 24 ore e gli scomparti sono stati riempiti con 300 μ L di PBS 10 mM. I campioni sono stati trasferiti in 1,5 mL di Eppendorf®, diluiti a 1 mL di volume finale con 10 mM di PBS e analizzati con fluorescenza. L'emissione di propranololo è stata misurata a 350 nm (emissione λ) dopo eccitazione a 289 nm (eccitazione λ); lo spettro è stato valutato tra 310 nm e 500 nm, con slit 3-4. L'emissione di ciprofloxacina è stata misurata a 418 nm (emissione λ) dopo eccitazione a 272 nm (eccitazione λ); lo spettro è stato valutato tra 290 nm e 500 nm, con slit 3-4.

Le intensità sono state sostituite nella curva di calibrazione al fine di determinare le concentrazioni di farmaco; da questi dati sono stati calcolati la massa del farmaco negli scomparti degli accettori (μ g), la massa cumulativa (μ g), la percentuale di massa permeata e la percentuale di massa cumulativa permeata.

In figura 10 vengono riportati i risultati ottenuti.

30 Esempio 5

Quantificazione dei glicani sulla superficie delle NPs-MUCGli con reattivo di PAS.

Per valutare l'effettiva presenza di glicani sulla superficie delle nanoparticelle e per poterli quantificare abbiamo eseguito un test colorimetrico con il reattivo di Schiff. Il test è basato su una reazione fucsina-reagente di Schiff. La soluzione del colorante fucsina è decolorata dalla presenza di acido solforoso e ritorna color magenta in presenza di glicani in modo proporzionale alla concentrazione dei carboidrati superficiali delle NPs-MUCGli. Come si può notare dallo spettro UV presente nella figura 11, nelle NPs-MUCGli si evidenzia e si misura una quantità di oligosaccaridi superficiali pari a circa la metà di quella presente nella mucina (PGM) di partenza. A parità di concentrazione espressa in $\mu\text{g/ml}$, la mucina di partenza presenta il doppio di oligosaccaridi rispetto alle NPs-MUCGli. Questo significa che nella sintesi delle NPs si possono "perdere" alcuni oligosaccaridi oppure essi possono non essere tutti esposti sulla superficie, ma rimanere all'interno delle NPs e quindi non essere quantificabili (possono essere infatti quantificati solamente gli oligosaccaridi presenti sulla superficie delle particelle).

I dati in presenza ciprofloxacina (NPs-MUCGli/cipro) sono confrontabili a quelli in assenza di ciprofloxacina (NPs-MUCGli).

Esempio 6

Interazione delle NPs-MUCGli/FITC con la concavalina A

Per dimostrare la capacità delle nanoparticelle glicosilate di mucina covalentemente reticolate della presente invenzione di interagire con le lectine è stato effettuato uno studio spettrofotometrico per determinare le costanti K_A e K_D dell'interazione NPs-MUGGli/FITC-concavalina A.

La concavalina A emette alla lunghezza d'onda di 350 nm se eccitata alla lunghezza d'onda di 280 nm. Come si può notare dalla figura 12 l'intensità di emissione decresce (quenching) in presenza di concentrazioni crescenti di nanoparticelle di mucina gastrica porcina caricate con fluoresceina.

Dall'analisi dei dati con un fitting non lineare (figura 12) si ottengono dei valori di $K_A = 9,1 \pm 11 \times 10^3 \text{M}^{-1}$ ed una $K_D = 1,1 \pm 0,24 \text{M}$.

Esempio 7

Test microbiologici – saggio MTT (bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) per la misurazione dell'attività enzimatica.

Le NPs-MUCGli e le NPs-MUCGli/cipro sono state preparate per eseguire un test MTT.

Prima di procedere con gli esperimenti, è stato condotto un test di sterilità: le piastre sono state striate con NPs-MUCGli e NPs-MUCGli/cipro e incubate per 48 ore a 37° C. Non è stata osservata nessuna contaminazione.

Quindi, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (ATCC 15692) è stato coltivato nel Müller Hinton Broth (MH) durante la notte in condizioni aerobiche a 37°C in un incubatore con agitazione orbitale. Questa coltura è stata inizialmente ridotta a densità finali di 1×10^3 cellule/100 µl, 1×10^4 cellule / 100 µl, 1×10^5 cellule/100 µl, 1×10^6 cellule/100 µl e incubata con ciprofloxacina conservata a -20° C e a temperatura ambiente.

Successivamente, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (ATCC 15692) è stato coltivato nel Müller Hinton Broth (MH) durante la notte in condizioni aerobiche a 37° C usando un incubatore con agitazione orbitale a densità finale di 1×10^4 celle / 100 µl. La coltura è stata incubata con ciprofloxacina a temperatura ambiente e NPs-MUCGli.

Le nanoparticelle sono state sintetizzate come descritto negli esempi precedenti e sono state determinate le seguenti concentrazioni: la concentrazione di ciprofloxacina nelle NPs-MUCGli/cipro era 67 µg/mL, la concentrazione di mucina nelle NPs-MUCGli/cipro era 1568 µg/mL, mentre la concentrazione nelle NPs-MUCGli era 765 µg/mL.

Sono state eseguite diluizioni di ciprofloxacina in 100 µl di PBS 1x ottenendo una concentrazione decrescente (Tabella 3) e le stesse concentrazioni sono state utilizzate per NPs-MUCGli/cipro e le NPs-

MUCGli (nella tabella 3 con V ss (μL) si intende il volume della soluzione madre di nanoparticelle)

Tabella3

[Ciprofloxacina] ($\mu\text{g/mL}$)	V ss (μL)	V H₂O (μL)	Diluizione
4	80	20	1,25
2	40	60	2,5
1	20	80	5
0,5	10	90	10
0,3	5	95	20
0,1	62,5	37,5	1,6
0,06	31,25	68,75	3,2
0,03	15,63	84,37	6,4
0,016	7,82	92,18	12,8

[NPs-MUCGli] ($\mu\text{g/mL}$)	V ss (μL)	V H₂O (μL)	Diluizione
94,68	80	20	1,25
47,34	40	60	2,5
23,67	20	80	5
11,83	10	90	10
5,92	5	95	20
2,96	62,5	37,5	1,6
1,48	31,25	68,75	3,2
0,74	15,63	84,37	6,4
0,37	7,82	92,18	12,8

5

I batteri coltivati su piastre di coltura tissutale (TCP) sono stati impostati come vitalità batterica al 100%.

Gli esperimenti sono stati condotti due volte (uno usando soluzioni concentrate - soluzioni madre - e l'altro usando campioni già diluiti) a 37° C, in un incubatore statico per 24 ore.

La figura 13 mostra i risultati di % vitalità batterica con diversa densità
5 cellulare (1×10^3 cellule / 100 μ l, 1×10^4 cellule/100 μ l, 1×10^5 cellule/100 μ l, 1×10^6 cellule/100 μ l) e ciprofloxacina conservata a -20°C (A) e a temperatura ambiente (B).

L'aumento delle concentrazioni di ciprofloxacina è riportato sull'asse X.

In entrambi i campioni è raggiunta la vitalità batterica al 100% e
10 l'andamento delle curve è simile, ma con 10^4 cellule / densità 100 μ l si osserva una deviazione standard minore.

La figura 14A mostra i risultati della vitalità batterica confrontando NPs-MUCGli (usato come controllo), NPs-MUCGli/cipro e ciprofloxacina. Dalla
percentuale di vitalità batterica, è stato possibile determinare la
15 percentuale di inibizione per differenza.

La vitalità batterica al 100% viene raggiunta con concentrazioni di ciprofloxacina tra 0,016 e 0,04 μ g/mL; Le NPs-MUCGli/cipro hanno
mostrato una vitalità batterica del 100% da 0,016 a 0,5 μ g/mL.

La percentuale di inibizione è stata calcolata come la differenza da ogni
20 concentrazione rispetto alla vitalità del 100%, la stessa tendenza per la ciprofloxacina è stata trovata ma speculare: il 100% dell'inibizione è raggiunto a 2 μ g/mL mentre è dello 0% fino a 0,03 μ g/ mL. Considerando le NPs-MUCGli/cipro, il 100% viene nuovamente raggiunto a 2 μ g/mL, ma è dello 0% fino a 0,5 μ g/mL.

25 Esempio 8

Internalizzazione cellulare delle nanoparticelle glicosilate di mucina covalentemente reticolate caricate con FICT (NPs-MUCGli/FITC).

È stato condotto uno studio di microscopia confocale per studiare l'assorbimento cellulare delle NPs-MUCGli/FITC sulle cellule HaCat. Prima
30 di impostare l'esperimento, le cellule HaCaT sono state seminate su piatti di coltura sterili e coltivate durante la notte (DMEM 10% FBS). Dopo 24

ore, il mezzo di crescita FBS DMEM al 10% è stato sostituito dal mezzo di crescita con una concentrazione di 25 µg/mL di NPs-MUCGII/FITC.

Dopo aver incubato le piastre di coltura a 37° C per 5 ore e 20 ore, il mezzo di crescita modificato è stato rimosso. Le cellule sono state trattate con Calcein AM (CellTrace™, calcein rosso-arancio, Molecular Probe®, Life Technology) per ottenere un citoplasma rosso-fluorescente. La calceina è stata diluita con HBSS (soluzione salina bilanciata di Hanks) a una concentrazione di 250 nM e quindi incubata per 30 minuti a 37° C.

Infine, le cellule sono state lavate due volte con HBSS e fissate a 37°C con una soluzione di PFA (paraformaldeide) al 4% per 2 minuti. I campioni erano quindi pronti per essere osservati mediante microscopia confocale: per visualizzarli mediante CLSM (Confocal Laser Scanning Microscopy) è stato utilizzato un montatore DABCO MIX. CLSM è stato eseguito con un TCS Leica SP8 X (Leica Microsystem) dotato di uno scanner con laser DPSS (561 nm, per monitorare la calceina) e laser Ar (488 nm, per monitorare la fluoresceina).

Le immagini risultanti (1024x1024 pixel o 1152x1152 pixel) sono state ottenute da una lente ad immersione in olio (HC PLAPO CS2 63X/1.4 A.N). La ricostruzione delle immagini 3D ha aiutato a comprendere l'adozione delle NPs-MUCGII/FITC. Per l'analisi delle immagini è stato utilizzato il software Image J (figura 15).

Esempio 9 di confronto

Confronto con le nanoparticelle di mucina ottenute in Yan H. et al. "Reversible Condensation of Mucins into nanoparticles", *Langmuir* (2018), vol. 34, p. 13615-13625.

Le nanoparticelle di mucina NPs-MUCGII ottenute con il metodo dell'invenzione presentano delle differenze significative rispetto agli aggregati nanometrici reversibili (PGM YAN) ottenuti da Yan et al. Innanzitutto, nella preparazione dell'invenzione è preferibilmente utilizzata la mucina gastrica porcina (PGM) di tipo III e non mucina estratta al momento (nativa) come in Yan et al. La mucina nativa ha proprietà

chimico fisiche leggermente differenti rispetto a quelle della mucina commercialmente disponibile: essa presenta infatti una tendenza alla gelificazione (stabilizzazione) superiore rispetto alla mucina commercialmente disponibile, in quanto quella nativa è meno pura e meno standardizzata.

In Yan *et al.* gli autori studiano la formazione di aggregati nanometrici reversibili di mucina in presenza di glicerolo in diverse percentuali ed H₂O. Dai risultati ottenuti in Yan *et al.* si evince che il 30% v/v glicerolo/H₂O risulta essere la percentuale ottimale per ottenere questi aggregati nanometrici reversibili. In questo documento si ottengono degli aggregati nanometrici reversibili (PGM YAN) che possono essere resi parzialmente stabili aggiungendo dei reticolanti (polilisina) e calcio.

Partendo dalla mucina gastrica porcina di tipo III usata nella presente invenzione (mucina gastrica porcina di tipo III) ed utilizzando le condizioni di sintesi ottimali descritte da Yan *et al.* (30% v/v glicerolo/H₂O) sono state ottenute delle NPs piccole non purificabili per centrifugazione nemmeno a 4° C (NPs PGM Yan), in accordo con il fatto che nell'articolo non è stato descritto alcun processo di purificazione e/o di liofilizzazione per gli aggregati nanometrici reversibili ottenuti.

In Yan *et al.* non è stato inoltre fatto alcun accenno alla glicosilazione degli aggregati nanometrici ottenuti.

La formazione delle NPs PGM Yan con il metodo descritto in letteratura non è monitorabile via UV: come si può notare dalla figura 16 esse mantengono sostanzialmente lo stesso spettro della mucina da sola, molto diverso dallo spettro delle NPs-MUCGli della presente domanda.

Per quanto riguarda la caratterizzazione via TEM si può notare come le NPs PGM Yan ottenute con il metodo descritto in letteratura non abbiano contorni ben definiti, effetto riscontrabile anche nel TEM riportato in letteratura per gli aggregati nanometrici ottenuti con mucina nativa estratta dallo stomaco di maiale.

Nella figura 17 si può vedere un confronto delle immagini TEM: A) NPs-MUCGli ottenute dalla mucina gastrica porcina di tipo III con la metodica descritta nella presente domanda di brevetto; B) NPs PGM Yan ottenute dalla mucina gastrica porcina di tipo III con la metodica basata su glicerolo/H₂O descritta in letteratura da Yan *et al.*

Da questo confronto si può evincere come il metodo di Yan *et al.*, oltre a non essere utile per la sintesi di nanoparticelle stabili purificabili e liofilizzabili a base di mucina gastrica porcina nativa, non sia utilizzabile neanche per ottenere nanoparticelle stabili a base di mucina gastrica porcina di tipo III commerciale, al contrario del metodo proposto nella presente invenzione.

Nell'articolo citato non viene inoltre descritta alcuna metodica per inglobare principi attivi, marcatori e/o biomolecole nelle nanoparticelle e non è descritta alcuna applicazione biologica per gli aggregati nanometrici ottenuti.

Esempio 10

Preparazione di nanoparticelle di mucina submascellare bovina glicosilate covalentemente reticolate (NPs-MUCGli).

Sono stati pesati 50 mg di mucina submascellare bovina (BSM). Poi sono stati aggiunti 2 ml di NaCl 10 mM. Si è lasciato sotto agitazione per 4 ore, titolando il pH a 8,5 con NaOH 0,1 mM. Si sono aggiunti 8 ml di etanolo 1 gtt/sec. Quindi si sono aggiunti 90 µl di glutaraldeide all'8% in acqua milli-q (agente reticolante) e si è lasciato in agitazione per 24 ore.

Le nanoparticelle ottenute in soluzione sono state purificate per centrifugazione: sono state trasferite in un falco e sono stati effettuati 5 cicli di centrifugazione: 1) 1000 rpm x 5 min; 2) 2000 rpm x 5 min; 3) 4000 rpm x 5 min; 4) 4000 rpm x 15 min; 5) 4000 rpm x 15 min.

Il surnatante è stato rimosso ad ogni passaggio ed è stato sostituito con 1 ml di acqua fresca milli- dopo ogni ciclo di centrifugazione.

Dalla centrifugazione è stato ottenuto un solido che è stato risolubilizzato in soluzione acquosa.

Le NPs-MUCGli sono state liofilizzate per ottenere la forma in polvere: il campione è stato diviso in tre aliquote da 2 mL in tre diverse provette Eppendorf® e posto in azoto liquido fino a completo congelamento. Il pallone è stato quindi collegato a un liofilizzatore da tavolo (HETO
5 LyoLab3000) dotato di frigorifero, centrifuga a vuoto e pompa a vuoto per mantenere la temperatura a -56 ° C per un periodo di 8 ore. Le NPs-MUCGli sono state risospese in 2 ml di acqua milli-q e confrontata con il campione originale attraverso uno studio UV-Vis (figura 18) e TEM (figura 19) e si osserva che le nanoparticelle mantengono le loro caratteristiche.

10 Caratterizzazione delle nanoparticelle NPs-MUCGli

Dopo la sintesi delle NPs-MUCGli è stato condotto uno studio UV-vis: 100 µL di NPs-MUCGli sono stati diluiti a 1 ml con acqua milli-q (900 µL). Lo spettro è stato misurato a 25 ° C nell'intervallo 200-400 nm (figura 18).

Le nanoparticelle sintetizzate sono state caratterizzate via TEM (modello
15 JEOL 3010-UHR) (figura19).

IL MANDATARIO

D.ssa Cristina Biggi
(Albo iscr. n. 1239 B)

RIVENDICAZIONI

1. Nanoparticelle glicosilate di mucina covalentemente reticolate, in cui le catene oligosaccaridiche della mucina, responsabili della glicosilazione, sono disposte sulla superficie delle nanoparticelle stesse.

5

2. Nanoparticelle glicosilate di mucina covalentemente reticolate secondo la rivendicazione 1, in cui la mucina è la mucina gastrica porcina, preferibilmente mucina gastrica porcina di tipo III, oppure mucina submascellare bovina.

10

3. Nanoparticelle glicosilate di mucina covalentemente reticolate secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui le catene oligosaccaridiche comprendono zuccheri scelti tra N-acetilgalattosamina, N-acetilglucosamina, fucosio, galattosio e/o acido sialico.

15

4. Nanoparticelle glicosilate di mucina covalentemente reticolate secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-3, per l'uso come veicoli di almeno un composto scelto tra un principio attivo, un marcatore e una biomolecola.

20

5. Nanoparticelle glicosilate di mucina covalentemente reticolate secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-3, comprendenti almeno un composto scelto tra un principio attivo, un marcatore e una biomolecola.

25

6. Nanoparticelle glicosilate di mucina covalentemente reticolate secondo la rivendicazione 5, in cui il principio attivo è un antibiotico, preferibilmente scelto tra un antibiotico appartenente alla classe degli aminoglicosidi, delle cefalosporine, dei chinoloni, delle lincosamidi, dei macrolidi, dei nitroimidazoli, delle penicilline, dei sulfamidici, delle tetracicline e/o dei peptidi.

30

7. Nanoparticelle glicosilate di mucina covalentemente reticolate secondo

la rivendicazione 6, in cui l'antibiotico appartenente alla classe degli antibiotici chinolinici è la ciprofloxacina.

8. Nanoparticelle glicosilate di mucina covalentemente reticolate secondo la rivendicazione 5, in cui il principio attivo è un antivirale, preferibilmente scelto tra un principio attivo anti virus influenzali, anti virus erpetici, anti virus epatici, anti HIV, anti virus della famiglia Poxviridae e/o anti virus SARS-CoV-2.

9. Nanoparticelle glicosilate di mucina covalentemente reticolate secondo la rivendicazione 8, in cui il principio attivo contro il virus SARS-CoV-2 è remdesivir oppure una miscela di principi attivi antivirali, preferibilmente lopinavir/ritonavir, darunavir/ritonavir e darunavir e cobicistat.

10. Nanoparticelle glicosilate di mucina covalentemente reticolate secondo la rivendicazione 5, in cui il principio attivo è un principio attivo antitumorale, preferibilmente scelto tra un agente alchilante, un antimetabolita, un antibiotico antitumorale, un inibitore della topoisomerasi, un agente differenziato e/o uno stimolante del sistema immunitario.

11. Nanoparticelle glicosilate di mucina covalentemente reticolate secondo la rivendicazione 5, in cui il marcatore è un fluoroforo, preferibilmente scelto tra fluoresceina isotiocianato, rosa bengala e/o un fluoroforo nel vicino infrarosso, preferibilmente una cianina.

12. Nanoparticelle glicosilate di mucina covalentemente reticolate secondo la rivendicazione 5, in cui il marcatore è una biomolecola, preferibilmente scelta tra acidi nucleici, peptidi, lipidi e/o fattori di crescita.

13. Nanoparticelle glicosilate di mucina covalentemente reticolate secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui le catene

oligosaccaridiche sono ulteriormente funzionalizzate con zuccheri, preferibilmente con α -L-fucosio e/o uno o più composti della classe delle lectine, preferibilmente concavalina A, concavalina A, emoagglutinina (HA), neuraminidasi (NA), lectina A (LecA) e/o lectina B (LecB).

5

14. Nanoparticelle glicosilate di mucina covalentemente reticolate secondo la rivendicazione 5, per l'uso nel trattamento della resistenza agli antibiotici.

10 15. Nanoparticelle glicosilate di mucina covalentemente reticolate secondo la rivendicazione 5, per l'uso nel trattamento delle infezioni virali.

15 16. Nanoparticelle glicosilate di mucina covalentemente reticolate secondo la rivendicazione 5, per l'uso nel trattamento di patologie in cui si ha una sovra-produzione di muco, preferibilmente la fibrosi cistica, la bronchietasi e l'infezione causata dal virus *SARS-CoV-2*.

17. Nanoparticelle glicosilate di mucina covalentemente reticolate secondo la rivendicazione 5, per l'uso nel molecular imaging.

20

18. Metodo "one-pot" per la preparazione di nanoparticelle glicosilate di mucina covalentemente reticolate secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-3, che comprende i passaggi di:

25 a) ottenere una soluzione, preferibilmente una soluzione salina, di mucina;

b) regolare il pH della soluzione ottenuta nel passaggio precedente ad un pH compreso tra 7,5 e 9,5, preferibilmente tra 8 e 9 e ancora più preferibilmente a pH 8,5;

30 c) desolvatare la mucina mediante l'aggiunta di un solvente alcolico, preferibilmente etanolo, alla soluzione direttamente ottenuta nel passaggio b);

d) aggiungere un reticolante, preferibilmente glutaraldeide, alla soluzione direttamente ottenuta nel passaggio c).

19. Metodo "one-pot" per la preparazione di nanoparticelle glicosilate di mucina covalentemente reticolate secondo una qualsiasi delle rivendicazioni dalla 5 alla 12, che comprende i passaggi di:

a) ottenere una soluzione, preferibilmente una soluzione salina, di mucina;

10 a') aggiungere alla soluzione ottenuta nel passaggio a) almeno un composto scelto tra un principio attivo, un marcatore e una biomolecola;

b) regolare il pH della soluzione ottenuta nel passaggio precedente ad un pH compreso tra 7,5 e 9,5, preferibilmente tra 8 e 9 e ancora più preferibilmente a pH 8,5;

15 c) desolvatare la mucina mediante l'aggiunta di un solvente alcolico, preferibilmente etanolo, alla soluzione direttamente ottenuta nel passaggio b);

d) aggiungere un reticolante, preferibilmente glutaraldeide, alla soluzione direttamente ottenuta nel passaggio c).

20

20. Metodo "one-pot" secondo la rivendicazione 18 oppure 19, ulteriormente comprendente un passaggio di purificazione delle nanoparticelle glicosilate di mucina covalentemente reticolate, preferibilmente mediante centrifugazione.

25

21 Metodo "one-pot" secondo una qualsiasi delle rivendicazioni dalla 18 alla 20, ulteriormente comprendente un passaggio di liofilizzazione delle nanoparticelle glicosilate di mucina covalentemente reticolate purificate.

30 22. Metodo "one-pot" secondo una qualsiasi delle rivendicazioni dalla 18 alla 21, ulteriormente comprendente un passaggio di funzionalizzazione

delle catene oligosaccaridiche esterne delle nanoparticelle glicosilate di mucina covalentemente reticolate con zuccheri, preferibilmente con α -L-fucosio e/o uno o più composti della classe delle lectine, preferibilmente concavalina A, emoagglutinina (HA), neuraminidasi (NA), lectina A (LecA) e/o lectina B (LecB).

23. Nanoparticelle glicosilate di mucina covalentemente reticolate ottenibili secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 18-22.

24. Formulazioni farmaceutiche comprendenti le nanoparticelle glicosilate di mucina covalentemente reticolate secondo una qualsiasi delle rivendicazioni dalla 1 alla 13, insieme ad almeno un eccipiente fisiologicamente accettabile.

25. Formulazioni farmaceutiche secondo la rivendicazione 24, per uso nella somministrazione per via orale, inalatoria e/o parenterale.

IL MANDATARIO

D.ssa Cristina Biggi
(Albo iscr. n. 1239 B)

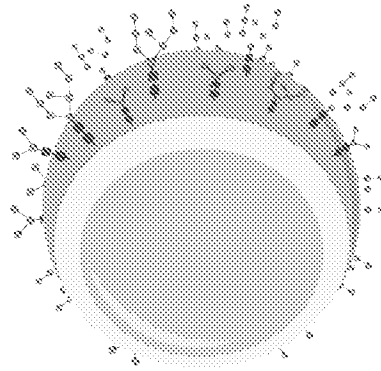


Fig. 1B

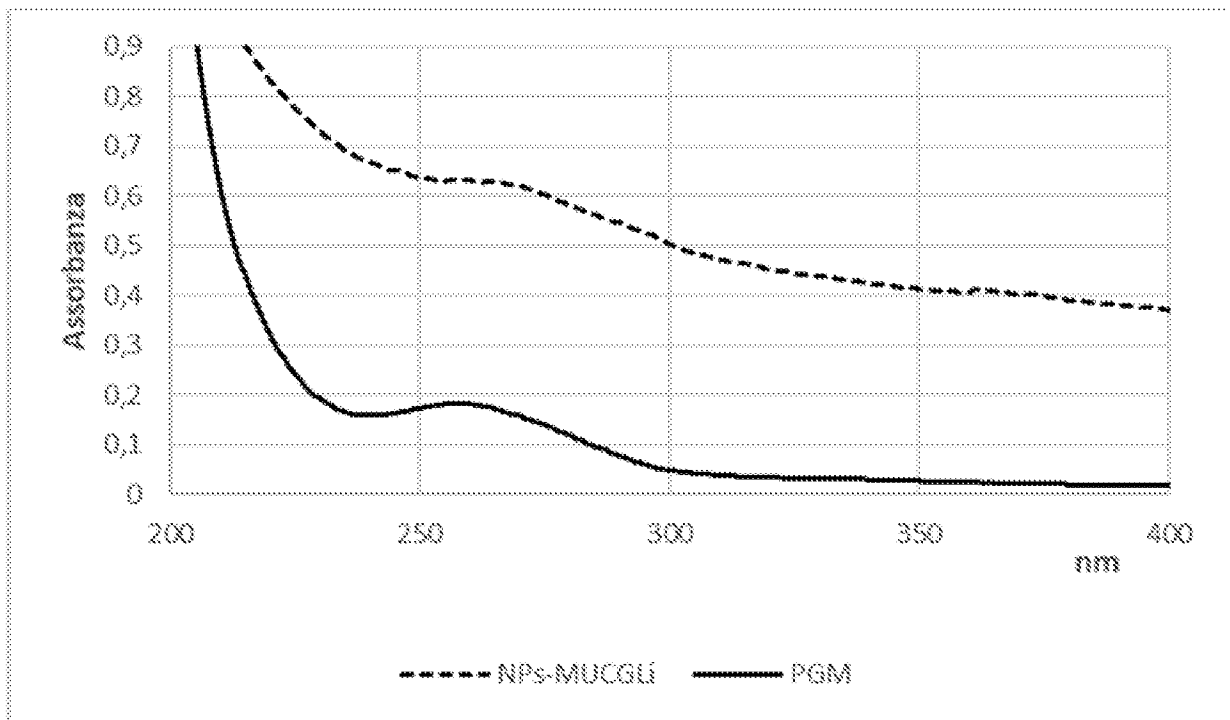


Fig. 1A

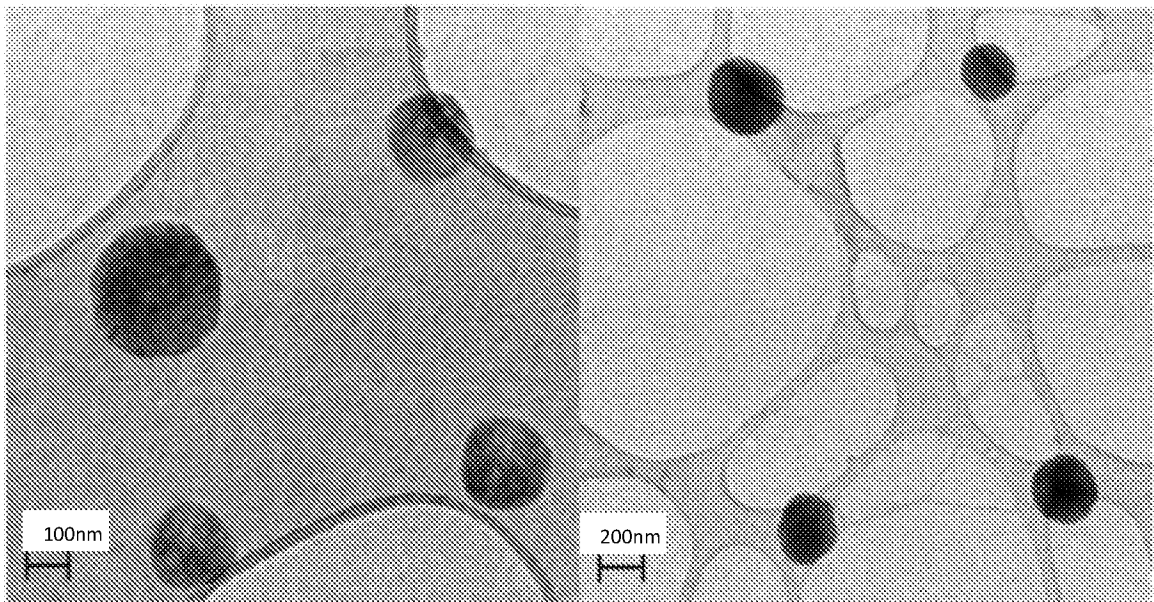


Fig. 2A

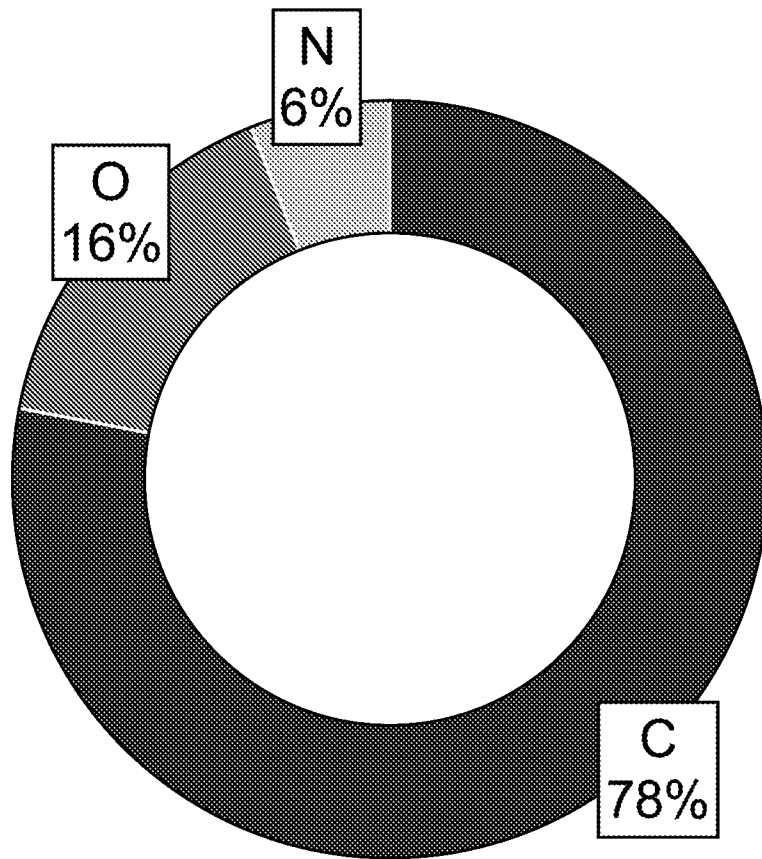


Fig. 2B

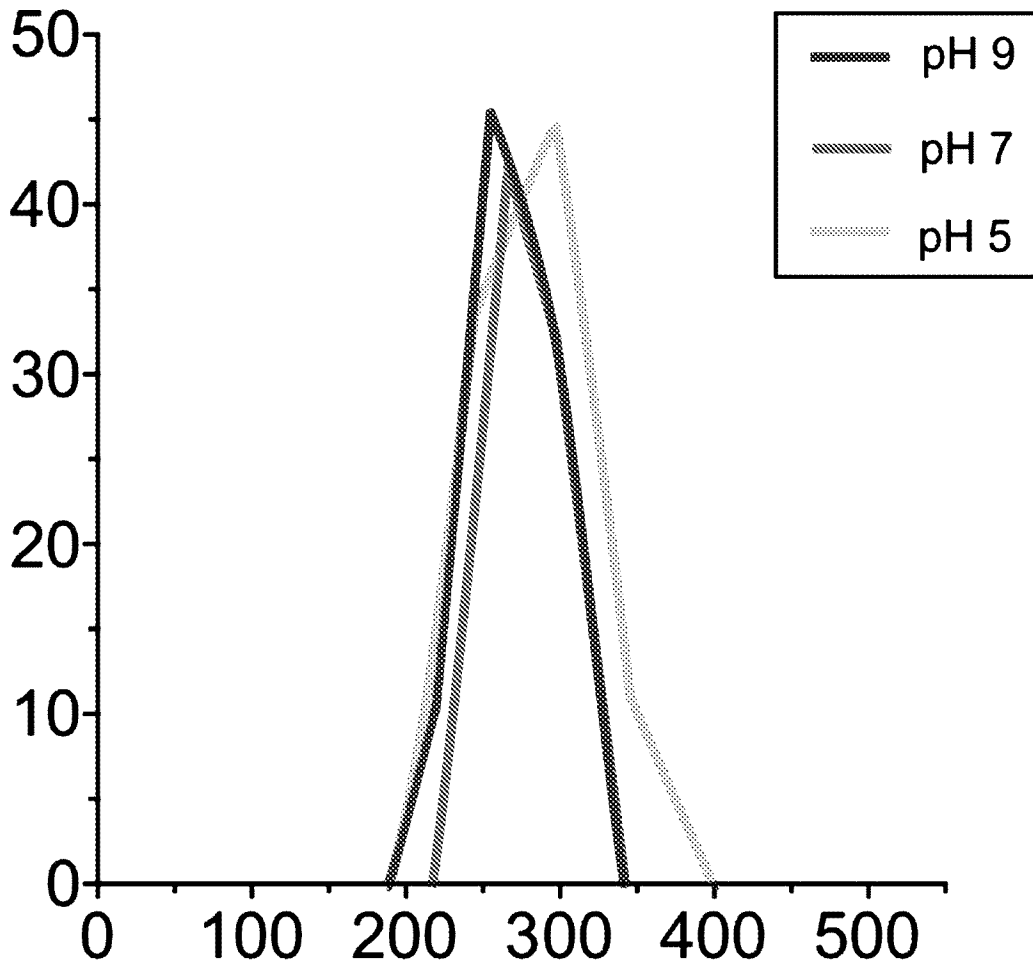


Fig. 3

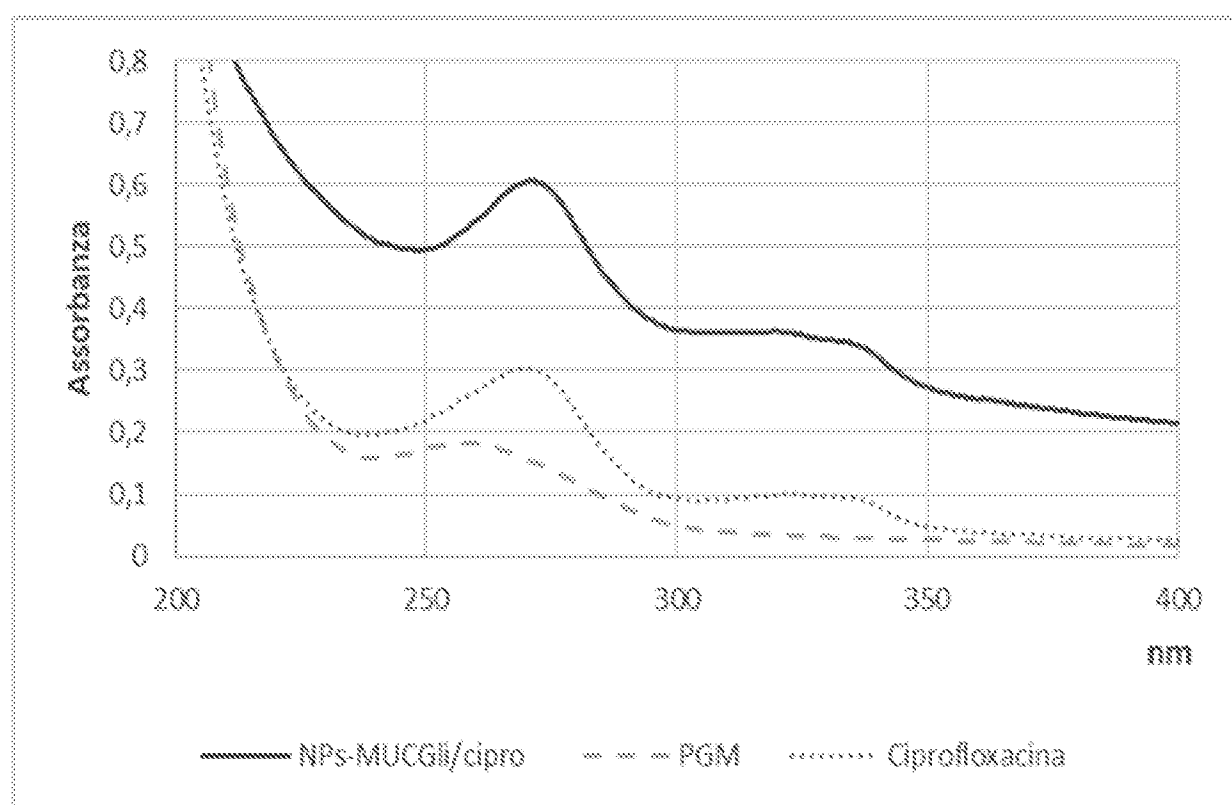


Fig. 4

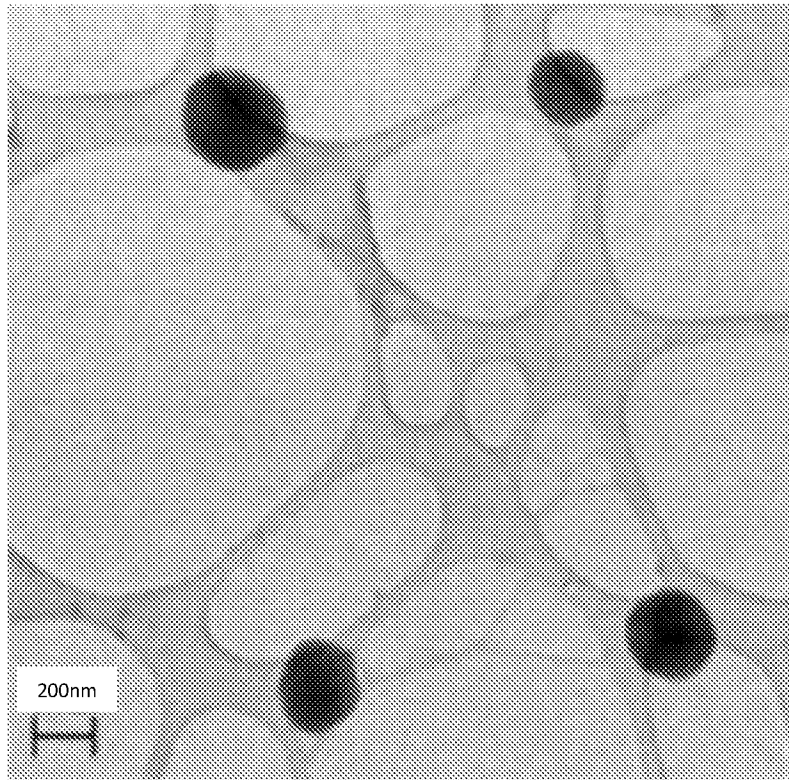


Fig. 5

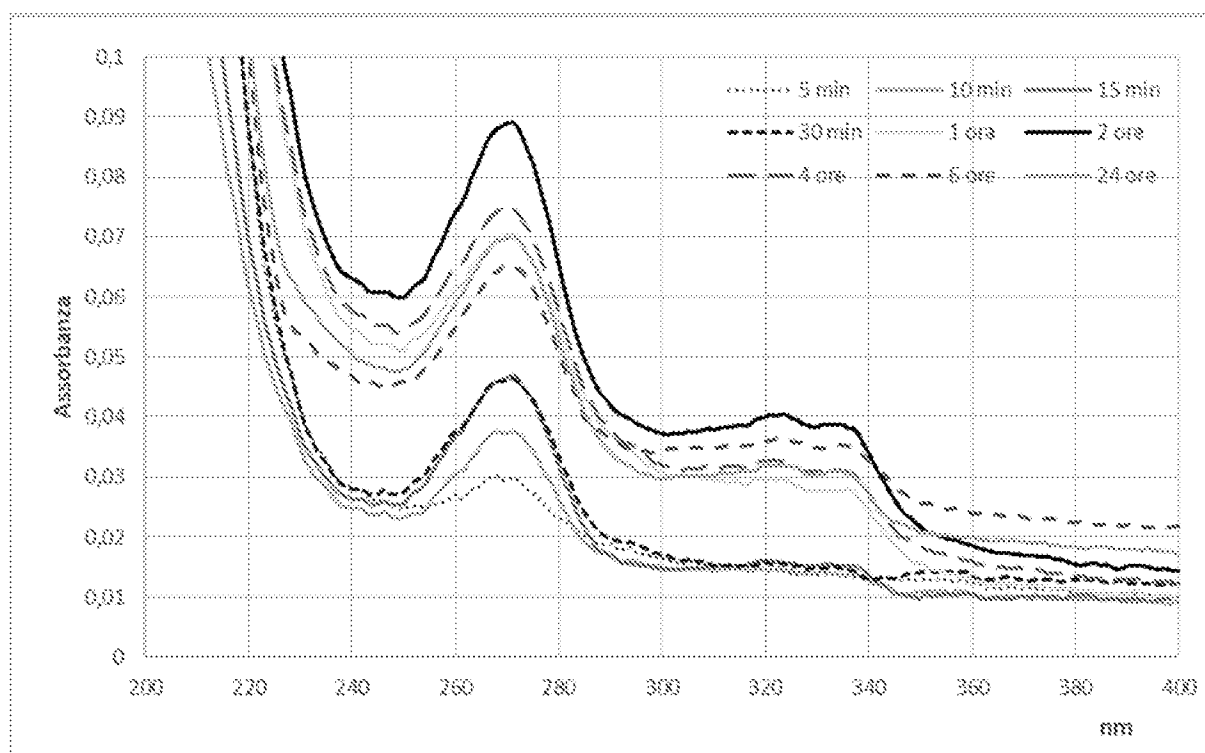


Fig. 6

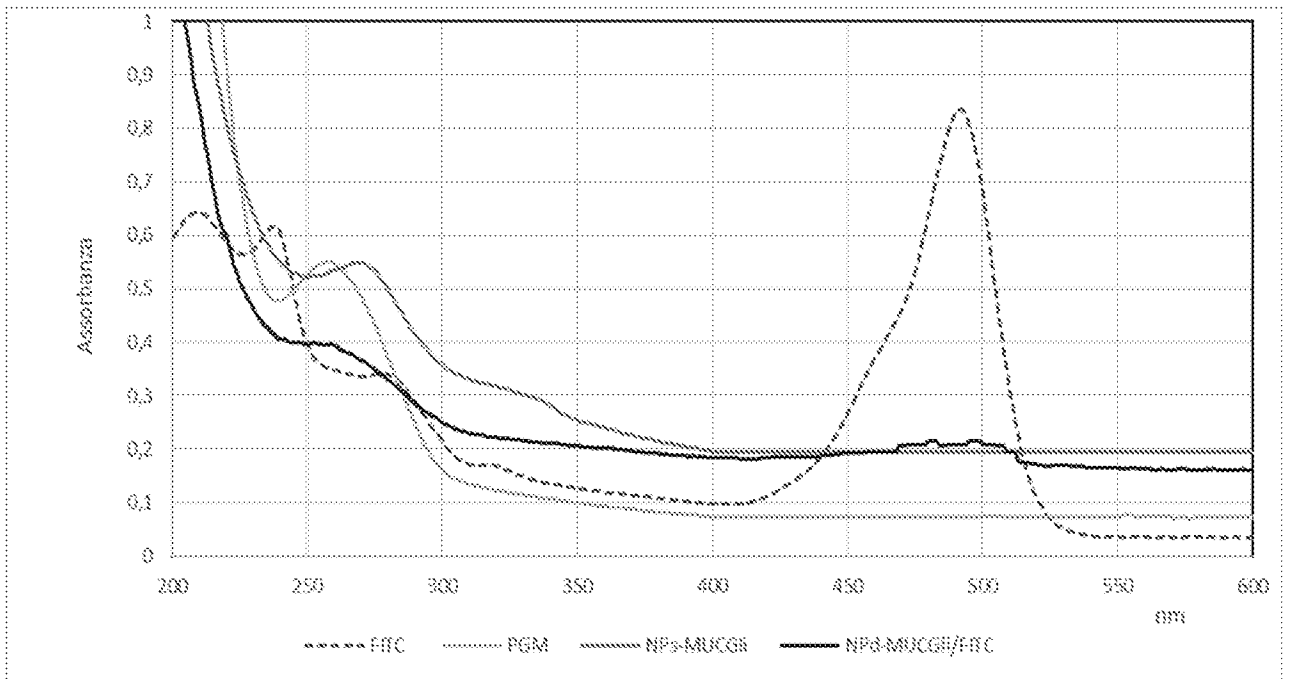


Fig. 7

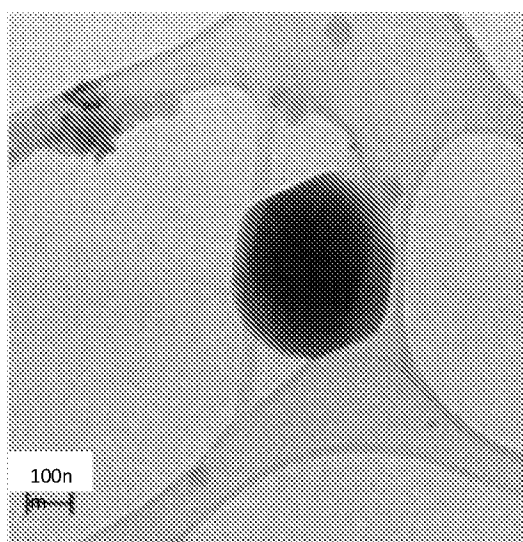
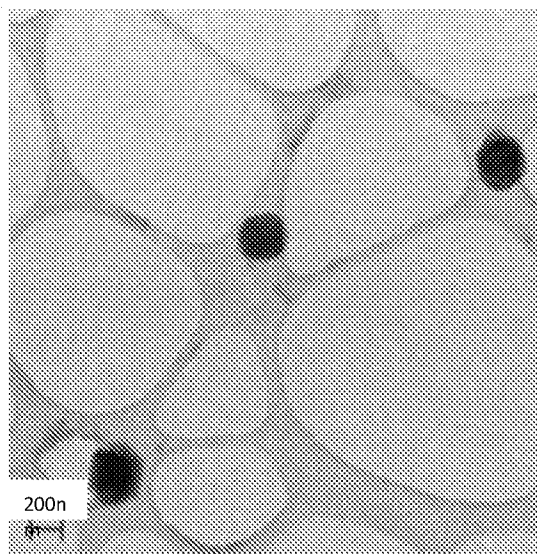


Fig. 8

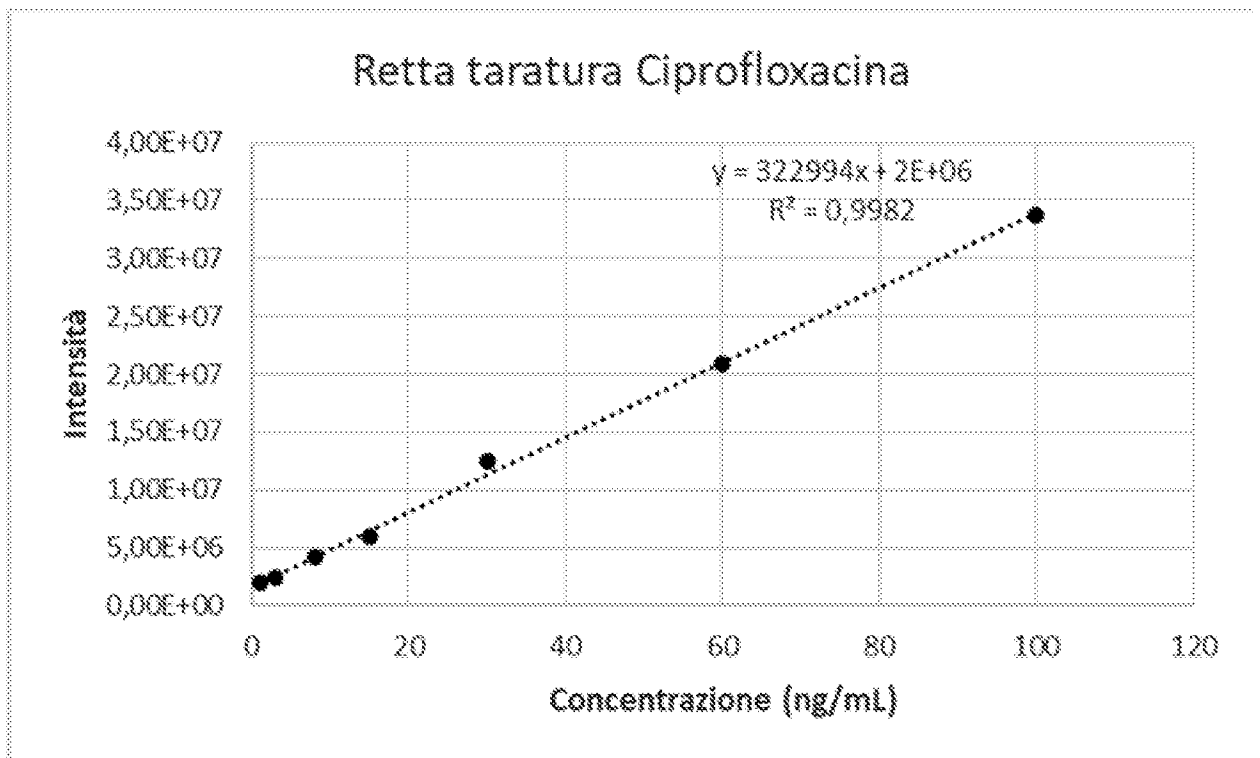


Fig. 9A

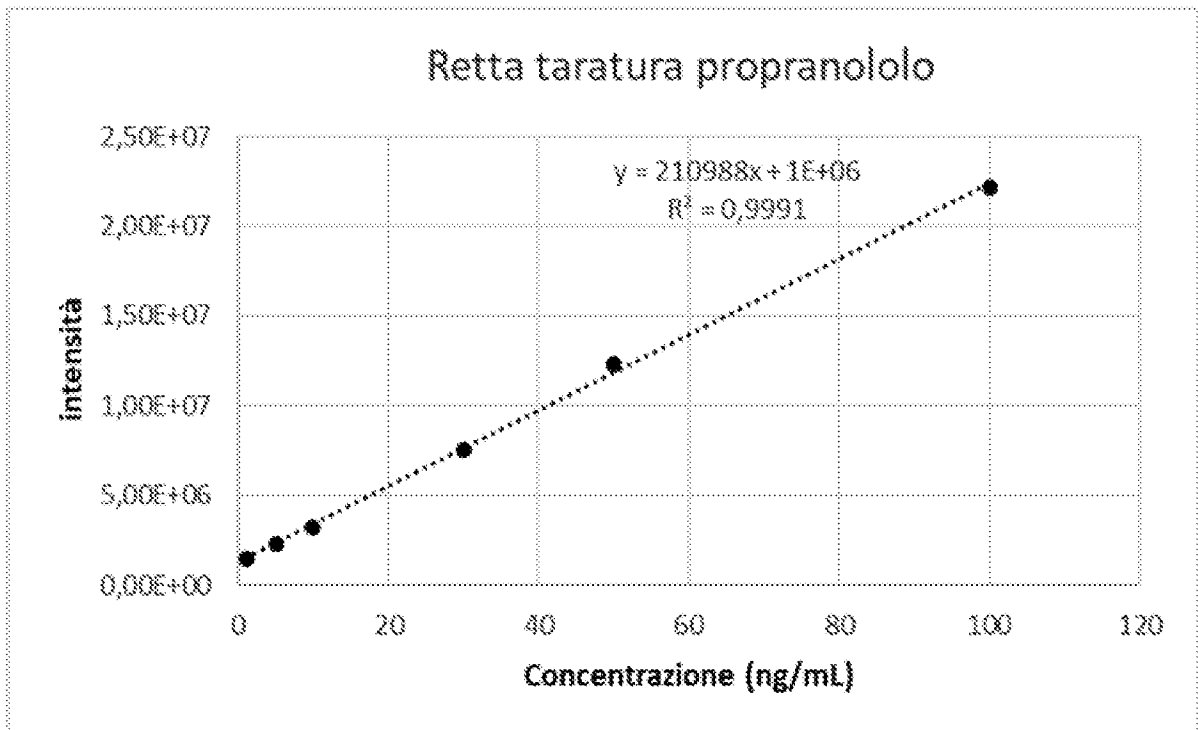


Fig. 9B

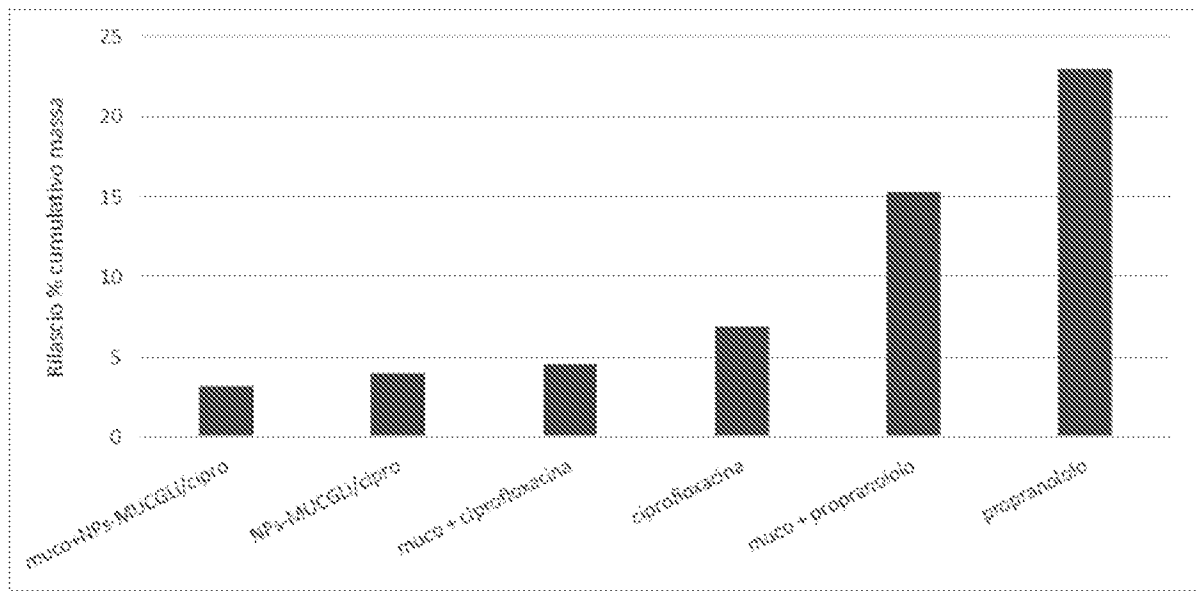


Fig. 10

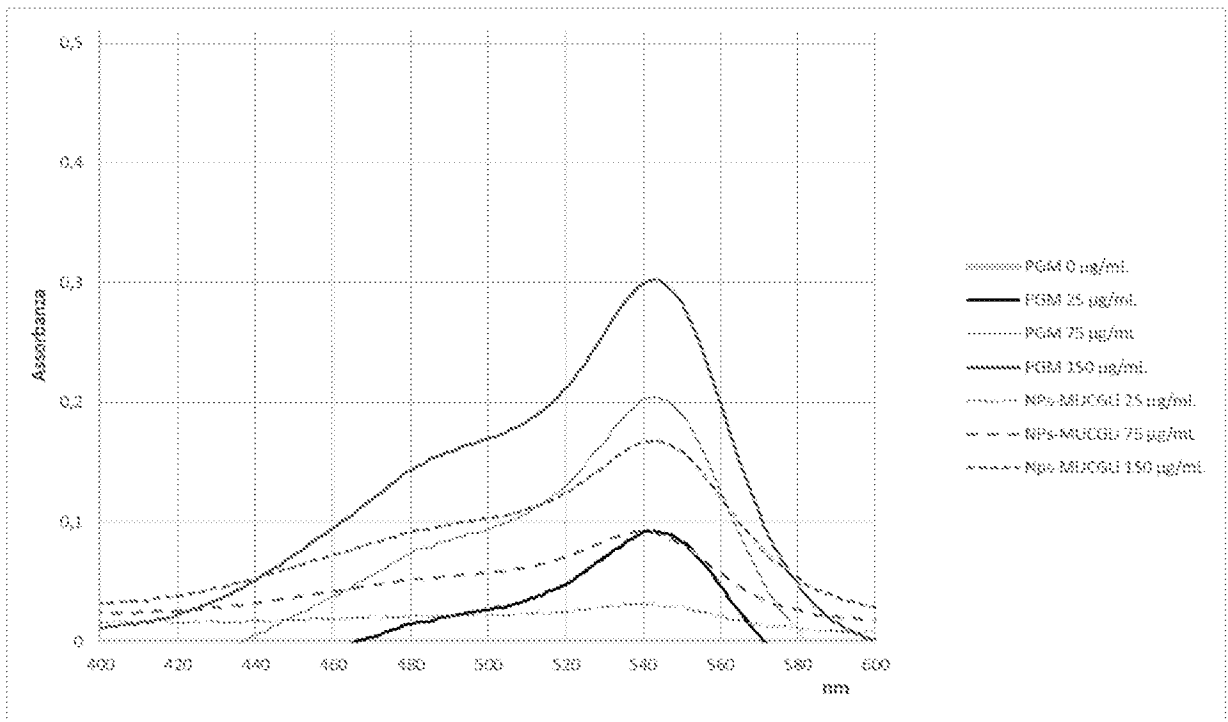


Fig. 11

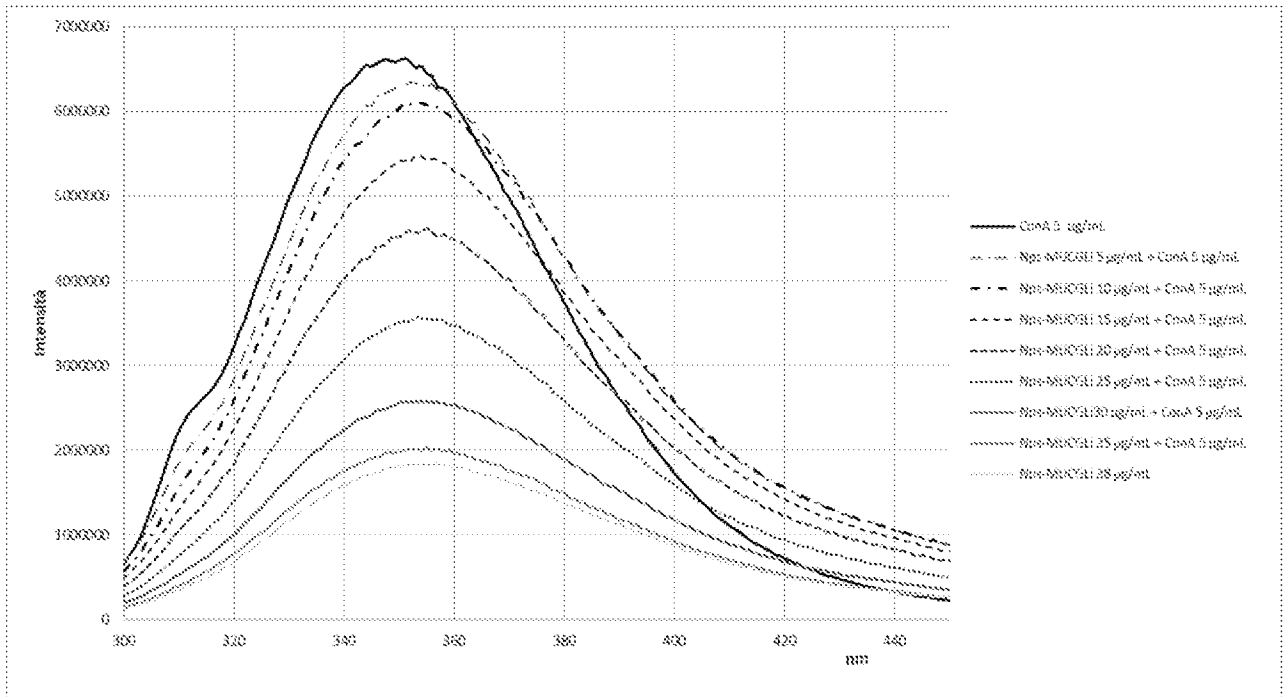


Fig. 12

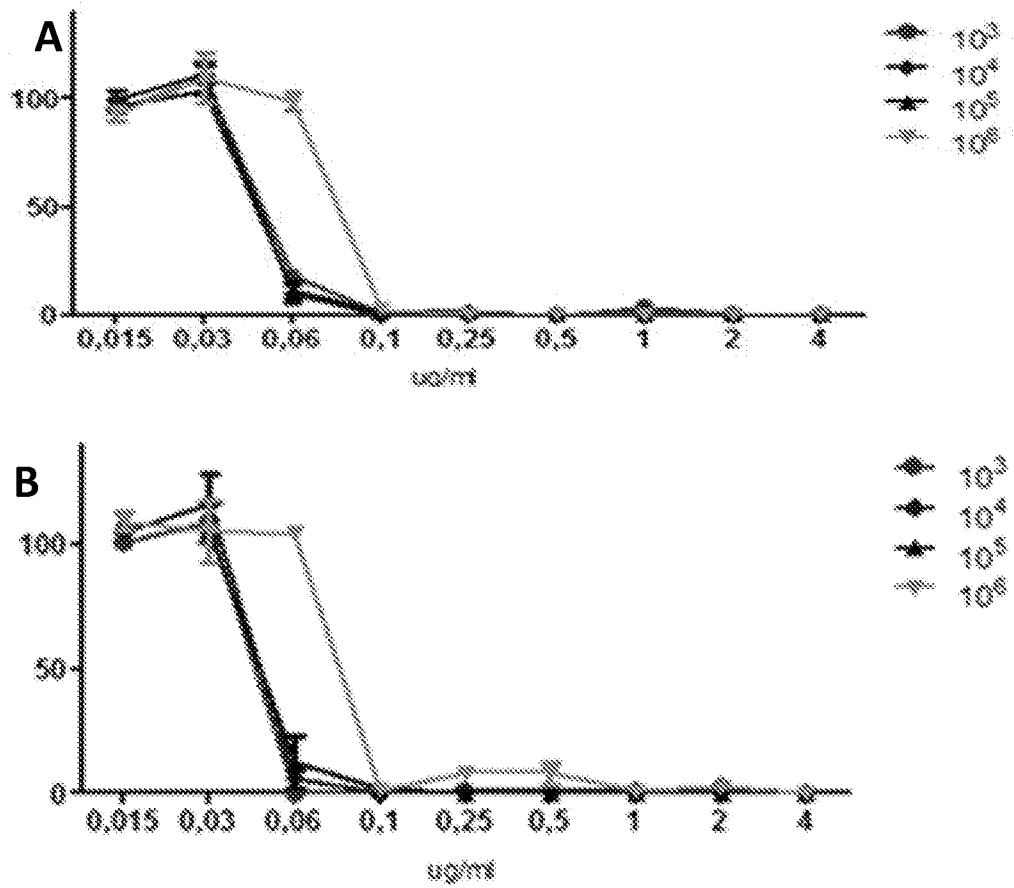


Fig. 13

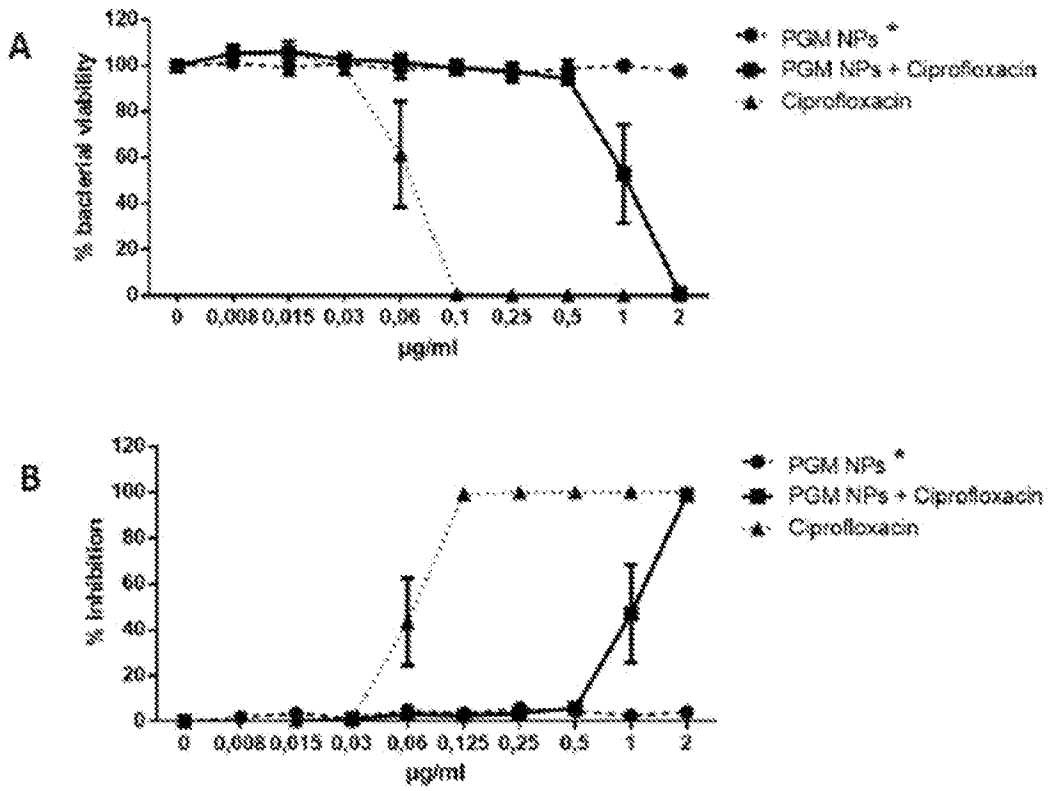


Fig. 14

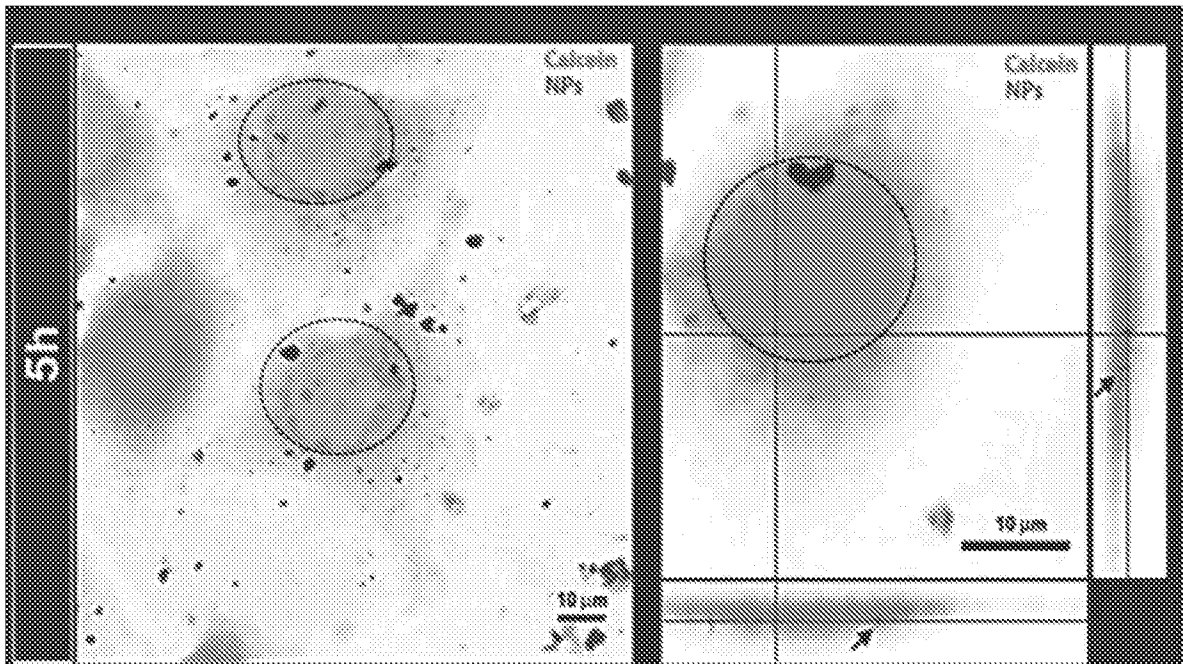


Fig. 15

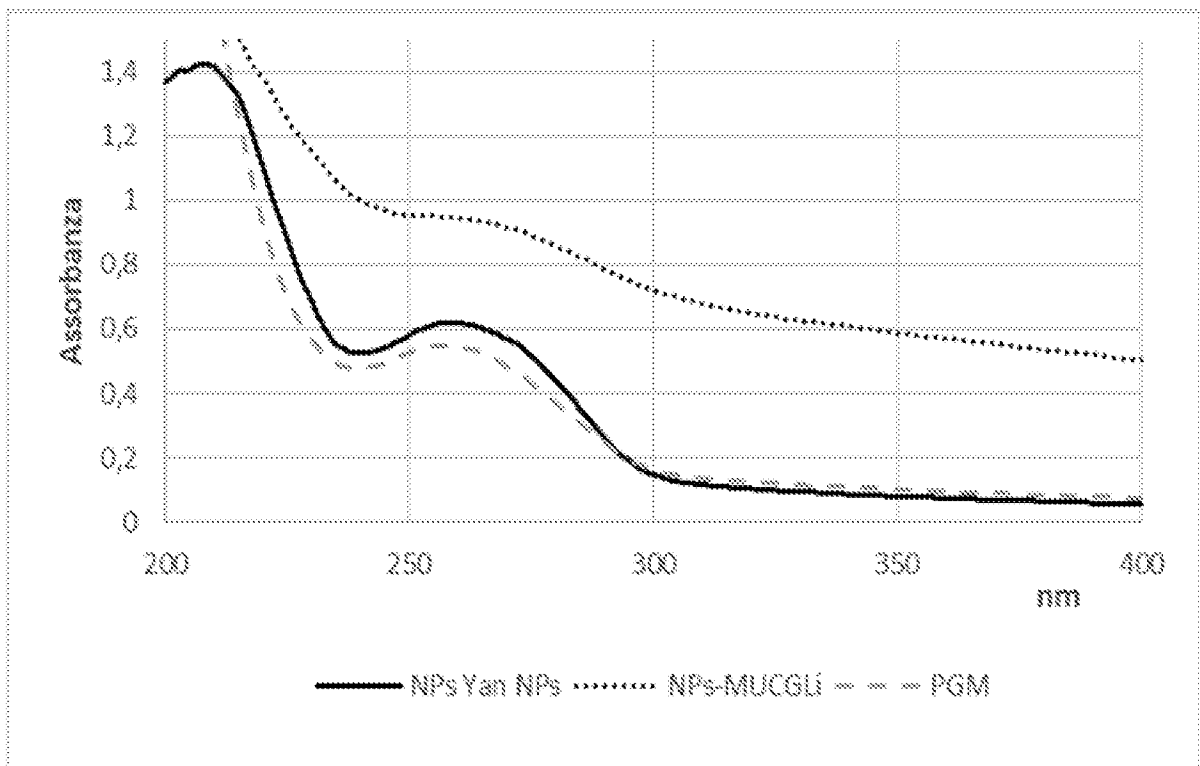


Fig. 16

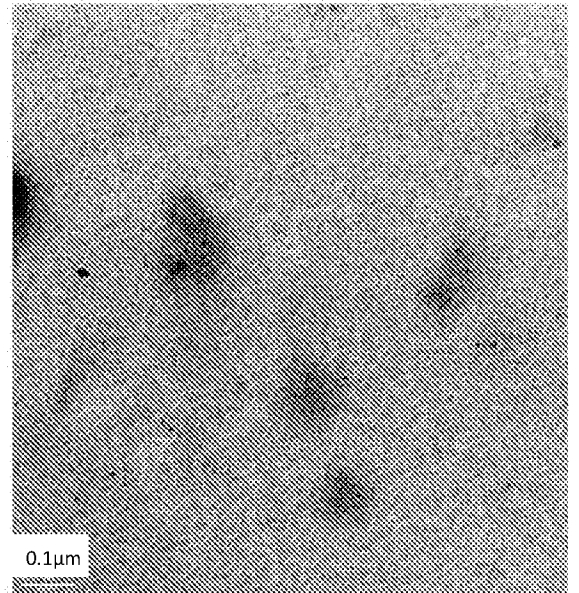
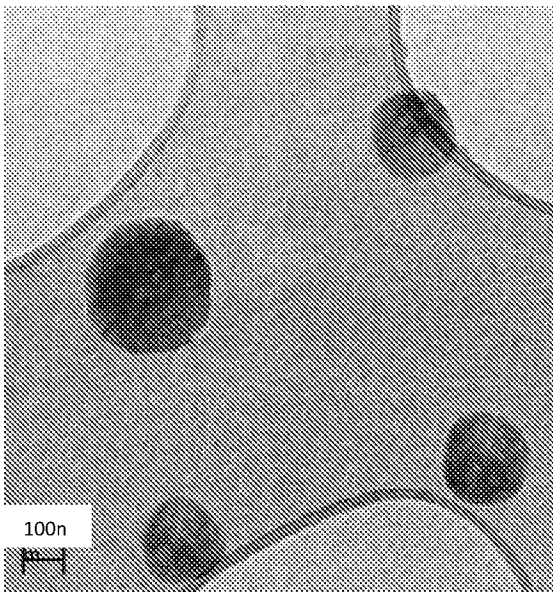


Fig. 17

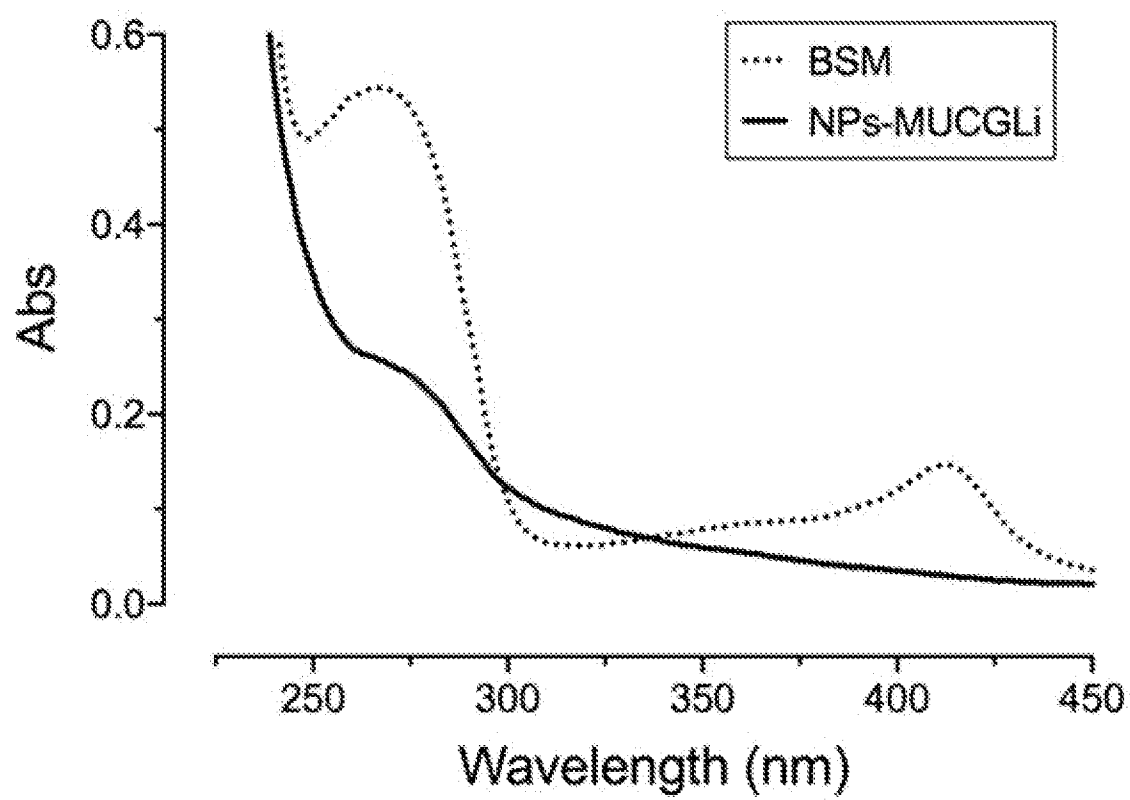


Fig. 18

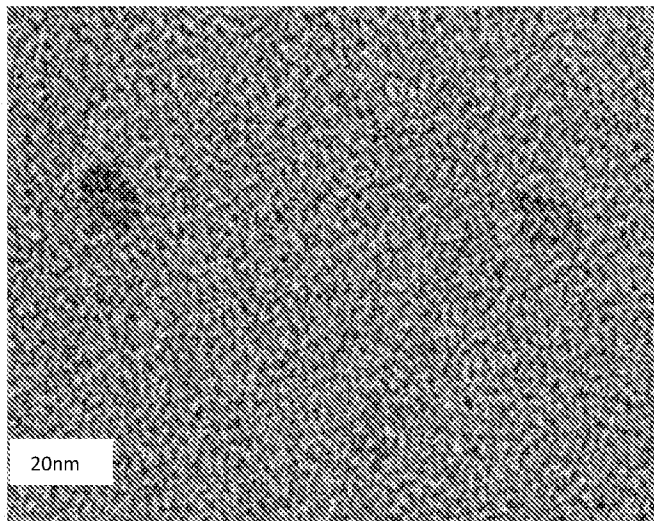
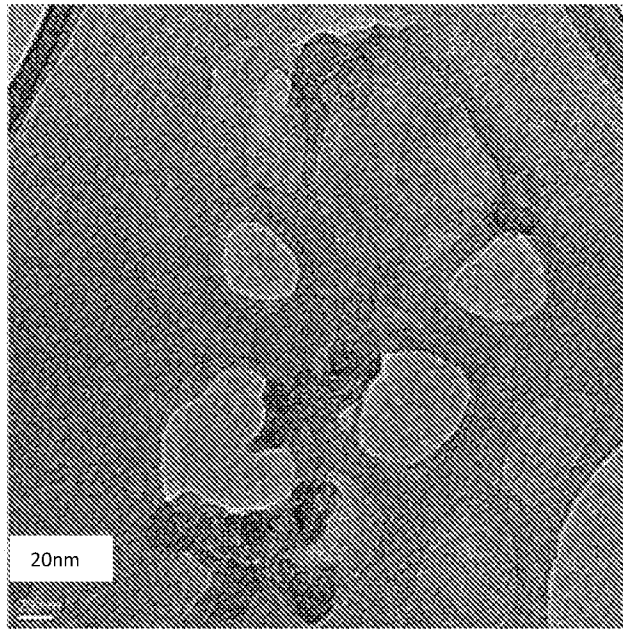


Fig. 19