



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

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102012902075864
Data Deposito	07/08/2012
Data Pubblicazione	07/02/2014

Classifiche IPC

Titolo

NANOGELI DI POLIAMMIDOAMMINE

9784 M Descrizione del brevetto per invenzione industriale avente per titolo:

GB/mc **“NANOGLI DI POLIAMMIDOAMMINE”**

a nome : **1. CONSORZIO INTERUNIVERSITARIO NAZIONALE
PER LA SCIENZA E TECNOLOGIA DEI MATERIALI
(38%);
2. UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO (37%);
3. UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TORINO (25%)**

con sede in: 1. Firenze; 2. Milano; 3. Torino

* * *

CAMPO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione si riferisce a nanogeli di poliammidoammine reticolate, ad un procedimento per la loro preparazione e a sistemi di rilascio di farmaci che li contengono.

Il lavoro che ha portato alla presente invenzione ha ricevuto fondi dalla [Unione Europea] Settimo Programma Quadro ([FP7/2007-2013] sotto il *grant agreement* n°[CP-IP 213631-2 NANOTHER].

TECNICA NOTA

In letteratura sono riportati molti esempi di nanoparticelle biocompatibili e biodegradabili che trovano applicazione come veicolanti di molecole bioattive, sia a basso peso molecolare, quali doxorubicina, paclitaxel, 10-idossicamptotecina, naltrexone, bupivacaina sia macromolecole, quali ad esempio peptidi, proteine (insulina, enzimi), acidi nucleici (siRNA, DNA) (Li,N. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* Volume: 83, Issue: 2, April 1, 2011, pag. 237-244; Toita, S. *Journal of Controlled Release* Volume: 155, Issue: 1, October 10, 2011, pp. 54-59;

Moya-Ortega, M.D. *Carbohydrate Polymers* Volume: 87, Issue: 3, February 14, 2012, pp. 2344-2351; Tamura, A. *Journal of Controlled Release* Volume: 146, Issue: 3, September 15, 2010, pp. 378-387, Chacko, R.T. *Advanced Drug Delivery Reviews* Volume: 64, Issue: 9, June 15, 2012, pp. 836-851).

In generale l'incorporazione di biomolecole nelle nanoparticelle note in letteratura comporta l'uso di solventi o di tensioattivi sintetici, o l'applicazione di stress di varia natura che possono portare a perdita di attività per denaturazione o degradazione delle biomolecole stesse.

Le poliammidoammine (PAA) reticolate, grazie alla loro insolubilità ed elevata rigonfiabilità in acqua, sono in grado di formare idrogeli, inoltre hanno una serie di proprietà che le rendono molto interessanti per l'uso biomedico quali la biodegradabilità e la biocompatibilità; la non immunogenicità; l'assenza di tossicità dei prodotti di degradazione; la modulabilità delle caratteristiche acido-base; la capacità di dare per interazione ionica complessi con proteine di polarità prevalente opposta; la possibilità di 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.

DESCRIZIONE

Fino ad ora non era stato possibile ottenere nanogeli di PAA reticolate applicando i metodi generalmente noti nella tecnica. La presente invenzione fornisce un metodo che permette di ottenere per la prima volta nanogeli di poliammidoammine reticolate.

I nanogeli di PAA reticolate dell'invenzione sono stabili, grazie ai

legami di natura chimica covalente presenti al loro interno che ne mantengono l'individualità, inoltre la natura fortemente idrofila delle PAA rende inutile l'aggiunta di tensioattivi o comunque di mezzi disperdenti per mantenerli sospesi in mezzi acquosi. Inoltre i nanogeli di PAA sono biodegradabili con velocità modulabile a prodotti non tossici, cosa che ne evita l'accumulo per somministrazioni ripetute, e quando contengono gruppi ionizzabili, il loro rigonfiamento varia in funzione del pH, con massima ampiezza di variazione passando dal pH fisiologico (7.4) al pH lisosomale (5-5.5).

La presente invenzione si riferisce a nanogeli di poliammidoammine (PAA) reticolate. In particolare i nanogeli secondo l'invenzione sono formati da nanoparticelle di dimensione inferiore a 500 nm, preferibilmente inferiore a 300 nm.

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. Esempi di PAA reticolate utilizzabili nell'invenzione sono riportati in:

P. Ferruti, M.A. Marchisio, R. Barbucci, Polymer 1985, 26, 1336-1348;

P. Ferruti, In Polymeric Materials Encyclopedia; Salamone, J.C., Ed.; CRC: Boca Raton, FL, 1996; Vol. 5, pp 3334-3359;

P. Ferruti, M.A. Marchisio, R. Duncan, Macromol. Rapid Commun. 2002, 23, 332-355;

P. Ferruti, S. Bianchi, E. Ranucci, F. Chiellini, V. Caruso Macromol. Bioscience 2005, 5, 613-622;

P. Ferruti, S. Bianchi, E. Ranucci, F. Chiellini, A.M. Piras Biomacromolecules 2005, 6, 2229-2235;

R. Annunziata, J. Franchini, E. Ranucci, P. Ferruti Magn. Reson. Chem.
2007; 45, 51-58;

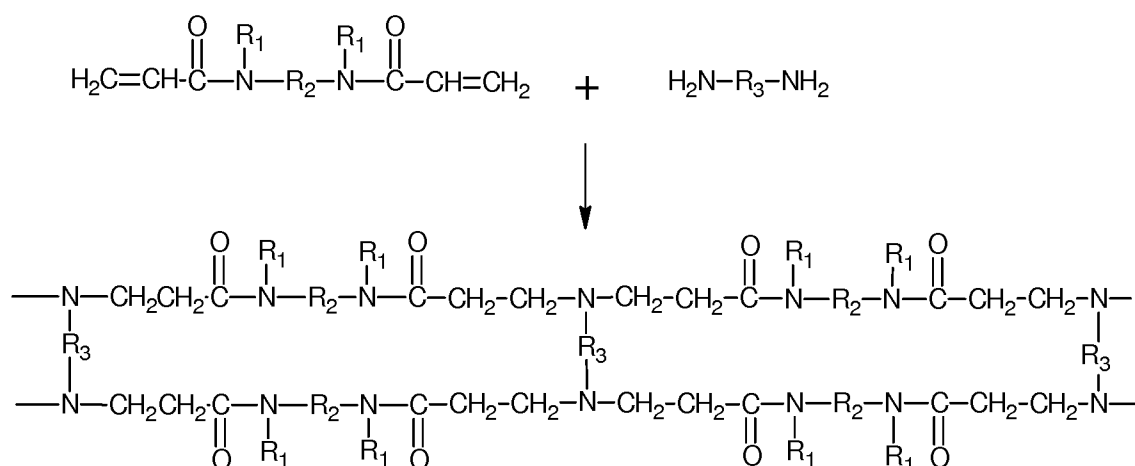
P. Ferruti, E. Ranucci, S. Bianchi, L. Falciola, P.R. Mussini, M. Rossi
J. Polym. Sci.: Part A: Poly. Chem., 2006, 44, 2316-2327;

In particolare i nanogeli dell'invenzione sono formati da poliammidoammine reticolate ottenute per reazione di una bisacrilammide con una diammina primaria che, contenendo quattro funzioni reattive, è in grado di inserirsi tra due catene parallele, come riportato nel seguente Schema 1 in cui:

R_1 è H, C_{1-6} alchile, opzionalmente sostituito con un gruppo $-COOH$, $-SO_3H$, $-OPO_3H$, $-OH$, oppure $-N(R_7, R_8)$ o $-N(R_7, R_8, R_9)^+$, in cui ciascuno di R_7, R_8 e R_9 indipendentemente è un gruppo C_{1-4} alchile;

R_2 è C_1-C_4 alchilene, opzionalmente sostituito con un gruppo $-(CH_2)_m-$ X, in cui m è un intero tra 0 e 6 e X è un gruppo scelto tra $-COOH$, $-SO_3H$, $-OPO_3H$, $-OH$, oppure $-N(R_7, R_8)$ o $-N(R_7, R_8, R_9)^+$ in cui R_7, R_8 e R_9 sono come sopra definiti;

R_3 è C_{1-6} alchilene.



Schema 1

Un'altra classe di poliammidoammine reticolate utilizzabili per formare i nanogeli dell'invenzione sono le poliammidoammine in cui la poliammidoammina reticolata contiene unità di ciclodestrina legate a segmenti di poliammidoammina quali quelle descritte in WO2008/151775 e in S. Swaminathan, Roberta Cavalli, F. Trotta, P. Ferruti, E. Ranucci, I. Gerges, A. Manfredi, D. Marinotto, P.R. Vavia J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem. 2010, 68, 183-191, ottenute per poliaddizione di Michael di una ciclodestrina ed una ammina ad una bisacrilammide.

Le ciclodestrine preferite sono la α , β o γ -ciclodestrina.

Le reazioni di poliaddizione di Michael sono condotte in solventi protici come acqua o alcoli, a temperatura ambiente e senza catalizzatori aggiunti.

Le poliammidoammine anfotere che portano funzioni acide come sostituenti laterali, hanno un notevole interesse come polimeri bioattivi dato che, oltre ad essere generalmente meno tossiche di quelle puramente cationiche di struttura simile, in soluzione esse variano la loro carica media in funzione del pH.

Ulteriore oggetto delle presente invenzione è un procedimento per la preparazione del nanogel di poliammidoammine reticolate comprendente uno o più cicli di omogeneizzazione ad alta pressione di idrogeli di poliammidoammine reticolate come sopra definiti.

L'omogeneizzazione ad alta pressione (HPH, high pressure homogeneization) fino ad ora è stata utilizzata per ottenere nanoparticelle di farmaci cristallini.

Preferibilmente l'omogeneizzazione ad alta pressione viene condotta ad una

pressione ad una pressione tra 100 e 1000 bar più preferibilmente tra 200 e 800 bar.

Il procedimento secondo l'invenzione comprende da 3 a 30 cicli di omogeneizzazione ad alta pressione, preferibilmente da 5 a 20 cicli.

In particolare l'omogeneizzazione ad alta pressione viene condotta in presenza di inibitori radicalici idrosolubili quali acido ascorbico, sodio bisolfito, sodio metabisolfito, cisteina, tioglicerolo. L'inibitore di radicali liberi è aggiunto preferibilmente in una concentrazione tra 0,05% e 3%, più preferibilmente tra 0,5 e 2% anche in presenza di agenti chelanti quali EDTA alla concentrazione tra lo 0,02 e 0,05%.

L'aggiunta di inibitori radicalici idrosolubili permette di ottenere nanogeli con dimensioni delle particelle inferiori ai 200 nm. Le dimensioni delle particelle rimangono costanti nel tempo e di conseguenza, le sospensioni di nanogeli rimangono stabili per un tempo indefinito. Le nanosospensioni acquose risultanti sono semitrasparenti e non hanno tendenza a sedimentare nel tempo.

I protocolli di omogeneizzazione ad alta pressione sviluppati nella presente invenzione hanno permesso di produrre nanoparticelle a base di poliammidoammine reticolate di dimensioni colloidali e di forma sferica come evidenziato mediante microscopia elettronica a trasmissione (TEM) in Figura 1 (Microfotografia TEM 105000 x). In particolare 7 cicli di omogeneizzazione con pressioni fino a 500 bar producono particelle con dimensioni inferiori ai 500 nm. L'aggiunta di un inibitore radicalico durante il processo di produzione in omogeneizzatore ad alta pressione in percentuali inferiori all'1% permette di ottenere particelle con dimensioni inferiori ai 200 nm come determinato mediante analisi laser light scattering. Le nanosospensioni acquose di queste nanoparticelle dimostrano di essere stabili per oltre 24 mesi,

conservate a 4°C, senza la formazione di aggregati o agglomerati e mantenendo le loro dimensioni iniziali. Queste nanoparticelle posseggono una elevata efficienza di incapsulazione nei confronti di farmaci sia idrofili sia lipofili che di macromolecole proteiche.

Ulteriore oggetto della presente invenzione è un sistema per il rilascio di farmaci comprendente il nanogelo di polimmidoammina reticolata come sopra definito e un principio attivo. In particolare il principio attivo è un farmaco antitumorale, quale paclitaxel, 5-flurouracile o camptotecina. Nel caso di incorporazione di molecole proteiche, i nanogeli dell'invenzione e hanno dimostrato di essere in grado di proteggerle dalla degradazione.

La matrice polimerica delle nanoparticelle è in grado di rigonfiare in funzione del valore di pH del mezzo in cui si trovano. La Figura 2 riporta il grado di rigonfiamento in soluzione tampone a diversi pH di nanogeli di poliammidoammina contenenti rispettivamente β e γ -ciclodestrina dopo 24 ore. Questa speciale caratteristica può essere sfruttata per modulare la cinetica di rilascio delle molecole incorporate queste nelle nanoparticelle. Tale comportamento favorisce il rilascio della molecola attiva in funzione di uno stimolo esterno quale il pH (particelle intelligenti) come dimostrato da studi di rilascio in vitro condotti a diversi valori di pH.

Esempi di preparazione di idrogeli

Esempio 1

L'acido 2,2'-bis(acrilammido)acetico (0,8 g, 4,0 mmol) venne sciolto con litio idrossido monoidrato (0,17 g, 4,0 mmol) in 1,34 ml di acqua distillata. Vennero aggiunte 2-metilpiperazina (0,30 g, 2,8 mmol) ed etilendiammina (40 μ l, 0,6 mmol). La miscela venne mantenuta sotto

agitazione fino a completa dissoluzione dei reagenti e successivamente lasciata a temperatura ambiente per 3 giorni. L'idrogelo finale venne lavato con acqua distillata fino a pH neutro delle acque di lavaggio.

Esempio 2

Il procedimento dell'esempio 1 venne ripetuto, sostituendo 2-metilpiperazina con piperazina (0,24 g, 2,8 mmol).

Esempio 3

Il procedimento dell'esempio 1 venne ripetuto, sostituendo 2-metilpiperazina con N,N'-diidrossietilpiperazina (0,415 g, 2,8 mmol).

Esempio 4

Il procedimento dell'esempio 1 venne ripetuto, sostituendo 2-metilpiperazina con 4-amminobutilguanidina solfato (0,64 g, 2,8 mmol) ed aggiungendo una quantità doppia di litio idrossido monoidrato (0,34 g, 8,0 mmol).

Esempio 5

Il procedimento dell'esempio 1 venne ripetuto, utilizzando le seguenti quantità dei reagenti: 2,2'-bis(acrilammido)acetico (0,8 g, 4,0 mmol); litio idrossido monoidrato (0,17 g, 4,0 mmol); 2-metilpiperazina (0,32 g, 3,0 mmol); etilendiammina (33 µl, 0,5 mmol).

Esempio 6

Il procedimento dell'esempio 1 venne ripetuto, sostituendo etilendiammina con dodecandiammina (0,11 g, 0,6 mmol) sciolta nella minima quantità di metanolo.

Esempio 7

Il procedimento dell'esempio 1 venne ripetuto, sostituendo acido 2,2'-bis(acrilammido)acetico con N,N'-bisacriloilpiperazina (0,78 g, 4 mmol)

ed eliminando litio idrossido.

Esempio 8

Litio idrossido monoidrato (220 mg, 5,24 mmol) venne sciolto in acqua bidistillata (1,825 mL) alla temperatura ambiente di 21°C. Si aggiunse quindi acido 2,2'-bis(acrilammido)acetico (1 g, 5 mmol), poi in successione, 2-metilpiperazina (0,24 g, 0,024 mmol) e β -ciclodestrina (0,688 g, 0,6 mmol). Quando la soluzione divenne limpida, l'agitazione magnetica venne interrotta. La reazione venne fermata dopo 4 giorni. Il tempo di reticolazione osservato era di 48 ore. L'idrogelato venne lavato ripetutamente con acqua.

Esempio 9

Il procedimento dell'esempio 8 venne ripetuto, sostituendo β -ciclodestrina con γ -ciclodestrina (0,786 g, 0,6 mmol).

Esempi di preparazione di nanogeli

Esempio 10

200 mg di polimero ottenuto nell'esempio 1 sono vennero dispersi in 10 ml di acqua filtrata contenenti l'1% di acido ascorbico. La sospensione ottenuta venne omogeneizzata mediante HPH secondo il seguente protocollo:

- 90 minuti ad una pressione di 500 bar

- numero di cicli: VIII

Caratterizzazione chimico fisica del campione dopo omogeneizzazione:

Diametro medio = 215 ± 12 nm

Indice di polidispersione = 0.17 ± 0.02

Potenziale Z = 32.7 ± 2.7 mV

Esempio 11

Il protocollo utilizzato per l'esempio 10 venne ripetuto utilizzando una

pressione di 700 bar nel processo di omogeneizzazione.

Esempio 12

Il protocollo utilizzato per l'esempio 10 venne ripetuto utilizzando una pressione di 500 bar e VI cicli nel processo di omogeneizzazione.

Esempio 13

200 mg di polimero ottenuto nell'esempio 9 furono dispersi in 10 ml di acqua filtrata contenete l'1,5% di acido ascorbico. La sospensione ottenuta è venne omogeneizzata mediante HPH secondo il seguente protocollo:

- 90 minuti ad una pressione di 500 bar;
- numero di cicli: VI

Esempio 14

200 mg di polimero ottenuto nell'esempio 8 furono dispersi in 10 ml di acqua filtrata contenete l'1,5% di acido ascorbico. La sospensione ottenuta è venne omogeneizzata mediante HPH secondo il seguente protocollo:

- 90 minuti ad una pressione di 500 bar;
- numero di cicli: VII

Esempio 15

200 mg di polimero ottenuto nell'esempio 8 furono dispersi in 10 ml di acqua filtrata contenete l'1,5% di acido ascorbico. La sospensione ottenuta è venne omogeneizzata mediante HPH secondo il seguente protocollo:

- 90 minuti ad una pressione di 700 bar;
- numero di cicli: VIII

Le caratteristiche dei nanogeli ottenuti nei precedenti esempi sono riportate nella seguente Tabella 1: _____

TABELLA 1

Esempio	Polimero e cicli usati	Diametro medio (nm)	Indice di polidispersione	pH
10	Campione preparato come nell'Esempio 1 VIII cicli (500 bar)	215±12	0.17±0.02	5
11	Campione preparato come nell'Esempio 1 VIII cicli (700 bar)	165±8	0.13±0.02	5
12	Campione preparato come nell'Esempio 8 VI cicli (500 bar)	285±4	0.10±0.02	4.6
13	Campione preparato come nell'Esempio 9 VI cicli (500 bar)	504±6	0.20±0.02	5.4
14	Campione preparato come nell'Esempio 8 VII cicli (500 bar)	334±10	0.15±0.01	4.7
15	Campione preparato come nell'Esempio 8 VIII cicli (700 bar)	185±15	0.18±0.01	4.7

Esempi di rigonfiamento di idrogeli a diversi valori di pH

Esempio 16

Vennero preparati tamponi a diversi valori di pH con concentrazione 0.005 M come riportato nella seguente Tabella 2.

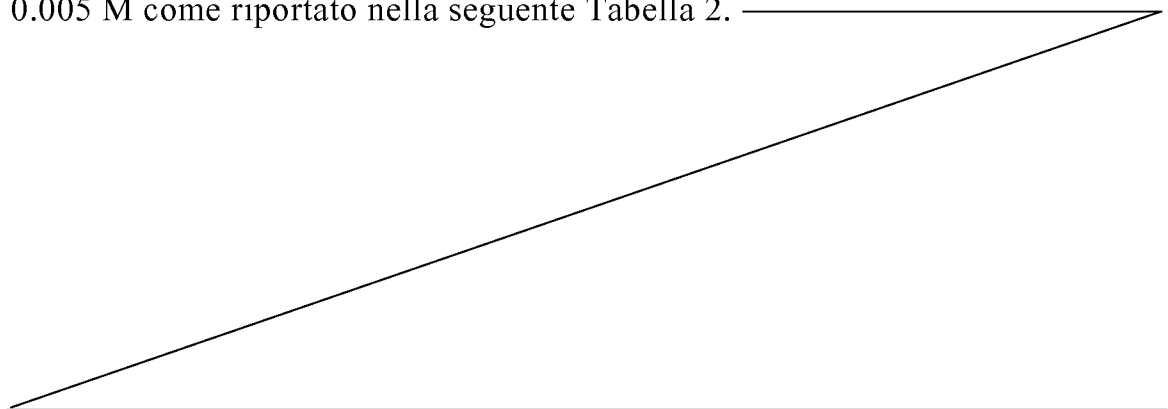


TABELLA 2

Valore pH	Sale	Base	Acido
5.0	CH ₃ COONa	/	CH ₃ COOH
6.0	KH ₂ PO ₄	KOH	/

In una provetta graduata da 10 mL vennero pesati alla bilancia analitica circa 7 mg di campione liofilizzato (nanogel ottenuto nell'esempio 14) e vennero aggiunti 10 mL di tampone (o 10 mL di tampone e 1 mL di NaCl). Il sistema venne lasciato equilibrare per 24 ore, poi il surnatante venne eliminato e il gel pesato alla bilancia analitica.

Vennero analizzati i rigonfiamenti degli idrogeli a pH 5.0 e 6.0 con solo tampone 0.005 M e con l'aggiunta di 1 mL di NaCl 0,9%. Il grado di rigonfiamento venne calcolato dal rapporto tra il peso del nanogel rigonfiato ed il nanogel essiccato.

Esempio 17

Vennero preparati tamponi a diversi valori di pH con concentrazione 0.005 M come riportato nella seguente Tabella 3.

TABELLA 3

Valore pH	Sale	Base	Acido
4.0	CH ₃ COONa	/	CH ₃ COOH
5.0	CH ₃ COONa	/	CH ₃ COOH
6.0	KH ₂ PO ₄	KOH	/
7.4	KH ₂ PO ₄	KOH	/

In una provetta graduata da 10 mL furono pesati circa 7 mg di campione (nanogel ottenuto nell'esempio 13) e si aggiunsero 10 mL di tampone. Venne quindi seguita la stessa procedura dell'esempio 16.

Esempi di preparazione di nanogeli con principi attivi incapsulati**Esempio 18**

5 mg di paclitaxel esattamente pesati vennero addizionati a 3 ml di sospensione acquosa dei due nanogeli preparati negli Esempi 14 e 13, alla concentrazione di 10 mg/ml. Le miscele furono lasciate sotto agitazione per 24 ore e quindi vennero centrifugate a 14000 rpm per 10 minuti. Il surnatante venne separato e liofilizzato per ottenere il nanogel contenente il paclitaxel in forma di polvere. La percentuale di paclitaxel incorporato venne determinata pesando alla bilancia analitica una quantità di polvere liofilizzata che venne introdotta in un matraccio da 10 ml, portata a volume con metanolo e quindi sonicata per 10 minuti. La nanosospensione così ottenuta venne centrifugata per 5 minuti a 10000 rpm ed il surnatante venne analizzato allo spettrofotometro dopo opportuna diluizione. L'assorbanza al massimo di assorbimento del paclitaxel a 227 nm venne utilizzata per calcolare la concentrazione di farmaco presente nei nanogeli facendo riferimento ad una curva di taratura.

I risultati sono riportati nella seguente Tabella 4.

TABELLA 4

Nanogel	Farmaco	% incorporata
Esempio 14	Paclitaxel	9,12
Esempio 13	Paclitaxel	14,24

In Fig. 3 sono riportati gli spettri ottenuti dall'analisi di un campione contenente paclitaxel libero e di due campioni dei nanogeli caricati con paclitaxel. I campioni sono stati preparati disperdendo in 10 mL di metanolo circa 1 mg di polvere liofilizzata ottenuta come sopra riportato.

Il picco alla lunghezza d'onda caratteristica del paclitaxel (227 nm) è ben visibile in tutti e tre i campioni, ma quando il paclitaxel si trova incorporato nei nanogeli si ha uno spostamento della lunghezza d'onda del picco. Questo comportamento conferma l'interazione del paclitaxel con la matrice dei nanogeli.

Esempio 19

I nanogeli dell'esempio 14 e dell'esempio 13 sono stati utilizzati per incorporare due farmaci contemporaneamente, il 5-Fluorouracile ed il Desametasone.

Nella tabella 5 seguente sono riportate le quantità dei farmaci e delle sospensioni dei nanogeli utilizzati per l'incorporazione del 5-fluorouracile e della camptotecina nei due tipi di nanogeli. La procedura utilizzata è quella riportata nell'esempio 18.

TABELLA 5

Campione	Caricamento
5-fluorouracile	5 mg
Camptotecina	4 mg
Nanogel esempio 14	15 mg
Nanogel esempio 13	15 mg

Per verificare la percentuale di camptotecina e di 5-fluorouracile incorporata nei nanogeli è stata utilizzata la procedura di estrazione riportata nell'esempio 18 per il paclitaxel. Gli estratti sono stati analizzati allo spettro fotometro. Per il 5-fluorouracile si è utilizzato la lunghezza d'onda corrispondente al massimo di assorbimento a 265 nm, mentre per la camptotecina quello a 370 nm. I risultati sono riportati nella seguente Tabella 6.

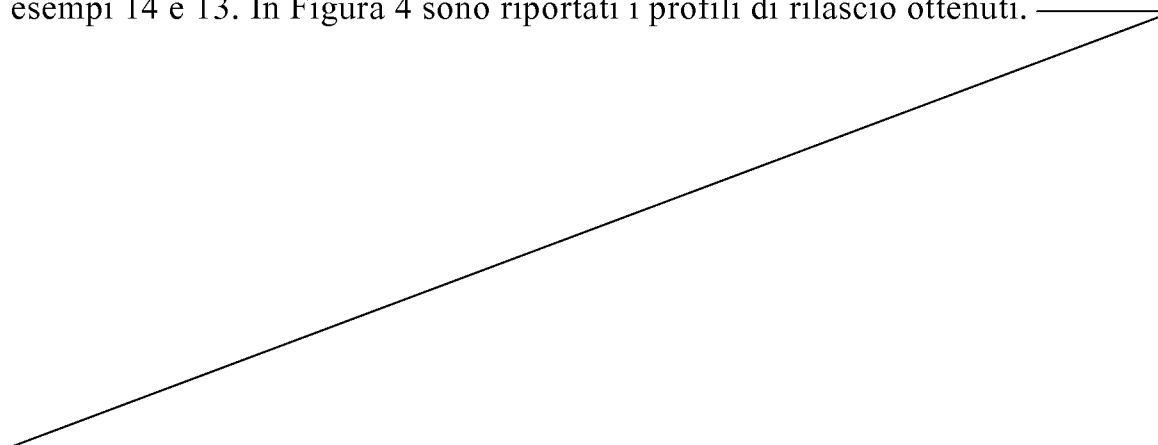
TABELLA 6

Campione	Farmaco	% incorporata
Nanogel Es. 14 β -CD/PAA	Camptotecina	1,21
Nanogel Es. 14 β -CD/PAA	5-FU	11,47
Nanogel Es. 13 γ -CD/PAA	Camptotecina	0,91
Nanogel Es. 13 γ -CD/PAA	5-FU	8,93

Esempi di rilascio di farmaci: Paclitaxel**Esempio 20**

Per valutare il rilascio in vitro dei farmaci dalle formulazioni è stata utilizzata una cella da dialisi multicompartimentale costituita da compartimenti donatori e riceventi separati da una membrana da dialisi con cut off 12000 da.

Gli studi di rilascio in vitro sono stati condotti in tampone fosfato 0.005M a pH=7,4. Nella fase ricevente è stato addizionato sodio dodecilsolfato (SDS) in percentuale dello 0,001% per ottenere le condizioni sink. Le fasi riceventi sono state raccolte e liofilizzate, poi disperse in metanolo (1 mL) e centrifugate (15000 rpm per 5 minuti) prima di analizzarle allo spettrofotometro. La concentrazione delle nanogeli PAA/CD/paclitaxel nella fase donatrice era circa 5 mg/mL e 3 mg/mL per i nanogeli ottenuti negli esempi 14 e 13. In Figura 4 sono riportati i profili di rilascio ottenuti.



7. Il nanogel secondo la rivendicazione 6 in cui le unità di ciclodestrina sono α , β o γ -ciclodestrina.
8. Un procedimento per la preparazione del nanogel come rivendicato in ciascuna delle rivendicazioni da 1 a 7 comprendente uno o più cicli di omogeneizzazione ad alta pressione di idrogeli di poliammidoammine reticolate.
9. Il procedimento secondo la rivendicazione 8 in cui la omogeneizzazione ad alta pressione avviene ad una pressione tra 2000 e 10000 psi.
10. Il procedimento secondo la rivendicazione 9 in cui la omogeneizzazione ad alta pressione avviene ad una pressione tra 3000 e 7000 psi.
11. Il procedimento secondo ciascuna delle rivendicazioni da 8 a 10 comprendente da 3 a 30, preferibilmente da 10 a 20 cicli di omogeneizzazione ad alta pressione.
12. Il procedimento secondo ciascuna delle rivendicazioni da 8 a 11 in cui la omogeneizzazione ad alta pressione viene condotta in presenza di un inibitore di radicali liberi idrosolubile.
13. Il procedimento secondo la rivendicazione 12 in cui l'inibitore di radicali liberi è acido ascorbico, sodio bisolfito, sodio metabisolfito, cisteina o tioglicerolo.
14. Il procedimento secondo le rivendicazioni 12 e 13 in cui l'inibitore di radicali liberi è aggiunto in una concentrazione tra 0,05% e 3%.
15. Il procedimento secondo ciascuna delle rivendicazioni da 12 a 14 in cui l'omogeneizzazione ad alta pressione viene condotta anche in presenza di

agenti chelanti.

16. Un sistema per il rilascio di farmaci comprendente il nanogelo secondo le rivendicazioni da 1 a 7 e un principio attivo.

17. Il sistema per il rilascio di farmaci secondo la rivendicazione 16 in cui il principio attivo è un farmaco antitumorale.

18. Il sistema per il rilascio di farmaci secondo la rivendicazione 17 in cui il farmaco antitumorale è paclitaxel, 5-flurouracile o camptotecina.

Milano, 7 agosto 2012

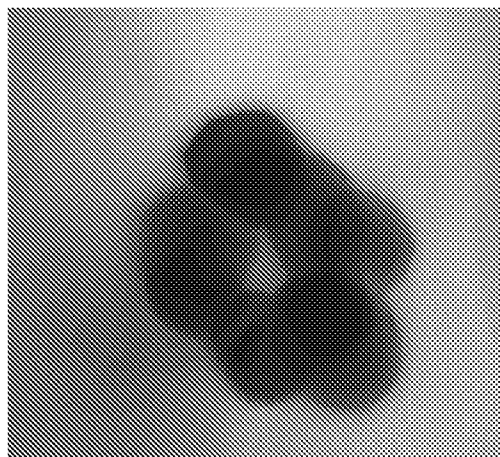


Fig. 1

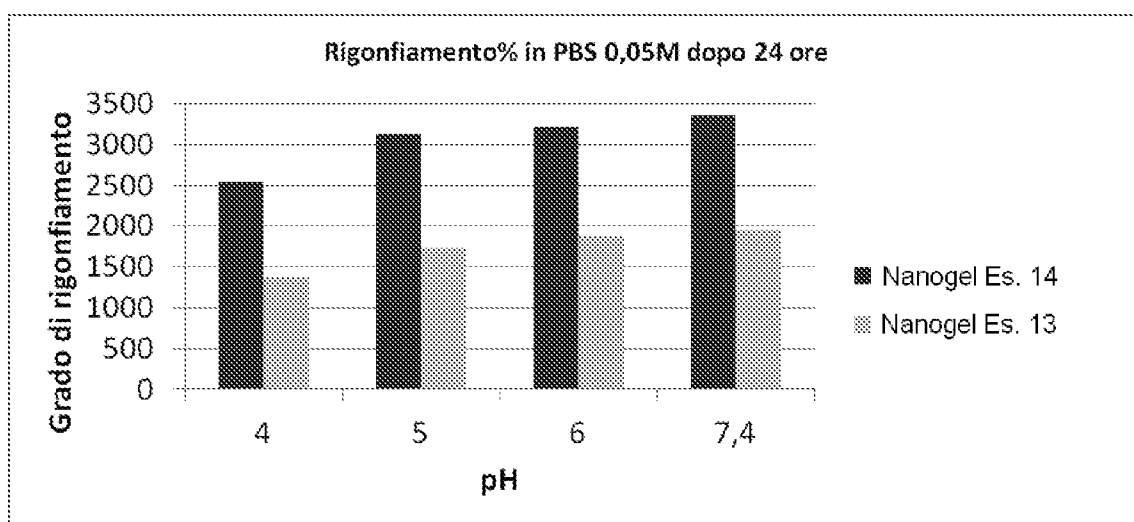


Fig. 2

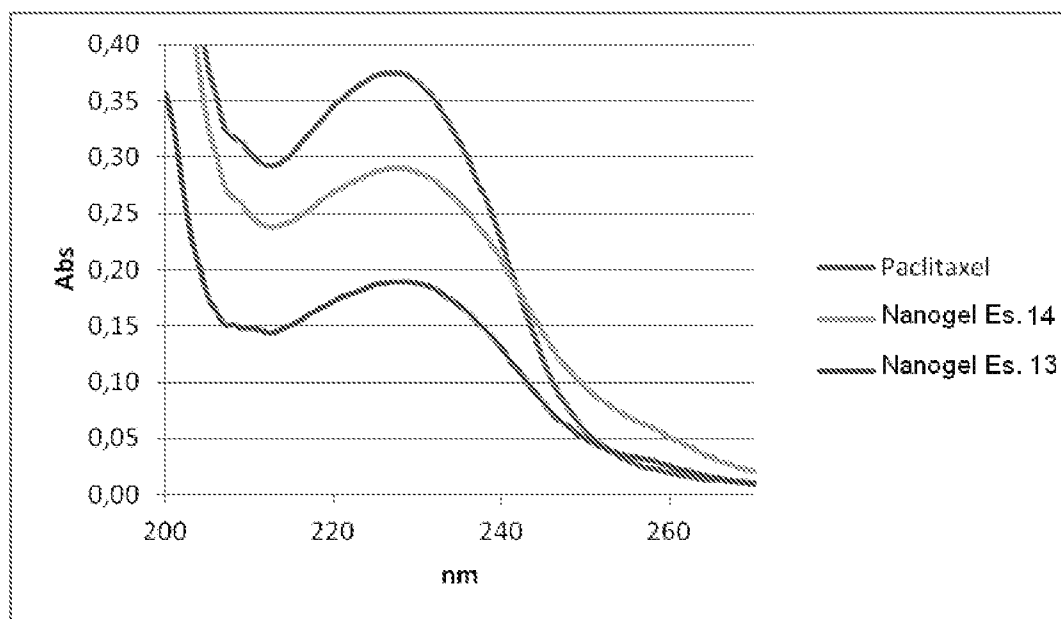


Fig. 3

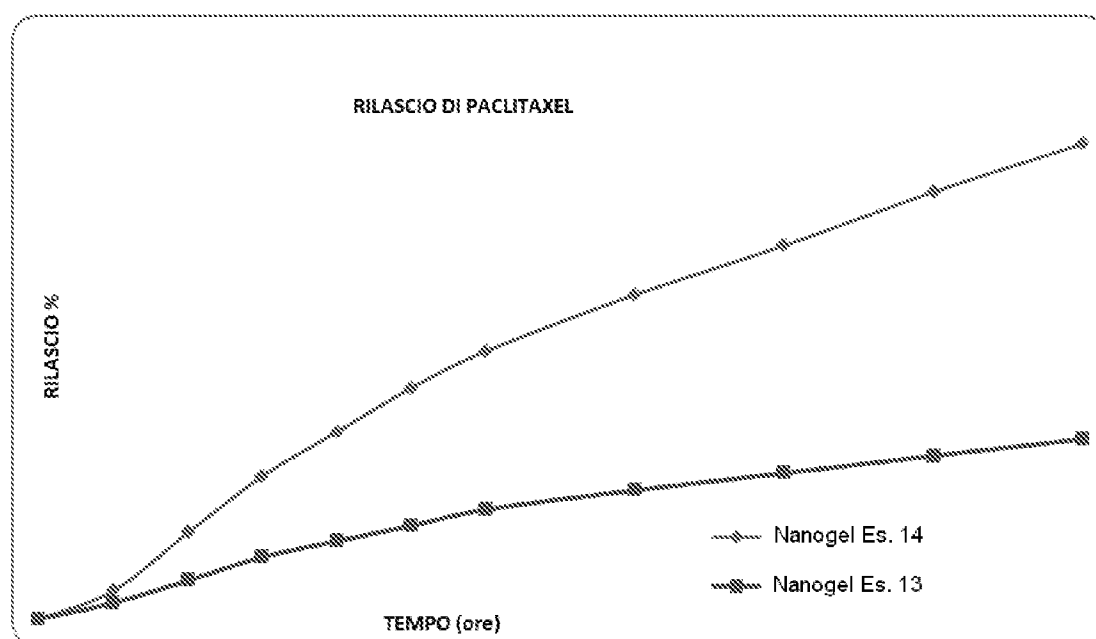


Fig. 4