



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

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102019000008745
Data Deposito	12/06/2019
Data Pubblicazione	12/12/2020

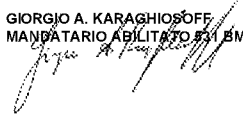
Classifiche IPC

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	47	69

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	P	9	10

Titolo

NANO-LIPOSOMI INGEGNERIZZATI PER UNA TERAPIA MIRATA DI ATEROSCLEROSI E
LORO PROCEDIMENTO DI PREPARAZIONE



DESCRIZIONE dell'Invenzione Industriale dal titolo:

"NANO-LIPOSOMI INGEGNERIZZATI PER UNA TERAPIA MIRATA
5 DI ATEROSCLEROSI E LORO PROCEDIMENTO DI
PREPARAZIONE"

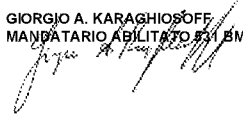
appartenente a Università degli Studi di Genova, di
nazionalità italiana, con sede in Via Balbi, 5, 16126
Genova GE.

10 Depositato il Al Nr.

TESTO DELLA DESCRIZIONE

La presente invenzione ha per oggetto nano-
liposomi ingegnerizzati, denominati anche immuno-
15 nano-liposomi, e il loro procedimento di
preparazione, per una terapia mirata di
aterosclerosi.

L'aterosclerosi è una patologia multifattoriale
sempre accompagnata da un processo infiammatorio, dal
20 momento di insorgenza della placca a quello di
formazione del trombo. Le placche originano
dall'accumulo di lipoproteine a bassa densità (low
density lipoproteins, LDL) nello strato sub-
endoteliale delle arterie ove si innesca un processo
25 di anomala proliferazione di cellule muscolari, di
alterata migrazione leucocitaria e di attivazione
macrofagica. Nei macrofagi così attivati, diversi
fattori di trascrizione inducono l'espressione di
proteine coinvolte nel processo flogistico, quali il
30 fattore di necrosi tumorale α , le metalloproteasi
della matrice e diverse interleuchine. Sebbene un
blocco completo di tali fattori presenti risvolti
positivi nell'aterosclerosi, la loro attività è



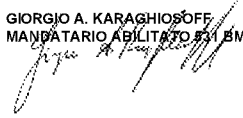
comunque fondamentale in diversi meccanismi molecolari coinvolti a livello del sistema immunitario e non solo. Da qui, nasce il bisogno di un'inibizione mirata di tali fattori di trascrizione.

5 Ad oggi esistono differenti approcci farmacologici alla terapia dell'aterosclerosi. Questi comprendono: (1) inibitori dell'enzima HMG-CoA reduttasi (statine), (2) inibitori dell'assorbimento del colesterolo e (3) fibrati. Tali classi di molecole
10 sono costituite da farmaci che hanno come bersaglio sistemi biochimici coinvolti nel metabolismo del colesterolo, ma nessuno di questi è in grado di aggredire la placca aterosclerotica direttamente dall'interno, agendo sui meccanismi molecolari che
15 vengono innescati durante la formazione della placca stessa.

Noi ora con l'impiego di nanosistemi di drug delivery possiamo ottenere un'inibizione mirata dei fattori di trascrizione sopra specificati.

20 Oggetto della presente invenzione sono nanoliposomi ingegnerizzati (immuno-nanoliposomi), unilamellari e/o multilamellari aventi un diametro preferibilmente compreso tra 10 e 200 nm , che possono essere utilizzati come trattamento nella
25 terapia dell'aterosclerosi, caratterizzati dal fatto di contenere anticorpi monoclonali terapeutici, ossia attivi nei confronti della placca ateromasica, e di presentare sulla superficie esterna di detti nanoliposomi dei poli-anioni e/o poli-cationi.

30 Gli anticorpi monoclonali terapeutici possono essere scelti preferibilmente fra quelli in grado di bloccare molecole coinvolte nella trasduzione di segnali pro-infiammatori o anticorpi commerciali con



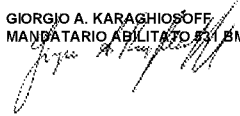
la capacità di ridurre eventi cardiovascolari, come, ad esempio, il Canakinumab sviluppato dalla Novartis.

In particolare gli anticorpi monoclonali terapeutici sono imprigionati nei nano-liposomi e i
5 poli-anioni e/o poli-cationi sono ancorati alla superficie dei detti nano-liposomi, dove all'attacco terminale dei detti poli-anioni e/o poli-cationi sono innestati anticorpi monoclonali specifici per le placche ateromasiche capaci di guidare detti nano-
10 liposomi ingegnerizzati a livello del tessuto bersaglio.

I poli-anioni e/o i poli-cationi da utilizzare sono scelti preferibilmente fra il glicol polietilenico (PEG), i polimeri idrofili e le
15 proteine.

La scelta degli anticorpi da innestare all'attacco terminale dei detti poli-anioni e/o poli-cationi ricade preferibilmente su anticorpi diretti contro specifici epitopi delle low density
20 lipoproteins ossidate presenti in elevata concentrazione a livello della placca aterosclerotica, così come per domini proteici della fibronectina presente a livello della placca ateromasica così come anticorpi diretti contro
25 epitopi di proteine espresse esclusivamente a livello di placche ateromasiche in fase florida.

Ulteriore oggetto della presente invenzione è rappresentato da una composizione farmaceutica per uso sistemico, in particolare per il trattamento
30 nella terapia dell'aterosclerosi, contenente i nano-liposomi ingegnerizzati sopra descritti in miscela



con eccipienti e/o diluenti e/o sistemi di veicolazione.

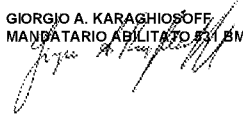
Pertanto la novità dell'invenzione è rappresentata da un lato dalla definizione di un sistema di drug delivery per una delle più importanti patologie del sistema vascolare, e dall'altro per il trattamento dell'aterosclerosi con anticorpi terapeutici.

Nell'ultimo decennio, sempre maggiore attenzione è stata rivolta ai sistemi di drug delivery in quanto consentono di avere un rilascio sito-specifico delle molecole incapsulate e modulabile nel tempo, andando a diminuire gli effetti indesiderati della terapia classica.

L'incapsulamento di molecole bioattive, quali anticorpi terapeutici, presenta il vantaggio di migliorarne la biodisponibilità e la farmacocinetica. I liposomi, grazie ai bassi costi, alla loro alta biocompatibilità ed alla loro capacità di incapsulare anche molecole chimicamente differenti, rappresentano sistemi di incapsulamento ideali per la sintesi di nanoparticelle da impiegare in protocolli di terapia mirata.

I nanoliposomi, inoltre, costituiscono un ottimo substrato per l'autoassemblaggio elettrostatico di polianioni/policationi sulle loro superfici. Questi consentono di stabilizzare le nanoparticelle stesse, modulare il rilascio dell'agente incapsulato e consentire l'immobilizzazione di anticorpi sulla loro superficie.

Dato che le placche aterosclerotiche presentano markers molecolari specifici, un loro epitopo può rappresentare un ottimo target per guidare un sistema



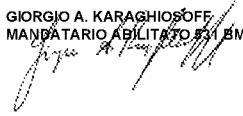
nanoparticellare coniugato con uno specifico anticorpo, immobilizzato sulla superficie delle nanoparticelle stesse, a livello del sito patologico.

5 Tali immuno-nanoparticelle saranno in grado di modulare il processo infiammatorio che è uno dei processi alla base dell'ostruzione vasale in presenza di placche aterosclerotiche. Tale invenzione permetterà di superare le limitazioni attualmente legate alla terapia classica.

10 Infatti, nel complesso, i risultati attesi mirano a sviluppare un approccio terapeutico innovativo per il trattamento delle placche ateromasiche nella fase florida, evitando l'approccio sistemico con farmaci innovativi ma dotati di effetti collaterali evitabili con i bassi dosaggi concentrati
15 sulla placca.

I nanosistemi alla sua base, ovvero i liposomi, sono di facile sintesi, molto versatili, altamente biocompatibili.

20 La terapia mirata proposta va ad annullare completamente gli effetti indesiderati che la somministrazione aspecifica di un inibitore di tali fattori potrebbe avere sull'intero sistema immunitario del paziente. Questo sistema innovativo
25 di drug delivery consente di superare gli svantaggi dovuti alla terapia classica, andando a diminuirne gli effetti collaterali, in quanto l'agente farmacologicamente attivo, verrà trasportato e rilasciato solamente a livello della placca
30 aterosclerotica, nel giusto dosaggio e nei tempi prestabiliti. Un sistema di drug delivery per il trattamento dell'aterosclerosi, come quello sopra descritto, risulta essere, considerata anche la



scarsa letteratura presente a tale riguardo, un approccio farmacologico fortemente innovativo.

Ulteriore oggetto dell'invenzione è rappresentato dalla sintesi di detti nanoliposomi ingegnerizzati (immuno-nanoliposomi) da impiegare
5 nella terapia dell'aterosclerosi dove gli anticorpi monoclonali terapeutici sono imprigionati nei nanoliposomi e il glicol polietilenico, polimeri idrofili o proteine sono ancorati alla superficie dei nanoliposomi.
10

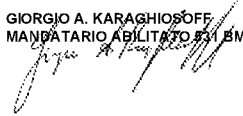
In dettaglio l'invenzione prevede la definizione di un semplice ed economico processo di incapsulamento di proteine terapeutiche, gli anticorpi monoclonali diretti verso molecole
15 coinvolte nel processo infiammatorio, in nanoliposomi specifici per la placca ateromasica, vista la presenza sulla loro superficie di un anticorpo che riconosce proteine espresse esclusivamente a tale livello.

20 Il procedimento per preparare i nano-liposomi ingegnerizzati sopra specificati comprende essenzialmente le fasi seguenti:

a) produzione di nano-liposomi caricati con anticorpi monoclonali attivi nei confronti
25 della placca ateromasica mediante idratazione di film lipidico;

b) modifica superficiale dei detti nanoliposomi mediante poli-anioni e/o policationi;

30 c) innesto degli anticorpi monoclonali specifici per le placche ateromasiche capaci di guidare detti nano-liposomi ingegnerizzati a livello del tessuto

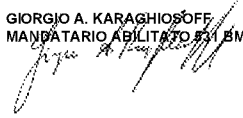


bersaglio (cioè diretto contro le placche
ateromasiche) all'attacco terminale dei
detti poli-anioni e/o poli-cationi .

Il processo di incapsulamento effettuato nello
5 stadio a) permette di ottenere nanoliposomi che
posseggano idonee caratteristiche chimico-fisiche, di
rilascio ed efficacia del principio attivo
incapsulato e siano bio- ed emocompatibili.

Lo stadio (b) riguarda la modifica superficiale
10 dei liposomi al fine di renderne la superficie più
idonea all'attacco di un anticorpo, che avviene nello
stadio (c), altamente specifico per le placche
ateromasiche capace di guidare le nanoparticelle a
livello del tessuto bersaglio.

15 La produzione di nano-liposomi caricati con
anticorpi monoclonali attivi nei confronti della
placca ateromasica mediante idratazione di film
lipidico, (stadio a), viene effettuata utilizzando
una soluzione a diverse concentrazioni di lipidi
20 preparata con differenti tipi di solvente, che viene
fatta evaporare al fine di ottenere la deposizione di
uno strato lipidico, che viene sottoposto ad
idratazione mediante aggiunta di una soluzione
idratante contenente o costituita da acqua e/o buffer
25 salini e/o soluzioni fisiologiche, in cui è stato
disperso un anticorpo monoclonale terapeutico, cioè
attivo nei confronti della placca ateromasica, da
incapsulare, effettuata sotto agitazione fino ad
ottenere una sospensione liposomale, la quale viene
30 successivamente sottoposta a sonicazione con
ultrasuoni, al fine di ottenere un buon controllo
della granulometria, indi sottoposta a



centrifugazione e lavaggio, preferibilmente con
acqua, eventualmente ripetuti preferibilmente da una
a tre volte, al fine di rimuovere l'agente non
incapsulato, ottenendo infine il surnatante ed il
5 pellet.

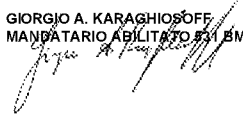
Il surnatante può essere conservato e
riutilizzato eventualmente in un ciclo successivo di
produzione.

Il pellet così ottenuto invece viene
10 normalmente risospeso in un volume di liquido
(buffer, soluzione fisiologica) e nuovamente
centrifugato e lavato sia al fine del raggiungimento
della concentrazione desiderata, preferibilmente fra
circa 10^6 e 10^7 particelle/mL, sia al fine di
15 rimuovere le eventuali tracce di agente attivo non
incapsulato che potrebbero interferire negli step
successivi.

La soluzione viene preparata preferibilmente con
un numero di concentrazioni diverse di lipidi uguale
20 o maggiore di 5 comprese fra 1 e 20 mg/mL e
preferibilmente con un numero di differenti solventi
impiegati uguale o maggiore di 4.

Nel caso di almeno 4 solventi impiegati detti
solventi sono etanolo, metanolo, cloroformio, acetato
25 di etile.

I lipidi possono essere scelti preferibilmente
fra i fosfolipidi, in particolare i derivati
dell'acido fosfatidico, nel quale il glicerolo è
esterificato in posizione 1 e 2 con acidi grassi e in
30 posizione 3 con acido ortofosforico. L'acido
ortofosforico, oltre alla esterificazione con il
glicerolo, presenta una seconda esterificazione con



un alcol (amminoalcol o un amminoacido con gruppo alcolico o uno zucchero).

Detti fosfolipidi sono preferibilmente scelti fra fosfatidil-colina, fosfatidil-etanolamina e
5 fosfatidil-inositolo.

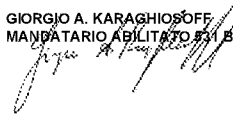
La soluzione preparata a diverse concentrazioni di lipidi con differenti tipi di solvente viene fatta evaporare preferibilmente a pressione ridotta, per un tempo compreso fra 0,5 e 1,5 h, ad una temperatura di
10 circa 40 °C. L'evaporazione completa del solvente è consigliata per ottenere la deposizione di un doppio strato fosfolipidico dal ridotto spessore.

L'idratazione del film lipidico avviene preferibilmente a temperature fra 15 e 40°C, per
15 tempi compresi fra 0,5 e 3 ore e sotto blanda agitazione fra 200 e 600 rpm, con un rapporto idratante /lipide compreso fra 5 e 30.

Gli anticorpi monoclonali terapeutici da incapsulare, cioè attivi nei confronti della placca
20 ateromasica, sono preferibilmente anticorpi in grado di bloccare molecole coinvolte nella trasduzione di segnali pro-infiammatori o anticorpi commerciali con la capacità di ridurre eventi cardiovascolari, come, ad esempio, il canakinumab, sviluppato dalla
25 Novartis, che viene aliquotato e disciolto nella suddetta fase acquosa in modo da avere un loading dell'agente attivo.

I liposomi formati possono essere unilamellari e/o multilamellari (preparazione liposomale mista),
30 con dimensioni preferibilmente comprese tra 10 e 200 µm.

La sonicazione con ultrasuoni viene preferibilmente effettuata per un tempo compreso tra



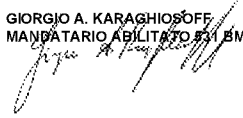
1 e 5 minuti, con intervalli da 10 a 30 secondi, e a temperature comprese fra 15°C e 40°C, l'erogazione degli ultrasuoni potendo eventualmente avvenire in modalità pulsata, impulso on da 1 a 10 secondi, 5 impulso off da 3 a 15 secondi.

Ad esempio come apparecchiatura può essere utilizzata una sonda, un sonicatore con tip immersa direttamente nella sospensione, con potenze che variano dal 30% al 70% rispetto alla potenza totale di output.

10 I liposomi ottenuti dopo la sonicazione con ultrasuoni possono essere unilamellari e/o multilamellari, con dimensioni comprese preferibilmente tra 10 e 200 nm e indici di dispersione del 5 fino al 30%.

15 La centrifugazione (o le centrifugazioni) della sospensione liposomale, che segue la sonicazione con ultrasuoni, avviene, preferibilmente, a velocità comprese tra 10000 e 24000 rpm al fine di recuperare i liposomi prodotti e separarli dall'acqua esterna 20 che contiene il farmaco eventualmente non incapsulato.

La modifica superficiale dei nano-liposomi mediante poli-anioni e/o poli-cationi (stadio b), al fine di rendere la superficie idonea all'attacco 25 dell'anticorpo responsabile dell'effettivo targeting della nanostruttura alla zona bersaglio del trattamento, avviene preferibilmente attraverso uno step di reazione di attacchi di tipo chimico (legami covalenti), di tipo chimico-fisico (adsorbimento) 30 e/o di tipo elettrostatico (legami non covalenti), in modo da ancorare detti poli-anioni e/o i poli-cationi alla superficie dei liposomi stessi.



I poli-anioni e/o i poli-cationi utilizzati sono scelti preferibilmente fra il glicol polietilenico (PEG), i polimeri idrofili e le proteine.

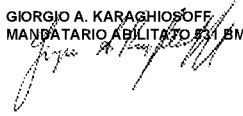
La scelta di tali anticorpi potrà ricadere su
5 anticorpi diretti contro specifici epitopi delle low density lipoproteins ossidate presenti in elevata concentrazione a livello della placca aterosclerotica, così come per domini proteici della fibronectina presente a livello della placca
10 ateromasica così come anticorpi diretti contro epitopi di proteine espresse esclusivamente a livello di placche ateromasiche in fase florida.

L'innesto degli anticorpi monoclonali specifici per le placche ateromasiche, capaci di
15 guidare detti nano-liposomi ingegnerizzati a livello del tessuto bersaglio, all'attacco terminale del poli-anioni e/o poli-cationi (stadio c) può avvenire mediante accoppiamento covalente oppure non covalente.

20 Opportune modifiche ai terminali dei poli-anioni e poli-cationi, , permettono l'accoppiamento covalente di ligandi.

Per l'accoppiamento non covalente di anticorpi ai liposomi, si possono utilizzare invece anticorpi e
25 lipidi funzionalizzati con proteine o piccole molecole che hanno forti affinità reciproche.

In entrambi i casi, sia per l'attacco covalente sia per l'attacco non covalente, lo stadio (c) viene preferibilmente effettuato mediante incubazione dei
30 nano-liposomi modificati nello stadio (b), lavorando con un eccesso di anticorpo, ad una specifica temperatura ("phase-transition temperature", dipendente dal tipo di lipide o fosfolipide



utilizzato) per tempi di reazione compresi tra 0,5 e 12 ore al fine di ottenere l'integrazione dell'anticorpo target specifico al bilayer lipidico del nanocarrier.

- 5 La sospensione ottenuta è centrifugata e lavata, a velocità comprese preferibilmente tra 10000 e 24000 rpm al fine di recuperare i liposomi prodotti e separarli dall'acqua esterna che contiene l'anticorpo non innestato sulla superficie dei liposomi e
- 10 eventuali intermedi di reazione.

L'operazione di centrifugazione e lavaggio può essere preferibilmente ripetuta da una ad un massimo di tre volte. L'anticorpo non legato alla superficie potrà essere riciclato per nuove fasi di innesto dello

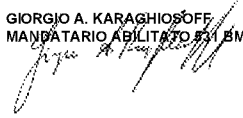
15 stesso.

Ulteriore oggetto dell'invenzione è rappresentato dall'uso dei nano-liposomi ingegnerizzati come sopra descritti come trattamento nella terapia dell'aterosclerosi.

20

RIVENDICAZIONI

- 5 1.Nano-liposomi ingegnerizzati (immuno-
nanoliposomi) caratterizzati dal fatto di
contenere anticorpi monoclonali attivi nei
confronti della placca ateromasica e di
presentare sulla superficie esterna di detti
10 nano-liposomi poli-anioni e/o poli-cationi.
- 2.Nano-liposomi ingegnerizzati come da
rivendicazione 1 dove detti nano-liposomi sono
unilamellari e/o multilamellari aventi un
diametro compreso tra 10 e 200 nm.
- 15 3.Nano-liposomi ingegnerizzati come da
rivendicazione 1 o 2 dove gli anticorpi
monoclonali attivi nei confronti della placca
ateromasica sono imprigionati nei nano-
liposomi e i poli-anioni e/o poli-cationi
20 sono ancorati alla superficie dei detti
nano-liposomi, dove all'attacco terminale
dei detti poli-anioni e/o poli-cationi sono
innestati anticorpi monoclonali specifici
per le placche ateromasiche capaci di
25 guidare detti nano-liposomi ingegnerizzati a
livello del tessuto bersaglio.
- 4.Nano-liposomi ingegnerizzati come da almeno
una delle rivendicazioni precedenti dove i
poli-anioni e/o i poli-cationi sono scelti
30 fra il glicol polietilenico (PEG), i
polimeri idrofili e le proteine.
- 5.Composizione farmaceutica per uso sistemico
contenente i nano-liposomi ingegnerizzati



come da almeno una delle rivendicazioni precedenti in miscela con eccipienti e/o diluenti e/o sistemi di veicolazione.

5 6. Composizione farmaceutica come da rivendicazione 5 per uso come trattamento nella terapia dell'aterosclerosi.

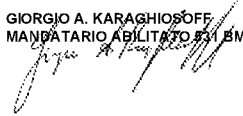
10 7. Procedimento per preparare i nano-liposomi ingegnerizzati come da almeno una delle rivendicazioni da 1 a 4 comprendente essenzialmente le fasi seguenti:

a) produzione di nano-liposomi caricati con anticorpi monoclonali attivi nei confronti della placca ateromasica mediante idratazione di film lipidico;

15 b) modifica superficiale dei detti nano-liposomi mediante poli-anioni e/o policationi;

20 c) innesto degli anticorpi monoclonali specifici per le placche ateromasiche capaci di guidare detti nano-liposomi ingegnerizzati a livello del tessuto bersaglio all'attacco terminale dei detti poli-anioni e/o policationi .

25 8. Procedimento come da rivendicazione 7 dove la produzione di nano-liposomi caricati con anticorpi monoclonali attivi nei confronti della placca ateromasica mediante idratazione di film lipidico, stadio (a), viene effettuata utilizzando una soluzione a
30 diverse concentrazioni di lipidi preparata con differenti tipi di solvente, che viene fatto evaporare al fine di ottenere la deposizione di uno strato lipidico, che



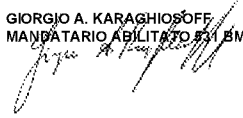
viene sottoposto ad idratazione mediante aggiunta di una soluzione idratante contenente o costituita da acqua e/o buffer salini e/o soluzioni fisiologiche, in cui è stato disperso un anticorpo monoclonale terapeutico, cioè attivo nei confronti della placca ateromasica, da incapsulare, effettuata sotto agitazione fino ad ottenere una sospensione liposomale, la quale viene successivamente sottoposta a sonicazione con ultrasuoni, indi sottoposta a centrifugazione e lavaggio, preferibilmente con acqua, ottenendo infine il surnatante ed il pellet.

5
10
15 9) Procedimento come da rivendicazione 8 dove il pellet viene risospeso fino al raggiungimento della concentrazione desiderata, preferibilmente fra circa 10^6 e 10^7 particelle/mL.

20 10) Procedimento come da rivendicazione 8 dove i lipidi sono fosfolipidi scelti fra fosfatidil-colina, fosfatidil-etanolamina e fosfatidil-inositolo.

25 11) Procedimento come da rivendicazione 8 dove l'idratazione del film lipidico avviene a temperature fra 15 e 40°C per tempi compresi fra 0,5 e 3 ore e sotto blanda agitazione fra 200 e 600 rpm, con un rapporto idratante /lipide compreso fra 5 e 30.

30 12) Procedimento come da rivendicazione 8 dove la sonicazione con ultrasuoni viene effettuata per un tempo compreso tra 1 e 5 minuti, con intervalli da 10 a 30 secondi,



e a temperature comprese fra 15°C e 40°C,
l'erogazione degli ultrasuoni potendo
eventualmente avvenire in modalità pulsata,
impulso on da 1 a 10 secondi, impulso off da
3 a 15 secondi.

5

13) Procedimento come da rivendicazione 8 dove
la centrifugazione della sospensione
liposomale, che segue la sonicazione con
ultrasuoni, avviene a velocità comprese tra
10000 e 24000 rpm.

10

14) Procedimento come da rivendicazione 7 dove
la modifica superficiale dei liposomi
mediante poli-anioni e/o poli-cationi ,
avviene attraverso uno step di reazione di
attacchi di tipo chimico (legami covalenti),
di tipo chimico-fisico (adsorbimento) e/o
di tipo elettrostatico (legami non
covalenti).

15

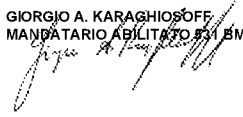
15) Procedimento come da rivendicazione 7 dove
l'anticorpo monoclonale viene innestato
all'attacco terminale dei poli-anioni e/o
poli-cationi mediante incubazione dei nano-
liposomi modificati nello stadio (b),
lavorando con un eccesso di anticorpo, ad
una temperatura dipendente dal tipo di
lipide o fosfolipide utilizzato per tempi di
reazione compresi tra 0,5 e 12 ore, essendo
poi seguita da una centrifugazione e
lavaggio, preferibilmente ripetute da una
tre volte, a velocità comprese tra 10000 e
24000 rpm.

20

25

30

16) Uso dei nano-liposomi ingegnerizzati come da
almeno una delle rivendicazioni da 3 a 4



come trattamento nella terapia
dell'aterosclerosi.

P.I. Università degli studi di Genova.

5

Giorgio A. Karaghiosoff

Mandatario Abilitato

Iscritto al N. 531 BM

