

**NANOVETTORE COCARICATO CON UN INIBITORE DELL'ESOCITOSI E UN
PRINCIPIO ATTIVO**

5 SETTORE TECNICO

La presente invenzione è relativa a un nanovettore caricato con almeno un inibitore dell'esocitosi e almeno un principio attivo.

Le particelle micro e nanostrutturate sono studiate
10 come vettori per il trasporto di farmaci per indirizzare in modo selettivo al tessuto bersaglio questi ultimi, incrementandone l'efficacia e minimizzandone gli effetti collaterali. Gli ulteriori vantaggi generali di questo tipo vettori sono: la possibilità di somministrare molecole non
15 solubili o poco solubili in acqua e la protezione dalla degradazione prematura del farmaco. Per queste ragioni, l'utilizzo di alcuni farmaci accoppiati a nanovettori è già in studio in fase clinica.

STATO DELL'ARTE ANTERIORE

20 Negli ultimi anni è stato mostrato un crescente interesse nell'utilizzo di nanoparticelle di silica mesoporose (MSN). L'ossido di silicio infatti è stato riconosciuto come un materiale biocompatibile e sicuro dalla Food and Drug Administration (FDA). Inoltre, a causa
25 dell'elevata versatilità e dell'alta capacità di caricamento

del farmaco, le MSN sono un ottimo mezzo per veicolare farmaci in modo efficace e sicuro.

In campo oncologico, la veicolazione efficace e sicura dei farmaci è di particolare importanza. La doxorubicina, un'antraciclina somministrata per il trattamento di vari tipi di tumori tra cui tumori del sangue, tumori solidi e sarcomi è uno tra i farmaci più utilizzati.

In generale, le nanoparticelle cariche di farmaco, raggiunte le cellule da colpire, vengono endocitate. Il processo di endocitosi si può classificare in base alle proteine di membrana coinvolte che a loro volta dipendono dalle caratteristiche chimico/fisiche del vettore oggetto di studio. In linea generale, il processo implica 4 fasi:

- interazione con la membrana cellulare;
- invaginazione della membrana;
- formazione di vescicole (endosomi primari e secondari);
- fusione delle vescicole con un compartimento sub-cellulare e rilascio del materiale trasportato all'interno della cellula.

In particolare, le MSN, una volta internalizzate, vengono indirizzate verso la via endo-lisosomiale, in cui i lisosomi, rappresentano l'ultimo compartimento cellulare raggiunto. La via endo-lisosomiale è caratterizzata da una graduale diminuzione del pH che va da 7.4 nella membrana

plasmatica, passando a circa 6×10^6 negli endosomi primari, 5.5×10^6 negli endosomi secondari per finire a $4.6-5 \times 10^5$ nei lisosomi.

In generale, il principio alla base della somministrazione di farmaco mediante nanoparticelle è il cosiddetto "effetto cavallo di Troia" ("trojan horse effect"), cioè l'effetto per cui le nanoparticelle vengono internalizzate in cellule in maniera rapida e massiva, al contrario di quanto succede per molecole cariche (farmaci, oligonucleotidi, ecc.), sfavorite nell'attraversamento della membrana cellulare.

Per aumentare ulteriormente l'effetto terapeutico dei nanovettori, sono ricercate nuove strategie che possano incrementare localmente i livelli di farmaco. Ad esempio, è stato riportato recentemente come un'adeguata modificazione chimica della superficie delle nanoparticelle possa indurre il cosiddetto "endolysosomal escape" al fine di ottenere il rilascio delle molecole attive direttamente nel citosol, massimizzando l'azione specifica del farmaco trasportato. Altre strategie mirano invece alla funzionalizzazione con molecole specifiche, per esempio mediante "cell penetrating peptides", allo scopo di favorire l'assorbimento (uptake) cellulare dei nanovettori, incrementando così la dose finale di farmaco.

Alcuni studi si sono focalizzati sulla comprensione dei meccanismi alla base dei processi che portano all'endocitosi

di nanoparticelle e di come le caratteristiche chimico-fisiche del nanomateriale possano influenzare l'interazione particella/cellula.

Un limite generale dei nanovettori è dato dai naturali
5 processi di esocitosi cellulare, per cui, così come le nanoparticelle vengono internalizzate abbondantemente dalle cellule, altrettanto efficacemente i nanovettori internalizzati vengono espulsi all'esterno delle cellule. Tali processi riducono in maniera significativa il tempo
10 medio di "residenza" intracellulare dei nanovettori, riducendone così in maniera forte l'efficacia terapeutica. Queste problematiche sono state fino ad oggi poco affrontate perché si conosce ancora poco dei meccanismi molecolari e cellulari che regolano l'esocitosi di nanoparticelle e
15 nanovettori.

Pochi recenti articoli prendono in considerazione il fenomeno dell'esocitosi delle nanoparticelle studiandone la correlazione con le proprietà chimico-fisiche dei vettori analizzati ma senza riuscire a dare una descrizione
20 dettagliata dei meccanismi alla base di questi eventi. Una delle ipotesi riguardo al meccanismo di esocitosi di nanoparticelle è descritta in Yanes et al. (Small 9, 697-704, 2013) e suppone che l'esocitosi avvenga direttamente attraverso la fusione dei lisosomi con la membrana cellulare,

la cosiddetta esocitosi lisosomiale, ma tuttora i dati a disposizione in letteratura sono insufficienti per chiarire il fenomeno.

La caratterizzazione dei meccanismi che determinano l'espulsione di nanovettori dalla cellula è essenziale per comprendere meglio le reali potenzialità dell'utilizzo di nanomateriali in un sistema di drug delivery. Sarebbe infatti fondamentale riuscire a trattenere i nanovettori all'interno della cellula per un tempo sufficientemente lungo affinché essi possano svolgere le loro funzioni nel modo ottimale. La maggiore limitazione di un approccio di questo tipo è la mancata selettività delle molecole normalmente utilizzate per inibire il processo di esocitosi. È noto infatti che molti meccanismi che governano l'esocitosi sono gli stessi che regolano i processi di endocitosi e che gli inibitori che sono stati finora utilizzati per studiare l'esocitosi dei nanovettori interferiscono anche sul processo di endocitosi. Per questa ragione tali inibitori, in vitro, sono sempre somministrati in una fase successiva alla fase di somministrazione del nanovettore recante il farmaco, in modo che l'iniziale assorbimento del farmaco nelle cellule non sia inibito. In vivo una tale somministrazione sequenziale e separata risulterebbe tossica per l'organismo e pertanto non sarebbe applicabile.

Ad oggi, quindi, non vi sono a disposizione nanovettori

che abbiano un'azione mirata all'inibizione del rilascio dei vettori dalle cellule.

OGGETTO DELL'INVENZIONE

Uno scopo della presente invenzione è pertanto di sviluppare nanovettori che possano essere caricati con farmaci, vengano internalizzati efficacemente nelle cellule e non vengano espulsi all'esterno delle cellule, e che siano sicuri e privi di effetti collaterali in particolare per una somministrazione in vivo.

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

Definizioni

Con il termine "nanovettore" si intende un materiale formato da particelle di dimensioni nell'ordine di grandezza da 1 a 500 nm in grado di trasportare un'altra sostanza, per esempio un farmaco.

Con l'espressione "nanovettore caricato con la sostanza X", si intende un nanovettore al quale è legata la sostanza X, o in cui è incapsulata/intrappolata la sostanza X, o a cui è associata la sostanza X.

Con l'espressione "nanovettore cocaricato con la sostanza X e la sostanza Y" oppure "nanovettore cocaricato con una combinazione della sostanza X e della sostanza Y" si intende un nanovettore al quale sono legate la sostanza X e

la sostanza Y, o in cui sono incapsulate/intrappolate la sostanza X e la sostanza Y, o a cui sono associate la sostanza X e la sostanza Y.

Descrizione delle Figure

5 - la figura 1 illustra un grafico con misure ICP-AES (spettroscopia di emissione atomica), in cui è valutato il contenuto di silicio per cellula (mol/cell) dopo esposizione a nanoparticelle per tempi diversi;

 - la figura 2 illustra un grafico che riporta la
10 vitalità cellulare misurata tramite saggio WST dopo trattamento con 10 µg/ml e 30 µg/ml di nanoparticelle non funzionalizzate (M), cariche di doxorubicina (M-doxo), di DMA (M-DMA), o coincubate con doxorubicina e DMA (M-DD) per 24 ore;

15 - la figura 3 illustra un grafico che riporta la vitalità cellulare misurata tramite saggio WST dopo trattamento con 30 µg/ml di nanoparticelle non funzionalizzate (M), cariche di doxorubicina (M-Doxo), di citocalasina B (M-CytB), o coincubate con doxorubicina e
20 citocalasina B (M-DC) per 24 ore;

 - la Figura 4 illustra un grafico che riporta il rilascio di doxorubicina in soluzione da parte di MSN coincubate con doxorubicina e DMA a pH 4.5 e 7.4.

Descrizione dettagliata

25 Il nanovettore secondo la presente invenzione è

cocarcato con almeno un inibitore dell'esocitosi e almeno un principio attivo.

Il nanovettore è preferibilmente un nanovettore metallico (nanoparticelle di oro, argento, platino, ossido di ferro, ossido di cerio, ossido di silicio, silicio/silica mesoporosa, ossido di zinco, quantum dots (CdSe, InP), ossido di titanio, rame), un nanovettore polimerico (particelle di PLGA; PLA, chitosano, coprolattoni, capsule layer-by-layer, dendrimeri), un nanovettore lipidico (liposomi, lipoplessi, particelle "lipidiche solide"), un nanovettore di carbonio (nanodiamanti, nanoparticelle di grafene/ossido di grafene, nano-onions di carbonio, carbon dots, nanotubi di carbonio, fullereni) o un nanovettore a base di proteine e oligonucleotidi.

Più preferibilmente il nanovettore è una nanoparticella di silica mesoporosa.

L'inibitore dell'esocitosi è preferibilmente dimetilamiloride (5-(N,N-dimetil)amiloride cloridrato), citocalasina A, B o D, o nocodazolo. La citocalasina A e la citocalasina D agiscono inibendo la polimerizzazione dell'actina. Il nocodazolo è invece un inibitore della formazione dei microtubuli. Più preferibilmente l'inibitore dell'esocitosi è dimetilamiloride o citocalasina B. Ancor più preferibilmente, l'inibitore è dimetilamiloride.

Il principio attivo è preferibilmente un farmaco, un

plasmide o un miRNA/siRNA, più preferibilmente un farmaco antitumorale, ancor più preferibilmente doxorubicina.

Il nanovettore secondo la presente invenzione è utilizzato per il trattamento di una patologia medica. Più
5 in particolare il suddetto nanovettore è utilizzato per il trattamento di un tumore.

Esempi

Esempio 1 - esocitosi di nanoparticelle

Con riferimento alla figura 1, è illustrato un esempio
10 di come normalmente le nanoparticelle vengano espulse al di fuori della cellula mediante un efficiente processo di esocitosi.

È stata infatti analizzata l'internalizzazione cellulare nel tempo di nanoparticelle di ossido di silicio funzionalizzate in superficie con amino gruppi (NH_2) (50 nm
15 di diametro, prodotte da HiQ-Nano), molto utilizzate in nanomedicina grazie alla loro biocompatibilità e versatilità.

Una soluzione di tali nanoparticelle ad una
20 concentrazione di 1 nM è stata aggiunta a colture di cellule HeLa. Sono state effettuate misure ICP-AES (spettroscopia di emissione atomica con sorgenti a plasma) per valutare il contenuto di silicio per cellula (mol/cell) dopo esposizione alle nanoparticelle per tempi diversi.

25 Si vede chiaramente che, a fronte di una rapida e

massiva internalizzazione cellulare di nanoparticelle, vi è un processo altrettanto efficiente di esocitosi che causa una loro significativa espulsione al di fuori della cellula.

Se tali nanoparticelle fossero utilizzate da nanovettori trasportatori di farmaci, quindi, il fenomeno di esocitosi diminuirebbe sostanzialmente la loro efficacia terapeutica, indipendentemente dal farmaco/molecola attiva trasportata.

Esempio 2 - Nanoparticelle di silice mesoporosa caricate con doxorubicina e dimetilamiloride

Una soluzione di nanoparticelle di silice mesoporosa (MSN) prodotte da Sigma Aldrich (CAS number: 7631-86-9) ad una concentrazione di 1 mg/ml è stata preparata aggiungendo 0,5 mg/ml di doxorubicina e 0,5 mg/ml di dimetilamiloride (DMA) e lasciata in agitazione per una notte per favorire la diffusione di entrambe le molecole all'interno della porosità delle MSN. Il valore medio del diametro delle MSN è di 200 nm e la porosità di 4 nm.

Le MSN sono state prima centrifugate e lavate abbondantemente e le quantità di doxorubicina e DMA assorbite sono state determinate per differenza leggendo l'assorbanza del surnatante a 495 nm e 375 nm rispettivamente quantificando mediante curva di taratura.

Le MSN così preparate sono state quindi risospese in mezzo di coltura ad una concentrazione finale di 10 e 30

µg/ml e messe in contatto con cellule HeLa per tempi diversi.

Mediante un saggio di vitalità cellulare (WST), sono state testate le cellule HeLa trattate con diverse concentrazioni di MSN coincubate con doxorubicina e DMA (M-
5 DD).

La Figura 2 mostra un grafico riassuntivo che riporta la vitalità cellulare dopo trattamento con 10 µg/ml e 30 µg/ml di MSN non funzionalizzate (M), cariche di doxorubicina (M-doxo), di DMA (M-DMA), o coincubate con doxorubicina e
10 DMA (M-DD) per 24 ore.

I risultati mostrano una netta diminuzione di cellule metabolicamente attive a seguito del trattamento con M-DD rispetto al trattato con nanoparticelle contenenti esclusivamente doxorubicina (M-Doxo) (dopo 24 ore, si ha una
15 mortalità pressoché totale nel caso del sistema co-incubato).

L'effetto osservato è dovuto al minor rilascio extra-cellulare (esocitosi) delle MSN da parte della cellula nei momenti successivi all'internalizzazione. In generale, il
20 nanovettore secondo l'invenzione, abbattendo i fenomeni di esocitosi cellulare di MSN, aumenta in maniera significativa il tempo di permanenza del vettore carico del farmaco e di conseguenza l'efficacia terapeutica.

È molto importante notare che la metodologia proposta
25 offre un forte effetto sinergico in termini di efficacia

terapeutica. Infatti, si può vedere dai dati riportati in Figura 2 che l'efficacia terapeutica del nanovettore coincubato (induzione di una mortalità pressoché totale delle cellule) è molto maggiore di quella che ci si potrebbe aspettare solo in base alla maggiore dose di farmaco intracellulare derivante dell'inibizione dell'esocitosi. Nel caso della sola doxorubicina, si vede infatti che pur triplicando la dose (da 10 a 30 µg/ml), si ottiene solo un piccolo guadagno del 10% in termini di mortalità, quindi il sistema nanovettore coincubato è in grado di indurre complessi effetti sinergici a livello cellulare che aumentano tantissimo l'efficacia del farmaco trasportato.

Esempio 3 - Nanoparticelle di silice mesoporosa caricate con doxorubicina e citocalasina B

In alternativa alla DMA, è stata utilizzata la citocalasina B come inibitore dell'esocitosi.

La Figura 3 riporta un grafico riassuntivo che riporta la vitalità cellulare dopo trattamento con 30 µg/ml di nanoparticelle non funzionalizzate (M), cariche di doxorubicina (M-Doxo), di citocalasina B (M-CytB) e coincubate con doxorubicina e citocalasina B (M-DC) per 24 ore.

I dati ottenuti da test WST mostrano come anche in questo caso in presenza dell'inibitore è possibile osservare un miglioramento dell'attività citotossica della

doxorubicina, anche se l'effetto inibitorio della Citocalasina B si è dimostrato meno efficace rispetto a quanto visto con la DMA.

Esempio 4 - Influenza del pH sul rilascio di farmaco
5 **all'interno della cellula**

Con riferimento alla Figura 4, è stato osservato come il rilascio di doxorubicina dalle MSN coincubate con Doxo-DMA sia fortemente influenzato dal pH della soluzione con un aumento considerevole della quantità di farmaco rilasciato
10 con l'acidificazione.

Trattenendo per un tempo più lungo le nanoparticelle all'interno dell'ambiente lisosomiale che presenta un pH acido, è possibile ottenere un aumento della dose locale di doxorubicina.

15 Dai suddetti esempi sono evidenti i vantaggi che il nanovettore secondo la presente invenzione consente di ottenere.

In particolare, il suddetto nanovettore consente l'utilizzo di minori dosi di farmaco, poiché
20 l'internalizzazione del nanovettore è particolarmente efficiente nel tempo e il rilascio del farmaco all'interno della cellula è particolarmente favorito dal pH acido dell'ambiente lisosomiale. Il rilascio del farmaco è pertanto elevato e prolungato nel tempo.

Inoltre i processi di esocitosi lisosomiale dei nanovettori internalizzati sono contestualmente inibiti grazie alla presenza dell'inibitore dell'esocitosi. L'inibitore dell'esocitosi non ha alcun effetto
5 sull'iniziale endocitosi del nanovettore poiché si trova incapsulato in quest'ultimo. Non influenza quindi in modo negativo l'entrata del nanovettore nella cellula, perché rimane mimetizzato dal nanovettore stesso.

Infine, come anche discusso precedentemente, il
10 nanovettore coincubato con il farmaco e l'inibitore di esocitosi induce complessi effetti sinergici a livello cellulare, per cui l'efficacia terapeutica del farmaco è fortemente ed ulteriormente aumentata (in maniera ulteriore rispetto al solo incremento di dose intracellulare dovuto
15 all'inibizione dell'esocitosi).

RIVENDICAZIONI

1. Nanovettore cocaricato con almeno un inibitore dell'esocitosi e almeno un principio attivo.

2. Nanovettore cocaricato con una combinazione di
5 almeno un inibitore dell'esocitosi e almeno un principio attivo.

3. Nanovettore secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui il nanovettore è selezionato dal gruppo che consiste di un nanovettore metallico, un nanovettore polimerico, un
10 nanovettore lipidico, un nanovettore di carbonio, e nanovettore a base di proteine e oligonucleotidi.

4. Nanovettore secondo la rivendicazione 3, in cui il nanovettore è una nanoparticella di silica mesoporosa.

5. Nanovettore secondo una qualsiasi delle
15 rivendicazioni precedenti, in cui l'almeno un inibitore dell'esocitosi è dimetilamiloride, citocalasina A, B o D, o nocodazolo.

6. Nanovettore secondo la rivendicazione 5, in cui l'almeno un inibitore dell'esocitosi è dimetilamiloride o
20 citocalasina B.

7. Nanovettore secondo la rivendicazione 6, in cui l'almeno un inibitore dell'esocitosi è dimetilamiloride.

8. Nanovettore secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui l'almeno un principio
25 attivo è un farmaco, un plasmide o un miRNA o un siRNA.

9. Nanovettore secondo la rivendicazione 8, in cui il farmaco è doxorubicina.

10. Nanovettore secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti per uso terapeutico.

5 11. Nanovettore secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 10 per uso nel trattamento di un tumore.

RIASSUNTO

Viene descritto un nanovettore cocaricato con almeno un inibitore dell'esocitosi e almeno un principio attivo. Tale nanovettore è utilizzato per uso terapeutico, in particolare
5 nel trattamento di un tumore.

Figura principale: Figura 2

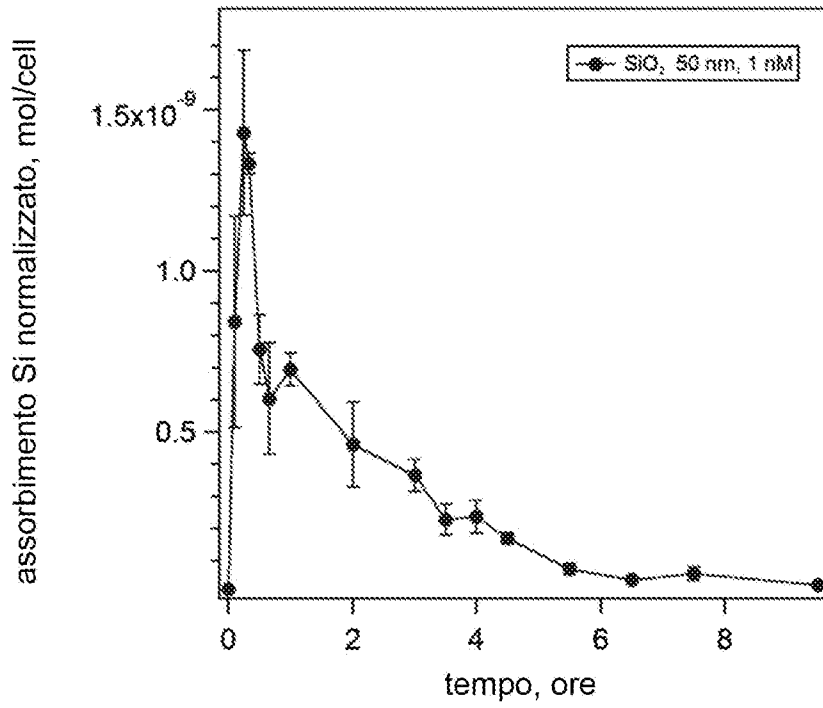


FIG. 1

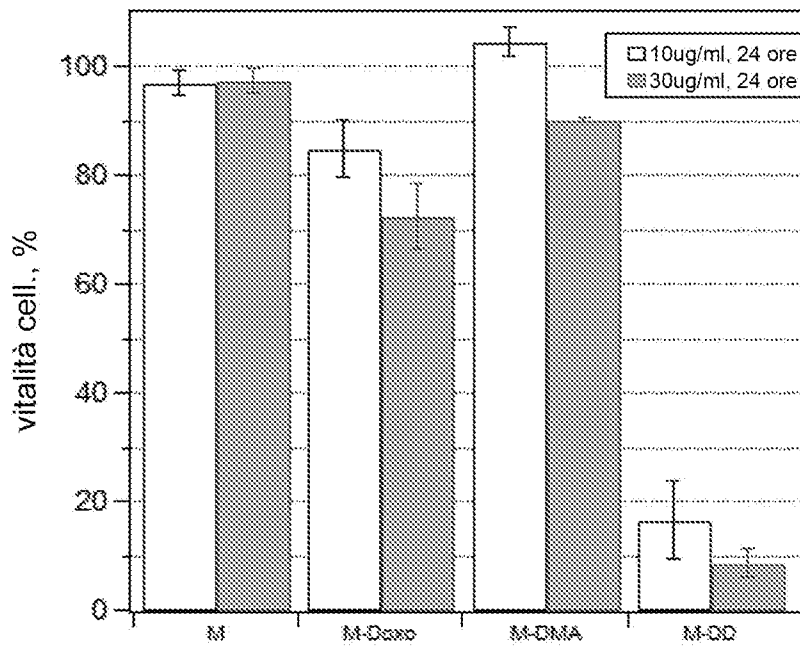


FIG. 2

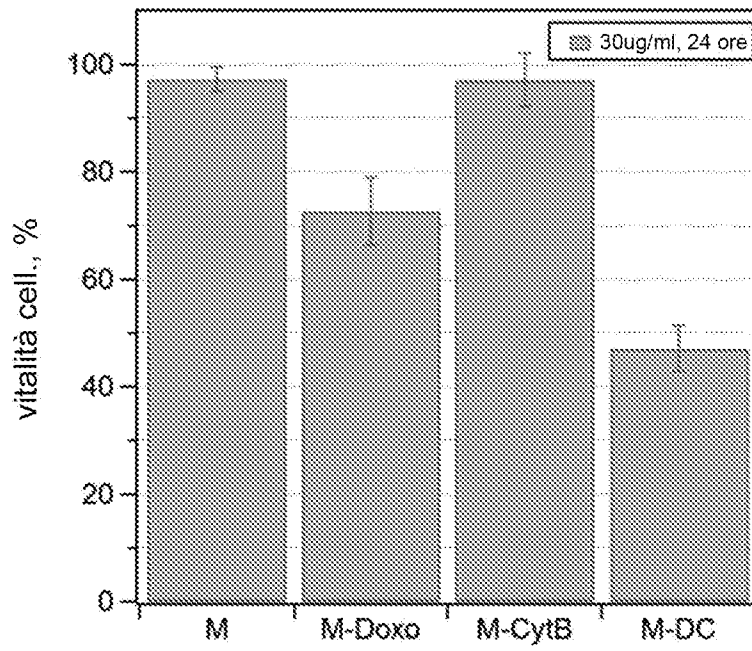


FIG. 3

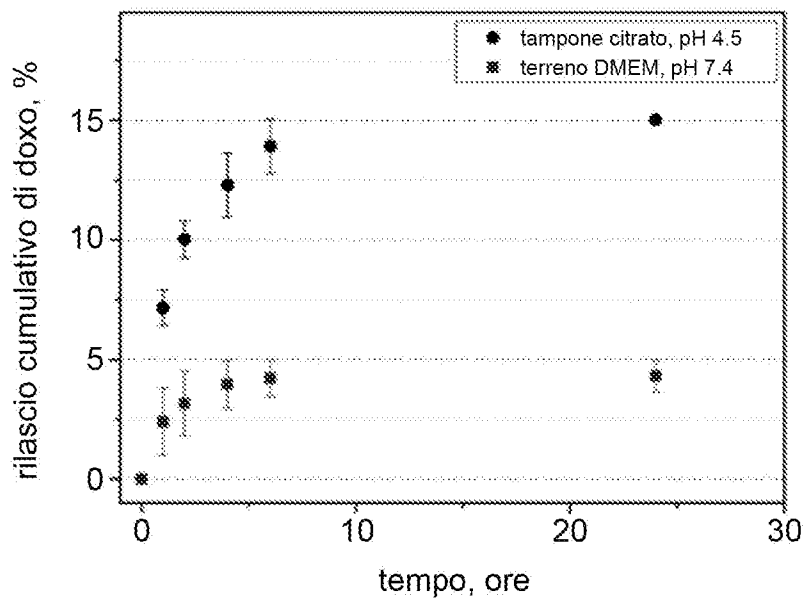


FIG. 4