

"Metodo per la preparazione di nanoparticelle lipidiche solide contenenti anticorpi in forma di coppia ionica, mediante la tecnica della coacervazione degli acidi grassi"

* * * * *

R I A S S U N T O

* * * * *

Il presente trovato si riferisce ad un metodo per la preparazione di nanoparticelle lipidiche solide contenenti anticorpi, comprendente le fasi di:

(a) preparare una soluzione micellare comprendente:

da 0,02 mg/ml a 10 mg/ml di almeno un tensioattivo anionico selezionato dal gruppo costituito da alchilfosfati, alchilsolfati e alchilsolfonati;

da 0,1% a 30% in peso/peso totale della soluzione micellare di almeno un sapone alcalino;

da 0,1% a 30% in peso/peso totale della soluzione micellare di almeno un polimero anfifilico non ionico selezionato dal gruppo costituito da polivinilacetato parzialmente idrolizzato, copolimeri polioossietilene/polioossipropilene, poliacrilamidi, polivinilpirrolidone e suoi derivati, derivati di destrano e agarosio a vari pesi molecolari, derivati della cellulosa, gomme non ioniche, ciclodestrine e loro derivati;

detta soluzione micellare essendo preparata mediante i seguenti passaggi:

(i) solubilizzare in acqua l'almeno un tensioattivo anionico;

(ii) aggiungere l'almeno un sapone alcalino scaldando ad una temperatura compresa tra 35°C e 90°C; e

(iii) aggiungere l'almeno un polimero anfifilico non ionico;

(b) aggiungere alla soluzione micellare preparata nella fase (a) una soluzione contenente almeno un anticorpo di interesse in concentrazione compresa tra 0,1 mg/ml e 10 mg/ml rispetto alla soluzione finale risultante dalla fase (b);

(c) aggiungere alla soluzione ottenuta nella fase (b) almeno un acido in concentrazione compresa tra 0,01M e 5M rispetto alla soluzione finale risultante dalla fase (c);

(d) raffreddare in bagno di ghiaccio la sospensione ottenuta nella fase (c), fino a temperatura ambiente.

* * * * *

FERBI S.r.l.,

con sede a Mosciano S. Angelo

* * * * *

D E S C R I Z I O N E

Il presente trovato ha come oggetto un metodo per la preparazione di nanoparticelle lipidiche solide contenenti anticorpi.

Le nanoparticelle lipidiche solide (SLN, solid lipid nanoparticles) sono ampiamente utilizzate nel campo farmaceutico per la veicolazione di principi attivi, grazie alla loro bassa tossicità e semplicità di preparazione.

Nel campo della tecnica farmaceutica sono noti numerosi metodi per la preparazione delle nanoparticelle lipidiche solide, quali ad esempio il metodo dell'omogeneizzazione a freddo, il metodo della omogeneizzazione a caldo (Müller et al., EP0605497), il metodo della diluizione della microemulsione (Munper et al., US2006/0292183), il metodo dell'evaporazione del solvente dall'emulsione (Siekman et al., European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 1996; 43: 104-109), il metodo della diluizione del solvente dall'emulsione (Trotta et al., International

Journal of Pharmaceutics 2003; 257(1-2): 153-160) e il metodo dell'iniezione di solvente (Schubert et al., European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2003; 55(1): 125-131).

Tutti i metodi sopra citati permettono la produzione di nanoparticelle aventi dimensioni comprese tra 10 e 1000 nm aventi una ridotta distribuzione dimensionale. L'unica eccezione è rappresentata dal metodo dell'omogeneizzazione a freddo, che consiste in un metodo di macinazione e porta a particelle di dimensioni più grosse (microparticelle aventi dimensioni comprese tra 1 e 100 μm).

Tuttavia, tutti i metodi di cui sopra presentano degli svantaggi. Ad esempio, il metodo dell'omogeneizzazione a caldo richiede l'utilizzo di strumenti complessi e costosi e di elevate temperature; il metodo della diluizione e quello di raffreddamento di microemulsioni richiedono l'uso di grandi quantitativi di tensioattivi e cotensioattivi e di temperature elevate che non consentono pertanto l'incorporazione di farmaci termosensibili; ancora, i metodi che comportano l'uso di solventi non sono in grado di garantire

la completa eliminazione del solvente utilizzato che talvolta può essere tossico.

Recentemente è stato sviluppato un nuovo metodo per la preparazione di nanoparticelle lipidiche solide basato sulla coacervazione degli acidi grassi (Battaglia et al., Journal of Microencapsulation 2010; 27(1): 78-85, WO 2008/149215). Tale metodo ha permesso di superare, almeno in parte, gli svantaggi presentati dagli altri metodi descritti in letteratura.

L'inglobamento dei peptidi e delle proteine all'interno delle nanoparticelle lipidiche solide è una delle sfide emergenti nel campo della veicolazione dei farmaci e dei principi attivi, molti dei quali sono, per l'appunto, proteine o peptidi. L'applicazione terapeutica dei peptidi e delle proteine è infatti limitata da alcune caratteristiche quali l'alto peso molecolare, il carattere idrofilo e la limitata stabilità chimica. Queste caratteristiche sono alla base della bassa biodisponibilità, della scarsa capacità di attraversare le membrane biologiche e dalla breve emivita nel torrente circolatorio di peptidi e proteine somministrate ad uso

terapeutico.

Le SLN possono essere utili per la veicolazione di peptidi e proteine all'interno dell'organismo grazie alla potenzialità della matrice lipidica di proteggere le molecole peptidiche dalla degradazione e di promuoverne l'assorbimento. Tuttavia, l'inglobamento di peptidi e proteine nelle SLN rimane ancora un obiettivo difficile, poiché ogni molecola peptidica è caratterizzata da caratteristiche peculiari proprie (ad esempio il peso molecolare, l'idrofilia e la stabilità) che variano da una molecola peptidica all'altra.

Questa situazione spesso ostacola la formulazione di veicoli per la somministrazione di peptidi e proteine in un organismo, dal momento che ogni peptide o proteina richiederebbe uno studio a sé per determinare la strategia più adatta per la sua veicolazione nell'organismo. La scelta della corretta strategia formulativa è dettata principalmente da considerazioni sulla solubilità e sulla stabilità della singola molecola (A. J. Almeida and E. Souto, *Advanced Drug Delivery Reviews* 2007 59 (6), 478-490).

L'utilizzo di matrici lipidiche come materiali per formulazioni a lento rilascio di peptidi e proteine è stato riportato solo da alcuni autori (H. Reithmeier et al., *Journal of Controlled Release* 2001, 73, (2-3), 339-350; M. Garcia-Fuentes et al. *Colloids and Surfaces B* 2002, 27, 3, 159-168). La causa di ciò risiede nella natura idrofobica della matrice lipidica, in cui possono essere incorporate più facilmente molecole lipofile piuttosto che idrofile come peptidi e proteine.

Una valida strategia per promuovere l'inglobamento di molecole peptidiche in un sistema colloidale solido di natura lipidica è quello di aumentare la lipofilia delle molecole peptidiche stesse formando un complesso tra la proteina o il peptide avente azione farmacologica ed un tensioattivo mediante la cosiddetta tecnica dell'hydrophobic ion pairing (J. D. Meyer and M. C. Manning, *Pharmaceutical Research* 1998, 15, (2), 188-193). Tale tecnica si basa sulla formazione di un'interazione tra una molecola dotata di carica elettrica ed un tensioattivo dotato di carica elettrica opposta, che porta alla formazione di un

complesso lipofilo insolubile. Nel caso specifico di proteine e peptidi, i gruppi amminici presenti su di essi possono essere protonati, acquistando così una carica elettrica positiva che può formare facilmente dei complessi (coppie ioniche) con tensioattivi dotati di carica negativa.

Attualmente, nell'area biomedica sta riscuotendo particolare interesse la ricerca sugli anticorpi, che sono complessi proteici a struttura modulare capaci di legarsi in modo altamente specifico a molecole strutturalmente complementari denominate antigeni.

L'applicazione della tecnica dell'hydrophobic ion pairing alle proteine è stata descritta in letteratura e brevettata (WO 1994/008599). Anche la veicolazione di coppie ioniche all'interno di nanoparticelle lipidiche solide è stata documentata in letteratura (Gallarate M. et al. Int J Chem Eng 2011). Tuttavia, non è stata ancora descritta la veicolazione all'interno di nanoparticelle lipidiche di anticorpi grazie alla tecnica dell'hydrophobic ion pairing. Ciò è dovuto all'elevato peso molecolare degli anticorpi, che può essere di ostacolo all'inglobamento nelle

nanoparticelle lipidiche. Inoltre, la particolare struttura terziaria degli anticorpi, fondamentale ai fini della loro attività biologica, li differenzia dalle altre proteine dotate di peso molecolare inferiore. La peculiarità della formazione di una coppia ionica tra un anticorpo ed un controione a carica negativa sta nell'ottimizzare la quantità del controione in modo da aumentare la lipofilia dell'anticorpo, pur senza saturare tutti i gruppi amminici presenti sull'anticorpo, in modo da salvaguardarne l'attività biologica.

Compito precipuo del presente trovato è pertanto quello di fornire un metodo per la preparazione, mediante la tecnica della coacervazione, di nanoparticelle lipidiche solide contenenti anticorpi, inglobati in dette nanoparticelle mediante la tecnica dell'hydrophobic ion pairing.

Ancora, la presente invenzione ha come scopo quello di fornire un metodo per preparare nanoparticelle lipidiche solide contenenti anticorpi inglobati nelle nanoparticelle stesse in

forma di coppia ionica.

Non ultimo scopo del trovato è quello di realizzare un metodo per la preparazione di nanoparticelle lipidiche solide contenenti anticorpi che sia di elevata affidabilità, di relativamente facile realizzazione e a costi competitivi.

Questo compito, nonché questi ed altri scopi che meglio appariranno in seguito, sono raggiunti dal metodo secondo il presente trovato per preparare, mediante la tecnica della coacervazione, nanoparticelle lipidiche solide contenenti anticorpi, inglobati mediante la tecnica dell'hydrophobic ion pairing.

Altri scopi, caratteristiche e vantaggi dell'invenzione risulteranno maggiormente dalla seguente descrizione dettagliata.

Nel contesto della presente invenzione, con il termine "soluzione acquosa" si intende una soluzione in cui il solvente è l'acqua. Con il termine "soluzione micellare" si intende una soluzione acquosa comprendente almeno un tensioattivo anionico, almeno un sapone alcalino e almeno un polimero anfifilico non ionico. Con il

termine "nanoparticelle" si intendono particelle di dimensione compresa tra 10 e 1000 nm. Con il termine "sostanza biocompatibile" si intende una sostanza biologicamente compatibile con tessuti, organi e funzioni dell'organismo, che non provoca risposte tossiche o immunologiche da parte dello stesso. Con il termine "soluzione acida" si intende una soluzione di un acido biocompatibile con pH compreso tra 0 e 7. Con il termine "sapone alcalino" si intende un sale alcalino di un acido grasso solubile in acqua, ad esempio un sale sodico o potassico. Con il termine "molecola peptidica" si intende un peptide o una proteina, di origine naturale o sintetica.

La presente invenzione consiste in un metodo per la preparazione di nanoparticelle lipidiche solide contenenti anticorpi, comprendente le fasi di:

(a) preparare una soluzione micellare comprendente:

da 0,02 mg/ml a 10 mg/ml di almeno un tensioattivo anionico selezionato dal gruppo costituito da alchilfosfati, alchilsolfati e alchilsolfonati;

da 0,1% a 30% in peso/peso totale della soluzione micellare di almeno un sapone alcalino;

da 0,1% a 30% in peso/peso totale della soluzione micellare di almeno un polimero anfifilico non ionico selezionato dal gruppo costituito da polivinilacetato parzialmente idrolizzato, copolimeri poliossietilene/poliossipropilene, poliacrilamidi, polivinilpirrolidone e suoi derivati, derivati di destrano e agarosio a vari pesi molecolari, derivati della cellulosa, gomme non ioniche, ciclodestrine e loro derivati;

detta soluzione micellare essendo preparata mediante i seguenti passaggi:

(i) solubilizzare in acqua l'almeno un tensioattivo anionico;

(ii) aggiungere l'almeno un sapone alcalino scaldando ad una temperatura compresa tra 35°C e 90°C; e

(iii) aggiungere l'almeno un polimero anfifilico non ionico;

(b) aggiungere alla soluzione micellare preparata nella fase (a) una soluzione contenente almeno un anticorpo di interesse in concentrazione

compresa tra 0,1 mg/ml e 10 mg/ml rispetto alla soluzione finale risultante dalla fase (b);

(c) aggiungere alla soluzione ottenuta nella fase (b) almeno un acido in concentrazione compresa tra 0,01M e 5M rispetto alla soluzione finale risultante dalla fase (c);

(d) raffreddare in bagno di ghiaccio la sospensione ottenuta nella fase (c), fino a temperatura ambiente.

Il tensioattivo anionico presente nella soluzione micellare funge da controione per l'anticorpo da inglobare nella nanoparticella lipidica solida che, come detto precedentemente, essendo una molecola proteica può essere protonato a livello dei suoi gruppi amminici, acquistando una carica elettrica positiva. Il tensioattivo anionico e l'anticorpo formano quindi una coppia ionica lipofila.

Preferibilmente, l'almeno un tensioattivo anionico è selezionato dal gruppo costituito da sodio diottilsolfosuccinato, sodio dodecilsolfato, sodio deossitaurocolato, sodio taurocolato, potassio cetilfosfato, potassio decilfosfato, potassio dodecilfosfato e potassio

tetradecilfosfato.

Si è detto in precedenza che il termine "sapone alcalino" indica un sale solubile in acqua di un acido grasso. In una forma di realizzazione preferita dell'invenzione, il sapone alcalino è un sale selezionato dal gruppo costituito da sali alcalini, quali ad esempio i sali di sodio e di potassio. In un'altra forma di realizzazione preferita, il sapone alcalino è un sale di un acido grasso solido a temperatura ambiente. Preferibilmente, l'acido grasso ha una catena alifatica di lunghezza compresa tra 10 e 24 atomi di carbonio. Più preferibilmente, l'acido grasso è selezionato dal gruppo costituito da acido stearico, acido palmitico, acido miristico, acido laurico, acido arachidico, acido beenico. Preferibilmente, l'almeno un sapone alcalino presente nella soluzione micellare è selezionato dal gruppo costituito da sodio stearato, sodio palmitato, sodio miristato, sodio laurato, sodio arachidato e sodio beenato. Inoltre, la concentrazione dell'almeno un sapone alcalino è preferibilmente compresa tra 1% e 5% in peso/peso totale della soluzione.

Il polimero anfifilico non ionico presente nella soluzione micellare agisce da stabilizzante per la sospensione, evitando l'aggregazione e la sedimentazione delle particelle.

Preferibilmente, la concentrazione dell'almeno un polimero anfifilico non ionico è compresa tra 1% e 5% in peso/peso totale della soluzione.

Preferibilmente, l'almeno un acido aggiunto alla soluzione nella fase (c) è un acido organico o inorganico. In una forma di realizzazione preferita, l'almeno un acido è un acido organico selezionato dal gruppo costituito da acido acetico, acido carbonico, acido acrilico, acido lattico, acido glicolico, acido tartarico, acido maleico, acido piruvico, acido malico, acido succinico, acido citrico, amminoacidi, poliamminoacidi e polimeri contenenti gruppi acidi. In un'altra forma di realizzazione preferita, l'almeno un acido è un acido inorganico selezionato dal gruppo costituito da acido cloridrico, acido fosforico, acido nitrico, acido solforico, polifosfati acidi e sali acidi di ammonio e loro derivati.

Nella fase (c), l'aggiunta dell'acido induce lo scambio di un protone tra l'acido e le molecole di sapone alcalino, che precipitano in forma di nanoparticelle lipidiche solide. Precipitando, le nanoparticelle lipidiche solide inglobano al loro interno l'anticorpo, in forma di coppia ionica lipofila con il tensioattivo anionico.

L'invenzione verrà ora ulteriormente descritta per mezzo di esempi il cui contenuto è da considerarsi non limitativo dello scopo del presente trovato.

Esempio 1: preparazione di SLN contenenti anticorpi anti-ratto.

Viene preparata una soluzione di AOT (diottilsolfosuccinato di sodio) alla concentrazione di 0,8 mg/ml. 80 mg di PVA (polivinil acetato parzialmente idrolizzato) 9000 vengono sciolti in 1 ml della soluzione di AOT; quindi vengono addizionati 40 mg di sodio stearato alla temperatura di 50°C ottenendo così una soluzione micellare. A parte, l'anticorpo è sciolto in 1 ml di acqua alla concentrazione di 2 mg/ml. Anche tale soluzione viene portata a 50°C, prima di essere addizionata alla soluzione

micellare. A questo punto le nanoparticelle vengono precipitate acidificando sotto agitazione con 0,1 ml di acido lattico 2M. La soluzione viene poi raffreddata in bagno di ghiaccio.

Le SLN ottenute presentano un diametro medio di 850 nm e una polidispersione di 0,250.

L'efficienza di inglobamento dell'anticorpo è determinata in seguito a centrifugazione delle SLN a 26000 rpm e lavaggio del precipitato ottenuto con tampone fosfato 0,1M a pH=7,4 e successivamente con etanolo al 30%: l'anticorpo è quindi estratto sciogliendo il precipitato con etanolo a 50°C e riprecipitando il lipide con aggiunta di tampone fosfato 0,1 M a pH=7,4. La miscela ottenuta è centrifugata e il surnatante iniettato in SEC-HPLC. L'efficienza di inglobamento misurata è circa del 90%.

Esempio 2: preparazione di SLN contenenti bevacizumab.

Viene preparata una soluzione di AOT (diottilsolfosuccinato di sodio) alla concentrazione di 0,33 mg/ml. 25 mg di HPMC (idrossipropilmetilcellulosa) 15cP vengono sciolti in 2,4 ml della soluzione di AOT; quindi vengono

addizionati 25 mg di sodio stearato alla temperatura di 50°C, ottenendo così una soluzione micellare. 0,1 ml di una soluzione acquosa di bevacizumab alla concentrazione di 25 mg/ml (corrispondenti a 2,5 mg) vengono quindi addizionati alla soluzione micellare. A questo punto le nanoparticelle vengono precipitate acidificando sotto agitazione con 0,1 ml di acido lattico 1M. La soluzione viene poi raffreddata in bagno di ghiaccio.

Le SLN ottenute presentano un diametro medio di 690 nm e una polidispersione di 0,150.

L'efficienza di inglobamento è determinata in seguito a centrifugazione delle SLN a 26000 rpm e lavaggio del precipitato con tampone carbonato 0,1M a pH=10: il precipitato viene quindi sciolto in acido acetico e analizzato allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 280 nm. L'efficienza di inglobamento misurata è circa del 30%.

Si è in pratica constatato come il metodo secondo il trovato assolva pienamente il compito prefissato in quanto, utilizzando la tecnica della coacervazione degli acidi grassi, consente di

preparare nanoparticelle lipidiche solide contenenti anticorpi, in forma di coppia ionica lipofila. In particolare, si è osservato che il metodo secondo l'invenzione consente un'efficace formazione delle nanoparticelle lipidiche solide e un efficace inglobamento al loro interno delle molecole di anticorpo, come indicato dal valore di efficienza di inglobamento.

Il metodo, così concepito, è suscettibile di numerose modifiche e varianti, tutte rientranti nell'ambito del concetto inventivo; inoltre, tutti i dettagli potranno essere sostituiti da altri elementi tecnicamente equivalenti.

In pratica, i materiali impiegati, nonché le quantità, potranno essere qualsiasi secondo le esigenze e lo stato della tecnica.

* * * * *

R I V E N D I C A Z I O N I

1. Metodo per la preparazione di nanoparticelle lipidiche solide contenenti anticorpi, comprendente le fasi di:

(a) preparare una soluzione micellare comprendente:

da 0,02 mg/ml a 10 mg/ml di almeno un tensioattivo anionico selezionato dal gruppo costituito da alchilfosfati, alchilsolfati e alchilsolfonati;

da 0,1% a 30% in peso/peso totale della soluzione micellare di almeno un sapone alcalino;

da 0,1% a 30% in peso/peso totale della soluzione micellare di almeno un polimero anfifilico non ionico selezionato dal gruppo costituito da polivinilacetato parzialmente idrolizzato, copolimeri poliossietilene/poliossipropilene, poliacrilamidi, polivinilpirrolidone e suoi derivati, derivati di destrano e agarosio a vari pesi molecolari, derivati della cellulosa, gomme non ioniche, ciclodestrine e loro derivati;

detta soluzione micellare essendo preparata mediante i seguenti passaggi:

(i) solubilizzare in acqua l'almeno un tensioattivo anionico;

(ii) aggiungere l'almeno un sapone alcalino scaldando ad una temperatura compresa tra 35°C e 90°C; e

(iii) aggiungere l'almeno un polimero anfifilico non ionico;

(b) aggiungere alla soluzione micellare preparata nella fase (a) una soluzione contenente almeno un anticorpo di interesse in concentrazione compresa tra 0,1 mg/ml e 10 mg/ml rispetto alla soluzione finale risultante dalla fase (b);

(c) aggiungere alla soluzione ottenuta nella fase (b) almeno un acido in concentrazione compresa tra 0,01M e 5M rispetto alla soluzione finale risultante dalla fase (c);

(d) raffreddare in bagno di ghiaccio la sospensione ottenuta nella fase (c), fino a temperatura ambiente.

2. Metodo secondo la rivendicazione 1 in cui l'almeno un tensioattivo anionico presente nella soluzione micellare è selezionato dal gruppo

costituito da sodio diottilsolfosuccinato, sodio dodecilsolfato, sodio deossitaurocolato, sodio taurocolato, potassio cetilfosfato, potassio decilfosfato, potassio dodecilfosfato e potassio tetradecilfosfato.

3. Metodo secondo la rivendicazione 1 o 2 in cui il sapone alcalino presente nella soluzione micellare è un sale selezionato dal gruppo costituito da sali sodici e sali potassici.

4. Metodo secondo una o più delle rivendicazioni precedenti in cui il sapone alcalino è un sale di un acido grasso solido a temperatura ambiente.

5. Metodo secondo la rivendicazione 4 in cui l'acido grasso ha una catena alifatica di lunghezza compresa tra 10 e 24 atomi di carbonio.

6. Metodo secondo la rivendicazione 4 o 5 in cui l'acido grasso è selezionato dal gruppo costituito da acido stearico, acido palmitico, acido miristico, acido laurico, acido arachidico, acido beenico.

7. Metodo secondo una o più delle rivendicazioni precedenti in cui l'almeno un sapone alcalino è selezionato dal gruppo

costituito da sodio stearato, sodio palmitato, sodio miristato, sodio laurato, sodio arachidato e sodio beenato.

8. Metodo secondo una o più delle rivendicazioni precedenti in cui la concentrazione dell'almeno un sapone alcalino è compresa tra 1% e 5% in peso/peso totale della soluzione micellare.

9. Metodo secondo una o più delle rivendicazioni precedenti in cui la concentrazione dell'almeno un polimero anfifilico non ionico è compresa tra 1% e 5% in peso/peso totale della soluzione micellare.

10. Metodo secondo una o più delle rivendicazioni precedenti in cui l'almeno un acido aggiunto alla soluzione nella fase (c) è un acido organico o inorganico.

11. Metodo secondo la rivendicazione 10 in cui l'almeno un acido è un acido organico selezionato dal gruppo costituito da acido acetico, acido carbonico, acido acrilico, acido lattico, acido glicolico, acido tartarico, acido maleico, acido piruvico, acido malico, acido succinico, acido citrico, amminoacidi,

poliamminoacidi e polimeri contenenti gruppi acidi.

12. Metodo secondo la rivendicazione 10 in cui l'almeno un acido è un acido inorganico selezionato dal gruppo costituito da acido cloridrico, acido fosforico, acido nitrico, acido solforico, polifosfati acidi e sali acidi di ammonio e loro derivati.

Il Mandatario:

- Micaela N. MODIANO -