

## **DOCUMENT MADE AVAILABLE UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)**

International application number:	<b>PCT/IB2020/055562</b>
International filing date:	<b>15 June 2020 (15.06.2020)</b>
Document type:	<b>Certified copy of priority document</b>
Document details:	Country/Office: <b>IT</b>
	Number: <b>102019000009258</b>
	Filing date: <b>17 June 2019 (17.06.2019)</b>
Date of receipt at the International Bureau:	<b>30 July 2020 (30.07.2020)</b>

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a),(b) or (b-bis)

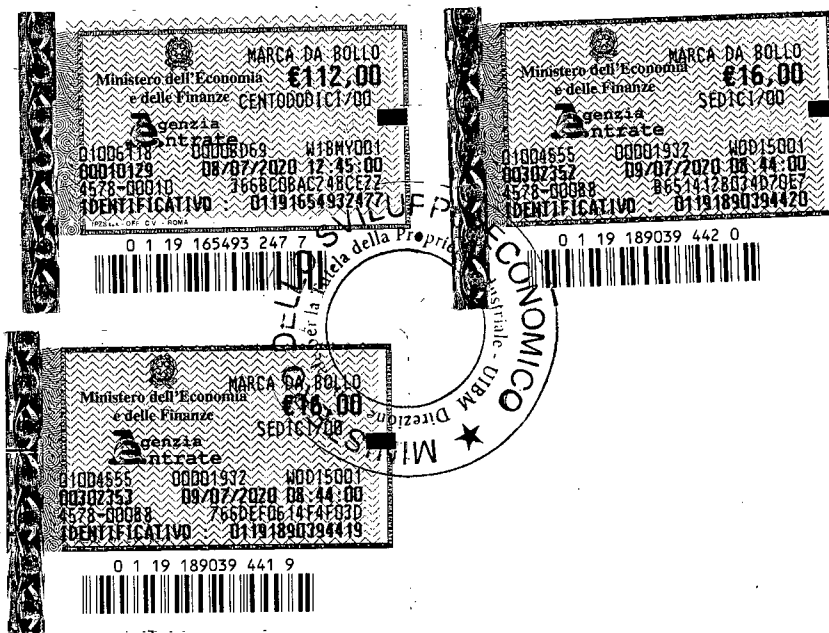


1820/55560

# Ministero dello Sviluppo Economico

Direzione Generale Per la tutela della proprietà industriale  
Ufficio Italiano Brevetti e Marchi - Div. V

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:  
INVENZIONE INDUSTRIALE N. 10201900009258.



Copia della documentazione di origine cartacea e/o riproduzione cartacea della documentazione di origine informatica debitamente firmata e depositata presso questo ufficio.

Si compone di pagg. 35... (compreso il frontespizio).

ROMA li. 08 LUG 2020

IL FUNZIONARIO  
*[Signature]*

Dr.ssa Cristina Papadia

# UIBM

MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO  
Direzione Generale per la Lotta alla Contraffazione  
Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

**Attestato di deposito**  
**di**  
**Invenzione industriale**

**Numero di domanda: 102019000009258**

**Data di deposito: 17/06/2019**



*Ministero dello Sviluppo Economico*

---

Ricevuta di presentazione

per

Brevetto per invenzione industriale

---

Domanda numero: 102019000009258

Data di presentazione: 17/06/2019

## DATI IDENTIFICATIVI DEL DEPOSITO

Ruolo	Mandatario
Depositante	Marco Brunacci
Data di compilazione	17/06/2019
Riferimento depositante	29041IT/MB/BF/VC
Titolo	METODO PER LA PREPARAZIONE DI NANOPARTICELLE LIPIDICHE
Carattere domanda	Ordinaria
Esenzione	NO
Accessibilità al pubblico	NO
Numero rivendicazioni	13
Autorità depositaria	

## PRIVACY

Autorizzo il trattamento dei dati personali, inseriti all'interno del deposito, ai sensi del GDPR (Regolamento UE 2016/679) e del Decreto Legislativo 30 giugno 2003, n. 196 "Codice in materia di protezione dei dati personali"

## RICHIEDENTE/I

Natura giuridica	Persona giuridica
Denominazione	R BIO TRANSFER S.R.L.
Partita IVA	04055070652
Tipo Società	societa' a responsabilita' limitata
Nazione sede legale	Italia
Comune sede legale	Albanella (SA)
Indirizzo	Corso Europa
Civico	102
CAP	84044
Telefono	

Fax	
Email	
Pec	
Quota percentuale	100.0%

## DOMICILIO ELETTIVO

Cognome/R.sociale	Brunacci & Partners S.r.l.
Indirizzo	via Scaglia Est 19-31
Cap	41126
Nazione	Italia
Comune	Modena (MO)
Telefono	059 - 2929757
Fax	059 - 359847
Email\PEC	brunacci-partners@sicurezzapostale.it

## MANDATARI/RAPPRESENTANTI

Cognome	Nome
Brunacci	Marco

## INVENTORI

Cognome	Nome	Nazione residenza
BATTAGLIA	Luigi Sebastiano	Italia
DIANZANI	Chiara	Italia
MUNTONI	Elisabetta	Italia
SCORZIELLO	Franco	Italia

## CLASSIFICAZIONI

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
---------	--------	-------------	--------	-------------

A

61

K

## NUMERO DOMANDE COLLEGATE

## DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

Tipo documento	Riserva	Documento
Descrizione in italiano*	NO	29041 Descrizione.pdf.p7m hash: f1e92fa55593b1ef10000226d7c244c1
Riassunto	NO	29041 Riassunto.pdf.p7m hash: a745fdad935e25790cc492b4c6f01454
Rivendicazioni	NO	29041 Rivendicazioni.pdf.p7m hash: d5905d2ee068eb06b97bd69498703a02
Disegni	NO	29041 Disegni.pdf.p7m hash: 5b7f826e9ee14a05bfbe82093159ba17
Lettera di Incarico	SI	hash:
Rivendicazioni in inglese	SI	hash:

## PAGAMENTI

Tipo	Identificativo	Data
Bollo	01171658513289	06/02/2019

## DOVUTO

**Gli importi indicati non tengono conto delle eventuali esenzioni applicabili**

Importo Tasse:	€ 185,00
Importo Imposta Bollo:	€ 20,00

## NOTE





## RIASSUNTO

Il metodo per la preparazione di nanoparticelle lipidiche comprende:

- la fase di miscelare in un unico contenitore una miscela comprendente una soluzione acquosa con una matrice lipidica solida e con almeno un tensioattivo non-ionico biocompatibile;
- la fase di riscaldare il contenitore a una temperatura di lavoro inferiore a 100°C ad ottenere un'emulsione;
- la fase di raffreddare l'emulsione fino ad una temperatura inferiore a 30°C a ottenere nanoparticelle lipidiche solide di dimensione inferiore a 500 nm.

Descrizione di Brevetto per Invenzione Industriale avente per titolo:

**“METODO PER LA PREPARAZIONE DI NANOPARTICELLE LIPIDICHE”.**

A nome: **R BIO TRANSFER S.R.L.**, una società costituita ed esistente secondo la legge italiana, avente sede in 84044 ALBANELLA (SA).

Inventori designati: **BATTAGLIA Luigi Sebastiano, DIANZANI Chiara, MUNTONI Elisabetta, SCORZIELLO Franco.**

**DESCRIZIONE**

La presente invenzione si riferisce ad un metodo per la preparazione di nanoparticelle lipidiche.

È noto e ampiamente diffuso l'impiego di nanoparticelle lipidiche in campo farmaceutico per la veicolazione di principi attivi farmaceutici.

Con particolare riferimento al campo farmaceutico sono noti numerosi metodi per la preparazione di nanoparticelle lipidiche.

Una delle tecniche più utilizzate per la produzione di nanoparticelle lipidiche è quella dell'omogeneizzazione ad alta pressione, che può essere effettuata a caldo o a freddo. In entrambi i casi il farmaco viene dissolto o solubilizzato nella matrice lipidica fusa (5-10°C sopra la temperatura di fusione). Nella tecnica di omogeneizzazione a caldo la miscela ottenuta viene dispersa sotto agitazione in una soluzione acquosa di tensioattivo, precedentemente portata alla stessa temperatura dei lipidi. Si ottiene così una pre-emulsione che viene omogeneizzata tramite omogeneizzatori ad alta pressione e successivamente raffreddata per fare cristallizzare i lipidi ed ottenere nanoparticelle lipidiche solide.

La tecnica a caldo non può essere però utilizzata per incorporare nelle

nanoparticelle farmaci termolabili, che verrebbero degradati per effetto delle alte temperature, o idrofili, che potrebbero ripartirsi nella fase acquosa durante l'omogeneizzazione.

Tale metodica è stata descritta nel documento brevettuale EP0605497 e presenta numerosi inconvenienti tra i quali annoverato il fatto che richiede l'utilizzo di strumenti complessi e costosi, oltre che l'uso di temperature elevate.

A ciò si aggiunge che le elevate forze di cavitazione generate determinano l'alterazione del principio attivo veicolato.

Un alternativo metodo di preparazione è basato sulla formazione di microemulsioni a caldo come precursori delle nanoparticelle lipidiche.

Le microemulsioni sono miscele bifasiche stabili e trasparenti costituite da due liquidi immiscibili, acqua e olio, stabilizzate da un tensioattivo e da un cotensioattivo. In particolare, la dimensione della fase interna le rende idonee come precursori di sistemi nanoparticellari.

Tale metodo, descritto nel documento brevettuale US1993/5250236, consiste nella diluizione della microemulsione in acqua fredda al fine di romperla e causare la precipitazione delle particelle costituite dai lipidi solidificati. Tuttavia, anche tale metodo non è privo di inconvenienti.

Infatti, uno degli svantaggi presentati dal suddetto metodo è correlato alla diluizione della microemulsione iniziale che porta ad ottenere una sospensione diluita di nanoparticelle, a cui si aggiunge il fatto che tale metodo è laborioso da eseguire su larga scala.

Per ovviare almeno in parte a tali inconvenienti è stato messo a punto un metodo di preparazione di nanoparticelle lipidiche, descritto nel documento

brevettuale US2006/0292183, che consente di ottenere nanoparticelle lipidiche per semplice raffreddamento di una microemulsione olio in acqua. Tuttavia, questo metodo permette di ottenere una concentrazione di lipide impiegabile per la realizzazione di una microemulsione stabile a caldo e una sospensione di nanoparticelle a freddo, estremamente bassa pari a 0,2% p/v, riducendo notevolmente la possibilità di caricamento del principio attivo.

Un ulteriore metodo di preparazione di nanoparticelle lipidiche, descritto nel documento brevettuale WO 01/64328, consiste nel riscaldamento e nel raffreddamento di una miscela. Tale metodo è basato sul principio dell'inversione di fase che richiede l'uso di tensioattivi non approvati dalla Food and Drug Administration (FDA) e che ne impediscono la somministrazione parenterale.

Il compito principale della presente invenzione è quello di escogitare un metodo per la preparazione di nanoparticelle lipidiche che consenta di preparare nanoparticelle solide in soluzione acquosa concentrata e stabilizzate da tensioattivi e cotensioattivi biocompatibili.

Ulteriore scopo del presente trovato è quello di escogitare un metodo per la preparazione di nanoparticelle lipidiche che consenta di semplificare notevolmente le operazioni di preparazione rispetto ai metodi di tipo noto.

Altro scopo del presente trovato è quello di escogitare un metodo per la preparazione di nanoparticelle lipidiche che consenta di superare i menzionati inconvenienti della tecnica nota nell'ambito di una soluzione semplice, razionale, di facile ed efficace impiego e dal costo contenuto.

Altre caratteristiche e vantaggi della presente invenzione risulteranno maggiormente evidenti dalla descrizione di una forma di esecuzione preferita, ma non esclusiva, di un metodo per la preparazione di nanoparticelle lipidiche, illustrata a titolo indicativo, ma non limitativo, nelle unite tavole di disegni in cui:

la figura 1 è grafico elaborato in funzione dell'analisi termica di nanoparticelle di trimiristina prodotto con il metodo in accordo con il presente trovato;

la figura 2 mostra il grafico di confronto tra i frattogrammi con rivelazione UV di trimiristina 1, trimiristina 2 e trimiristina 3 prodotte con il metodo secondo il trovato;

le figure 3-5 sono grafici rappresentativi rispettivamente del frattogramma FFF DLS delle nanoparticelle di trimiristina 1, trimiristina 2 e trimiristina 3;

le figure 6 e 7 sono grafici a colonna rappresentativi dell'analisi comparativa realizzata relativamente all'efficacia di inglobamento e caricamento del colorante rispettivamente di Trimiristina 1, Trimiristina 2 e Trimiristina 3 a seguito di separazione per gel filtrazione e separazione per centrifugazione in destrano;

la figura 8 è un grafico a colonna relativo alla citotossicità delle nanoparticelle lipidiche di trimiristina 2;

la figura 9-12 sono grafici a colonna relativi allo studio comparativo inerente alla biodistribuzione delle nanoparticelle lipidiche marcate con 6-cumarina nei ratti Wistar dopo somministrazione endovenosa.

Il presente trovato riguarda un metodo per la preparazione di nanoparticelle

lipidiche solide.

Si specifica che nell'ambito della presente trattazione con il termine "nanoparticelle" si intendono particelle di dimensioni comprese tra 1 nm e 100 nm.

Secondo il trovato, il metodo comprende la fase di miscelare in un unico contenitore una miscela comprendente una soluzione acquosa con una matrice lipidica solida e con almeno un tensioattivo non-ionico biocompatibile.

Nel seguito, con l'espressione "matrice lipidica" si fa riferimento ad una matrice di natura lipofila, insolubile in acqua e solubile nei solventi organici, bassofondente e avente diversa natura chimica: paraffine, trigliceridi, cere, steroli, acidi grassi, alcoli grassi.

La miscela lipidica solida comprende almeno uno tra trigliceridi, una miscela di esteri alifatici o sterolici.

Preferibilmente, la suddetta miscela comprende idrocarburi.

Vantaggiosamente, il tensioattivo è un polisorbato.

Nel dettaglio, il tensioattivo è scelto dall'elenco comprendente: Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80.

In alternativa, il tensioattivo è un derivato del sorbitano etossilato.

Inoltre, la miscela comprende un cotensioattivo comprendente un estere del sorbitano.

Il cotensioattivo è scelto dall'elenco comprendente: Span 40, Span 60, Span 80.

Il metodo comprende:

- la fase di riscaldare il contenitore a una temperatura di lavoro inferiore

a 100°C ad ottenere un'emulsione;

- la fase di raffreddare l'emulsione fino ad una temperatura inferiore a 30°C a ottenere nanoparticelle lipidiche solide di dimensione inferiore a 500 nm.

La matrice lipidica è presente in una concentrazione in peso/volume, valutata rispetto al peso complessivo della soluzione acquosa, compresa tra 0,3% e 5% e preferibilmente tra 0,5% e 4%.

Vantaggiosamente, il tensioattivo è presente in una concentrazione peso/volume, valutata rispetto al peso complessivo della soluzione acquosa, compresa tra 1% e 20% e preferibilmente tra 2% e 16%.

Preferibilmente, il cotensioattivo è presente in una concentrazione in peso/volume, valutata rispetto al peso complessivo della soluzione acquosa, compreso tra 0,5% e 10%, preferibilmente tra 1% e 8%.

È bene puntualizzare che durante la fase di riscaldare, la miscela viene riscaldata fino ad una temperatura superiore al punto di fusione del lipide e al cloud point del tensioattivo, cioè del Tween, ma inferiore al punto di ebollizione dell'acqua.

In queste condizioni il Tween diventa insolubile in acqua, si separa dalla soluzione della medesima e interagisce intimamente con il cotensioattivo, cioè lo Span, e con un lipide fuso. Tale interazione avviene all'interno di un sistema dall'aspetto torbido in cui i componenti non acquosi della miscela si miscelano tra loro.

A seguire, il metodo comprende una fase di purificazione delle nanoparticelle lipidiche solide.

La fase di purificazione è scelta dal gruppo comprendente: cromatografia a

esclusione molecolare, sedimentazione e risospensione.

Vantaggiosamente, le nanoparticelle lipidiche solide presentano una dimensione compresa tra 40 nm e 500 nm.

Il presente trovato riguarda, inoltre, l'uso di nanoparticelle lipidiche solide in formulazioni di farmaci a radiofrequenza, di farmaci antitumorali, di radiofarmaci, e in sensori.

In particolare, tali farmaci antitumorali sono farmaci per organi con massa.

Si elencano qui di seguito esempi di formulazioni di nanoparticelle lipidiche solide.

#### ESEMPIO 1

##### Formulazione di nanoparticelle lipidiche solide di trimiristina e colesteriloleato.

Si elencano nella seguente tabella (Tabella 1) diverse formulazioni di nanoparticelle lipidiche solide ottenute con il procedimento in accordo con il presente trovato e comprendenti un lipide scelto tra trimiristina, colesteril palmitato o tripalmitina.

NANOPARTICELLE LIPIDICHE	Lipide (mg)	Span 80 ( $\mu$ l)	Tween 20 ( $\mu$ l)	Acqua deionizzata (ml)
Trimiristina 1	100	200	400	5
Trimiristina 2	100	200	300	5
Trimiristina 3	100	200	250	5
Colesteril palmitato 1	100	200	400	5
Colesteril palmitato 2	100	200	300	5
Tripalmitina	100	200	300	5

Tabella 1

Il lipide scelto tra Trimiristina e Colesteril palmitato è stato miscelato con



la soluzione acquosa, Tween 20 e Span 80. Tale soluzione è stata riscaldata a 80°C, cioè una temperatura superiore al cloud point del Tween 20.

Successivamente tale soluzione è stata raffreddata a 60°C, il raggiungimento di tale temperatura consente la formazione di una microemulsione.

Si specifica che nell'ambito della presente trattazione, con il termine "microemulsione" si fa riferimento ad una miscela bifasica stabile e di colore trasparente, consistente in due liquidi immiscibili (acqua e olio) stabilizzati da un tensioattivo e in genere da un cotensioattivo.

Nel dettaglio, la microemulsione è limpida e le nanoparticelle lipidiche sono sospese in essa.

A seguire, la microemulsione viene raffreddata fino a temperatura ambiente, determinando la precipitazione di nanoparticelle.

## ESEMPIO 2

### Analisi termica delle nanoparticelle di trimiristina 2

L'analisi termica è stata condotta mediante calorimetria a scansione differenziale (DSC) sulle nanoparticelle in sospensione sia precedentemente che successivamente alla fase di purificazione. Nel dettaglio, la fase di purificazione è stata eseguita per esclusione molecolare (tecnica di gel filtrazione con limite di esclusione di 100000 Da).

In particolare, la gel filtrazione rimuove il Tween 20 in eccesso, libero e in micelle.

Come osservabile in figura 1, la microemulsione prima della purificazione non mostra transizioni di fase alla luce del fatto che la temperatura di

fusione del lipide ricade nell'intervallo di temperatura di esistenza e stabilità della microemulsione. Invece, il campione purificato dalle micelle mostra una transizione di fusione tipica della trimiristina.

### ESEMPIO 3

#### Analisi dimensionale delle nanoparticelle di trimiristina

L'analisi dimensionale delle nanoparticelle di trimiristina (Trimiristina 1, Trimiristina 2, Trimiristina 3) è stata condotta con il Dynamic Light Scattering (DLS).

Nella tabella sottostante (Tabella 2) si riportano i risultati ottenuti:

Nanoparticelle Lipidiche	Diametro medio (nm)	Polidispersione
Trimiristina 1	158,1	0,140
Trimiristina 2	251,4	0,019
Trimiristina 3	424,3	0,157

Tabella 2

L'analisi dimensionale è stata ulteriormente approfondita con la Field Flow Fractionation (FFF) con rivelazione UV e DLS.

La figura 2 mostra il grafico di confronto tra i frattogrammi con rivelazione UV di trimiristina 1, trimiristina 2 e trimiristina 3.

I picchi corrispondenti alla Trimiristina 1, Trimiristina 2 e Trimiristina 3 sono stati ulteriormente analizzati con rivelazione DLS.

Le figure 3, 4 e 5 sono raffigurano il grafico comparativo dei frattogrammi ottenuti con FFF UV.

In particolare, in figura 3 è osservabile il frattogramma FFF DLS delle nanoparticelle di trimiristina 1 caratterizzato da:

- picco 1: 38 nm;

- picco 2: 70 nm;
- picco 3: 136 nm.

Parallelamente, in figura 4 è osservabile il frattogramma FFF DLS delle nanoparticelle di trimiristina 2 caratterizzato da:

- picco 1: 59 nm;
- picco 2: 202 nm.

Ancora, in figura 5 è osservabile il frattogramma FFF DLS delle nanoparticelle di trimiristina 3 caratterizzato da:

- picco 1: 72 nm;
- picco 2: 407 nm.

Dall'analisi di tali grafici di evince che le nanoparticelle di trimiristina 1, che presentano una polidispersione più alta rispetto alla lettura in batch del DLS, risultano composte da una miscela di tra popolazioni. Quelle di trimiristina 2 e 3 invece risultano costituite da una popolazione maggioritaria, con una limitata quantità di nanoparticelle più piccole.

La dimensione media delle nanoparticelle di trimiristina 1 è stata ulteriormente analizzata mediante DLS, dopo essere state purificate con tecniche di esclusione molecolare (gel filtrazione e gel centrifugazione) e, successivamente, sedimentazione (centrifugazione dopo diluizione 1:1 con destrano 30%, seguita da risospensione in acqua del precipitato). La gel centrifugazione ha un limite di esclusione di 100000 Da; ciò significa che tale tipologia di tecnica esclude il Tween 20 in forma monomera e in micelle.

Inoltre, la sedimentazione per centrifugazione separa le nanoparticelle da tutti i componenti idrosolubili.

Appena preparate		Gel centrifugate		Gel filtrate		Centrifugate in destrano e risospese	
Dimensione media (nm)	polidispersione	Dimensione media (nm)	polidispersione	Dimensione media (nm)	polidispersione	Dimensione media (nm)	polidispersione
158,1	0,140	158,9	0,153	160,3	0,135	176,7	0,074

Tabella 3

#### ESEMPIO 4

##### Caricamento e inglobamento di coloranti nelle nanoparticelle di trimiristina, tripalmitina e colesteril palmitato.

Le nanoparticelle lipidiche sono state caricate con due coloranti fluorescenti lipofili: il rosso Nilo e la 6-cumarina.

Tali coloranti sono stati aggiunti al contenitore precedentemente alla fase di riscaldare.

Il colorante in eccesso è stato successivamente rimosso in seguito a sedimentazione spontanea.

L'analisi dell'inglobamento ha tenuto conto di due parametri:

- capacità di carico (cioè il rapporto tra il colorante veicolato e il lipide);
- efficienza di inglobamento (cioè il rapporto tra il colorante inglobato nella matrice lipidica e quello totale presente nella formulazione).

Nel dettaglio, le tecniche di misurazione dell'efficienza di inglobamento del colorante nelle nanoparticelle sono: tecniche di esclusione molecolare (gel filtrazione, gel centrifugazione) e sedimentazione.

Allo scopo di valutare l'efficienza di inglobamento sono state analizzate le

formulazioni di trimiristina 1, trimiristina 2 e trimiristina 3 caricate con 6-cumarina e rosso Nilo.

Come osservabile in figura 6, la separazione mediante gel centrifugazione ha portato ad un'efficienza di inglobamento superiore a 90%.

I risultati ottenuti mediante gel filtrazione e sedimentazione sono riportati nelle figure 6 e 7. In particolare, la capacità di carico è stata calcolata a seguito di centrifugazione in destrano 30% e risospensione delle nanoparticelle di trimiristina e colesteril palmitato caricate con 6-cumarina.

Successivamente, sono stati prelevati 100 microlitri delle nanoparticelle lipidiche sospese e, successivamente, sono state diluite in 900 microlitri di etanolo al fine di estrarre il colorante. Qui di seguito (Tabella 4) si riportano i risultati ottenuti.

Nanoparticelle lipidiche	Mg colorante/g lipide
Trimiristina 1	1,20
Trimiristina 2	1,35
Trimiristina 3	1,75
Colesteril palmitato 1	72
Colesteril palmitato 2	138

Tabella 4

Dai suddetti dati, è evidente come il Colesteril palmitato mostra una capacità di carico sorprendentemente maggiore rispetto alla trimiristina.

#### ESEMPIO 5

##### Citotossicità delle nanoparticelle di trimiristina 2.

La citotossicità è stata studiata su linee cellulari tumorali con il saggio MTT dopo 72 ore di incubazione (figura 8).

Infatti, sebbene gli eccipienti utilizzati per la preparazione delle nanoparticelle siano sicuri e biocompatibili, i tensioattivi, a seguito di lunga esposizione sulle cellule possono causare citotossicità. Pertanto, è stato considerato l'effetto del metodo di purificazione dal tensioattivo (Tween 20) sulla citotossicità dopo 72 ore di esposizione. La purificazione è avvenuta tramite le metodiche descritte nell'esempio 3.

Come si può notare in figura 8, la tecnica di purificazione influisce notevolmente sulla citotossicità delle nanoparticelle lipidiche.

La gel filtrazione è, infatti, in grado di assicurare la minore citotossicità. La purificazione per centrifugazione con destrano 30% e risospensione consente di minimizzare la citotossicità soltanto dopo diluizione 1:200 del campione in terreno di coltura.

Ciò fa supporre che la metodica della gel filtrazione sia il più efficace nel rimuovere il tensioattivo. Al contrario, la gel centrifugazione sembra non funzionare a causa del range di esclusione molecolare utilizzato (6000 Da), che non consente di separare le micelle di tensioattivo dalle nanoparticelle.

#### ESEMPIO 6

##### Biodistribuzione delle nanoparticelle lipidiche marcate con 6-cumarina nei ratti Wistar (250g) dopo somministrazione endovenosa.

Sono state utilizzate le seguenti formulazioni (Figure 9-12):

Nanoparticelle lipidiche solide	SLN 1	SLN2	SLN3	SLN4
Colesterilpalmitato (mg)	100	100	30	100
Tripalmitina (mg)			70	

Span 80 ( $\mu$ l)	200	200	200	200
Tween 20 ( $\mu$ l)	350	375	375	
Tween 80 ( $\mu$ l)				500
Acqua (ml)	5	5	5	5
Purificazione	Centrifugazione in destrano 30%	Gel filtrazione (diluizione 1:2)	Gel filtrazione (diluizione 1:2)	Gel filtrazione (diluizione 1:2)
Dimensione media (nm)	170,1	148,1	246,5	221,8
Polidispersione	0,130	0,124	0,105	0,227

Tabella 5

I tessuti sono stati omogenati 1:4 con acqua e il sangue centrifugato a 4000 rpm. Plasma e omogenati sono stati diluiti 1:4 con metanolo e centrifugati. Il surnatante è stato successivamente iniettato in HPLC.

Non sembrano esserci differenze nella biodistribuzione di nanoparticelle formulate con lipidi o tensioattivi diversi. Sembra esserci influenza del metodo di purificazione delle nanoparticelle sulla loro biodistribuzione: le particelle purificate con destrano 30% presentano un significativo aumento dell'accumulo a livello cerebrale; ciò è riconducibile alla maggiore concentrazione di tensioattivo residuo presente in sospensione.

Si è in pratica constatato come l'invenzione descritta raggiunga gli scopi proposti.

In particolare, si sottolinea che il particolare accorgimento di prevedere una miscela comprendente una soluzione acquosa con una matrice lipidica solida e con almeno un tensioattivo non-ionico biocompatibile inserita all'interno di un solo contenitore, consente di ottenere nanoparticelle lipidiche solide concentrate, evitando diluizioni.

## RIVENDICAZIONI

- 1) Metodo per la preparazione di nanoparticelle lipidiche, comprendente:
  - la fase di miscelare in un unico contenitore una miscela comprendente una soluzione acquosa con una matrice lipidica solida e con almeno un tensioattivo non-ionico biocompatibile;
  - la fase di riscaldare detto contenitore a una temperatura di lavoro inferiore a 100°C ad ottenere un'emulsione;
  - la fase di raffreddare detta emulsione fino ad una temperatura inferiore a 30°C a ottenere nanoparticelle lipidiche solide di dimensione inferiore a 500 nm.
- 2) Metodo secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che detta matrice lipidica solida comprende almeno uno tra trigliceridi, una miscela di esteri e idrocarburi alifatici saturi.
- 3) Metodo secondo una o più delle rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto che detta matrice lipidica solida comprende idrocarburi.
- 4) Metodo secondo una o più delle rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto che detto tensioattivo è un polisorbato.
- 5) Metodo secondo una o più delle rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto che detto tensioattivo è un derivato del sorbitano etossilato.
- 6) Metodo secondo una o più delle rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto che detta miscela comprende un cotensioattivo comprendente un estere del sorbitano.
- 7) Metodo secondo una o più delle rivendicazioni precedenti,



caratterizzato dal fatto che detta matrice lipidica è presente in una concentrazione percentuale peso/volume, valutata rispetto al peso complessivo della soluzione acquosa, compresa tra 0,3% e 5% e preferibilmente tra 0,5% e 4%.

8) Metodo secondo una o più delle rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto che detto tensioattivo è presente in una concentrazione percentuale peso/volume, valutata rispetto al peso complessivo della soluzione acquosa, compresa tra 1% e 20% e preferibilmente tra 2% e 16%.

9) Metodo secondo una o più delle rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto che detto cotensioattivo è presente in una concentrazione percentuale peso/volume, valutata rispetto al peso complessivo della soluzione acquosa, compreso tra 0,5% e 10%, preferibilmente tra 1% e 8%.

10) Metodo secondo una o più delle rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto che comprende una fase di purificazione di dette nanoparticelle lipidiche solide.

11) Metodo secondo una o più delle rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto che detta fase di purificazione è scelta dal gruppo comprendente: cromatografia a esclusione molecolare, sedimentazione e risospensione.

12) Metodo secondo una o più delle rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto che dette nanoparticelle lipidiche solide presentano una dimensione compresa tra 40 nm e 500 nm.

13) Uso di nanoparticelle lipidiche ottenute secondo una o più delle

rivendicazioni precedenti, in formulazioni di farmaci a radiofrequenza, di farmaci antitumorali, di radiofarmaci, e in sensori.

Modena, 17 giugno 2019

Per incarico

Ing. Marco Brunacci

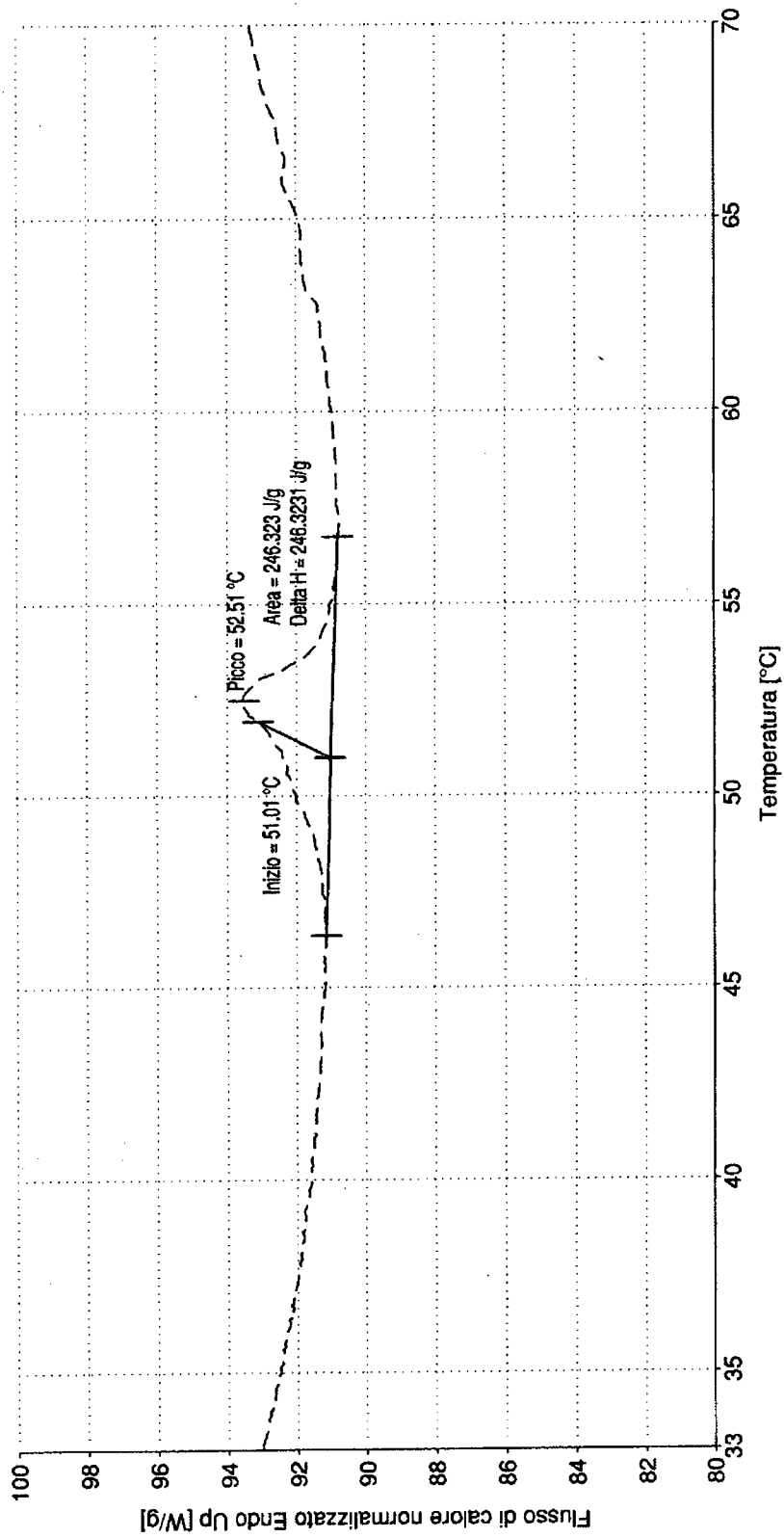


Fig.1

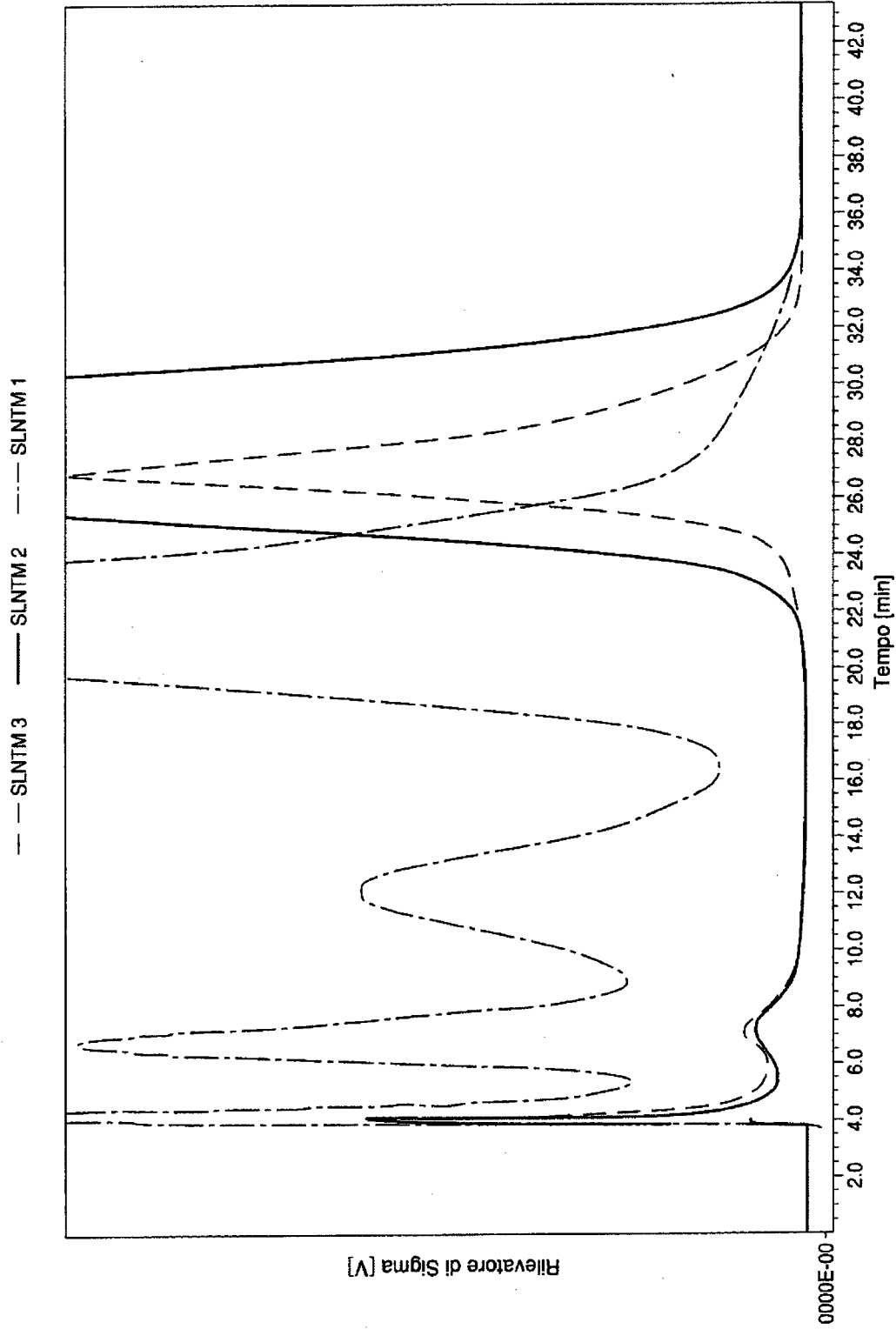


Fig.2

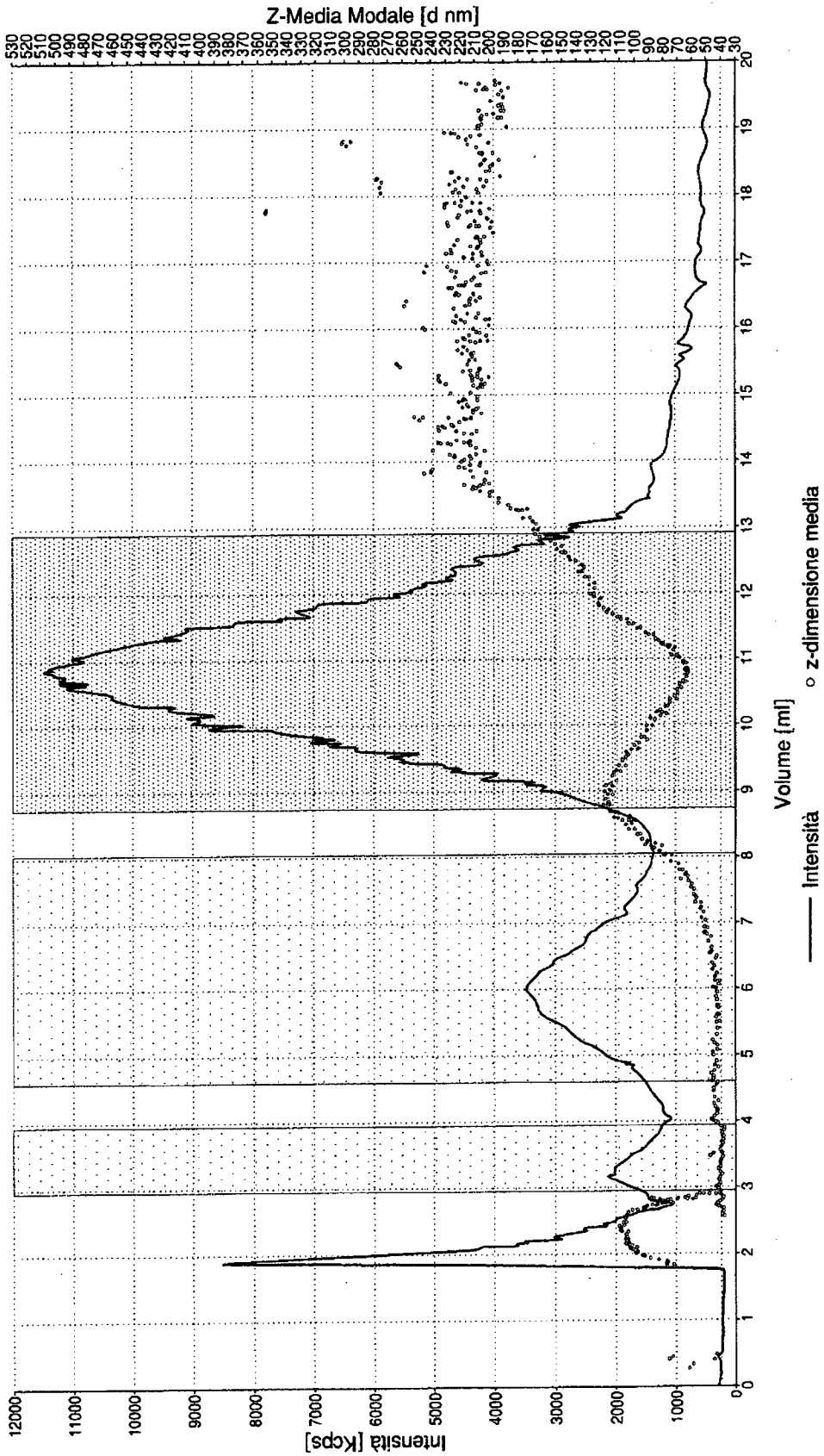


Fig.3

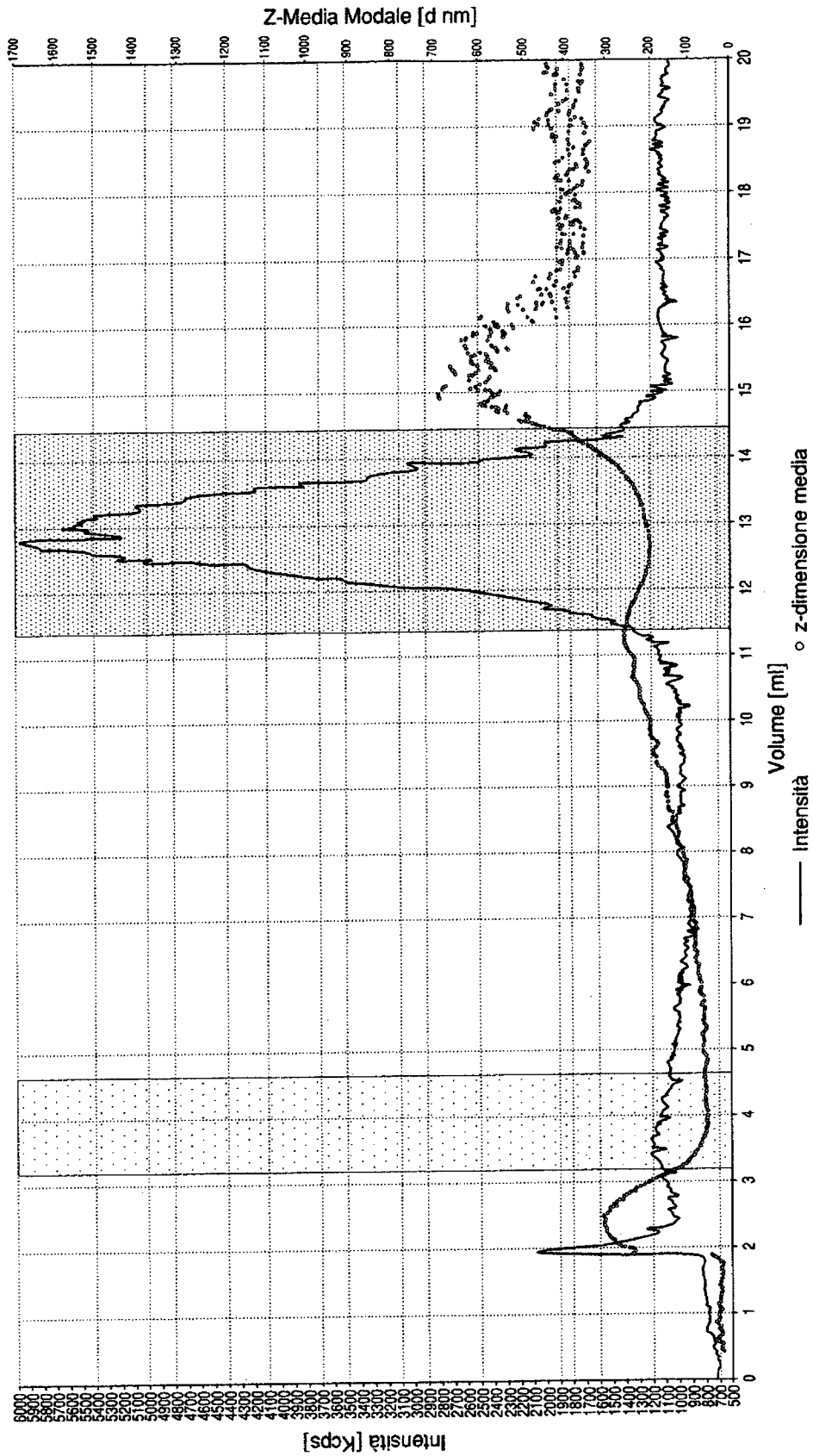


Fig.4

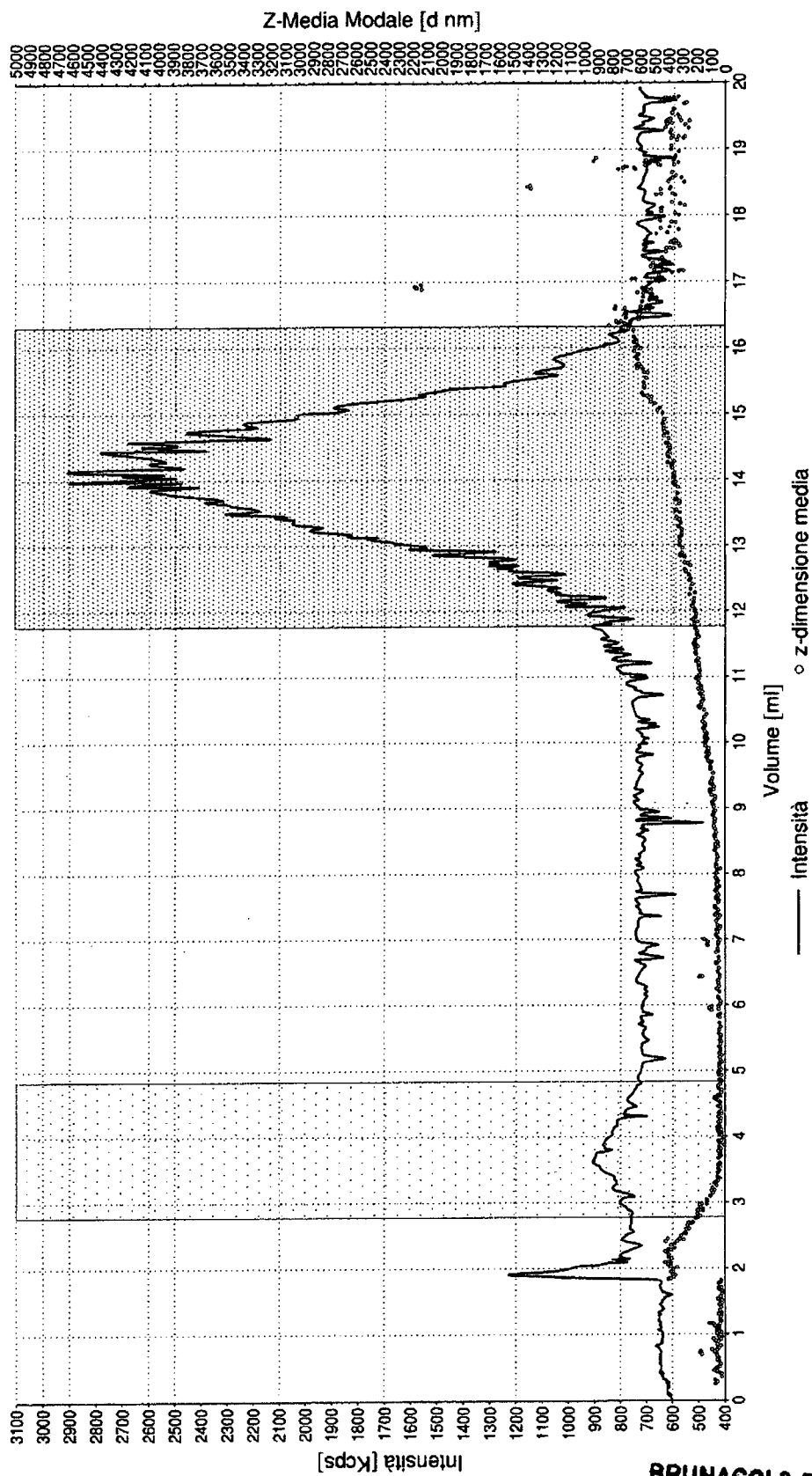


Fig.5

**BRUNACCI & PARTNERS S.R.L.**  
Via Scaglia Est, 19-31  
41126 MODENA  
Tel. 059.357305 - 059.2929757  
Fax 059.359847

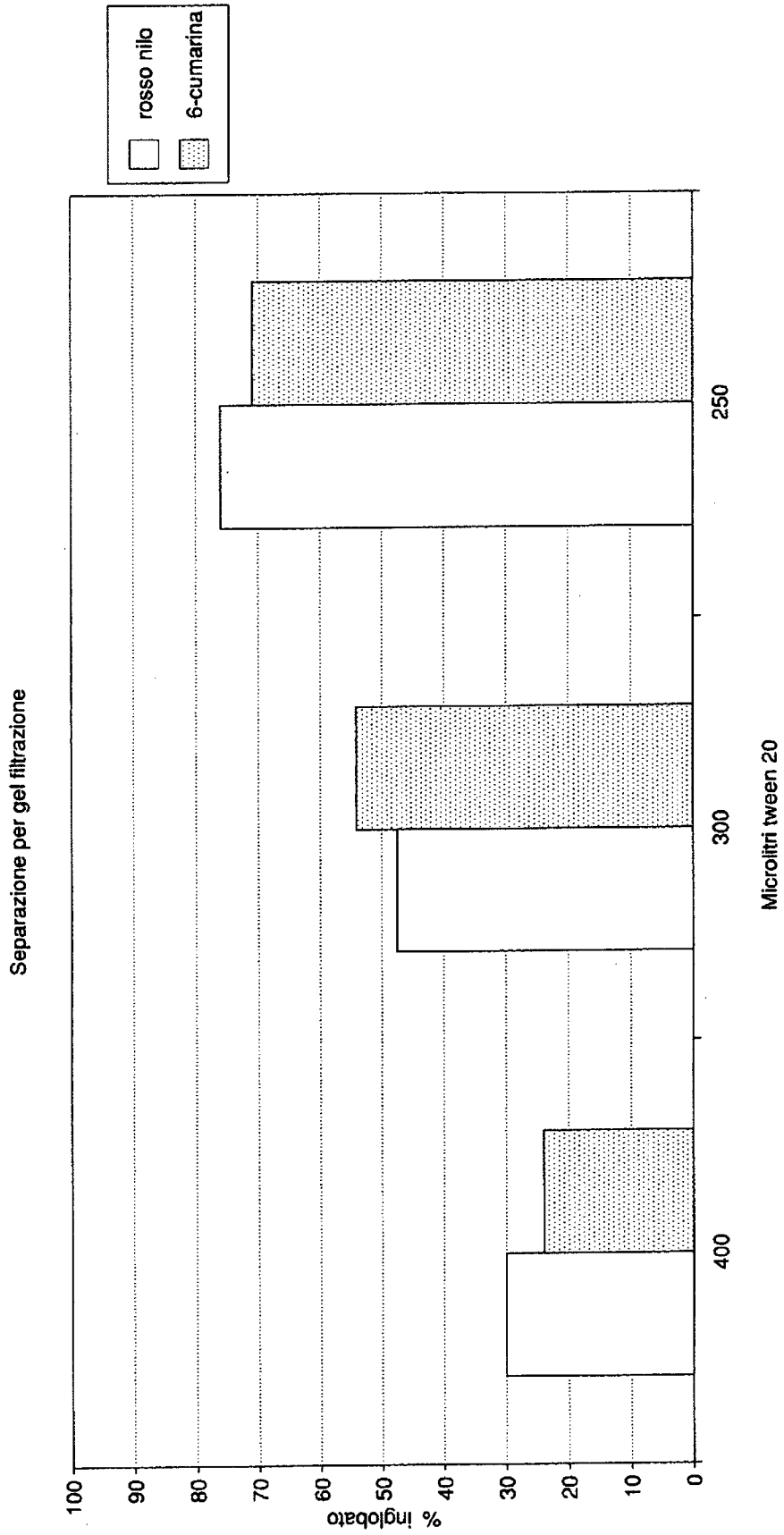


Fig.6



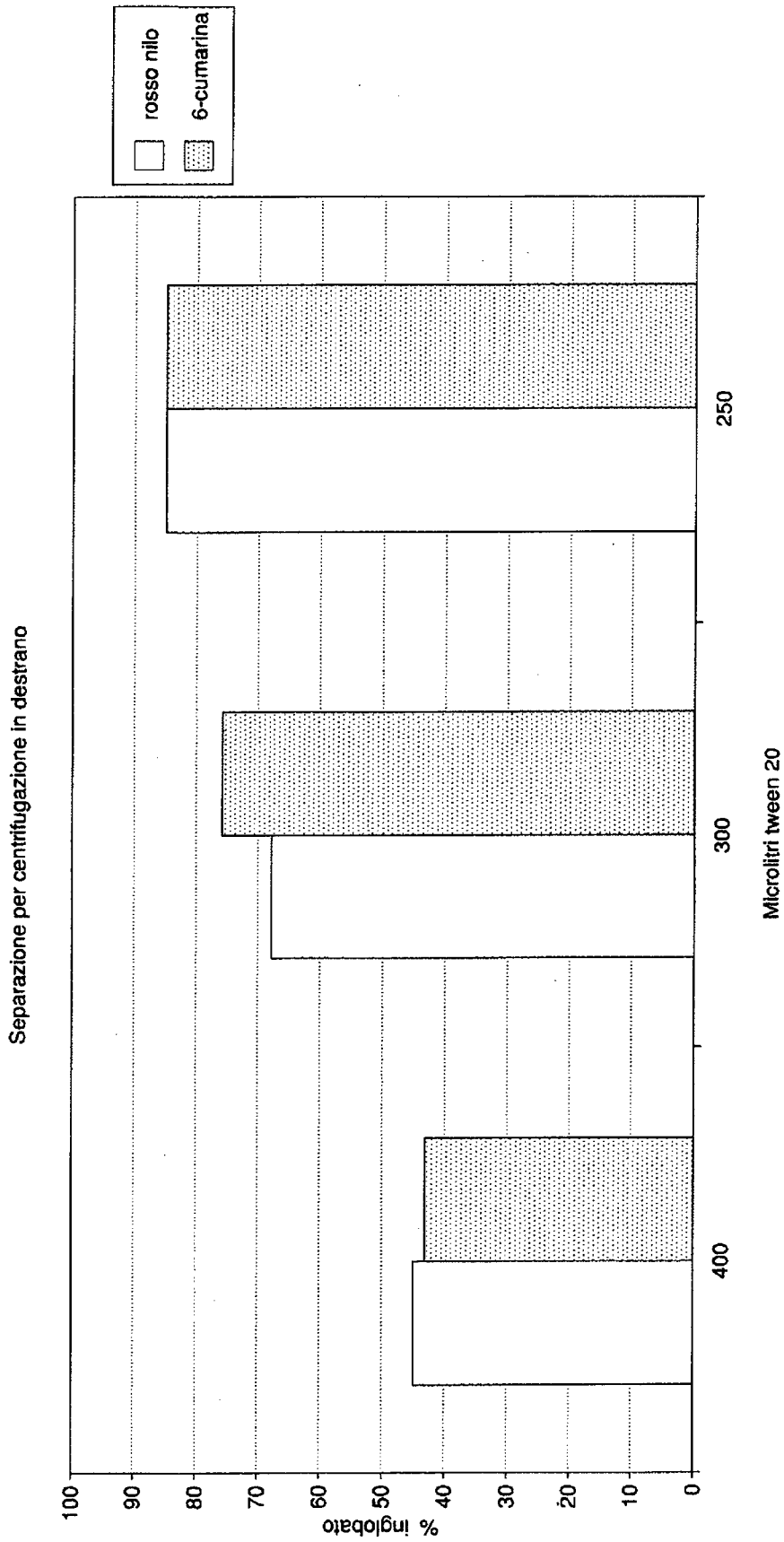


Fig.7

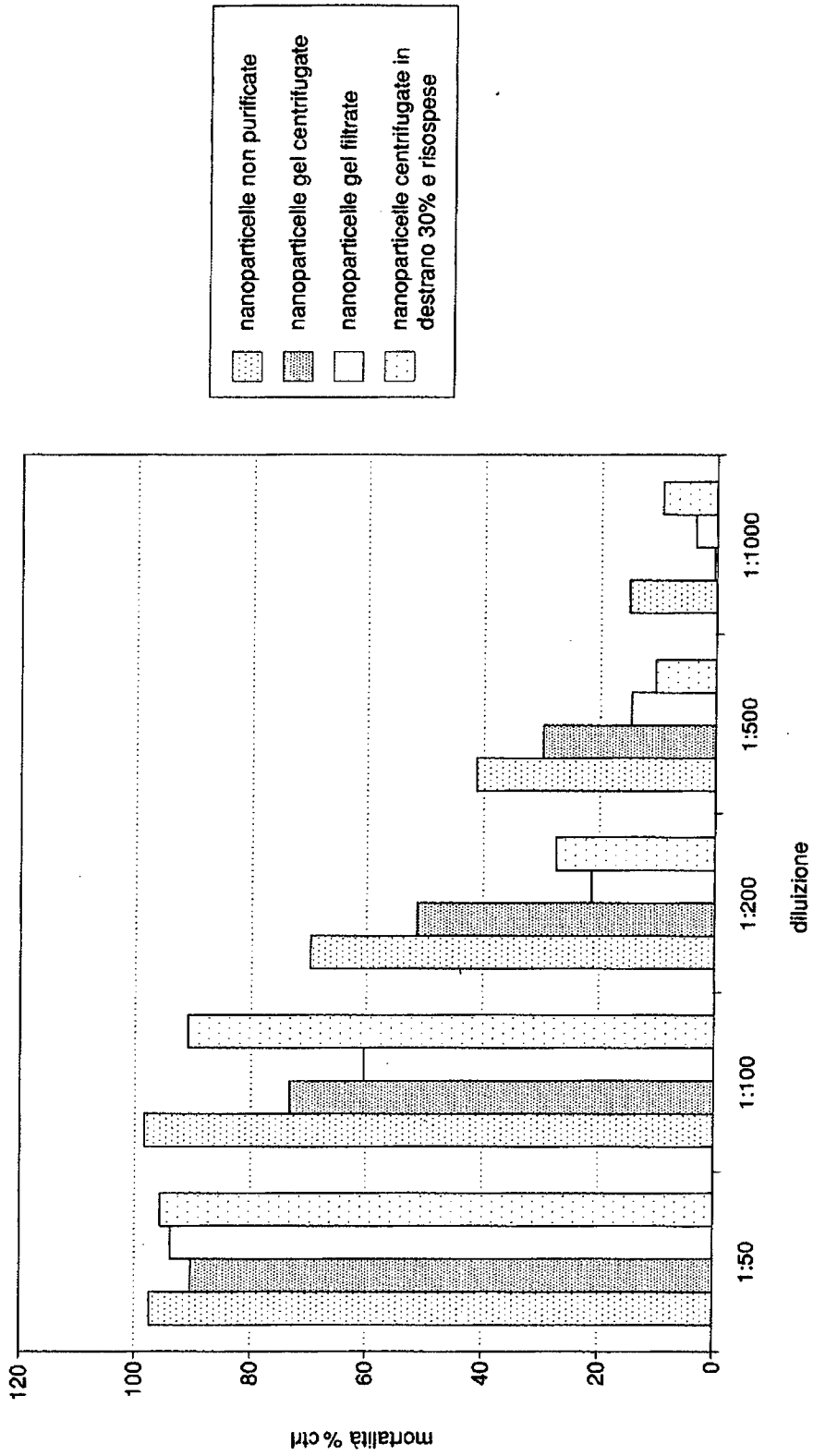


Fig.8

9/10

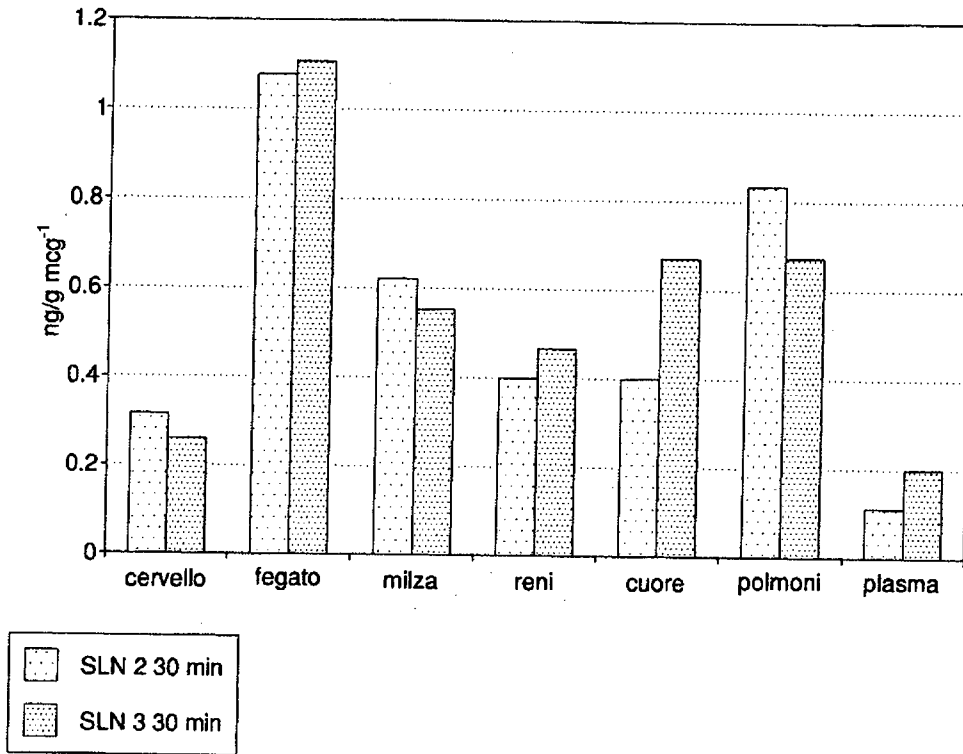


Fig.9

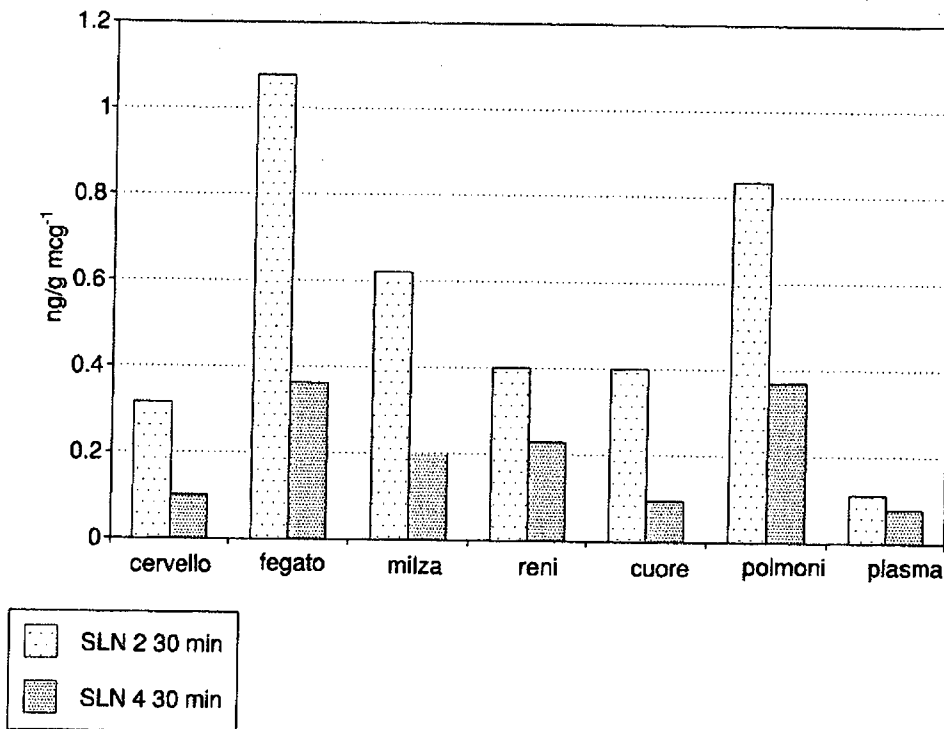


Fig.10

**BRUNACCI & PARTNERS S.R.L.**  
Via Scaglia Est, 19-31  
41126 MODENA  
Tel. 059.357305 - 059.2929757  
Fax 059.359847

10 / 10

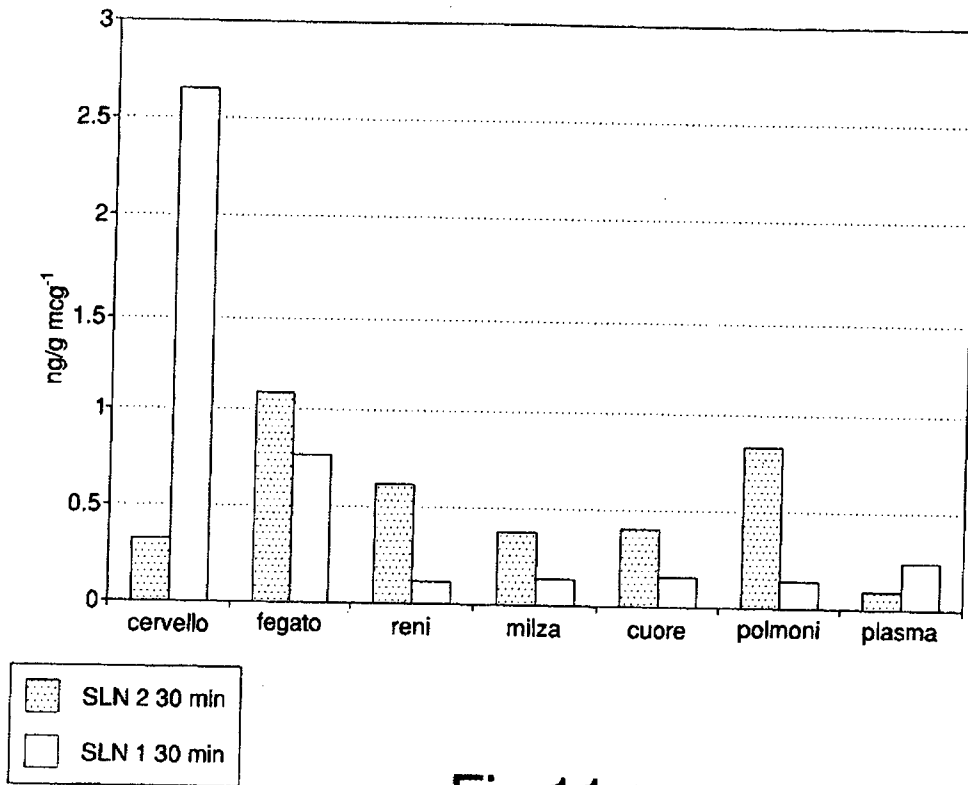


Fig.11

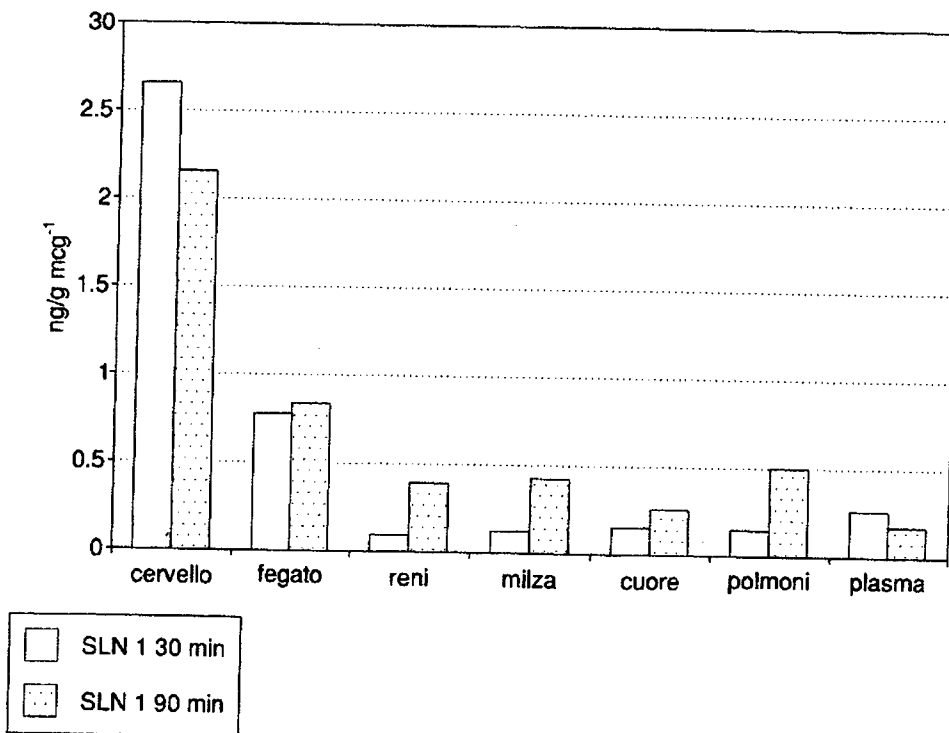


Fig.12

**BRUNACCI & PARTNERS S.R.L.**  
Via Scaglia Est, 19-31  
41126 MODENA  
Tel. 059.357305 - 059.2929757  
Fax 059.359847

