



CONFEDERAZIONE SVIZZERA  
UFFICIO FEDERALE DELLA PROPRIETÀ INTELLETTUALE

⑪ CH 662 944 A5

⑤① Int. Cl. 4: A 61 K 9/10  
A 61 K 47/00

**Brevetto d'invenzione rilasciato per la Svizzera ed il Liechtenstein**  
Trattato sui brevetti, del 22 dicembre 1978, fra la Svizzera ed il Liechtenstein

⑫ **FASCICOLO DEL BREVETTO** A5

⑳ Numero della domanda: 4983/84

㉔ Data di deposito: 18.10.1984

㉔ Brevetto rilasciato il: 13.11.1987

㉔ Fascicolo del  
brevetto pubblicato il: 13.11.1987

㉔ Titolare/Titolari:  
Prof. Dr. Pier Luigi Luisi, Zürich  
Prof. Enea Menegatti, Ferrara (IT)

㉔ Inventore/Inventori:  
Luisi, Pier Luigi, Prof. Dr., Zürich  
Menegatti, Enea, Prof., Ferrara (IT)

㉔ Mandatario:  
E. Blum & Co., Zürich

⑤④ **Procedimento per la preparazione di biocompatibili di micelle inverse di biocompatibili e loro utilizzazione.**

⑤⑦ Si descrive il procedimento per cui soluzioni biocompatibili di micelle inverse, dette anche microemulsioni quando il contenuto di acqua nel sistema è relativamente alto, è caratterizzato dal fatto che almeno un tensioattivo è dissolto in un solvente biocompatibile.

Le micelle inverse e microemulsioni acqua in olio possono essere usate quali delivery systems di farmaci e composti ad uso cosmetico.

## RIVENDICAZIONI

1. Procedimento per preparare soluzioni biocompatibili di micelle inverse o microemulsioni, caratterizzato dal fatto che almeno un tensioattivo è dissolto in un solvente biocompatibile.

2. Procedimento secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che il tensioattivo è selezionato dal gruppo di AOT, di-(2-etiletil)-solfosuccinato di sodio; cloruro di benzalconio; cetil-trimetil-ammonio-bromuro; tensioattivi a base di altri sali di ammonio quaternari; tensioattivi a base di glicole etilenico; tensioattivi di origine naturale come fosfolipidi, lecitine, fosfolecitine, fosfatidilcoline; tensioattivi ottenuti sinteticamente, aventi come nucleo fondamentale la glicerina; tensioattivi aventi la struttura di esteri di acidi grassi, per esempio sorbitan tri-stearato od oleato del polioxi-etilensorbitano, per esempio Polisorbato 80.

3. Procedimento secondo una delle rivendicazioni 1 a 2, caratterizzato dal fatto che il solvente è selezionato dal gruppo di solventi organici naturali quali lo squalano, oli essenziali, terpeni, oli vegetali, miglyol, esteri di acidi grassi naturali, per esempio palmitico, stearico, idrocarburi perfluorurati.

4. Procedimento secondo una delle rivendicazioni 1 a 3, caratterizzato dal fatto che anche co-surfattanti vengono aggiunti al sistema.

5. Procedimento secondo una delle rivendicazioni 1 a 4, caratterizzato dal fatto che il sistema contiene sostanze in grado di esplicare attività terapeutica o cosmetica.

6. Uso di micelle inverse o micro-emulsioni acqua in olio preparato secondo il procedimento secondo una delle rivendicazioni 1 a 5 quali delivery systems in farmaci e composti ad uso cosmetico.

7. Uso secondo la rivendicazione 6, caratterizzato dal fatto che i farmaci sono quali per favorirne l'assorbimento sia nel tratto gastrointestinale, che attraverso la pelle via transdermica.

8. Uso secondo la rivendicazione 6, caratterizzato dal fatto che i composti ad uso cosmetico sono quali per facilitare la penetrazione al sito di azione, ad esempio enzimi usati come coadiuvanti nelle depilazioni.

Questa invenzione concerne un procedimento per preparare soluzioni biocompatibili di micelle inverse.

L'invenzione è definita nelle rivendicazioni indipendenti.

Le forme speciali preferite sono definite nelle rivendicazioni dipendenti.

La scoperta concerne in particolare la preparazione di una soluzione contenente sostanze ad azione farmaceutica o cosmetica. In particolare, si tratta di una soluzione idrocarburica od organica contenente micelle inverse, le quali sono capaci di solubilizzare, all'interno della microfase acquosa, sostanze idrofile dotate di attività farmacologica. La scoperta è caratterizzata principalmente dal fatto che il principio attivo è solubilizzato omogeneamente in un solvente oleoso biocompatibile (per esempio isopropilpalmitato, mygliol, oppure sostanze oleose naturali, oppure oli essenziali, oppure terpeni naturali, oppure idrocarburi come squalano, squalene e derivati).

È noto che certi tensioattivi sono capaci di formare aggregati sferici stabili in soluzioni apolari. Le teste polari del tensioattivo sono rivolte verso l'interno dell'aggregato, formando un nucleo polare che, a sua volta, è capace di solubilizzare acqua. All'interno di tale microfase acquosa, che ha dimensioni dell'ordine di 10-200 Å, possono essere solubilizzate sostanze idrofile, formando soluzioni termodinamicamente stabili e trasparenti. Le proprietà chimiche e fisiche di tali aggregati sono state studiate in dettaglio, particolarmente da Autori come Fendler, Menger negli ultimi dieci anni [consulta: H.F. Fendler, «Membrane mimetic chemistry», John Wiley and Sons, N.Y. 1982; F.M. Menger et al., J. Amer. Chem. Soc. 95, 286

(1973); H.F. Eicke and J. Rehak, *Helv. Chim. Acta* 59, 2883 (1976), H.F. Eicke *Topics, Curr. Chem.*, 87, 85 (1980)]. Per una review particolareggiata si rimanda al libro «Reverse Micelles» Plenum Press 1984 edito da P.L. Luisi e B. Straub. Scarse sono invece le applicazioni farmaceutiche, ad eccezione dell'uso per la preparazione di «nanocapsule» proposto da Speiser in Zurigo (consulta: P.P. Speiser, in «Applied Biology and Therapeutics», 6, Lingle and Breimer editors, Elsevier, N.Y. 1983).

La caratteristica più saliente di tali sistemi sta nel fatto che molecole idrofile, incluso enzimi, acidi nucleici e polisaccaridi, possono essere solubilizzati in soluzione di idrocarburi. Gli enzimi dissolti in idrocarburi, con l'aiuto delle micelle inverse mantengono la loro attività. (Consulta: P.L. Luisi and R. Wolf, «Solution behaviour of surfactants» vol. 12, Mittel and Fendler eds., Plenum Press 1982).

Il sistema che è stato più estesamente studiato con sostanze biologiche è formato da isotano/AOT/acqua. AOT è l'abbreviazione usata per il tensioattivo, biocompatibile, di-(2-etiletil)solfosuccinato di sodio. Con poche eccezioni il solvente organico utilizzato finora per solubilizzare proteine o peptidi in soluzioni micellari inverse è un idrocarburo a basso peso molecolare e, come tale, non ideale per un uso farmaceutico diretto.

In questo procedimento si descrive come soluzioni o geli di farmaci o composti dotati di attività cosmetica possono essere preparate usando solventi biocompatibili quali lo squalano, il miglyol, esteri dell'acido palmitico (in particolare isopropilpalmitato), olio vegetale, olio di vaselina. Il tensioattivo AOT sarà utilizzato per molti degli esempi dati in questo brevetto. Tuttavia il procedimento è estendibile ad altri tensioattivi, come indicato negli esempi e nelle rivendicazioni di questo lavoro.

Con sorpresa abbiamo potuto constatare che soluzioni micellari di tali sistemi, finora non descritti nella letteratura, sono stabili termodinamicamente e possono contenere quantità apprezzabili di composti dotati di attività farmacologica e cosmetica. Questo brevetto si occupa in modo particolare di applicazioni di questo sistema per facilitare:

- i) l'assorbimento gastrointestinale di farmaci
- ii) l'assorbimento transdermico
- iii) per applicazioni cosmetiche.

La concentrazione del farmaco o del cosmetico nella soluzione micellare può essere determinata spettroscopicamente (UV o ORD). Qualora questo non sia possibile si possono usare metodi cromatografici (es. HPLC) oppure tecniche elettroforetiche.

Nel caso di enzimi la concentrazione può essere facilmente calcolata dall'attività che si può determinare in maniera analoga alle soluzioni acquose (consulta: P.L. Luisi and R. Wolf, «Solution behaviour of surfactants» vol. 12, Mittel and Fendler eds., Plenum Press 1982).

Qualora sia necessario valutare l'attività farmacologica (ad es. nel caso di un ormone) il farmaco può essere facilmente trasferito dalla soluzione micellare ad una soluzione acquosa mediante la tecnica del «backward transfer» [consulta: P.L. Luisi et al. in «Topics in Pharmaceutical Science», Breimer and Speiser eds. Elsevier (1983)].

L'urogastrone (human Epidermal Growth Factor, h. EGF) è un ormone con attività ripitelizzante in grado di inibire la secrezione acida gastrica [consulta: R. Hori et al. *Chem. Pharm. Bull.* 25, 1974 (1977); R. Hori et al. *Japan Kokai*, 76, 95 (1975)]. Con queste proprietà può quindi rappresentare un valido agente antiulcera.

Si è visto [consulta R. Hori et al. *Japan Kokai*, 76, 95 (1975)] che l'aggiunta di olio di oliva o di un derivato del glicerolo ne aumenta l'assorbimento gastrointestinale.

D'altra parte è noto che alcuni tensioattivi sono in grado di aumentare la velocità di assorbimento [consulta: G. Levy et al. *J. Pharm. Sci.*, 55, 394 (1966)].

Le micelle inverse (spesso dette anche microemulsioni

acqua/olio) possono quindi rappresentare il carrier ideale per questo ormone. L'urogastrone è facilmente incorporato nella microfase acquosa ed è in grado di diffondere fuori dal solvente organico.

Il grande vantaggio di questo sistema risiede nel fatto che non si ha alcuna perdita del costoso materiale biologico, l'urogastrone nel nostro caso specifica, in quanto questo può stare solo nell'acqua contenuta all'interno delle micelle.

La preparazione delle soluzioni micellari che contengono urogastrone, o suoi frammenti, o l'ormone modificato mediante legame covalente con metossipolienglicole (PEG), segue il procedimento classico per preparare soluzioni micellari (consulta: P.L. Luisi and R. Wolf, «Solution behaviour of surfactants» vol. 12, Mittal and Fendler eds., Plenum Press 1982). Il tensioattivo (AOT ad esempio) è disciolto nel solvente, in modo da preparare soluzioni da 50 a 300 mM del tensioattivo stesso. La dissoluzione avviene a freddo, senza sonicazione. A tale soluzione idrocarburica si può aggiungere la soluzione acquosa del biopolimero, per esempio 1 ml di una soluzione di urogastrone in tampone pH 7.0 fosfato 50 mM vengono aggiunti a 100 ml della precedente soluzione organica di AOT. La quantità di acqua nel sistema può tuttavia variare a cioè tra 0 e 30%, più in particolare tra 0.03 e 3% (v:v).

In tali condizioni una soluzione limpida e trasparente è ottenuta senza sonicazione, semplicemente agitando manualmente per alcuni minuti. Come solventi possono servire, come già esposto, idrocarburi a basso peso molecolare, solventi idrocarburici fluorurati, oli naturali e vegetali, squalano, squalene, esteri dell'acido palmitico e di altri acidi grassi, mioglyol. La concentrazione finale del biopolimero (nel nostro caso urogastrone) nella soluzione finale può variare in un range vasto, a seconda della soluzione acquosa di partenza e dell'uso. In genere varia nell'intervallo 0,1 µg - 10 mg/ml, più in particolare 0,1 µg - 1 mg/ml (concentrazione 0,1 µg - 1 mg/ml riferita al volume totale). Il pH può anche essere variato ampiamente, ma di fatto sono utilizzate preparazioni nell'intervallo di pH tra 5 e 7. Le soluzioni così preparate sono stabili per lungo tempo, particolarmente se tenute in frigorifero (0-2°C). Esse possono anche essere raffreddate sotto zero per una conservazione prolungata. Un precipitato si osserva solo a concentrazioni di acqua elevate (intorno al 5% fino al 10%), ma il sistema è reversibile. Da notare che a concentrazioni basse di acqua (per esempio inferiori al 3%), l'acqua non congela a 0°C.

Il medrossiprogesterone acetato, iniettato intramuscolarmente, viene attualmente impiegato nella terapia di alcuni tumori ormonodipendenti. Un problema connesso a questa via di somministrazione è rappresentato dalla facile insorgenza di accessi. Molto più comoda sarebbe la somministrazione orale qualora si potessero risolvere i problemi connessi ad uno scarso assorbimento.

L'uso di micelle inverse, preparate usando come fase continua un solvente nel quale il medrossiprogesterone acetato sia poco solubile, aumenta la velocità di assorbimento probabilmente per azione diretta delle micelle sulla membrana biologica di cui aumenta la permeabilità al farmaco.

La preparazione delle soluzioni micellari contenenti medrossiprogesterone acetato segue il procedimento classico per la preparazione di soluzioni micellari (consulta: P.L. Luisi and R. Wolf, «Solution behaviour of surfactants» vol. 12, Mittal and Fendler eds., Plenum Press 1982) con l'unica variazione che il farmaco, data la sua insolubilità in acqua, viene disciolto nella soluzione micellare preparata in precedenza.

I nitriti ed i nitrati per ridurre il dolore e la frequenza delle crisi anginose possono essere usati vantaggiosamente per via transdermica in soluzioni, o meglio in geli, di micelle inverse.

Gli unguenti commerciali a base di vaselina e lanolina idrata usati come veicolo per la nitroglicerina oltre a non incontrare il gradimento dei pazienti sembra non siano in grado di mantenere un livello plasmatico costante del farmaco [consulta: S. Sved et al. J. Pharm. Sci., 70, 1368 (1981)].

Il gelo, oggetto del presente brevetto, supportato su un opportuno supporto solido, munito di una parte adesiva che assicuri il contatto con la pelle, non solo è di più comodo impiego, ma è pure in grado di controllare la diffusione del farmaco assicurando così un assorbimento costante.

Endopeptidasi vengono usate in cosmetica per la graduale eliminazione dei peli superflui. Un problema connesso con questa pratica consiste nella difficoltà di far arrivare l'enzima al bulbo pilifero. Lo strato di materie grasse che provengono dalla secrezione sebacea, lo rende, infatti, non bagnabile dalle soluzioni acquose.

Le micelle inverse, essendo delle microemulsioni A/O, rendono possibile il contatto fra l'enzima e la base del pelo.

### Esempi

1. 0.44 g di AOT vengono disciolti in 10 ml di isopropilpalmitato, così che ne risulta una soluzione 100 mM del tensioattivo. A questa soluzione vengono aggiunti tramite una microsiringa 100 µl di una soluzione acquosa di urogastrone, 1 mg/ml in tampone fosfato 50 mM a pH 7. l'aggiunta è fatta in modo lento e, terminata, si agita a mano lentamente. Alla fine dell'operazione si ha una soluzione limpida, il cui contenuto in urogastrone può essere determinato spettroscopicamente.

2. Una soluzione al 6% di lecitina di soia in olio di soia purificato viene preparata a temperatura ambiente. In 10 ml di tale soluzione vengono introdotti lentamente 300 µl di una soluzione acquosa di urogastrone modificato con metossipolienglicole (PEG) (1 mg/ml). Si opera come sopra.

La soluzione finale contiene il 3% di acqua e 0.03 mg/ml di ormone.

3. 6 g di lecitina di soia vengono sciolti in 100 ml di olio di soia purificato, si aggiungono 7 ml di acqua e si agita a mano lentamente fino ad ottenere una microemulsione. Si aggiungono quindi 20 g di medrossiprogesterone acetato e si agita di nuovo fino a completa dissoluzione.

4. 8.8 g di AOT vengono sciolti in 100 ml di isopropilpalmitato. A questa soluzione si aggiungono 6 ml di butanolo come cosurfattante. Il tutto viene agitato a mano lentamente fino ad ottenere una soluzione limpida.

3 g di gelatina vengono sospesi in 8 ml di acqua. Si riscalda fino a 45°C agitando ed a dissoluzione avvenuta si versa lentamente, sotto agitazione, nella soluzione oleosa previamente riscaldata alla stessa temperatura.

Ottenuta una microemulsione si lascia raffreddare e si ottiene un gelo. Sulla superficie del gelo che non andrà a contatto con la pelle si pone nitroglicerina adsorbita su lattosio e silice colloidale in modo da avere una concentrazione di farmaco di 1 mg/cm<sup>2</sup>.

5. AOT è disciolto in squalano, in modo da ottenere una soluzione 200 mM del tensioattivo. A 100 ml di tale soluzione vengono aggiunti 3 ml di una soluzione acquosa tamponata a pH 8.0 (Borato 40 mM) contenente papaina ad una concentrazione di 10 mg/ml.

6. Ad una soluzione 300 mM di lecitina da soia nel solvente isopropilpalmitato viene aggiunto il principio odorifero limonene fino al 10% in volume. A tale soluzione viene aggiunta acqua in piccole porzioni e sotto agitazione fino ad una concentrazione finale di 0.9 M. Ne risulta un gel che può essere usato direttamente come crema cosmetica e odorante.