



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

DOMANDA NUMERO	101999900773195
Data Deposito	09/07/1999
Data Pubblicazione	09/01/2001

Priorità	98 08809
Nazione Priorità	FR
Data Deposito Priorità	

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	J		

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
B	01	J		

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Titolo

PARTICELLE, SPECIALMENTE MICROPARTICELLE O NANOPARTICELLE, DI OLIGOSACCARIDI E MONOSACCARIDI RETICOLATI, PROCEDIMENTI PER LA LORO PREPARAZIONE E COMPOSIZIONI COSMETICHE, FARMACEUTICHE O ALIMENTARI IN CUI ESSE SONO PRESENTI.

DESCRIZIONE dell'invenzione industriale dal titolo:  
"Particelle, specialmente microparticelle o nanoparticelle, di oligosaccaridi e monosaccaridi reticolati, procedimenti per la loro preparazione e composizioni cosmetiche, farmaceutiche o alimentari in cui esse sono presenti",

di: COLETICA nazionalità francese, 32, rue Saint Jean-de-Dieu, 69007 Lyon (Francia).

Inventori designati: Levy, Marie-Christine; Pariot, Nadine; Edwards, Florence; Andry, Marie-Christine.

Depositata il **9 LUG, 1999** **NO 99A 000599**

\* \* \* \* \*

DESCRIZIONE

La presente invenzione si riferisce essenzialmente a particelle, specialmente microparticelle o nanoparticelle, di monosaccaridi e oligosaccaridi reticolati, a procedimenti per la loro preparazione ed a composizioni cosmetiche, farmaceutiche o alimentari un cui sono presenti. Queste particelle sono vantaggiosamente di piccole dimensioni. Inoltre, queste particelle vengono vantaggiosamente usate per l'incorporazione o l'incapsulamento di varie sostanze idrofile o lipofile e particolarmente di sostanze che possono venire usate nei settori far-

maceutico, cosmetico e alimentare.

Nel quadro della presente descrizione e rivendicazioni, l'espressione "particella (particelle) di piccole dimensioni" indica sia microparticelle che nanoparticelle ed i termini "microparticelle" o "nanoparticelle" si riferiscono sia a microsfeere che a nanosfeere nonché a microcapsule o nanocapsule.

Inoltre, i termini "microsfeere" o "nanosfeere" si riferiscono a particelle che hanno una struttura praticamente uniforme per tutta la loro massa, mentre i termini "microcapsule" o "nanocapsule" si riferiscono a particelle che hanno una parete reticolata che circonda un nucleo o spazio interno riempito con un mezzo solido, gelificato, liquido o gassoso.

#### Stato della tecnica

L'incapsulamento di sostanze attive in particelle offre considerevoli vantaggi, come per esempio, la protezione della sostanza incapsulata o il suo lento rilascio nel sito di uso per un effetto prolungato.

Se le particelle sono destinate all'uso nei settori cosmetico, farmaceutico o alimentare, esse debbono essere formate da prodotti biocompatibili

come proteine e polisaccaridi.

La preparazione di microcapsule da polisaccaridi, cioè carboidrati ad alto peso molecolare, è stata ampiamente descritta nella letteratura precedente (vedi, per esempio, P.B. Deasy: Microencapsulation and related processes, Drugs and the Pharmaceutical Sciences, vol. 20, 1984, Marcel Dekker).

In particolare, questi composti possono venire usati come tali in procedimenti di microincapsulamento basati sulla semplice coacervazione, oppure associati con polimeri policationici in procedimenti basati sulla formazione di complessi polielettroliti.

Sono state anche preparate microcapsule mediante reticolazione interfacciale di polisaccaridi per mezzo di isocianati polifunzionali, come descritto per esempio nel documento FR-A-2 275 250, che si riferisce a microcapsule preparate da idrossipropilcellulosa, oppure nel documento US 4 138 362, che si riferisce a resine naturali o chitosano.

Inoltre, microcapsule con una parete formata da glicosamminoglicani e collagene co-reticolati, sono descritte nel documento FR-A-2 642 329, che si riferisce all'applicazione della reticolazione in-

terfacciale mediante cloruri biacidi, a miscele di glicosamminoglicani e collagene.

La reticolazione interfacciale per mezzo di cloruri biacidi in sistemi in emulsione è stata pure utilizzata nella preparazione di particelle da polisaccaridi, nel documento EP-0 630 287 B1, il pH di reazione adottato essendo non superiore a 10.

In questi vari procedimenti per la preparazione di microcapsule, i carboidrati usati sono polisaccaridi, cioè molecole con pesi molecolari superiori a 5000 dalton, costituite da un'associazione di un gran numero di unità "oside". In effetti, è ben noto che macromolecole tipo proteine e polisaccaridi hanno speciali proprietà di adsorbimento alle interfacce; vedi, per esempio, da pagina 317 a pagina 335 della seguente pubblicazione: "Functional properties of food macromolecules", di Mitchell J.R. e Ledward D.A., Elsevier, London, 1986. Questi fenomeni di adsorbimento alle interfacce che portano alla formazione di una pellicola interfacciale, sono un fattore particolarmente favorevole nella preparazione di particelle mediante reticolazione interfacciale di biopolimeri come polisaccaridi.

Per quanto si riferisce a carboidrati con pesi molecolari inferiori a 5000 dalton, la letteratura

3  
5

tecnica precedente contiene procedimenti per la preparazione di perline polimeriche da ciclodestri-  
ne, che sono oligosaccaridi ciclici aventi una ca-  
vità idrofoba in grado di intrappolare varie mole-  
cole con geometria compatibile. L'agente reticolan-  
te più largamente impiegato è la epicloridrina, co-  
me indicato per esempio nell'articolo di Wiedenhof  
N. et al. (Die Stärke, 1969, 21, 119-123).

Per quanto si riferisce all'uso di dicloruri  
acidi, il documento US 3.472.835 descrive la prepa-  
razione di resine ciclodestriniche mediante retico-  
lazione in un mezzo omogeneo (DMF o DMSO). Tutta-  
via, le condizioni preparative sono drastiche, poi-  
ché la reazione si verifica a 100°C per un periodo  
di tempo prolungato (6 h). Inoltre, le sostanze da  
intrappolare non si diffondono facilmente in queste  
perline compatte. Sono state fatte proposte per mi-  
gliorare la porosità dei polimeri, sia generando  
una liberazione in situ di CO<sub>2</sub> (nel documento US  
4.958.015) che realizzando la reticolazione sulla  
superficie di un ossido minerale poroso (US  
4.902.788). Il documento US 4.902.788 indica (pagi-  
na 3, colonna 3, righe 54-55) che l'inconveniente  
principale dei dicloruri acidi aromatici è che con-  
ducono a rese relativamente basse di resina. Quin-

di, la tecnica precedente non descrive né suggerisce la preparazione di particelle mediante reticolazione interfacciale di monosaccaridi o oligosaccaridi, come ciclodestrine, mediante dicloruri acidi in sistemi in emulsione.

#### Scopi dell'Invenzione

Uno scopo principale dell'invenzione consiste nel risolvere un nuovo problema tecnico costituito nel fornire particelle biocompatibili e biodegradabili stabili che incorporano opzionalmente varie sostanze idrofile o lipofile e possono venire usate nei settori farmaceutico, cosmetico e alimentare.

Un ulteriore scopo principale dell'invenzione consiste nel risolvere un nuovo problema tecnico costituito dal provvedere particelle biocompatibili e biodegradabili con un procedimento di fabbricazione particolarmente semplice, ottenendo particelle di qualità costante, preferibilmente da sostanze aventi composizione chimica perfettamente definita, che presentano anche la vantaggiosa possibilità di venire disciolte, particolarmente in una fase acquosa, a temperatura ambiente.

Uno scopo principale della presente invenzione consiste nel risolvere un nuovo problema tecnico consistente nel provvedere nuove particelle biocom-

patibili e biodegradabili di piccole dimensioni, da monosaccaridi e oligosaccaridi.

Un ulteriore scopo della presente invenzione consiste nel risolvere il nuovo problema tecnico consistente nel provvedere una soluzione per la preparazione di particelle stabili di piccole dimensioni da monosaccaridi ed oligosaccaridi, consentendo nello stesso tempo opzionalmente l'incapsulamento di una o più sostanze attive sotto forma di soluzione, sospensione o emulsione.

Un ulteriore scopo della presente invenzione consiste nel risolvere il nuovo problema tecnico costituito nel provvedere una soluzione per la preparazione, da ciclodestrine, particolarmente  $\beta$ -ciclodestrine, di nuove particelle biocompatibili e biodegradabili, insolubili e di piccole dimensioni che possano facilmente venire isolate da un mezzo liquido ed abbiano mantenuto la specifica capacità di intrappolamento di queste ciclodestrine.

Un altro scopo della presente invenzione consiste nel risolvere il nuovo problema tecnico consistente nel provvedere una soluzione per la preparazione, da ciclodestrine, particolarmente  $\beta$ -ciclodestrine, di nuove particelle biocompatibili e biodegradabili, porose e insolubili, di piccole dimen-

sioni, che possano facilmente venire caricate con varie molecole attive e quindi incorporate in particelle più grandi, che siano pure biocompatibili e biodegradabili, così da acconsentire un rilascio prolungato e più lento della molecola attiva per diffusione attraverso il materiale di detta particella più grande.

Un altro scopo della presente invenzione consiste nel risolvere il nuovo problema tecnico consistente nel provvedere una soluzione per la preparazione di un prodotto da diidrossiacetone (DHA) il quale, quando incorporato in una composizione, non ne peggiora la stabilità, particolarmente la sua stabilità al colore, ed il quale, quando applicato alla pelle, liberi il DHA, quest'ultimo essendo capace di combinarsi con gli amminoacidi della pelle per produrre una pigmentazione.

Un ulteriore scopo della presente invenzione consiste nel prevenire qualsiasi degradazione di una composizione contenente DHA, in particolare qualsiasi modifica del suo colore nel tempo.

Un altro scopo della presente invenzione consiste nel risolvere il nuovo problema tecnico consistente nel provvedere una soluzione per la preparazione di particelle stabili di piccole dimensioni

da oligosaccaridi o monosaccaridi, oppure polioli o amminozuccheri derivati da questi, che siano in grado di liberare il composto di partenza per idrolisi enzimatica, costituendo quindi un tipo speciale di precursore capace di rilasciare lentamente un composto con una importante attività biologica.

Un ulteriore scopo della presente invenzione consiste nel risolvere un nuovo problema tecnico consistente nel provvedere una soluzione per la preparazione di particelle stabili di piccole dimensioni da eterosidi, la cui parte oside contiene uno o più molecole di oside, che sono in grado di liberare l'eteroside mediante idrolisi enzimatica, costituendo quindi un tipo speciale di precursore o profarmaco.

Un ulteriore scopo della presente invenzione consiste nel risolvere i problemi tecnici summenzionati con procedimenti di preparazione semplici che possono venire usati su scala industriale, particolarmente nell'industria cosmetica, farmaceutica o alimentare. Questa soluzione renderebbe preferibilmente possibile la preparazione di particelle di piccole dimensioni, la cui dimensione può essere regolata a piacere, particolarmente in un campo di dimensioni da 1 nm a oltre 1 µm, e specialmente tra

circa 10 nm e circa 2  $\mu$ m.

Un altro scopo principale dell'invenzione consiste nel risolvere i nuovi problemi tecnici summenzionati con composti di partenza perfettamente innocui e non costosi, consentendo quindi un largo impiego nell'industria farmaceutica, cosmetica e alimentare.

#### Sommario dell'Invenzione

Quindi, secondo la presente invenzione, è stato scoperto, in modo del tutto inatteso, che è possibile ottenere particelle stabili, specialmente microparticelle o nanoparticelle, da monosaccaridi o oligosaccaridi iniziando una reazione di reticolazione interfacciale tra un monosaccaride o un oligosaccaride ed un agente reticolante acilante polifunzionale, particolarmente un alogenuro biacido e preferibilmente un cloruro biacido, all'interfaccia delle fasi di una emulsione, particolarmente del tipo "acqua in olio", preferibilmente a temperatura ambiente.

In una realizzazione particolarmente vantaggiosa, queste particelle possono venire prodotte emulsionando dapprima una fase acquosa alcalina contenente il monosaccaride o l'oligosaccaride in una fase idrofoba, preferibilmente a temperatura

ambiente, ed aggiungendo quindi la soluzione di agente reticolante all'emulsione. Si trova quindi che le membrane costituite da molecole reticolate del carboidrato sono formate all'interfaccia delle goccioline acquose per la creazione di legami esteri tra l'agente reticolante ed i gruppi ossidrilici del monosaccaride o oligosaccaride.

L'invenzione rende pure possibile la preparazione di particelle di grande valore mediante reticolazione interfacciale di monosaccaridi ed oligosaccaridi per mezzo di agenti acilanti bifunzionali in sistemi di emulsione, preferibilmente a temperatura ambiente. In effetti, i monosaccaridi e gli oligosaccaridi sono sostanze con composizione chimica perfettamente definita, e quindi di qualità costante, i quali, contrariamente ai polisaccaridi ad alto peso molecolare, non comportano il rischio di una variazione di composizione da un produttore all'altro e da una carica all'altra di prodotto. Inoltre, contrariamente ai polisaccaridi, che spesso non sono facilmente solubili nelle fasi acquose impiegabili in questi procedimenti e richiedono sovente il riscaldamento della fase acquosa per la dissoluzione, monosaccaridi come glucosio e oligosaccaridi come lattosio o saccarosio sono molto so-

lubili in acqua a temperatura ambiente. Si può aggiungere che molti di questi composti, come saccarosio o lattosio, sono largamente usati nell'industria alimentare e sono disponibili a costo relativamente basso. Inoltre, questi composti sono perfettamente innocui.

In linea generale, essi si presentano quindi in grado di formare particelle biocompatibili e biodegradabili, incorporanti varie sostanze idrofile o lipofile, che possono venire usate nei settori farmaceutico, cosmetico e alimentare.

Inoltre, la reticolazione interfacciale di alcuni di questi composti può rendere possibile in raggiungimento di specifici obiettivi, quali:

- la stabilizzazione di una sostanza degradabile, come nel caso di diidrossiacetone (DHA), che forma nel tempo prodotti di degradazione colorati,

- e/oppure la preparazione di un precursore in forma particolata che è in grado di liberare una forma attiva dopo attacco enzimatico, per esempio:

- DHA, che è capace di combinarsi con gli aminoacidi della pelle per impartire una pigmentazione,

- oppure un eteroside, come un saponoside o streptomycina, nel caso in cui la parte oside

dell'eteroside, che è costituito da una o più molecole di oside contenenti almeno un gruppo di alcool primario, ha reso possibile la preparazione di particelle mediante reticolazione interfacciale.

Si sottolinea che il principio di esteri precursori di molecole attive è stato sviluppato nel campo terapeutico per farmaci destinati all'utilizzazione per la pelle (Viala K.H. et al., Drug Dev. Ind. Pharm., 1985, 11, 1133 - 1173) oppure in cosmetologia (Forestier J.P., Int. J. Cosmetic Sci., 1992, 14, 47 - 63).

- Oppure nella preparazione di particelle insolubili porose di ciclodestrine che si aprono a specifiche applicazioni basate sull'intrappolamento di molecole per rimuoverle da un mezzo liquido, raccoglierle o liberare lentamente le molecole intrappolate nel sito di azione.

Ora, se le condizioni descritte nei documenti della tecnica precedente, come in EP-0 630 287 B1, applicate ai polisaccaridi, vengono applicate a monosaccaridi o oligosaccaridi, cioè se la reticolazione interfacciale viene realizzata con dicloruri acidi in sistemi in emulsione in cui il pH della fase acquosa impiegata per disciogliere i carboidrati non supera 9,8, non è possibile ottenere par-

ticelle stabili. Le particelle vengono ottenute con una resa zero o con resa molto bassa, e l'esame microscopico mostra abbondanti frammenti indicativi dell'elevata fragilità del prodotto reticolato.

Nel quadro dell'invenzione è stato scoperto, del tutto inaspettatamente, che è possibile ottenere particelle stabili, specialmente microparticelle o nanoparticelle, di oligosaccaridi o monosaccaridi reticolati usando una fase acquosa alcalina con un pH superiore a 10 per disciogliere i carboidrati ed iniziare la reazione di policondensazione mediante un dialogenuro, particolarmente un dicloruro acido, all'interfaccia di una emulsione.

Le particelle ottenute sono sufficientemente stabili da sopportare una prolungata incubazione in forno a 45°C, sotto forma di sospensione acquosa, senza che la loro struttura venga distrutta. Esse sono pure sufficientemente stabili da subire la liofilizzazione senza che la loro struttura venga distrutta, e riprendono un aspetto sferico dopo reidratazione, questo essendo pure un altro vantaggio tecnico decisivo dell'invenzione.

Le particelle vengono progressivamente distrutte dopo incubazione in plasma umano, il che dimostra la loro biodegradabilità, particolarmente

sotto l'azione dell'esterasi.

A seconda delle condizioni di emulsione scelte, la dimensione delle particelle può variare da meno di 1  $\mu\text{m}$ , cioè una dimensione nanometrica, ottenuta per esempio usando un omogeneizzatore ad alta pressione, a varie centinaia di micrometri ed anche a oltre 1 mm.

È stato pure scoperto che è possibile ottenere particelle iniziando la reazione di policondensazione in una emulsione del tipo "olio in acqua". In questo caso una fase idrofoba contenente un agente di reticolazione, preferibilmente un alogenuro biacido, è particolarmente un cloruro biacido, viene emulsionata in una fase acquosa alcalina contenente il monosaccaride o oligosaccaride, usato come fase continua. La reazione viene lasciata sviluppare all'interfaccia e si mantiene l'agitazione per un tempo adatto. Si è trovato che si forma una membrana attorno alle goccioline idrofobe disperse per formare particelle con contenuti idrofobi, costituite in questo caso da capsule.

#### Descrizione dettagliata dell'Invenzione

Secondo una prima caratteristica, la presente invenzione interessa particelle che comprendono, almeno sulla superficie, una parete formata da uno

o più monosaccaridi o oligosaccaridi reticolati per mezzo di reticolazione interfacciale in emulsione, preferibilmente a temperatura ambiente, tra il monosaccaride (monosaccaridi) o oligosaccaride (oligosaccaridi), comprendente almeno un gruppo di alcool primario, ed un agente di reticolazione acilante polifunzionale, preferibilmente un alogenuro biacido e particolarmente un cloruro biacido, così da produrre legami estere tra il gruppo (gruppi) ossidrilico acilabile dell'alcole (alcoli) primario del monosaccaride o oligosaccaride ed i gruppi acile dell'agente acilante polifunzionale.

Nel quadro dell'invenzione, si può usare senza limitazioni qualsiasi monosaccaride o oligosaccaride con un peso molecolare inferiore a 5000 dalton, contenente almeno un gruppo di alcool primario. Analogamente, si può usare senza limitazioni qualsiasi agente reticolante polifunzionale contenente almeno due gruppi acilanti.

In una vantaggiosa realizzazione dell'invenzione, è possibile usare derivati di monosaccaride o oligosaccaride come polioli ottenuti da idrogenazione dei gruppi chetonici o aldeidici di "osi" acidi aldonici derivati da aldosi e lattoni corrispondenti, esteri di acido fosforico di osi, osam-

mine o eterosidi, la cui parte oside è costituita da uno o più osi e contiene almeno un gruppo di alcool primario.

In una realizzazione vantaggiosa dell'invenzione, le particelle summenzionate possono venire preparate da un singolo monosaccaride o oligosaccaride a basso peso molecolare o da miscele.

Secondo un'altra realizzazione vantaggiosa dell'invenzione, i monosaccaridi summenzionati possono essere chetosi come diidrossiacetone (DHA), eritruiloso, ribuloso, xiluloso, fruttosio e sorbosio, come pure loro derivati.

In un'altra realizzazione vantaggiosa dell'invenzione, i monosaccaridi summenzionati possono essere aldosi come eritrosio, treosio, xilosio, arabinosio, ribosio, desossiribosio, glucosio, mannosio e galattosio, come pure loro derivati.

I derivati di monosaccaridi che possono venire usati, come tali o in miscele, nei procedimenti secondo l'invenzione, comprendono specialmente i polioli corrispondenti come sorbitolo, mannitolo, xilitolo, arabitolo, dulcitololo, lattitololo, galattitololo, eritritolo e treitololo, amminozuccheri come glucosammina, galattosammina, glucosammina solfato e galattosammina solfato e acidi aldonici o lattoni

come acido gluconico, acido galattonico, gluconolattone e galattonolattone. A questo gruppo appartengono anche preparati presenti in commercio contenenti polioli, per esempio Néosorb 70<sup>®</sup> ("sorbitolo 70%", Roquette).

Gli oligosaccaridi che possono venire usati, da soli o in miscela, nei procedimenti secondo l'invenzione, comprendono disaccaridi come, in particolare, saccarosio, lattosio, maltosio, cellobiosio, trealosio e melibiosio, oligosaccaridi come raffiniosio, destrine o prodotti dell'idrolisi parziale dell'amido, ciclodestrine come  $\alpha$ -ciclodestrina,  $\beta$ -ciclodestrina e  $\gamma$ -ciclodestrina, derivati di ciclodestrina come idrossietil  $\beta$ -ciclodestrina e idrossipropil  $\beta$ -ciclodestrine (2-HP- $\beta$ -CD, 3-HP- $\beta$ -CD, 2,3-HP- $\beta$ -CD), ciclodestrine ramificate come glucosil  $\beta$ -CD, diglucosil  $\beta$ -CD, maltosil  $\beta$ -CD e dimaltosil  $\beta$ -CD, o miscele di oligosaccaridi, per esempio i prodotti commercializzati con il nome Glucidex<sup>®</sup> dalla Roquette, contenenti proporzioni variabili di glucosio, maltosio e maltodestrine.

I derivati oligosaccaridi che possono venire usati, da soli o in miscela, nei procedimenti secondo l'invenzione, comprendono specialmente i corrispondenti polioli come maltitolo e lattitolo, op-

pure preparati del commercio contenenti polioli ed ottenuti per idrogenazione di prodotti dell'idrolisi parziale dell'amido.

I derivati di monosaccaride e oligosaccaride comprendono pure eterosidi o glicosidi, cioè molecole costituite da una parte di oside legata ad una parte non-oside. Gli eterosidi che possono essere usati nei procedimenti secondo l'invenzione hanno una parte di oside contenente una o più unità di oside ed almeno un gruppo di alcool primario. La frazione non-oside o aglicone ha preferibilmente una struttura ciclica contenente uno o più anelli aromatici o non aromatici che possono comprendere uno o più eteroatomi come azoto, ossigeno o zolfo.

Gli eterosidi che possono essere usati nei procedimenti secondo l'invenzione comprendono specialmente  $\beta$ -D-xilosidi, come 4-metilumbelliferil  $\beta$ -D-xiloside e p-nitrofenil  $\beta$ -D-xiloside, riboflavina, nucleosidi naturali costituiti da ribonucleosidi come guanosina, adenosina, uridina e citidina, o desossiribonucleosidi come desossiguanosina, desossiadenosina, desossicitidina e timidina, nucleosidi antivirali o antitumorali sintetici, analoghi strutturali di nucleosidi naturali, come analoghi di adenosina ed analoghi di desossicitidina, mono-

nucleotidi, desossimononucleotidi, oligonucleotidi, desossioligonucleotidi, antibiotici del gruppo degli amminoglicosidi, come streptomina, diidro-streptomina, canamicina, amicacina, dibecacina, tobramicina, neomicina e paromomicina, saponosidi con aglicone steroideo, come saponosidi di edera, saponosidi con triterpenaglicone, come saponoside di corteccia di Panama, o cardiotonici eterosidi con aglicone steroideo, come digitossina.

In un'altra realizzazione vantaggiosa dell'invenzione, la presente invenzione si riferisce pure a particelle che comprendono, almeno sulla superficie, una parete formata da ciclodestrine, particolarmente  $\beta$ -ciclodestrine reticolate.

Gli inventori hanno scoperto in modo particolarmente inatteso, che le particelle preparate da ciclodestrine mantengono una capacità di intrappolamento importante, vengono facilmente separate dal mezzo contenente la sostanza da intrappolare e possono essere riutilizzate dopo che la sostanza intrappolata è stata scaricata. Quindi, se si desidera eliminare un costituente da una miscela per complessazione, l'uso di detta forma insolubile renderà possibile separare facilmente il complesso ed anche scaricare la molecola complessata dalla forma

insolubile di ciclodestrina cosicché questa può essere riutilizzata.

Quindi, secondo un'altra realizzazione vantaggiosa dell'invenzione, le particelle di ciclodestrine reticolate secondo l'invenzione possono essere impregnate o caricate con una sostanza attiva, particolarmente una sostanza cosmeticamente attiva, una sostanza farmaceuticamente attiva, una sostanza dieteticamente attiva, una sostanza alimentare agricola o una sostanza agri-industriale. Questa impregnazione o caricamento con detta sostanza attiva o principio attivo può essere realizzata molto semplicemente. Per esempio, le particelle di ciclodestrine reticolate vengono immerse o incubate in una soluzione contenente il principio attivo per un periodo di tempo sufficiente a consentire alle particelle di impregnarsi o caricarsi con il principio attivo, oppure intrappolarne almeno una parte. Il pH della soluzione acquosa del principio attivo è prossimo alla neutralità o leggermente acido, e non deve superare 8, cioè è preferibilmente tra circa 4,5 e 8, così da evitare l'idrolisi dei legami estere e la degradazione delle particelle.

L'impregnazione o caricamento con sostanze o principi attivi produce un sistema che rilascia

lentamente tale sostanza o principio attivo dal sistema.

Il rilascio lento o ritardato può essere ulteriormente migliorato nel modo seguente.

Così, secondo ancora un'altra realizzazione vantaggiosa dell'invenzione, le particelle di ciclodestrine reticolate secondo l'invenzione, caricate con il principio attivo, possono venire racchiuse in particelle più grandi formate da una proteina reticolata oppure da una miscela di proteine e polisaccaridi co-reticolati per formare un sistema a rilascio lento. In questo caso queste particelle vengono prodotte preparando inizialmente particelle di ciclodestrine reticolate secondo l'invenzione. Queste particelle vengono poi incubate in una soluzione di principio attivo per un periodo di tempo sufficiente a consentire a parte del principio attivo di venire intrappolato dalle particelle, come è stato appena descritto per l'intrappolamento o il caricamento di una sostanza attiva o principio attivo nelle particelle di ciclodestrine reticolate.

Si disciolgono quindi nella sospensione di particelle reticolate proteine oppure una miscela di proteina e polisaccaride e la miscela risultante

viene usata come fase acquosa per la preparazione di particelle mediante reticolazione interfacciale della proteina o della miscela proteina/polisaccaride, in una emulsione del tipo acqua in olio, per mezzo di un dialogenuro acido, preferibilmente un dicloruro, secondo brevetti precedenti della richiedente, per esempio il Brevetto US-A-5.395.620 o il Brevetto FR-A-97 08968. La miscela viene quindi dispersa in una fase idrofoba per ottenere una emulsione, quindi si aggiunge all'emulsione un dialogenuro acido, preferibilmente un dicloruro, e la reazione viene lasciata procedere per un tempo sufficiente affinché si formino le particelle più grandi attorno alle particelle di ciclodestrine precedentemente reticolate secondo l'invenzione mediante acilazione dei gruppi funzionali acilabili della proteina o miscela proteina/polisaccaride. Questa infine forma particelle grandi contenenti le particelle intatte di ciclodestrine reticolate secondo l'invenzione e di principio attivo parzialmente complessato dalle particelle di ciclodestrine reticolate. Il materiale reticolato che costituisce le particelle più grandi consentirà un rilascio lento del principio attivo dal sistema.

Per quanto si riferisce alle proteine che pos-

sono essere vantaggiosamente usate nel quadro dell'invenzione, si possono menzionare proteine animali come collagene, atelocollagene, gelatina, seralbumina, ovalbumina, emoglobina, proteine del latte compresa caseina e proteine di siero di latte, lattalbumina, globuline e fibrinogeno e proteine vegetali estratte specialmente da leguminose e particolarmente dalle seguenti piante: soia, lupino, piselli, germogli di pisello, alfalfa, fave, lenticchie, semi di fagiolini, colza e girasole, o da cereali come frumento, mais, orzo, malto, avena e segale. Per quanto si riferisce ai polisaccaridi che possono essere vantaggiosamente impiegati, si preferiscono i glicosamminoglicani, vantaggiosamente comprendenti condroitin-4-solfato, condroitin-6-solfato, dermatan solfato, eparan solfato e chersatan solfato, come pure eparina e suoi derivati, particolarmente eparina a basso peso molecolare con un peso molecolare tra circa 2000 e 10.000, e sali di eparina cosmeticamente o farmaceuticamente accettabili come i sali di sodio e di calcio, resine naturali, carragenani, glucomannani, galattomannani, amilosio o amilopectina o loro miscele, e derivati polisaccaridi idrossialchilati come idrossietilamido o idrossietilcellulosa.

In un'altra realizzazione vantaggiosa dell'invenzione, la presente invenzione si riferisce pure a particelle che comprendono, almeno in superficie, una parete formata da ciclodestrine reticolate, particolarmente  $\beta$ -ciclodestrine, caricate con una sostanza attiva e racchiuse in particelle più grandi biocompatibili e biodegradabili, per esempio particelle di proteine reticolate oppure proteine e polisaccaridi co-reticolati, così da formare un sistema a rilascio lento.

Per preparare queste particelle in questo caso una proteina, opzionalmente insieme ad un polisaccaride, viene aggiunta ad una sospensione di particelle di ciclodestrina nella soluzione di sostanza attiva e questa fase acquosa viene usata per preparare le particelle mediante reticolazione interfacciale secondo i brevetti precedenti della richiedente, per esempio il Brevetto US-A-5.395.620 o il Brevetto FR-A-97 08968.

È noto che le ciclodestrine sono oligosaccaridi ciclici formati da 6 a 8 unità di glucosio. Queste molecole hanno proprietà importanti associate con l'idrofobicità della loro cavità interna. In particolare esse possono aumentare la solubilità in acqua di principi attivi (questo essendo il caso

specialmente delle  $\beta$ -ciclodestrine e di loro derivati idrofili) e possono intrappolare varie molecole e quindi stabilizzarle contro il calore, ossidazione, luce ed evaporazione (gli esempi essendo essenzialmente oli, aromatizzanti e vitamine liposolubili).

Inoltre, alcuni derivati di ciclodestrina realizzano un rilascio ritardato o lento della molecola intrappolata (Uekama K. et al. in: *New Trends in Cyclodextrins and Derivatives*, pubblicato da D. Duchêne, Editions de Santé, Paris, 1991, chap. 12, 411-446). Questo è il caso specialmente dei derivati idrofobi di  $\beta$ -ciclodestrina come dietil e trietil  $\beta$ -ciclodestrine, che riducono la solubilità in acqua di principi attivi molto idrosolubili (rilascio ritardato) e di derivati ionizzabili di  $\beta$ -ciclodestrina come carbossimetiletil  $\beta$ -ciclodestrina, un composto che è scarsamente solubile in mezzi acidi e la cui solubilità aumenta con il pH attraverso la ionizzazione dei gruppi carbossimetile (il rilascio viene impedito nel mezzo gastrico e ritardato fino a raggiungere l'intestino).

Tuttavia, questi derivati sono relativamente costosi rispetto alle ciclodestrine iniziali. Per quanto si riferisce alle ciclodestrine iniziali, la

loro solubilità in acqua presenta il problema che, se si desidera usarli in un sistema di rilascio che deve essere a contatto con acqua, questa solubilità rende difficile il controllo del rilascio della molecola complessata (Friedman R.B. in: *New Trends in Cyclodextrins and Derivatives*, edited by D. Duchêne, Editions De Santé, Paris, 1991, chap. 4, 157-177). Analogamente, la solubilità in acqua impedisce l'isolamento dei complessi quando si desidera specificamente rimuovere un costituente da una miscela in un mezzo acquoso, ed il recupero delle ciclodestrine libere quando si desidera riciclarle commercialmente.

La preparazione di polimeri contenenti ciclodestrina fornisce una soluzione a questi problemi. Quindi, si può ottenere un rilascio più lento di una sostanza attiva complessandola con un polimero avente  $\beta$ -ciclodestrine e disponendo una membrana di dialisi tra il polimero ed il mezzo di rilascio. Così, per esempio, Behar N. et al. (*S.T.P. Pharma*, 1987, 3, 237-247) dimostrano che, quando si pongono in un tubo di dialisi polimeri sintetici, uno dei quali idrosolubile (polietilenimmina) e l'altro insolubile (preparato da polivinilcloroformiato), aventi molecole di ciclodestrina e caricati con una

sostanza attiva molto solubile in acqua come il propranololo, è possibile rallentare la diffusione del principio attivo nel compartimento acquoso esterno, il polimero ed il complesso essendo incapaci di passare attraverso la membrana.

Inaspettatamente, gli inventori sono pure stati in grado di osservare lo stesso fenomeno in esperimenti di dialisi eseguiti con propranololo in presenza di particelle perfettamente biocompatibili e biodegradabili di ciclodestrine reticolate secondo la presente invenzione.

Seguendo lo stesso principio, Fenyvesi E. (J. Inclusion Phenom., 1988, 6, 537-545) riporta che un sistema costituito da microcapsule contenenti un principio attivo complessato con un polimero di ciclodestrina solubile rende possibile ritardare il rilascio del principio attivo, il polimero non essendo in grado di passare attraverso la membrana delle microcapsule.

Gli inventori sono pure riusciti ad ottenere questo notevole risultato con microcapsule perfettamente biocompatibili di proteina reticolata contenenti blu di metilene complessato con quantità crescenti di particelle di  $\beta$ -ciclodestrine reticolate. Gli esperimenti di rilascio in vitro mostrano

un rallentamento del rilascio rispetto alle microcapsule che non contengono particelle di ciclodestrina. Il rallentamento diventa più pronunciato quando la quantità di particelle di ciclodestrina incapsulate aumenta.

Gli inventori hanno pure trovato che particelle di DHA reticolato sono perfettamente stabili mentre allo stesso tempo permettono la comparsa di una pigmentazione dopo l'applicazione alla pelle, dimostrando che sono biodegradabili e sono capaci di rigenerare la sostanza di base con la sua attività specifica intatta dopo degradazione enzimatica.

Secondo un'altra caratteristica, la presente invenzione si riferisce ad un procedimento per la preparazione di particelle di piccole dimensioni comprendenti, almeno sulla superficie, una parete formata da uno o più monosaccaridi o oligosaccaridi reticolati, detto procedimento comprendendo:

a) la preparazione di una fase acquosa ad un pH tra 10,5 e circa 14, in cui è disciolto almeno un monosaccaride o almeno un oligosaccaride;

b) la preparazione di una fase idrofoba essenzialmente non miscibile con l'acqua e contenente opzionalmente un tensioattivo;

c) la dispersione della fase acquosa nella fase idrofoba per agitazione così da formare una emulsione del tipo acqua in olio;

d) l'aggiunta all'emulsione di una soluzione di agente acilante polifunzionale, mantenendo l'agitazione per un periodo di tempo sufficiente a reticolare il monosaccaride o oligosaccaride all'interfaccia delle goccioline disperse di detta emulsione e quindi formare particelle; e

e) opzionalmente la separazione di dette particelle dal mezzo di reazione.

La presente invenzione si riferisce pure ad un procedimento per la preparazione di particelle di piccole dimensioni comprendenti, almeno sulla superficie, una parete formata da uno o più monosaccaridi o oligosaccaridi reticolati, detto procedimento comprendendo:

a) la preparazione di una fase acquosa con un pH tra 10,5 e circa 14, in cui si discioglie almeno un monosaccaride o almeno un oligosaccaride;

b) la preparazione di una fase idrofoba praticamente non miscibile con l'acqua e contenente un agente reticolante di acilazione polifunzionale;

c) la dispersione della fase idrofoba nella fase acquosa per agitazione così da formare una

emulsione del tipo olio in acqua, l'agitazione essendo mantenuta per un periodo di tempo sufficiente a reticolare il monosaccaride o oligosaccaride all'interfaccia delle goccioline disperse di detta emulsione e quindi formare particelle, specialmente capsule; e

d) opzionalmente la separazione di dette particelle dal mezzo di reazione.

La presente invenzione si riferisce pure ad un procedimento per la preparazione di particelle di ciclodestrine reticolate di piccole dimensioni racchiuse in particelle più grandi, detto procedimento comprendendo le fasi seguenti:

a) anzitutto si preparano particelle di ciclodestrine reticolate secondo l'invenzione in un sistema di emulsione del tipo acqua in olio e si raccolgono.

b) Queste particelle vengono quindi poste o incubate in una soluzione acquosa di un principio attivo con un pH tra circa 4,5 e circa 8 per un tempo sufficiente a consentire al principio attivo di venire intrappolato dalle particelle.

c) Si discioglie quindi una proteina oppure una miscela proteina/polisaccaride nella sospensione di particelle.

d) La miscela viene dispersa per agitazione in una fase idrofoba per formare una emulsione del tipo di acqua in olio.

e) Si aggiunge all'emulsione una soluzione di agente di acilazione polifunzionale, mantenendo l'agitazione per un periodo di tempo sufficiente alla formazione di particelle più grandi attorno alle particelle di ciclodestrine reticolate secondo l'invenzione mediante l'acilazione dei gruppi funzionali acilabili della proteina o della miscela proteina/polisaccaride.

f) Opzionalmente le particelle più grandi ottenute, contenenti le particelle intatte di ciclodestrine reticolate secondo l'invenzione ed il principio attivo parzialmente complessato dalle ciclodestrine delle particelle di ciclodestrine reticolate, vengono separati.

In una realizzazione vantaggiosa dell'invenzione, questa soluzione acquosa può consistere in un tampone quale un tampone carbonato o fosfato portato a pH superiore a 10,5, per esempio pH 11, oppure una soluzione di un agente alcalino come idrossido di sodio, per esempio soluzione di idrossido di sodio 1 M.

In una realizzazione vantaggiosa dell'inven-

zione, la concentrazione di monosaccaride o oligosaccaride nella fase acquosa è tra il 3% e l'80%, preferibilmente tra il 10 ed il 30%.

In un'altra realizzazione vantaggiosa dell'invenzione, l'agente reticolante di acilazione polifunzionale summenzionato è costituito preferibilmente da almeno un dialogenuro acido, preferibilmente scelto dal gruppo comprendente dialogenuri di ftaloile, tereftaloile, sebacoile, glutarile, adipole e succinile, oppure una anidride di questi acidi. È preferibile usare un dicloruro di questi acidi.

In un'altra realizzazione vantaggiosa dell'invenzione, le microcapsule summenzionate vengono preparate mediante reticolazione interfacciale, preferibilmente a temperatura ambiente, da una emulsione la cui fase dispersa da incapsulare contiene una o più sostanze attive idrosolubili, liposolubili o insolubili incorporate sotto forma di soluzione, sospensione o emulsione.

Secondo una terza caratteristica, la presente invenzione si riferisce pure all'uso di queste particelle.

Le utilizzazioni generali delle particelle di monosaccaridi ed oligosaccaridi reticolati sono le

seguenti:

nel campo della cosmetica, nel campo farmaceutico ed alimentare, queste particelle biocompatibili e biodegradabili consentono di incorporare sostanze idrosolubili o liposolubili sotto forma di soluzioni, sospensioni o emulsioni.

Le particelle secondo l'invenzione hanno un particolare valore addizionale in cosmetica. Questo è associato con il rilascio sul posto, dopo idrolisi, del costituente di base, che può avere un'attività specifica desiderata sulla pelle, per esempio l'effetto umidificante dei monosaccaridi e disaccaridi (lattosio) e dei polioli derivati da questi (mannitolo, sorbitolo), un effetto stimolante sulla sintesi del glicosamminoglicano ed un effetto antirughe (glucosammina solfato, galattosammina solfato, derivati di  $\beta$ -xiloside).

Si deve anche porre attenzione al valore dell'incapsulamento di goccioline idrofobe in una membrana altamente idrofila costituita, per esempio, da sorbitolo o saccarosio reticolato.

Le applicazioni delle particelle di ciclodestrine reticolate sono le seguenti:

\* Come tali, non caricate, per rimuovere un costituente da un mezzo sotto forma di un complesso

JACOBIACCI & PERANI S.P.A.

di inclusione:

- per applicazioni tecnologiche come la separazione di stereoisomeri, la catalisi di reazioni chimiche e l'estrazione di molecole amare, caffeina, colesterolo e fenilalanina. Le particelle possono così costituire un adsorbente solido da usare, per esempio, per il riempimento di colonne attraverso le quali si fa passare il liquido da purificare.

- per la detossificazione di mezzi liquidi biologici o non biologici ed acqua, specialmente per l'estrazione di ammine aromatiche, fenoli, bilirubina e tossine. La biocompatibilità delle particelle è in questo caso un vantaggio importante.

- per il recupero di una sostanza da un mezzo liquido.

- per applicazioni analitiche, le particelle rendendo possibile migliorare la rivelazione di sostanze mediante la loro concentrazione.

- nel campo cosmetico, ove le proprietà di intrappolamento delle ciclodestrine possono essere utilizzata per adsorbire i lipidi in eccesso sulla pelle (effetto opacizzante) o per adsorbire composti di degradazione della traspirazione (prodotti deodoranti) o le sostanze responsabili dell'alito

cattivo (effetto anti-alito cattivo nei dentifrici e prodotti di risciacquo della bocca). La biocompatibilità delle particelle è anche in questo caso un vantaggio importante.

\* Caricate con sostanze attive sotto forma di complessi di inclusione ed incorporate in sistemi a diffusione lenta, particolarmente in particelle e specialmente particelle di proteine reticolate o proteine e polisaccaridi co-reticolati:

- nel campo cosmetologico per un rilascio più lento e prolungato della sostanza attiva, consentendo il prolungamento dell'azione, con un miglioramento nella tolleranza della pelle verso principi attivi aventi un effetto irritante, per esempio acido retinoico, acido salicilico, ecc.

- nel campo terapeutico per la preparazione di farmaci o composizioni farmaceutiche con un rilascio più lento e prolungato della sostanza attiva, consentendo il prolungamento dell'azione, con qualsiasi modo di somministrazione e con un miglioramento della tolleranza della pelle e della mucosa.

Le applicazioni delle particelle di DHA reticolato sono associate alla stabilizzazione del DHA, consentendo l'incorporazione in una varietà di preparati cosmetici ed il rilascio del DHA dopo degra-

dazione enzimatica sulla superficie della pelle, detto DHA essendo in grado di combinarsi con gli amminoacidi della pelle per fornire una pigmentazione.

Le particelle di eterosidi reticolati hanno applicazioni associate specialmente con il fatto che rappresentano nuovi precursori di tipo particolato:

- che possono venire usati in cosmetica per il rilascio lento, per degradazione enzimatica delle particelle, del costituente eteroside, che eserciterà quindi la sua specifica attività (esempio: particelle di saponoside reticolato), e

- che possono venire usate in campo terapeutico, nel qual caso le particelle costituiscono un nuovo tipo di vettore o profarmaco particolato consentendo contemporaneamente:

- la protezione del principio attivo ed il rilascio lento dell'eteroside costituente per degradazione enzimatica delle particelle, per un effetto prolungato e/oppure un miglioramento della biodisponibilità e/oppure un miglioramento della tolleranza da parte della pelle o della mucosa, e

- uso come composto mirato associato alla natura particolata del profarmaco.

A seconda della dimensione delle particelle sarà possibile, per esempio, preparare particelle con un diametro tra circa 10 e 100  $\mu\text{m}$ , per esempio di circa 15  $\mu\text{m}$ , da un antibiotico tipo streptomicina; dopo iniezione intravenosa, queste particelle possono rendere possibile la localizzazione nei capillari dei polmoni secondo il noto principio di vettorizzazione per bloccaggio capillare (Davis S.S. and Illum L., Acta Pharm. Technol., 1986, 32, 4-9) ed il rilascio lento di antibiotico sul posto per una efficacia migliorata. Alternativamente, si prepareranno nanoparticelle di sostanza attiva che verranno prelevate dalle cellule, particolarmente le cellule del sistema reticolo endoteliale, e che consentirà il trattamento con detta sostanza attiva di malattie quali malattie batteriche o parassitiche.

Come ulteriore alternativa, la preparazione di particelle di dimensione nanometrica da oligonucleotidi o oligodesossinucleotidi può consentire direttamente di ottenere una forma vettorizzata e stabile di questi oligonucleotidi o oligodesossinucleotidi che possono passare direttamente nelle cellule e sono in grado di liberare l'oligonucleotide o l'oligodesossinucleotide iniziale all'inter-

no della cellula, specialmente per l'uso nel contesto della terapia antivirale o anticancro o nel contesto della terapia genetica, o per l'uso nel contesto generale della transfezione di cellule o trasferimento di materiale genetico, evitando in tal modo l'uso di vettori virali o vettori sintetici.

Come ulteriore alternativa, la preparazione di particelle di dimensione nanometrica da nucleosidi antivirali o anticancro può consentire direttamente di ottenere una forma vettorizzata e stabile di questi nucleosidi che passa direttamente nelle cellule ed è in grado di liberare il nucleoside iniziale all'interno della cellula.

Secondo una quarta caratteristica, la presente invenzione si riferisce pure ad una composizione, scelta specialmente dal gruppo costituito da una composizione cosmetica, una composizione farmaceutica ed una composizione alimentare, che comprende, come uno dei componenti o principi attivi, le particelle summenzionate comprendenti, almeno sulla superficie, una parete formata da uno o più monosaccaridi o oligosaccaridi reticolati particolarmente per mezzo di reticolazione interfacciale in emulsione, preferibilmente a temperatura ambiente,

tra il monosaccaride (monosaccaridi) o oligosaccaride (oligosaccaridi), comprendente almeno un gruppo di alcool primario ed un agente di reticolazione acilante polifunzionale, preferibilmente un alogenuro biacido e particolarmente un cloruro biacido, così da formare legami estere tra i gruppi ossidrilici acilabili dell'alcool (alcoli) primario del monosaccaride o oligosaccaride ed i gruppi acili dell'agente acilante polifunzionale.

Altre caratteristiche di queste particelle sono evidenti dalla descrizione precedente e dalla descrizione seguente relativa agli esempi.

Secondo una quinta caratteristica, la presente invenzione si riferisce pure ad un procedimento per il trattamento cosmetico o terapeutico che comprende l'applicazione, in un sito appropriato su un mammifero, preferibilmente un essere umano, di una quantità cosmeticamente o terapeuticamente efficace delle particelle summenzionate comprendenti, almeno sulla superficie, una parete formata da uno o più monosaccaridi o oligosaccaridi reticolati particolarmente per mezzo di reticolazione interfacciale in emulsione, preferibilmente a temperatura ambiente, tra il monosaccaride (monosaccaridi) o oligosaccaride (oligosaccaridi), comprendente almeno un

gruppo di alcool primario, ed un agente di reticolazione acilante polifunzionale, preferibilmente un alogenuro biacido e particolarmente un cloruro biacido, così da formare legami estere tra i gruppi ossidrilici acilabili dell'alcool (alcoli) primario del monosaccaride o oligosaccaride ed i gruppi acile dell'agente acilante polifunzionale.

Altre caratteristiche di queste particelle sono chiaramente evidenti dalla descrizione precedente e da quella seguente, specialmente con riferimento agli esempi ed analogamente all'uso cosmetico o terapeutico precedentemente indicato, particolarmente con riferimento alla descrizione della seconda caratteristica.

In una realizzazione particolare, la presente invenzione si riferisce ad un procedimento per il trattamento cosmetico di un mammifero, preferibilmente un essere umano, che comprende l'applicazione topica, ad una zona della pelle, scalpo o capelli interessata, di particelle come precedentemente definite e specialmente particelle che possono anche contenere almeno una sostanza cosmeticamente attiva.

In una vantaggiosa realizzazione, l'invenzione comprende anche un procedimento per il trattamento

terapeutico che comprende l'applicazione, ad un sito appropriato di un mammifero, preferibilmente un essere umano, di una quantità terapeuticamente efficace delle particelle summenzionate comprendente, almeno sulla superficie, una parete formata da ciclodestrine reticolate, particolarmente  $\beta$ -ciclodestrine, caricate con una sostanza attiva e racchiuse in particelle più grandi biocompatibili e biodegradabili come particelle di proteine reticolate o proteine e polisaccaridi co-reticolati, queste doppie particelle costituendo un sistema a ritardo lento che può venire somministrato mediante qualsiasi sistema di somministrazione, come per via orale, parenterale, rettale, vaginale, polmonare, cutanea, oftalmica e nasale.

In una realizzazione vantaggiosa, l'invenzione comprende pure un procedimento per il trattamento terapeutico che comprende l'applicazione, ad un sito adatto su un mammifero, preferibilmente un essere umano, di una quantità terapeuticamente efficace delle summenzionate particelle comprendenti, almeno sulla superficie, una parete formata da uno o più eterosidi reticolati, dette particelle comportandosi come profarmaci particolati o precursori dell'eteroside (eterosidi) attivo ed essendo in grado

di liberare il principio attivo in vivo attraverso l'azione degli enzimi come esterasi, le quali particelle possono venire somministrate con qualsiasi modo di somministrazione, quale somministrazione orale, parenterale, rettale, vaginale, polmonare, cutanea, oftalmica o nasale, e consentono la protezione del principio attivo, il rilascio lento, il miglioramento della biodisponibilità, il miglioramento della tolleranza della pelle o mucosa, la direzione mirata verso un organo, un tessuto o un territorio vascolare oppure, nel caso di nanoparticelle, il passaggio del principio attivo nelle cellule bersaglio per una terapia antibiotica, antivirale o anticancro o per il trasferimento di materiale genetico alle cellule.

Altri scopi, caratteristiche e vantaggi dell'invenzione appariranno chiaramente evidenti dalla seguente descrizione esplicativa che si riferisce a vari esempi dell'invenzione, che vengono forniti a semplice titolo di illustrazione e non possono quindi in alcun modo limitare lo scopo dell'invenzione, e con riferimento alle figure allegate, in cui:

#### Descrizione delle figure

- La Figura 1 mostra un negativo rilevato su

Papa & C. S.p.A.

un microscopio elettronico a scansione di particelle secondo l'invenzione preparate da  $\beta$ -ciclodestrine ad una concentrazione del 10%, usando una velocità di agitazione di 2000 giri/min, con riferimento all'Esempio 7.

- La Figura 2 mostra lo spettro all'infrarosso ottenuto rispettivamente da  $\beta$ -ciclodestrine non reticolate (a) e da particelle di  $\beta$ -ciclodestrine reticolate secondo l'invenzione, preparate da  $\beta$ -ciclodestrine ed a concentrazione del 7,5%, usando una velocità di agitazione di 5000 giri/min (b), con riferimento all'Esempio 7.

- La Figura 3 presenta i risultati di una prova di diffusione del propranololo attraverso una membrana di dialisi quale quella descritta nell'Esempio 11. Questa figura combina tre curve che rappresentano le quantità di propranololo rilasciato a differenti tempi ed espresse come percentuale della quantità iniziale, una di queste curve corrispondendo ad un esperimento eseguito senza aggiunta di particelle di  $\beta$ -ciclodestrina (controllo) e gli altri due corrispondendo a due esperimenti eseguiti con la rispettiva aggiunta di 10 mg o 50 mg di particelle di  $\beta$ -ciclodestrine reticolate dell'invenzione.

- La Figura 4 mostra i risultati di una prova sul rilascio di blu di metilene da microcapsule di albumina di siero reticolata come quelle descritte nell'Esempio 12. Questa figura combina cinque curve che rappresentano le quantità di blu di metilene rilasciato in momenti differenti ed espresso come percentuale della quantità iniziale (valori medi  $\pm$  deviazione standard), una di queste curve corrispondendo ad un esperimento eseguito senza l'aggiunta di  $\beta$ -ciclodestrine (controllo), un altro corrispondendo ad un esperimento eseguito con l'aggiunta di 50 mg di  $\beta$ -ciclodestrine non reticolate e gli altri tre corrispondendo a tre esperimenti eseguiti con la rispettiva aggiunta di 20 mg, 50 mg o 100 mg di particelle di  $\beta$ -ciclodestrine reticolabili dell'invenzione.

Negli esempi seguenti, tutte le percentuali sono in peso, a meno che sia diversamente specificato. Analogamente, a meno che sia altrimenti specificato, la temperatura è la temperatura ambiente e la pressione è la pressione atmosferica.

**Esempio 1: Protocollo standard per la preparazione di particelle di oligosaccaridi o monosaccaridi reticolati in un sistema in emulsione del tipo "acqua in olio"**

a) Si prepara una soluzione al 10% di oligosaccaride o monosaccaride in idrossido di sodio 1 M.

b) 6 ml di questa soluzione vengono emulsionati in 30 ml di cicloesano contenente il 5% di Span 85 mediante agitazione meccanica per 5 minuti a 2000 giri/min.

c) Senza interrompere l'agitazione, si aggiungono all'emulsione 40 ml di una soluzione al 5% di cloruro di tereftaloile in una miscela 1:4 (v/v) di cloroformio/cicloesano e l'agitazione viene proseguita per 30 minuti. Terminata la reazione, il mezzo di reazione viene diluito per aggiunta di 40 ml di cicloesano e l'agitazione viene proseguita per 2-3 minuti.

d) Le microcapsule vengono quindi separate mediante decantazione naturale o per centrifugazione.

e) Il sedimento viene lavato con successiva risospensione in differenti mezzi, precisamente cicloesano, etanolo al 95% con il 2% di Tween 20, etanolo al 95% e acqua distillata.

Questo protocollo viene applicato con successo con i seguenti composti (Sigma, a meno che sia altrimenti specificato) che vengono forniti come esempi:

- Esempio 1.1.  $\beta$ -ciclodestrine
- Esempio 1.2. Destrine (Glucidex 40<sup>®</sup> o Glucidex 47<sup>®</sup>, Roquette)
- Esempio 1.3. Raffinosio
- Esempio 1.4. Cellobiosio
- Esempio 1.5. Saccarosio
- Esempio 1.6. Maltosio
- Esempio 1.7. Lattosio
- Esempio 1.8. Trealosio
- Esempio 1.9. Diidrossiacetone (DHA)
- Esempio 1.10. D-fruttosio
- Esempio 1.11. Sorbosio
- Esempio 1.12. D-ribosio
- Esempio 1.13. D-desossiribosio
- Esempio 1.14. D-xilosio
- Esempio 1.15. Paranitrofenil  $\beta$ -D-xiloside
- Esempio 1.16. D-arabinosio
- Esempio 1.17. D-glucosio
- Esempio 1.18. D-mannosio
- Esempio 1.19. D-galattosio
- Esempio 1.20. Xilitolo
- Esempio 1.21. Eritritolo
- Esempio 1.22. Arabitololo
- Esempio 1.23. Sorbitolo
- Esempio 1.24. Mannitolo

- Esempio 1.25. Dulcitololo (galattitololo)
- Esempio 1.26. Maltitololo
- Esempio 1.27. Acido gluconico
- Esempio 1.28. Gluconolattone
- Esempio 1.29. D-glucosammina
- Esempio 1.30. D-galattosammina
- Esempio 1.31. D-glucosammina solfato
- Esempio 1.32. D-galattosammina solfato
- Esempio 1.33. Saponina da corteccia di saponaria
- Esempio 1.34. Guanosina
- Esempio 1.35. Streptomicina solfato
- Esempio 1.36. Riboflavina
- Esempio 1.37. Acido desossiribonucleico (DNA) da sperma di aringhe (oligonucleotidi grezzi)
- Esempio 1.38. Uridina
- Esempio 1.39. Lattitololo

Si ottengono microparticelle sferiche con una dimensione tra alcuni micrometri ed alcune decine di micrometri (da 20 a 90  $\mu\text{m}$ ).

**Esempio 2: Varianti della preparazione di particelle di oligosaccaridi o monosaccaridi reticolati in un sistema in emulsione del tipo "acqua in olio"**

1) La concentrazione dell'oligosaccaride o monosaccaride nella fase acquosa può variare tra il

2% e l'80%.

2) La soluzione di idrossido di sodio 1 M può essere sostituita con soluzioni di idrossido di sodio o soluzioni di un altro agente alcalino, come idrossido di potassio, che sono più concentrate (2 M, 5 M, ecc.) o più diluite, o con tamponi portati a pH superiori a 10, per esempio un tampone carbonato o fosfato a pH 11.

3) L'oligosaccaride o monosaccaride usato viene preferibilmente scelto dal gruppo di composti indicati nell'Esempio 1 e costituiti da  $\beta$ -ciclodestrine, destrine, raffinosio, disaccaridi come, in particolare, cellobiosio, saccarosio, maltosio, lattosio e trealosio, monosaccaridi comprendenti chetoni come diidrossiacetone (DHA), fruttosio e sorbosio, oppure aldosi come ribosio, desossiribosio, xilosio, arabinosio, glucosio, mannosio e galattosio, derivati di oligosaccaride o monosaccaride comprendenti, in particolare, i polioli corrispondenti come maltitolo, preparati del commercio contenenti polioli ed ottenuti mediante idrogenazione di prodotti dell'idrolisi parziale di amido, xilitolo, eritritolo, arabitolo, sorbitolo, mannitolo, dulcitol, lattitolo o galattitolo, amminozuccheri come glucosammina, acidi o lattoni deri-

vati da questi, come acido gluconico, e gluconolattone, eterosidi come saponina, antibiotici come streptomina, riboflavina, guanosina o adenosina, oppure oligonucleotidi o oligodesossinucleotidi.

È anche possibile usare:

- altre ciclodestrine come  $\alpha$ -ciclodestrina e  $\gamma$ -ciclodestrina, derivati di ciclodestrina come idrossietil  $\beta$ -ciclodestrina e idrossipropil  $\beta$ -ciclodestrine (2-HP- $\beta$ -CD, 3-HP- $\beta$ -CD, 2,3-HP- $\beta$ -CD), e ciclodestrine ramificate come glucosil  $\beta$ -CD, diglucosil  $\beta$ -CD, maltosil  $\beta$ -CD e dimaltosil  $\beta$ -CD,

- miscele di oligosaccaridi, per esempio i prodotti commercializzati da Roquette con il marchio Glucidex<sup>®</sup>, contenenti proporzioni variabili di glucosio, maltosio e maltodestrine,

- preparati commerciali contenenti polioli, per esempio Néosorb 70<sup>®</sup> ("sorbitolo 70%", Roquette),

- desossiribonucleosidi come desossiguanosina e desossicitidina, nucleosidi antitumorali o antivirali sintetici, analoghi strutturali di nucleosidi naturali, come adenosina ed analoghi di desossiadenosina e citidina e analoghi di desossicitidina, mononucleotidi ed oligonucleotidi e monodesossinucleotidi ed oligodesossinucleotidi.

4) La fase idrofoba può essere costituita da un altro solvente organico o miscela di solventi, oli fissativi come 2-etilesilcocoato, o loro miscele ben note con gli esperti del settore. La natura e la percentuale della sua superficie aggiunta possono pure variare.

5) La dimensione delle particelle viene regolata variando la natura e la percentuale del tensioattivo e/oppure la velocità di agitazione. Essa può essere di 1 µm o meno per velocità di rotazione di 15.000-20.000 giri/min.

**Esempio 3: Esperimenti di stabilità su particelle di oligosaccaridi reticolati o monosaccaridi in un sistema di emulsione del tipo "acqua in olio"**

Procedura sperimentale:

Campioni di particelle sospese in acqua distillata vengono posti in una stufa a 45°C. I campioni vengono osservati ad intervalli regolari per rivelare qualsiasi cambiamento di colore e di aspetto e valutare la limpidezza del supernatante. L'integrità delle particelle viene controllata mediante esame microscopico.

Risultati:

Si studiano le particelle seguenti:

\* Particelle di:

ITALIACQUA & RISOI S.p.A.

$\beta$ -ciclodestrine reticolate secondo l'Esempio 1.1  
saccarosio reticolato secondo l'Esempio 1.5  
DHA reticolato secondo l'Esempio 1.9  
fruttosio reticolato secondo l'Esempio 1.10  
mannitolo reticolato secondo l'Esempio 1.24  
glucosammina reticolata secondo l'Esempio 1.29  
saponina reticolata secondo l'Esempio 1.33.

Per la maggior parte delle particelle, si osserva una stabilità superiore a tre mesi: il colore del sedimento di particelle è invariato (bianco o crema), il supernatante è limpido ed incolore e l'esame microscopico mostra particelle intatte.

La stabilità è superiore a quattro mesi per le particelle di DHA e superiore a sei settimane per le particelle di mannitolo reticolato.

\* Particelle di  $\beta$ -ciclodestrine reticolate secondo l'Esempio 1.1, salvo il fatto che le concentrazioni di ciclodestrina sono del 7,5% o 5%: si osserva una stabilità superiore a tre mesi.

\* Si preparano altre particelle secondo l'Esempio 1, salvo il fatto che si sostituisce la soluzione di idrossido di sodio 1 M con un tampone carbonato di pH 11, esempi essendo particelle di:

$\beta$ -ciclodestrine reticolate preparate con il 10% o il 5% di ciclodestrine: stabilità superiore a

10 settimane.

saccarosio reticolato: stabilità superiore ad un mese.

DHA reticolato: stabilità superiore a tre mesi.

**Esempio 4: Esperimenti di biodegradabilità su particelle di oligosaccaridi o monosaccaridi reticolati in un sistema di emulsione del tipo "acqua in olio"**

Le particelle vengono preparate come descritto nell'Esempio 1, salvo il fatto che la velocità di agitazione viene aumentata a 5000 giri/min.

a) Degradazione delle particelle nel plasma sanguigno:

*Protocollo sperimentale:*

Si impiega plasma umano congelato (Centro di Trasfusione Sanguigna di Reims) che viene sgelato al momento dell'uso. 50 mg di particelle fresche filtrate vengono introdotti in una provetta e dispersi in 5 ml di plasma sanguigno. La provetta viene posta su un bagno d'acqua a 37°C. Si mette in moto l'agitazione magnetica. La degradazione viene seguita per mezzo di un microscopio ottico per confronto con una provetta di controllo preparata disperdendo 50 mg di particelle in un tampone fosfato

con pH 7,4.

*Risultati:*

\* Particelle di  $\beta$ -ciclodestrine reticolate: la degradazione inizia dopo 5 h. Frammenti molto abbondanti e particelle aperte dopo 24 h. Al confronto non si riscontra alcuna degradazione nella provetta di controllo contenente il tampone del pH 7,4.

\* Particelle di saccarosio reticolato: la degradazione inizia dopo 3 h. Frammenti molto copiosi di particelle dopo 24 h. Degradazione molto pronunciata rispetto alla provetta di controllo, in cui le particelle sono intatte.

\* Particelle di DHA reticolato: lenta degradazione che provoca la comparsa di una colorazione bruna, che è molto netta dopo 48 h, e mostra che il DHA rilasciato ha reagito con le proteine del plasma.

\* Particelle di glucosio reticolato: dopo 1 h le particelle perdono la loro forma sferica e diventano ellissoidali. Si osserva una lenta degradazione. Dopo 24 h sono visibili piccoli frammenti come pure microcapsule aperte.

\* Particelle di mannitolo reticolate: la degradazione inizia dopo 3 h. Frammenti molto abbondanti e particelle aperte dopo 24 h. Nessuna degradazione nella provetta di controllo.

\* Particelle di glucosammina reticolata: lenta degradazione e presenza di frammenti dopo 24 h.

\* Particelle di saponina reticolata: la degradazione inizia dopo 2 h: presenza di frammenti. Dopo 24 h tutte le particelle si sono degradate in piccoli frammenti.

Questi esperimenti mostrano che le particelle che formano l'oggetto dell'invenzione sono biodegradabili. Mentre esse sono intatte dopo prolungata incubazione in un tampone a pH 7,4, esse si degradano generalmente nel plasma sanguigno, mostrando una sensibilità all'azione dell'esterasi plasmica, che rompe i legami estere formati dall'agente reticolate con i gruppi ossidrilici dei monosaccaridi o oligosaccaridi o loro derivati.

b) Degradazione delle particelle di saccarosio reticolate mediante invertasi:

*Reagenti:*

Invertasi (Grado V, lievito da panettiere, SIGMA) usata in forma di dispersione all'1% in tampone acetato come pH 4,9.

*Protocollo sperimentale:*

50 mg di particelle fresche filtrate vengono introdotte in una provetta e quindi si aggiungono 5 ml di dispersione all'1% di invertasi in tampone

acetato. La provetta viene posta in un bagno d'acqua a 37°C. Si mette in moto l'agitazione magnetica. La degradazione viene seguita sotto un microscopio ottico per confronto con una provetta di controllo preparata disperdendo 50 mg di particelle nel tampone acetato di pH 4,9.

Inoltre, la presenza di glucosio nel mezzo viene rivelata per mezzo del test Clinistix® (BAYER): la colorazione rosa di una striscia di prova di glucosio ossidasi vira al violetto in presenza di glucosio.

*Risultato:*

Dopo 6 h: inizio di degradazione delle particelle visibile al microscopio ottico. Il test Clinistix è positivo: colorazione violetta, risultato: +.

Dopo 24 h rimangono intatte soltanto poche particelle isolate. Il test Clinistix dà un risultato più positivo: la colorazione è pure violetta, risultato: ++. Le particelle di saccarosio reticolate, che rimangono intatte dopo incubazione nel solo tampone, vengono attaccate dall'invertasi, un enzima in grado di degradare il saccarosio a glucosio e fruttosio.

**Esempio 5: Protocollo standard per la preparazione**

JACOBBACCI & PERANI S.P.A.

di particelle di oligosaccaridi o monosaccaridi reticolati in un sistema in emulsione del tipo "olio in acqua"

a) Preparazione della fase oleosa da incapsulare:

0,6 ml di cloruro di sebacoile vengono aggiunti a 5,4 ml di olio di oliva e gli ingredienti vengono miscelati.

b) Preparazione della fase acquosa:

si preparano 30 ml di una soluzione al 20% di saccarosio in una soluzione 1 M di idrossido di sodio.

c) Emulsione/reticolazione:

in 6 ml di miscela oleosa vengono emulsionati in 30 ml di fase acquosa mediante agitazione a 2000 giri/min, l'agitazione essendo mantenuta per 1 h.

d) Le particelle vengono separate dal mezzo di reazione, per esempio per centrifugazione.

e) Lavaggi:

le particelle vengono lavate varie volte con acqua distillata.

**Esempio 6: Caratteristiche di particelle di oligosaccaridi o monosaccaridi reticolati in un sistema in emulsione del tipo "olio in acqua"**

#### Preparazione delle particelle

Si preparano le seguenti cariche di particel-

le:

\* Carica 1: particelle di saccarosio reticolato secondo l'Esempio 5.

\* Carica 2: particelle di saccarosio reticolato secondo l'Esempio 5, salvo il fatto che la concentrazione di saccarosio nella fase acquosa viene aumentata al 30% e la velocità a 5000 giri/min.

\* Carica 3: preparata nello stesso modo della carica 1, salvo il fatto che il saccarosio viene sostituito con mannitolo (20%) e la velocità di agitazione viene aumentata a 5000 giri/min.

\* Carica 4: preparata nello stesso modo della carica 2, salvo il fatto che il saccarosio viene sostituito con sorbitolo, la concentrazione viene aumentata al 30% e la velocità di agitazione viene portata a 5000 giri/min.

#### Caratteristiche delle particelle

In ogni caso si ottiene un supernatante di color crema formato da microcapsule, ciascuna contenente una gocciolina di olio. L'esame microscopico mostra che tutto l'olio è stato incapsulato. Le microcapsule si presentano come sfere con diametri da circa 20 a 150  $\mu\text{m}$ , con membrane distinte di colore grigio. Esercitando pressione sul vetrino di osservazione microscopica le microcapsule si rompono,

liberando l'olio incapsulato e consentendo l'osservazione della membrana, che si presenta come una sacca rotta trasparente.

#### Test di stabilità a 45°C

Il test viene eseguito sulle cariche 2 e 4 nel modo descritto nell'Esempio 3.

Risultati: le microcapsule della carica 2 sono stabili per almeno 5 settimane a 45°C e le microcapsule della carica 4 per almeno 3 settimane.

**Esempio 7: Caratteristiche delle microparticelle di  $\beta$ -ciclodestrine ( $\beta$ -CD) reticolate in funzione dei parametri di preparazione**

#### 1) Morfologia /

Questa viene studiata mediante il microscopio ottico ed il microscopio elettronico a scansione.

##### *- Microscopia ottico:*

Le particelle preparate secondo l'Esempio 1 (10% di  $\beta$ -CD, 2000 giri/min) assumono la forma di un sedimento bianco. Questo è costituito da particelle sferiche con contenuti mazzati ed una membrana distinta. Con il 7,5% di  $\beta$ -CD (NP 143), le particelle hanno un aspetto paragonabile. Con il 5% di  $\beta$ -CD (NP 50 bis) si ottengono vescicole con contenuti trasparenti.

La sostituzione della soluzione di idrossido

di sodio 1 M con un tampone a pH 11 fornisce nuovamente particelle sferiche con contenuti granulari.

- *Microscopio elettronico a scansione:*

Questo esame viene realizzato su particelle liofilizzate. In tutte le condizioni suddette l'esame rivela particelle con una membrana continua che si è collassata per effetto della liofilizzazione. A titolo di esempio, la Figura 1 mostra microparticelle preparate nelle condizioni dell'Esempio 1. Si può notare che, quando queste particelle liofilizzate vengono risospese in acqua, recuperano rapidamente la loro forma sferica rigonfiandosi con acqua.

2) Dimensione

Questa viene determinata mediante una tecnica di diffrazione laser (granulometro Coulter LS 200, Coultronics). I risultati sono espressi come rapporto volume/diametro delle particelle (SD).

Risultati:

% di $\beta$ -CD	Fase acquosa	Velocità di agitazione	Dimensione media, $\mu\text{m}$ (SD)
10%	Soluzione di idrossido di sodio 1 M	2000 giri/min	34,26 (22,9)
10%	Soluzione di idrossido di sodio 1 M	5000 giri/min	11,28 (5,98)

(segue)

% di $\beta$ -CD	Fase acquosa	Velocità di agitazione	Dimensione media, $\mu\text{m}$ (SD)
7,5%	Soluzione di idrossido di sodio 1 M	2000 giri/min	21,65 (10,6)
7,5%	Soluzione di idrossido di sodio 1 M	5000 giri/min	8,40 (4,25)
5%	Soluzione di idrossido di sodio 1 M	2000 giri/min	20,69 (12)

Come previsto, la dimensione delle particelle diminuisce quando la velocità di agitazione aumenta. Inoltre, la dimensione delle particelle diminuisce quando diminuisce la concentrazione di  $\beta$ -ciclodestrine.

### 3) Spettro all'infrarosso

*Metodo:* lo spettro all'infrarosso viene determinato con la tecnica del disco di KBr usando uno spettrometro all'infrarosso a trasformata di Fourier (BOMEM, serie MB).

*Risultati:* a titolo di esempio, la Figura 2 confronta lo spettro IR ottenuto con  $\beta$ -CD non reticolato (spettro a) e lo spettro IR di particelle preparate secondo l'Esempio 1, salvo il fatto che la concentrazione di  $\beta$ -CD è del 7,5% e la velocità di agitazione è di 5000 (spettro b).

Le differenze principali tra i due spettri so-

no la comparsa di bande a  $1724\text{ cm}^{-1}$ ,  $1280\text{ cm}^{-1}$  e  $731\text{ cm}^{-1}$  nello spettro delle particelle (b), il che riflette la formazione di esteri dai gruppi ossidrilici del  $\beta$ -CD.

#### 4) Contenuto di $\beta$ -CD delle particelle: determinazione mediante polarimetria

##### *Procedimento:*

La quantità di  $\beta$ -CD contenuta nelle particelle viene misurata dall'indice di rifrazione del  $\beta$ -CD, come descritto per esempio da Behar N. et al., (S.T.P. Pharma, 1987, 3, 237-247) in un studio relativo a  $\beta$ -CD fissato su polimeri. La prima fase è la completa idrolisi delle particelle liofilizzate (60 mg) in soluzione di idrossido di sodio 0,5 M (3 ml) dopo agitazione per 45 minuti a  $20^\circ\text{C}$ . La miscela viene neutralizzata per aggiunta di acido cloridrico 0,25 M e portata a 12 ml con acqua distillata. La soluzione (corrispondente allo 0,5% di particelle) viene quindi filtrata su una membrana di  $0,22\ \mu\text{m}$ .

La soluzione viene studiata mediante polarimetria e confrontata con  $\beta$ -CD non reticolato. Con il  $\beta$ -CD non reticolato si è verificato che il trattamento con soluzione di idrossido di sodio 0,5 M non modifica i risultati delle misurazioni polarimetri-

che.

Le prove vengono realizzate su due cariche di particelle preparate secondo l'Esempio 1, salvo il fatto che la soluzione  $\beta$ -CD è al 7,5% e la velocità di agitazione è di 5000 giri/min.

Il contenuto di umidità residua di queste due cariche viene determinato mediante un analizzatore di umidità (Halogen Moisture Analyzer, Mettler Toledo, tipo HR 73) così da riferire il risultato al peso delle particelle secche.

*Risultati:*

**Contenuto di  $\beta$ -CD delle particelle (in % di peso secco)**

Carica 1	68,7%
Carica 2	67,4%
Media	68%

Le particelle contengono quindi, in peso, il 68% di  $\beta$ -CD ed il 32% di tereftalato il che, riferito ai pesi molecolari corrisponde ad una media di 3,2 moli di tereftalato per mole di  $\beta$ -CD.

**Esempio 8: Valutazione delle proprietà di complessazione di particelle di  $\beta$ -ciclodestrine reticolate verso il paranitrofenolo, ed influenza dei parametri di preparazione**

1) Proprietà di complessazione di una carica di ri-

ferimento: variazioni nel campione e nel tempo di  
complessazione

\* La carica di riferimento scelta viene preparata secondo l'Esempio 1 ma con il 7,5% di  $\beta$ -ciclodestrine (7,5% di  $\beta$ -CD in soluzione di idrossido di sodio 1 M, velocità di agitazione: 2000 giri/min).

\* Vari campioni di microparticelle vengono incubati a 20°C in una soluzione 1 mM di paranitrofenolo (pNP) tamponata a pH 4, sotto agitazione; quindi, a certi intervalli di tempo, si analizza il pNP residuo nel supernatante mediante spettrofotometria fino a raggiungere l'equilibrio. Le misurazioni di densità ottica vengono utilizzate per dedurre la concentrazione residua di pNP, dalla quale si calcola la quantità di pNP fissato nelle microcapsule. Questo viene espresso anzitutto come percentuale della quantità iniziale di pNP ed in secondo luogo in  $\mu$ mol fissate per grammo di microcapsule.

*Protocollo:*

Si incubano pesi crescenti di microparticelle (10, 20, 50 e 100 mg) a temperatura ambiente in 10 ml di una soluzione 1 mM di pNP in un tampone acetato a pH 4, per tempi crescenti e sotto agitazione con agitatore magnetico, in assenza di luce. Si effettua una incubazione per peso e per tempo di con-

tatto e ciascuna prova viene duplicata. Dopo l'incubazione la sospensione viene centrifugata. Si aggiungono 2,7 ml di tampone acetato a pH 4 e quindi 3 ml di soluzione di idrossido di sodio 0,25 M a 300  $\mu$ l di supernatante. La miscela viene filtrata su una membrana con porosità di 0,22  $\mu$ m. La densità ottica viene misurata a 405 nm contro un campione in bianco preparato senza pNP.

L'intero esperimento viene ripetuto su una nuova carica di microparticelle.

**Risultati:**

**Fissaggio di paranitrofenolo mediante microparticelle di  $\beta$ -CD, reticolato: influenza del campione e del tempo di incubazione.**

		<u>PNP fissato: %/<math>\mu</math>moli per g di particelle</u>				
		Tempo di incubazione				
		5 min	10 min	30 min	1 h	24 h
Campione	10 mg	13/128	12/119	13/134	14/145	11/111
	20 mg	19/96	20/98	21/106	24/121	21/103
	50 mg	36/72	38/76	35/69	42/83	42/83
	100 mg	55/55	53/53	54/54	57/57	61/61

\* Media di 4 determinazioni

Come previsto, quando la quantità di microcapsule usate aumenta, aumenta pure la quantità di pNP

fissato, espresso come % della quantità inizialmente presente. Si nota pure che, se le quantità di pNP fissate sono espresse in  $\mu$ mol per grammo di microcapsule, queste quantità diminuiscono quando il peso delle microcapsule usate aumenta: il pNP si diffonde di più tra le particelle quando il numero aumenta. Infine, si osserva che l'equilibrio viene raggiunto rapidamente. I valori non variano molto dopo un tempo di contatto di 5 minuti, i valori stabili essendo raggiunti dopo 1 h.

2) Influenza dei parametri di preparazione delle microparticelle sulle proprietà di complessazione (con 1 h di incubazione)

*Protocollo:*

Per questo studio si adottano le condizioni seguenti: campione: 50 mg, tempo di incubazione a 20°C: 1 h. Per ciascun parametro studiato, le proprietà di complessazione delle microcapsule vengono valute su due cariche differenti, due differenti incubazioni essendo realizzate per ciascuna carica. Questo rende possibile verificare la riproducibilità dei risultati ottenuti.

Le variazioni seguenti vengono studiate sulla carica di riferimento (7,5% di  $\beta$ -CD, 2000 giri/min), riprodotta due volte (cariche 1 e 2):

- variazioni di concentrazione di  $\beta$ -CD nella fase acquosa: aumento al 10% (cariche 3 e 4) e diminuzione al 5% (cariche 5 e 6)

- aumento della velocità di agitazione a 5000 giri/min (cariche 7 e 8)

- diminuzione della concentrazione del cloruro di tereftaloile al 2,5% (cariche 9 e 10)

Il diametro medio di tutte queste cariche di particelle viene determinato usando un granulometro Coulter LS 200.

*Risultati:*

a) Fissaggio del pNP in 1 h mediante le cariche di riferimento: cariche 1 e 2 (7,5% di  $\beta$ -CD; TC: 5%; s: 2000 giri/min)

Carica	Carica 1		Carica 2	
Dimensione media (SD)	28,02 (17,1)		24,8 (13,7)	
	Prova 1	Prova 2	Prova 1	Prova 2
pNP fissato: $\mu$ mol/g	83,6	83,6	82,6	84,5
Media della cariche 1 e 2	83			

b) Fissaggio di pNP in 1 h mediante le cariche 3 e 4: aumento della concentrazione di  $\beta$ -CD (10% di  $\beta$ -CD; TC: 5%; s: 2000 giri/min)

Carica	Carica 3		Carica 4	
Dimensione media (SD)	34,26 (22,9)		35,3 (20,4)	
	Prova 1	Prova 2	Prova 1	Prova 2
pNP fissato: $\mu\text{mol/g}$	79,8	72,2	79,4	75,4
Media della cariche 3 e 4	77			

c) Fissaggio di pNP in 1 h mediante le cariche 5 e 6: diminuzione della concentrazione di  $\beta$ -CD (5% di  $\beta$ -CD; TC: 5%; s: 2000 giri/min)

Carica	Carica 5		Carica 6	
Dimensione media (SD)	20,69 (12)		22,4 (10)	
	Prova 1	Prova 2	Prova 1	Prova 2
pNP fissato: $\mu\text{mol/g}$	93,4	91,6	93,4	89,8
Media della cariche 5 e 6	92			

d) Fissaggio di pNP in 1 h mediante le cariche 7 e 8: aumento della velocità di agitazione (7,5% di  $\beta$ -CD; TC: 5%; s: 5000 giri/min)

Carica	Carica 7		Carica 8	
Dimensione media (SD)	11,36 (10)		10,43 (7,37)	
	Prova 1	Prova 2	Prova 1	Prova 2
pNP fissato: $\mu\text{mol/g}$	99,0	97,0	97,4	97,6
Media della cariche 7 e 8	98			

e) Fissaggio di pNP in 1 h mediante le cariche 9 e

10: diminuzione della concentrazione di cloruro di tereftaloile a 2,5% (7,5% di  $\beta$ -CD; s: 2000 giri/min)

Carica	Carica 9		Carica 10	
Dimensione media (SD)	29,53 (14,7)		30,4 (16,2)	
	Prova 1	Prova 2	Prova 1	Prova 2
pNP fissato: $\mu\text{mol/g}$	87,6	85,8	82,2	84,8
Media della cariche 9 e 10	85			

Quindi, dal confronto con la carica di riferimento, che fissa 83  $\mu\text{mol/g}$ , si nota che le proprietà di complessazione variano con la concentrazione di  $\beta$ -CD nella fase acquosa: esse di riducono (77  $\mu\text{mol/g}$ ) per il 10% ed aumentano (92  $\mu\text{mol/g}$ ) per il 5%.

Inoltre, l'aumento della velocità di agitazione, che produce microcapsule di dimensioni minori e quindi di area superficiale maggiore, è un fattore favorevole (98  $\mu\text{mol/g}$ ). D'altro canto, diminuendo la concentrazione di agente reticolante al 2,5%, non si modificano le proprietà di complessazione.

**Esempio 9: Valutazione delle proprietà di complessazione di particelle di  $\beta$ -ciclodestrine reticolate rispetto al propranololo**

Il propranololo è un farmaco che blocca il sistema adrenergico. Esso è stato scelto per questo studio per la sua elevata solubilità in acqua e la sua elevata affinità per  $\beta$ -CD, dovuta al fatto che il gruppo naftalenico della molecola si adatta nella cavità idrofoba di  $\beta$ -CD (Behar et al., S.T.P. Pharma, 1987, 3, 237-247).

*Protocollo:*

Si preparano particelle di  $\beta$ -CD da una soluzione al 7,5% in soluzione di idrossido di sodio 1 M, con una velocità di agitazione di 5000 giri/min. Le proprietà di complessazione vengono valutate dopo agitazione di un campione di 10 mg di particelle liofilizzate in 10 ml di una soluzione 1 mM o 2 mM di propranololo in un tampone fosfato con pH 7,4, in assenza di luce. Dopo questo contatto, la sospensione viene centrifugata, il supernatante viene raccolto ed il propranololo non fissato viene analizzato mediante spettrofotometria UV a 290 nm. Per ciascuna delle due concentrazioni di propranololo, si studiano due cariche e si fanno due prove per carica. I risultati vengono espressi in  $\mu$ moli di propranololo fissato per grammo di microcapsule secche.

*Risultati:*

Propranololo fissato (in  $\mu\text{mol/g}$ ) mediante microparticelle  $\beta$ -CD dopo 1 h di incubazione in 10 ml di soluzione di propranololo 1 mM o 2 mM

Titolo della soluzione di propranololo	1 mM		2 mM	
	1	2	3	4
Carica n.				
Propranololo fissato ( $\mu\text{mol/g}$ )				
Test 1	509	492	835	794
Test 2	495	485	805	811
Media	495		811	

Questi risultati restano invariati se l'incubazione viene prolungata per 2 o 3 h.

**Esempio 10: Reversibilit  della complessazione del propranololo mediante particelle di  $\beta$ -ciclodestrine reticolate, e riutilizzo**

Le particelle di  $\beta$ -CD vengono preparate come descritto nell'Esempio 9 e liofilizzate.

*Protocollo di studio:*

1) Fase di complessazione

Un campione di 10 mg di microcapsule viene incubato in 10 ml di una soluzione 1 mM di propranololo in un tampone fosfato a pH 7,4. Dopo agitazione per 1 h, la sospensione viene centrifugata ed il propranololo viene analizzato nel supernatante.

## 2) Fase di decomplessazione

Le microparticelle che sono state centrifugate vengono disperse in 50 ml di tampone fosfato a pH 7,4 ed agitate con agitatore magnetico per 15 minuti. Esse vengono quindi separate dal mezzo. Il propranololo liberato nel supernatante viene analizzato.

Le particelle vengono quindi ridisperse in 50 ml di tampone fresco. Dopo agitazione magnetica per 15 minuti, esse vengono separate dal mezzo ed incubate nuovamente in 50 ml di tampone fresco. Dopo questo trattamento, la determinazione spettrofotometrica del propranololo rilasciato nel tampone mostra che tutto il propranololo è stato rilasciato dal complesso con il  $\beta$ -CD reticolato.

## 3) Riutilizzo delle microparticelle per una ulteriore complessazione

Le microparticelle precedenti, dalle quali è stato rimosso il propranololo, vengono nuovamente incubate in 10 ml di una soluzione 1 mM di propranololo in un tampone fosfato a pH 7,4. Dopo agitazione per 1 h, la sospensione viene centrifugata ed il propranololo viene analizzato nel supernatante. La prova viene fatta in duplicato.

*Risultati:*

\* Test n. 1:

- quantità di propranololo fissato dai 10 mg di particelle durante la fase di complessazione 1:514  $\mu\text{mol/g}$  di particelle secche.

- quantità di propranololo fissato dai 10 mg di particelle nel riutilizzo della fase 3 dopo i tre lavaggi della fase di decomplessazione: 517  $\mu\text{mol/g}$ .

\* Test n. 2:

- quantità di propranololo fissato dai 10 mg di particelle durante la fase di complessazione 1:512  $\mu\text{mol/g}$  di particelle secche.

- quantità di propranololo fissato dai 10 mg di particelle nella fase di riutilizzo 3 dopo i tre lavaggi della fase di decomplessazione: 523  $\mu\text{mol/g}$ .

Questa prova dimostra che le particelle di  $\beta$ -CD possono venire caricate con una sostanza e quindi scaricate e riutilizzate con la stessa capacità di intrappolamento.

**Esempio 11: Test di dialisi su una soluzione di propranololo contenente pesi crescenti di particelle di  $\beta$ -ciclodestrine reticolate: dimostrazione di un rilascio più lento del principio attivo**

Behar et al. (S.T.P. Pharma, 1987, 3, 237-247) usando propranololo, hanno dimostrato che il  $\beta$ -CD fissato ai polimeri solubili o insolubili rende

possibile rallentare la diffusione di questo principio attivo attraverso una membrana di dialisi, il polimero (ed il complesso di principio attivo e  $\beta$ -CD fissato al polimero) non essendo in grado di passare attraverso la membrana.

Un esperimento paragonabile è stato realizzato con le microparticelle di  $\beta$ -CD reticolate preparate come nell'Esempio 9.

*Protocollo:*

1) Fase che comporta la complessazione del propranololo dalle particelle

Un campione di 10 mg o 50 mg di microparticelle liofilizzate viene incubato in 10 ml di una soluzione 2 mM di propranololo in tampone fosfato a pH 7,4. L'agitazione viene mantenuta per 1 h a temperatura ambiente, in assenza di luce.

2) Studio sulla diffusione del propranololo attraverso la membrana di dialisi

I 10 ml di sospensione di particelle di  $\beta$ -CD nella soluzione di propranololo vengono introdotti in un tubo di dialisi (SPECTRA POR: membrana in estere di cellulosa, taglio molecolare: 5000, diametro: 15 mm) precedentemente lavato con tampone fosfato a pH 7,4. Il tubo viene chiuso con due pinzette, l'estremità inferiore delle quali è magneti-

ca e consente di agitare il sistema. Il tubo viene quindi posto in un becher contenente 140 ml di tampone fosfato pH 7,4. Il tutto viene introdotto in un bagno d'acqua a 37°C mettendo in marcia l'agitazione magnetica.

Campioni del mezzo di rilascio vengono prelevati ad intervalli di tempo regolari cosicché il propranololo che si è diffuso può venire analizzato mediante spettrofotometria UV a 290 nm. Dopo il saggio, il campione viene reintrodotta nel mezzo per mantenere il volume costante a 140 ml.

Si fanno tre determinazioni per ciascuno dei due campioni di particelle: 10 mg e 50 mg. I risultati vengono espressi come percentuali medie (con deviazioni standard) di propranololo liberato, in base alla quantità introdotta nel tubo di dialisi. Si effettua pure una serie di tre prove sul propranololo senza aggiunta di microparticelle (test di controllo).

*Risultati:*

**Diffusione del propranololo attraverso la membrana di dialisi ed effetto dell'aggiunta delle particelle di  $\beta$ -CD**

% di propranololo rilasciato: valore medio (deviazione standard) dopo:										
	30 min	1 h	1 h 30 min	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	7 h	8 h
Controllo senza par- ticelle	21,1 (2)	37,8 (1,5)	50,1 (1,6)	60,2 (0,7)	74,7 (0,5)	82,2 (0,6)	87,1 (0,7)	90 (0,7)	91,7 (0,5)	93,3 (0,2)
10 mg di particelle	12,9 (0,6)	24,2 (0,5)	33 (0,7)	40,9 (1,2)	52,6 (1,7)	59,7 (1,9)	65,1 (1,8)	68,9 (2,1)	71,7 (2,5)	74 (2,6)
50 mg di particelle	3,5 (0,4)	6,9 (0,3)	10,2 (0,4)	13,1 (0,7)	17,9 (0,6)	22,8 (0,8)	25,8 (0,6)	28,5 (0,8)	31,3 (0,9)	33,5 (1,1)

I dati ottenuti possono venire usati per tracciare le curve di rilascio della Figura 3.

Queste serie di prove mostra che le particelle di  $\beta$ -CD reticolata rendono in effetti possibile rallentare la diffusione di una molecola molto solubile attraverso una membrana semipermeabile in proporzione alla quantità di particelle. Così, dopo 6 h, il controllo ha rilasciato il 90% del propranololo, mentre le prove con 10 mg e con 50 mg di particelle hanno rilasciato rispettivamente il 68,9% ed il 28,5% del propranololo.

**Esempio 12: Dimostrazione di un rilascio più lento di un tracciante, blu di metilene, incapsulato con l'aumento dei pesi delle particelle di  $\beta$ -ciclodestrine reticolate in microcapsule di albumina di siero reticolata**

In base ai risultati precedenti, è stato preparato un nuovo sistema per il rilascio rallentato.

In questo caso la membrana di dialisi viene sostituita con la membrana semipermeabile di microcapsule di proteina reticolata. Le microparticelle di  $\beta$ -CD vengono quindi incapsulate con il tracciante scelto, blu di metilene.

*Protocollo:*

1) Preparazione delle cariche di controllo di microcapsule di albumina di siero reticolata

Si usa albumina di siero umano (HSA).

- *Preparazione della fase acquosa:* si disciolgono 10 mg di blu di metilene (FLUKA) in 10 ml di tampone acetato a pH 7,4. Si discioglie quindi 1 g di HSA in questa soluzione.

- *Emulsione:* i 10 ml di fase acquosa vengono dispersi in 50 ml di cicloesano contenente il 2% di Span 85. La dispersione viene agitata per 5 minuti a 2000 giri/min.

- *Reticolazione:* si aggiungono 60 ml di una soluzione al 2,5% di cloruro di tereftaloile in cicloesano. La miscela viene agitata per 30 minuti a 2000 giri/min.

Le microcapsule vengono quindi centrifugate e lavate quattro volte con cicloesano, il cicloesano viene rimosso per evaporazione su un evaporatore rotante e le microcapsule vengono congelate e lio-

filizzate.

*Risultato:* si ottengono microcapsule blu belle, perfettamente rotonde, con una membrana spessa ed una dimensione da 10 a 60  $\mu\text{m}$ . Dopo liofilizzazione, si ottiene 2 g di una polvere fine costituita da microcapsule intatte; questa polvere si disperde perfettamente in un mezzo acquoso.

2) Preparazione di cariche di microcapsule di HSA reticolato, contenente quantità crescenti di microparticelle di  $\beta$ -CD

*a) Incubazione:*

Un campione variabile (20 mg, 50 mg o 100 mg) di microparticelle  $\beta$ -CD preparate come nell'Esempio 9 e liofilizzate, viene disperso in 10 ml di soluzione allo 0,1% di blu di metilene in tampone acetato con pH 7,4. Si mantiene in agitazione per 1 h a temperatura ambiente in assenza di luce.

*b) Incapsulamento in microcapsule di HSA reticolato:*

- *Preparazione della fase acquosa:* si discioglie 1 g di HSA in 10 ml della sospensione suddetta di particelle di  $\beta$ -CD dopo 1 h di incubazione.

- *Emulsione:* i 10 ml di fase acquosa vengono dispersi in 50 ml di cicloesano contenente il 2% di Span 85. La dispersione viene agitata per 5 minuti

a 2000 giri/min.

- *Reticolazione*: si aggiungono 60 ml di soluzione al 2,5% di cloruro di tereftaloile in cicloesano. La miscela viene agitata per 30 minuti a 2000 giri/min.

Le microcapsule vengono quindi centrifugate e lavate quattro volte con cicloesano, il cicloesano viene allontanato per evaporazione su un evaporatore rotante e le microcapsule vengono congelate e liofilizzate.

*Risultati*: si ottengono belle microcapsule blu. L'osservazione microscopica rivela che sono perfettamente sferiche con una membrana spessa ed una dimensione da 10 a 70  $\mu\text{m}$ , e che contengono le microparticelle di  $\beta$ -CD fortemente colorate dal blu di metilene. Vi è un totale incapsulamento di queste microparticelle, indipendentemente dal campione (20 mg, 50 mg o 100 mg di microparticelle di  $\beta$ -CD)

Dopo la liofilizzazione, si ottengono da 2 g a 2,1 g di una polvere fine costituita da microcapsule intatte; questa polvere si disperde perfettamente nel mezzo acquoso.

3) Preparazione di cariche di microcapsule di HSA reticolato contenenti 50 mg di  $\beta$ -CD non reticolato

Per confronto, si preparano tre cariche di mi-

crocapsule aggiungendo 50 mg di  $\beta$ -CD non reticolato invece delle particelle di  $\beta$ -CD reticolato alla soluzione di blu di metilene. Come descritto in precedenza, si mantiene in agitazione per 1 h a temperatura ambiente. L'incapsulamento, la separazione e l'essiccamento vengono quindi realizzati nel modo precedentemente descritto.

Si può notare che il complesso blu di metilene/ $\beta$ -CD assorbe alla stessa lunghezza d'onda del blu di metilene libero. Inoltre si è verificato che, dopo 1 h di incubazione, la miscela contenente il blu di metilene ed i 50 mg di  $\beta$ -CD ha la stessa assorbanza di quella misurata senza l'aggiunta di  $\beta$ -CD.

#### 4) Test di rilascio di blu di metilene

##### Protocollo:

Per la dissoluzione si impiega un dispositivo a lama rotante (apparecchiatura ERWEKA secondo la farmacopea); il dispositivo viene termostattizzato a 37°C e la velocità di rotazione delle pale è di 50 giri/min.

L'intera carica di microcapsule liofilizzate viene dispersa in 500 ml di tampone fosfato a pH 7,4. Ad intervalli di tempo regolari, si prelevano e si centrifugano campioni di 5 ml della sospensio-

ne. Il supernatante viene filtrato su una membrana con porosità di 0,2  $\mu$ m. La densità ottica del filtrato viene misurata a 668 nm. Le microcapsule sedimentano nella provetta della centrifuga e vengono risospese in 5 ml di tampone fosfato e reintrodotte nel mezzo di rilascio. Ciascun test di rilascio (test di controllo, test con 20 mg, 50 mg e 100 mg di particelle di  $\beta$ -CD, test con 50 mg di  $\beta$ -CD non reticolato) viene realizzato in triplicato.

**Risultati:**

Le quantità di blu di metilene rilasciate dalle differenti cariche di microcapsule dopo tempi differenti, espresse in % della quantità usata nella prova, sono raccolte nella tabella seguente.

**% di blu di metilene rilasciato [media (deviazione standard)] dalle microcapsule di HSA reticolato ed effetto dell'aggiunta di particelle di  $\beta$ -CD o  $\beta$ -CD non reticolato**

	Controllo senza particelle	20 mg di particelle	50 mg di particelle	100 mg di particelle	50 mg di $\beta$ -CD
Tempo					
15 minuti	7,21 (0,22)	5,66 (0,06)	4,36 (0,13)	3,22 (0,19)	8,89 (0,12)
30 minuti	9,43 (0,14)	7,12 (0,17)	5,23 (0,08)	3,68 (0,24)	11,48 (0,39)
45 minuti	11,55 (0,17)	8,51 (0,07)	6,14 (0,21)	4,10 (0,31)	13,85 (0,36)

(segue)

	Controllo senza particelle	20 mg di particelle	50 mg di particelle	100 mg di particelle	50 mg di $\beta$ -CD
Tempo					
1 h	12,95 (0,25)	9,61 (0,20)	6,80 (0,26)	4,60 (0,48)	15,56 (0,41)
1 h 15 minuti	14,37 (0,20)	10,55 (0,16)	7,36 (0,05)	4,88 (0,23)	16,61 (0,37)
1 h 30 minuti	15,15 (0,11)	11,11 (0,53)	7,68 (0,32)	4,98 (0,13)	17,44 (0,35)
2 h	16,11 (0,34)	12,06 (0,13)	8,44 (0,20)	5,28 (0,09)	19,14 (0,44)
2 h 30 minuti	17,79 (0,12)	12,71 (0,06)	8,57 (0,21)	5,28 (0,09)	20,12 (0,58)
3 h	18,05 (0,12)	12,82 (0,19)	8,79 (0,10)	5,70 (0,19)	20,81 (0,51)
4 h	19,31 (0,19)	13,84 (0,20)	9,23 (0,21)	5,73 (0,37)	21,89 (0,37)
5 h	19,83 (0,09)	14,13 (0,19)	9,37 (0,09)	5,81 (0,20)	22,83 (0,40)
6 h	20,2 (0,38)	14,2 (0,09)	9,57 (0,22)	5,81 (0,13)	23,10 (0,44)
8 h	20,13 (0,43)	14,21 (0,14)	9,79 (0,05)	6,06 (0,28)	23,27 (0,40)

I dati ottenuti possono venire usati per tracciare le curve di rilascio riportate nella Figura 4. Questi risultati, che concordano con i risultati dello studio di dialisi dell'Esempio 11, mostrano che, dopo l'incapsulamento in una membrana semipermeabile, le particelle di  $\beta$ -CD reticolato rendono in effetti possibile ottenere un rilascio più lento di una sostanza idrosolubile. Anche in questo caso, il rallentamento è proporzionale alla quantità di

particelle di  $\beta$ -CD incapsulate.

Come previsto, l'incorporazione di  $\beta$ -CD non reticolata non rende possibile rallentare il rilascio. In effetti, il complesso si diffonde liberamente attraverso la membrana delle microcapsule per la sua solubilità ed il suo basso peso molecolare. Al contrario si è visto che, in presenza di  $\beta$ -CD non reticolata, il rilascio di blu di metilene è più rapido che non per le microcapsule delle cariche di controllo preparate senza aggiunta di  $\beta$ -CD. Questo viene indubbiamente spiegato dal fatto che, nelle microcapsule delle cariche di controllo, una certa proporzione del tracciante si fissa alla proteina interna delle microcapsule, ritardando il rilascio. Quando si aggiunge  $\beta$ -CD alla soluzione di blu di metilene, parte del tracciante viene complessato, riducendo in tal modo la proporzione di tracciante che è in grado di legarsi alla proteina nelle microcapsule. La velocità di rilascio viene quindi leggermente aumentata.

Da questo si conclude che, sebbene la  $\beta$ -CD non reticolata non possa rallentare la diffusione del tracciante, l'insolubilizzazione della  $\beta$ -CD sotto forma di microparticelle di  $\beta$ -CD reticolata comporta un vantaggio decisivo rendendo possibile rallen-

tare la velocità di rilascio di sostanze solubili in proporzione alla quantità di microparticelle incorporate.

**Esempio 13: Particelle di DHA reticolato: test in vitro sulla combinazione con amminoacidi**

1) Preparazione di microparticelle di DHA reticolato

\* Si preparano microparticelle di DHA reticolato come descritto nell'Esempio 1, salvo il fatto che si sostituisce la soluzione 1 M di idrossido di sodio con un tampone carbonato di pH 11, e:

- la velocità di agitazione viene mantenuta a 2000 giri/min (carica 1)
- la velocità di agitazione viene portata a 5000 giri/min (carica 2)
- la velocità di agitazione viene aumentata a 5000 giri/min e la concentrazione di DHA viene ridotta al 5% (carica 3).

2) Test in vitro sulla combinazione con amminoacidi

*Principio dei test:*

È stato osservato che le microcapsule di DHA reticolato si possono disciogliere gradualmente in miscele contenenti da un lato soluzione diluita di carbonato sodico (per esempio 1%) e dall'altro glicole polietilenico come PEG 200. Il procedimento

comporta l'alcolisi dei legami estere presenti nelle particelle, con rilascio del DHA. Questo è quindi in grado di reagire con amminoacidi per dare una caratteristica colorazione bruna.

Si confronta l'intensità delle colorazioni ottenute in presenza di glicina usando microparticelle preparate nelle condizioni precedentemente definite con l'intensità ottenuta usando DHA non reticolato, leggendo la densità ottica a 420 nm dopo 48 h.

*Protocollo di prova:*

\* Preparazione della provetta sperimentale di microparticelle, T1:

20 mg di particelle liofilizzate vengono introdotte in 4 ml di una miscela costituita dal 90% v/v di PEG 200 e 10% v/v di soluzione di carbonato sodico all'1%.

Si aggiungono 100 µl di soluzione di glicina 0,66 M e la provetta viene posta in un bagno termostattizzato a 32°C. Dopo 48 h la miscela viene diluita a  $\frac{1}{4}$  con acqua distillata e si determina la densità ottica.

\* Preparazione della provetta di microparticelle senza glicina, T2.

La procedura è uguale a quella della provetta

T1, salvo il fatto che si aggiungono 100 µl di acqua distillata invece della soluzione di glicina.

\* Preparazione della provetta di controllo di DHA non reticolato con glicina, T3:

La procedura è uguale a quella di T1, salvo il fatto che le microparticelle vengono sostituite con 20 mg di DHA.

\* Preparazione della provetta di controllo di DHA non reticolato senza glicina, T4:

La procedura è come per T2, salvo il fatto che le microparticelle vengono sostituite con 20 mg di DHA.

**Risultati:**

I risultati sono raccolti nella tabella seguente:

**Test in vitro su combinazioni di particelle di DHA reticolate con glicina: colore, misurazione della DO dopo 48 h, confronto con DHA libera**

Con glicina		Senza glicina	
Colore	DO a 48 h	Colore	DO a 48 h
<b>Controlli: DHA non reticolato</b>			
30 min: giallo chiaro		30 min: giallo chiaro	
2 h: bruno			
48 h: bruno-nero	1,169	48 h: giallo	0,154

(segue)

Con glicina		Senza glicina	
Colore	DO a 48 h	Colore	DO a 48 h
<b>Microparticelle, carica 1</b>			
1 h 30 min: accenno di bruno		2 h: incolore	
48 h: arancio-bruno	0,494	48 h: giallo chiaro	0,056
<b>Microparticelle, carica 2</b>			
1 h: accenno di bruno		24 h: accenno di giallo	
48 h: arancio-bruno	0,616	48 h: accenno di giallo	0,025
<b>Microparticelle, carica 3</b>			
30 min: accenno di bruno		24 h: accenno di giallo	
48 h: bruno	0,756	48 h: giallo chiaro	0,081

Così, sebbene producano una colorazione più chiara del DHA libero, le microparticelle danno inizio ad un aspetto di colorazione bruna dopo 48 h in presenza di glicina. Questo mostra che queste particelle sono in grado di liberare DHA, che a sua volta si può combinare con gli amminoacidi. Le microcapsule delle cariche 2 e 3, che vengono preparate con alta velocità di agitazione e sono quindi più piccole, forniscono le colorazioni più scure. La colorazione più intensa viene ottenuta con le particelle preparate con il 5% di DHA (carica 3).

**Esempio 14: Particelle di DHA reticolato: effetto**

### abbronzante sulla pelle ricostruita

Le microsferi di DHA preparate come descritto nell'Esempio 13 per la carica n. 3 vengono liofilizzate e sterilizzate con il 25 kgray di raggi  $\beta$ . Esse vengono quindi sospese ad una concentrazione del 2,5% in un mezzo sterile. Si preparano in tal modo soluzioni sterili contenenti concentrazioni di DHA tra 0 e 5%.

Queste due preparazioni vengono quindi applicate a pelle ricostruita costituita da cheratinociti e normali fibroblasti umani inoculati sulla superficie e, rispettivamente, entro una matrice extracellulare prodotta mediante liofilizzazione di un gel di collagene (Coletica). Questa pelle ricostruita può venire usata per simulare applicazioni ad un animale o un volontario umano.

Dopo l'applicazione di ciascuno dei preparati di prova (10  $\mu$ l/cm<sup>2</sup>) alla superficie di questa pelle ricostruita, si esegue la valutazione della comparsa del colore bruno caratteristico della reazione di DHA con amminoacidi e si confronta con quella di ciascuno dei campioni della serie di controllo.

Dopo 8, 24, 48 e 96 h di incubazione a 37°C e sotto una miscela gassosa di CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> normalmente usata nella coltura cellulare, questo colore viene os-

servato e valutato.

Anzitutto si può vedere che la colorazione aumenta con il tempo di incubazione che aumenta pure con la quantità di DHA applicata alla pelle ricostruita. Inoltre, dopo 96 h di incubazione, si può vedere che le microsfere di DHA, usate ad una concentrazione del 2,5% in sospensione in un mezzo sterile, consentono sistematicamente la colorazione della pelle ricostruita con la stessa intensità come con una soluzione al 5% di DHA. Ad una concentrazione identica, l'attività colorante ottenuta con le microsfere di DHA è quindi di intensità doppia di quella ottenuta con DHA usato in forma libera, il che viene spiegato con il fatto che il DHA è più disponibile quando viene usato in forma di microsfere. Il rilascio ritardato (o effetto ritardo) ottenuto con le microsfere di DHA fornisce quindi una spiegazione delle differenze osservate nel comportamento del DHA.

Questi effetti ritardanti rendono possibile più generalmente prevedere l'uso, in queste forme di microsfere o nanosfere, di ingredienti attivi che irritano, sono tossici, hanno bassa biodisponibilità o penetrano nei tessuti cutanei molto rapidamente, in prodotti cosmetici, farmaceutici o

agroalimentari.

Esempio 15: uso dei prodotti dell'invenzione in formulazioni cosmetiche o farmaceutiche del tipo di emulsione olio in acqua

Formulazione 15a

A	.Acqua demineralizzata	q.b. a 100
	.Glicole butilenico	2
	.Glicerolo	3
	.Sodio diidrossicetilfosfato, isopropilidrossicetiletere	2
B	.Glicerolo stearato SE	14
	.Triisononanoina	5
	.Ottilcocoato	6
C	.Butilenglicole, metilparaben, etilparaben, propilparaben pH portato a 5,5	2
D	.Prodotti dell'invenzione	0,01-10%

Formulazione 15b

A	.Acqua	q.b. a 100
	.Glicole butilenico	2
	.Glicerolo	3
	.Poliacrilammide, isoparaffina, eptaetilenglicollauriletere (lauret-7)	2,8
B	.Butilenglicole, metilparaben,	

	etilparaben, propilparaben	2
	.Fenossietanolo, metilparaben, propilparaben, butilparaben, etilparaben	2
	.Glicole butilenico	0,5
C	.Prodotti dell'invenzione	0,01-10%

**Formulazione 15c**

A	.Polimero carbossivinilico (Carbomero)	0,50
	.Propilenglicole	3
	.Glicerolo	5
	.Acqua demineralizzata	q.b. a 100
B	.Ottilcocoato	5
	.Bisabololo	0,30
	.Dimeticone	0,30
C	.Idrossido di sodio	1,60
D	.Fenossietanolo, metilparaben, propilparaben, butilparaben, etilparaben	0,50
E	.Profumo	0,3
F	.Prodotti dell'invenzione	0,01-10%

**Esempio 16 dell'invenzione: Uso dei prodotti dell'invenzione in una formulazione del tipo acqua in olio**

A	.PEG 30 - dipoliidrossistearato	3
---	---------------------------------	---

	.Trigliceridi caprici	3
	.Cetearilottanoato	4
	.Dibutiladipato	3
	.Olio di semi di uva	1,5
	.Olio di Jojoba	1,5
	.Fenossietanolo, metilparaben, propilparaben, butilparaben, etilparaben	0,5
B	.Glicerolo	3
	.Butilenglicole	3
	.Solfato di magnesio	0,5
	.EDTA	0,05
	.Acqua demineralizzata	q.b. a 100
C	.Ciclometicone	1
	.Dimeticone	1
D	.Profumo	0,3
E	.Prodotto dell'invenzione	0,01-10%

**Esempio 17 dell'invenzione: Uso dei prodotti dell'invenzione in una formulazione per shampoo o gel tipo doccia**

A	.Gomma xanthan	0,8
	.Acqua demineralizzata	q.b. a 100
B	.Butilenglicole, metilparaben, etilparaben, propilparaben	0,5
	.Fenossietanolo, metilparaben,	

	propilparaben, butilparaben,	
	etilparaben	0,5
C	.Acido citrico	0,8
D	.Laurilsolfato sodico	40,0
E	.Prodotto dell'invenzione	0,01-10%

**Esempio 18 dell'invenzione: Uso dei prodotti dell'invenzione in una formulazione del tipo comprendente rossetto ed altri prodotti anidri**

A	.Cera minerale	17,0
	.Isostearilisostearato	31,5
	.Propilenglicole dipelargonato	2,6
	.Propilenglicole isostearato	1,7
	.Cera d'api PEG 8	3,0
	.Olio di palma e di semi di palma	3,4
	.Olio di lanolina	3,4
	.Olio di sesamo	1,7
	.Tribehenina	1,7
	.Cetil lattato	1,7
	.Olio minerale, alcool lanolinico	3,0
B	.Olio di ricino	q.b. a 100
	.Pigmenti (totale)	3,9
	{biossido di titanio, Rosso	
	Covanor W360A <sup>®</sup> (Wackherr), Bromo	
	de Phloxine 27 <sup>®</sup> (Wackherr), Rosso	
	Covalac W 1510 <sup>®</sup> (Wackherr), ossidi	

di ferro}

C .Prodotto dell'invenzione 0,01-5

**Esempio 19 dell'invenzione: uso dei prodotti dell'invenzione in una formulazione di gel acquoso (gel per ombretto, gel dimagrante, ecc.)**

A .Acqua demineralizzata q.b. a 100

.Polimero carbossivinilico

(Carbomero) 0,5

.Glicole butilenico 15

.Fenossietanolo, metilparaben,

propilparaben, butilparaben,

etilparaben 0,5

B .Prodotto dell'invenzione 0,01-10

**Esempio 20: Studi tossicologici realizzati sui prodotti dell'invenzione**

**a) Tossicità orale**

Il protocollo di prova usato corrisponde alle istruzioni OECD relative allo studio della tossicità orale acuta (n. 401 del 24 Febbraio 1987), alle dosi massime di 5 g/kg di peso corporeo, ed il test non provoca alcuna lesione macroscopica attribuibile all'effetto tossico del prodotto.

Quando viene usato oralmente ad una dose inferiore a 5 g/kg, il prodotto dell'invenzione (Esempio 1) ha quindi una tossicità 0.

AGROFARMACI S.p.A.

**b) Irritazione per gli occhi**

I test vengono eseguiti secondo il metodo ufficiale corrispondente al decreto del 3 Maggio 1990 (Journal Officiel de la République Française del 14 Novembre 1990) con i prodotti dell'invenzione (Esempio 1) e non provoca lesioni all'iride o alla cornea.

I prodotti dell'invenzione (Esempio 1) instillato puro, sembra essere non irritante e la tolleranza dell'occhio può essere considerata molto buona.

**c) Irritazione per la pelle**

I test vengono eseguiti secondo il metodo ufficiale del decreto del 1° Febbraio 1982 (Journal Officiel de la République Française del 21 Febbraio 1982) con i prodotti dell'invenzione (Esempio 1) senza constatare alcun fenomeno di irritazione.

I prodotti dell'invenzione (Esempio 1) applicati puri, si presentano come non irritanti e la tolleranza della pelle può essere considerata eccellente.

## RIVENDICAZIONI

1. Particelle che comprendono, almeno sulla superficie, una parete formata da uno o più monosaccaridi o oligosaccaridi reticolati per mezzo di reticolazione interfacciale in emulsione, preferibilmente a temperatura ambiente, tra il monosaccaride (monosaccaridi) o oligosaccaride (oligosaccaridi), comprendenti almeno un gruppo di alcool primario, ed un agente di reticolazione acilante polifunzionale, preferibilmente un alogenuro biacido e particolarmente un cloruro biacido, così da produrre legami estere tra il gruppo (gruppi) ossidrilico acilabile dell'alcool (alcoli) primario del monosaccaride o oligosaccaride ed i gruppi acile dell'agente acilante polifunzionale.

2. Particelle secondo la rivendicazione 1, in cui i monosaccaridi o oligosaccaridi summenzionati hanno un peso molecolare inferiore a 5000 dalton e hanno almeno un gruppo di alcole primario.

3. Particelle secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui il monosaccaride o oligosaccaride summenzionato è presente sotto forma di derivati, per esempio almeno un composto scelto dal gruppo costituito da polioli risultante dall'idrogenazione dei gruppi aldeidico o chetonico di osi, acidi aldonici

derivati da aldosi e lattoni corrispondenti, esteri di acido fosforico di osi, osammine o eterosidi, la cui parte oside è costituita da uno o più osi e contiene almeno un gruppo di alcole primario.

4. Particelle secondo una delle rivendicazioni 1 a 3, che vengono preparate da un singolo monosaccaride o oligosaccaride a basso peso molecolare o da miscele.

5. Particelle secondo una delle rivendicazioni 1 a 4, in cui i suddetti monosaccaridi vengono scelti dal gruppo costituito da chetosi, aldosi, polioli, amminozuccheri o osammine, oppure acidi aldonici e lattoni corrispondenti.

6. Particelle secondo la rivendicazione 5, in cui i chetosi summenzionati vengono scelti tra diidrossiacetone, eritrulosio, ribulosio, xilulosio, fruttosio, sorbosio e loro derivati; i summenzionati aldosi vengono scelti dal gruppo costituito da eritrosio, treosio, xilosio, arabinosio, ribosio, desossiribosio, glucosio, mannosio e galattosio; i summenzionati polioli vengono scelti dal gruppo costituito da sorbitolo, mannitolo, xilitolo, arabitololo, dulcitololo o galattitololo, eritritolo e treitololo; gli amminozuccheri o osammine vengono scelti dal gruppo costituito da glucosammina, galattosam-

mina, glucosammina solfato e galattosammina solfato; gli acidi aldonici vengono scelti tra acido gluconico ed acido galattonico; ed i lattoni vengono scelti tra gluconolattoni e galattonolattoni.

7. Particelle secondo una delle rivendicazioni precedenti, in cui l'oligosaccaride summenzionato viene scelto dal gruppo costituito da un disaccaride come saccarosio, lattosio, maltosio, cellobiosio, trealosio, melibiosio o raffiniosio, una destrina, o prodotto dell'idrolisi parziale di amido oppure, preferibilmente, una ciclodestrina come  $\alpha$ -ciclodestrina,  $\beta$ -ciclodestrina o  $\gamma$ -ciclodestrina, derivati ciclodestrinici come idrossietil  $\beta$ -ciclodestrina o idrossipropil  $\beta$ -ciclodestrine (2-HP- $\beta$ -CD, 3-HP- $\beta$ -ciclodestrina, 2,3-HP- $\beta$ -ciclodestrina), ciclodestrine ramificate come glucosil  $\beta$ -ciclodestrina, diglucosil  $\beta$ -ciclodestrina, maltosil  $\beta$ -ciclodestrina o dimaltosil  $\beta$ -ciclodestrina, o miscele di oligosaccaridi; ed il poliolo derivato da un oligosaccaride viene scelto dal gruppo costituito da lattitolo, maltitolo e preparazioni commerciali contenenti polioli ottenuti idrogenando prodotti dell'idrolisi parziale di amido.

8. Particelle secondo una delle rivendicazioni 3 a 7, in cui l'eteroside comprende una parte

oside contenente una o più unità oside ed almeno un gruppo di alcool primario, ed una frazione non- oside o aglicone avente preferibilmente una struttura ciclica, contenente uno o più anelli aromatici o non aromatici, che può comprendere uno o più eteroatomi come azoto, ossigeno o atomi di zolfo, l'eteroside essendo preferibilmente scelto dal gruppo costituito da  $\beta$ -D-xilosidi come 4-metilumbelliferil  $\beta$ -D-xiloside e p-nitrofenil  $\beta$ -D-xiloside, riboflavina, nucleosidi naturali costituiti da ribonucleosidi come guanosina, adenosina, uridina e citidina oppure desossiribonucleosidi come desossiguanosina, desossiadenosina, desossicitidina e timidina, nucleosidi sintetici antivirali o anticancro, analoghi strutturali di nucleosidi naturali, come analoghi di adenosina ed analoghi di desossicitidina, mononucleotidi, desossimononucleotidi, oligonucleotidi, desossioligonucleotidi, antibiotici del gruppo degli aminoglicosidi, come streptomina, diidrostreptomina, canamicina, amicacina, dibecacina, tobramicina, neomicina e paromomicina, saponosidi con aglicole steroideo, come saponosidi dell'edera, saponosidi di triterpenaglicone, come saponosidi della corteccia di Panama, o eterosidi cardiotonici con aglicone steroideo, come

digitossina.

9. Particelle secondo una delle rivendicazioni precedenti che sono microparticelle, specialmente microcapsule o microsfele.

10. Particelle secondo una delle rivendicazioni 1 a 8 che sono nanoparticelle, specialmente nanocapsule o nanosfele.

11. Particelle secondo una delle rivendicazioni precedenti che comprendono, almeno in superficie, una parete formata da ciclodestrine, particolarmente da  $\beta$ -ciclodestrine reticolate.

12. Particelle di ciclodestrina secondo la rivendicazione 11, che sono caricate con una sostanza attiva, particolarmente una sostanza cosmetica, una sostanza farmaceutica, una sostanza dietetica, una sostanza agro-alimentare o una sostanza agro-industriale.

13. Particelle di ciclodestrina secondo la rivendicazione 11 o 12, che sono racchiuse in particelle biocompatibili e biodegradabili più grandi, come particelle di proteine reticolate o proteine co-reticolate e polisaccaridi, per formare particelle doppie che costituiscono un sistema a rilascio lento.

14. Particelle secondo la rivendicazione 13,

in cui la proteina summenzionata viene scelta dal gruppo costituito da proteine animali come collagene, atelocollagene, gelatina, albumina di siero, ovalbumina, emoglobina, proteine del latte compresa caseina e proteine del siero di latte, lattalbumina, globuline e fibrinogeno; e proteine vegetali estratte specialmente da leguminose e particolarmente dalle seguenti piante: soia, lupino, pisello, germi di pisello, alfalfa, fave, lenticchie, semi di fagioli, colza e girasole, o da cereali come frumento, mais, orzo, malto, avena e segale; ed il suddetto polisaccaride viene scelto dal gruppo costituito da glicosamminoglicani, comprendente vantaggiosamente condroitin 4-solfato, condroitin 6-solfato, dermatan solfato, eparan solfato e chera-tan solfato, come pure eparina e suoi derivati, particolarmente eparina a basso peso molecolare con un peso molecolare tra circa 2000 e 10.000, e sali di eparina farmaceuticamente accettabili come sali di sodio e di calcio, resine naturali, carragenani, glucomannani, galattomannani, amilosio o amilopectine o loro miscele, e derivati di polisaccaride idrossialchilati come idrossietilamido o idrossietilcellulosa.

15. Particelle secondo una delle rivendica-

zioni precedenti, in cui il monosaccaride summenzionato è diidrossiacetone.

16. Uso di particelle secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 15 come agente cosmetico o per la preparazione di una composizione farmaceutica o una composizione alimentare, dette particelle consentendo l'incorporazione opzionale di sostanze idrosolubili o liposolubili sotto forma di una soluzione, sospensione o emulsione.

17. Uso secondo la rivendicazione 16, in cui detta composizione comprende dallo 0,1 al 20% in peso di dette particelle, rispetto al peso finale della composizione, e preferibilmente tra 0,1 e 5% in peso rispetto al peso finale della composizione.

18. Procedimento per la preparazione di particelle di piccole dimensioni comprendenti, almeno sulla superficie, una parete formata da uno o più monosaccaridi o oligosaccaridi reticolati, detto procedimento comprendendo:

a) la preparazione di una fase acquosa ad un pH tra 10,5 e circa 14, in cui si discioglie almeno un monosaccaride o almeno un oligosaccaride;

b) la preparazione di una fase idrofoba praticamente non miscibile con l'acqua e contenente opzionalmente un tensioattivo;

c) la dispersione della fase acquosa nella fase idrofoba mediante agitazione, così da formare una emulsione del tipo acqua in olio;

d) l'aggiunta all'emulsione di una soluzione di un agente acilante polifunzionale, mantenendo l'agitazione per un periodo di tempo sufficiente a reticolare il monosaccaride o oligosaccaride all'interfaccia delle goccioline disperse di detta emulsione e quindi formare particelle; e

e) opzionalmente la separazione di dette particelle dal mezzo di reazione.

19. Procedimento per la preparazione di particelle di piccole dimensioni comprendenti, almeno sulla superficie, una parete formata da uno o più monosaccaridi o oligosaccaridi reticolati, detto procedimento comprendendo:

a) la preparazione di una fase acquosa ad un pH tra 10,5 e circa 14, in cui si discioglie almeno un monosaccaride o almeno un oligosaccaride;

b) la preparazione di una fase idrofoba essenzialmente non miscibile con l'acqua e contenente un agente reticolante di acilazione polifunzionale;

c) la dispersione della fase idrofoba nella fase acquosa mediante agitazione, così da formare una emulsione del tipo di olio in acqua, l'agita-

zione essendo mantenuta per un periodo di tempo sufficiente a reticolare il monosaccaride o oligosaccaride all'interfaccia delle goccioline disperse di detta emulsione e quindi formare particelle, specialmente capsule; e

d) opzionalmente la separazione di dette particelle dal mezzo di reazione.

20. Procedimento per la preparazione di particelle di ciclodestrine reticolate di piccole dimensioni racchiuse in particelle più grandi, detto procedimento comprendente le fasi seguenti:

a) si preparano anzitutto particelle di ciclodestrine reticolate secondo l'invenzione in un sistema in emulsione del tipo di acqua in olio, e si raccolgono,

b) queste particelle vengono poi poste o incubate in una soluzione acquosa di un principio attivo con un pH tra circa 4,5 e circa 8 per un tempo sufficiente a consentire al principio attivo di venire intrappolato dalle particelle,

c) una proteina o una miscela proteina/polisaccaride viene quindi disciolta nella sospensione di particelle,

d) la miscela viene dispersa mediante agitazione in una fase idrofoba per formare una emulsio-

ne del tipo acqua in olio,

e) si aggiunge all'emulsione una soluzione di agente acilante polifunzionale, mantenendo l'agitazione per un periodo di tempo sufficiente alla formazione di particelle più grandi attorno alle particelle di ciclodestrine reticolate secondo l'invenzione, mediante acilazione dei gruppi funzionali acilabili della proteina o della miscela proteina/polisaccaride,

f) opzionalmente le particelle più grandi ottenute, contenenti le particelle intatte di ciclodestrine reticolate secondo l'invenzione ed il principio attivo parzialmente complessato dalle ciclodestrine delle particelle di ciclodestrine reticolate vengono separate.

21. Procedimento secondo una delle rivendicazioni 18 a 20, in cui la soluzione acquosa è costituita da un tampone come tampone carbonato o fosfato portato a pH superiore a 10,5, per esempio a pH di circa 11, oppure una soluzione di un agente alcalino quale idrossido di sodio, per esempio soluzione di idrossido di sodio 1 M.

22. Procedimento secondo una delle rivendicazioni 18 a 21, in cui la concentrazione del suddetto monosaccaride o oligosaccaride nella fase acquo-

sa è tra il 3% e l'80%, preferibilmente tra il 10 ed il 30% in peso.

23. Procedimento secondo una delle rivendicazioni 18 a 22, in cui l'agente reticolante di acilazione polifunzionale summenzionato è costituito da almeno un dialogenuro acido scelto preferibilmente dal gruppo costituito da dialogenuri di ftaloile, tereftaloile, sebacoile, glutarile, adipoile e succinile, oppure una anidride acida.

24. Procedimento di trattamento cosmetico che comprende l'applicazione, in un sito appropriato di un mammifero, preferibilmente un essere umano, di una quantità cosmeticamente efficace di particelle secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 15 comprendenti, almeno sulla superficie, una parete formata da uno o più monosaccaridi o oligosaccaridi reticolati particolarmente per mezzo di reticolazione interfacciale in emulsione, preferibilmente a temperatura ambiente, tra il monosaccaride (monosaccaridi) o oligosaccaride (oligosaccaridi), comprendente almeno un gruppo di alcool primario, ed un agente reticolante di acilazione polifunzionale, preferibilmente un alogenuro biacido e particolarmente un cloruro biacido, così da formare legami estere tra il gruppo (gruppi) ossidrilico acilabile

dell'alcole (alcoli) primario del monosaccaride o oligosaccaride ed i gruppi acile dell'agente acilante polifunzionale.

25. Uso delle particelle secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 15, per la preparazione di una composizione farmaceutica che costituisce un sistema a rilascio lento che può venire somministrata con qualsiasi modo di somministrazione, come per via orale, parenterale, rettale, vaginale, polmonare, cutanea, oftalmica o nasale.

26. Uso delle particelle secondo la rivendicazione 8 per la preparazione di una composizione farmaceutica, dette particelle comprendendo, almeno sulla superficie, una parete formata da uno o più eterosidi reticolati, che si comportano come profarmaci o precursori particolati dell'eteroside (eterosidi) attivo e che sono in grado di rilasciare il principio attivo in vivo sotto l'azione di enzimi quali esterasi, le quali particelle possono venire somministrate con qualsiasi modo di somministrazione e consentono la protezione del principio attivo, il rilascio lento, il miglioramento della biodisponibilità, il miglioramento della tolleranza della pelle o mucosa, la direzionalità verso un organo, tessuto o un territorio vascolare, oppure,

nel caso di nanoparticelle, il passaggio del principio attivo nelle cellule bersaglio per una terapia antibiotica, antivirale o anticancro o per il trasferimento di materiale genetico nelle cellule.

MACORACCI & FERANI S.P.A.



PER INCARICO

**Ing. Angelo GERBINO**  
N. Iscriz. ALBO 488.  
(in proprio e per gli altri)

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Angelo Gerbino".

FO 300 00009



FIG.1

in incarico di: COLETICA

  
**Ing. Angelo GERBINO**  
N. Iscriz. A.I.R.O. 488  
(in proprio e per gli altri)

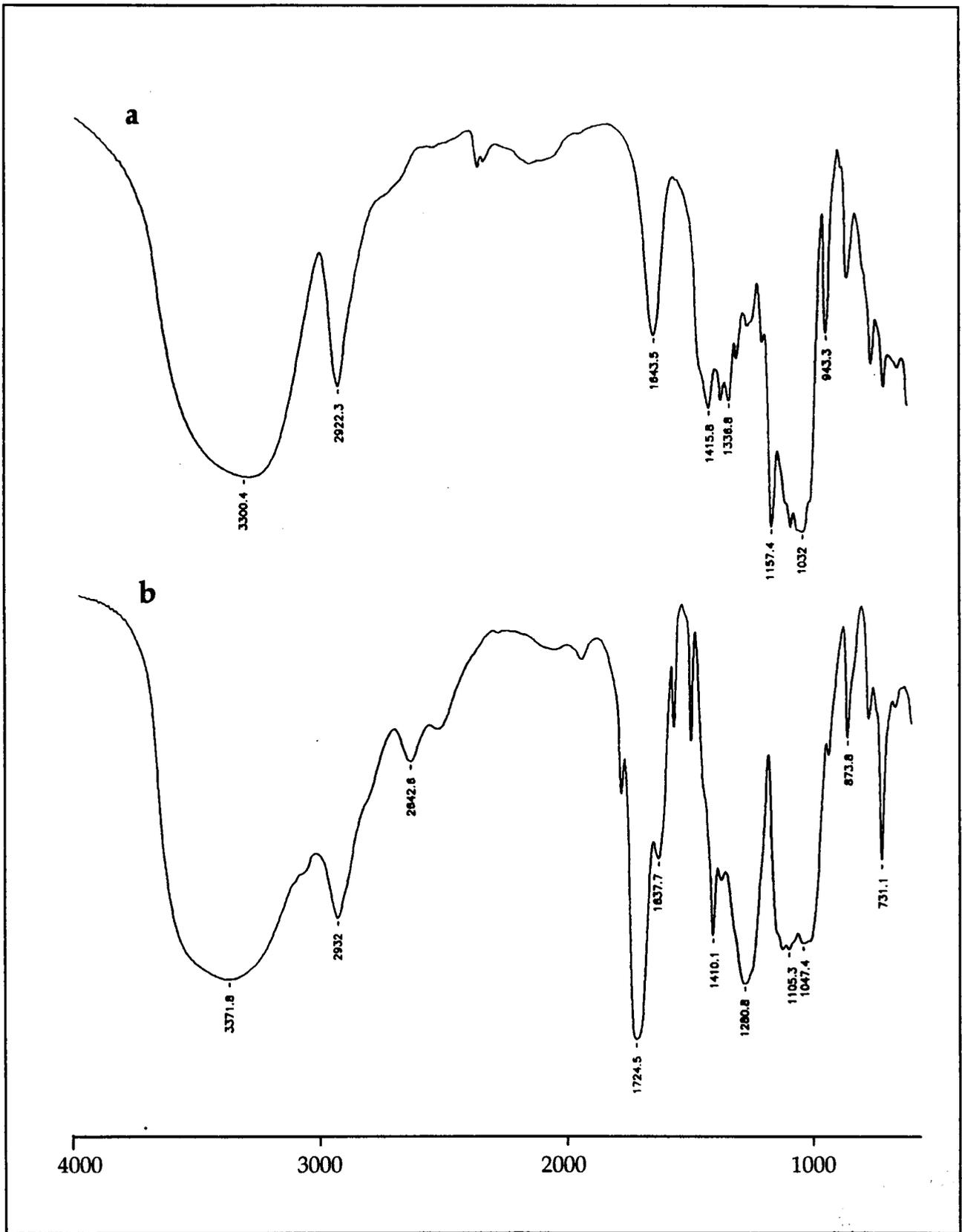


FIG.2

*[Handwritten signature and stamp]*

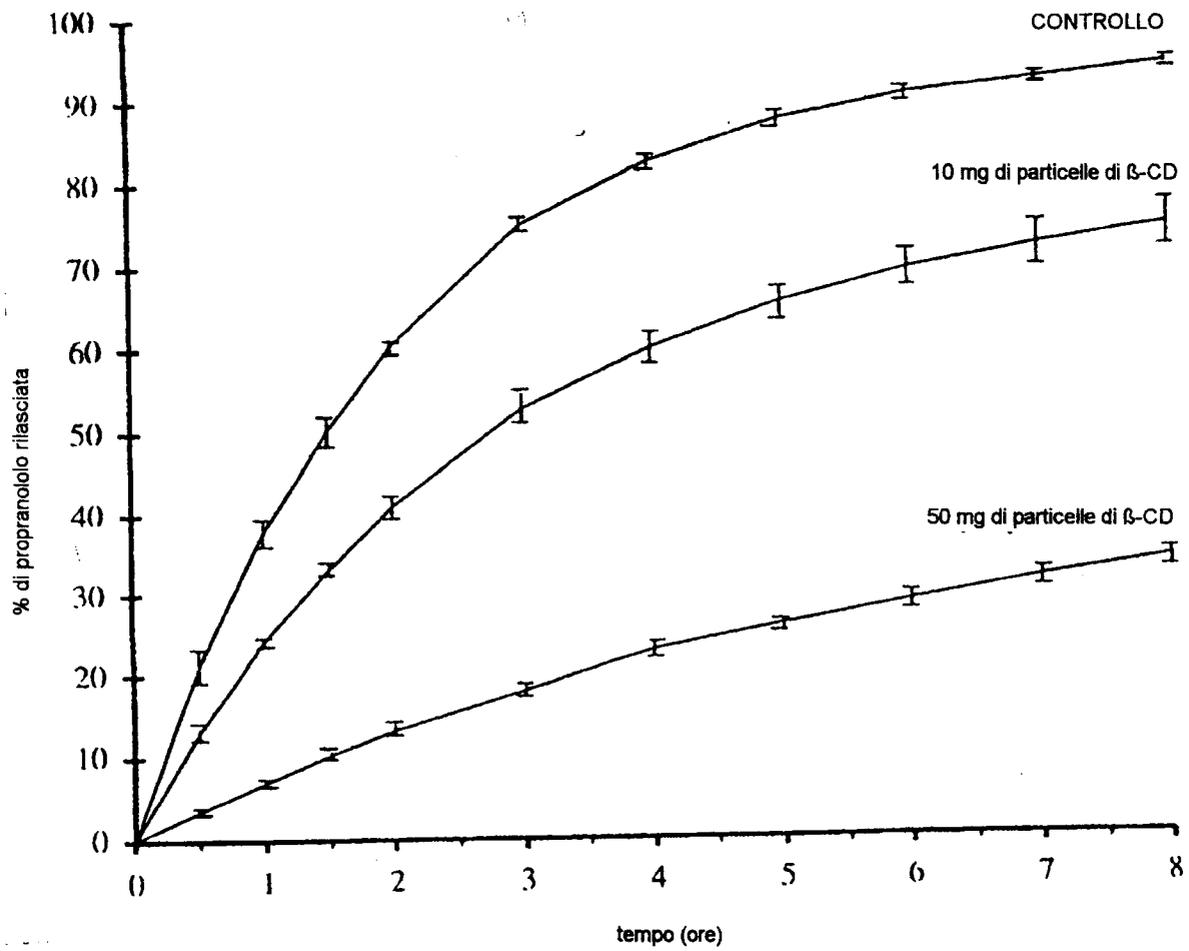


FIG.3

Per incarico di: COLETICA

Ing. Angelo GERBINO  
N. Iscriz. ALRO 488  
(in proprio e per gli altri)



TO 99A 000599

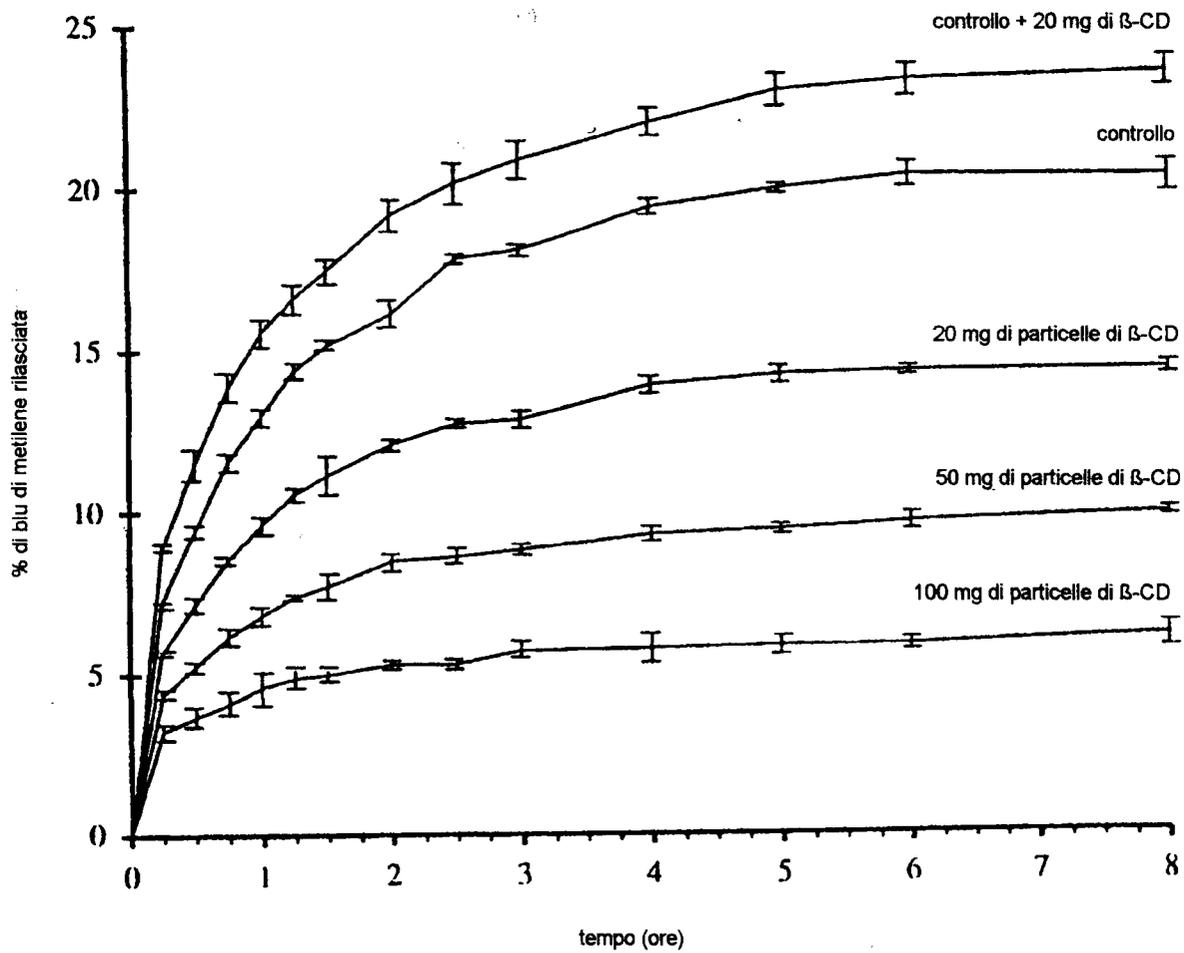


FIG.4

Per incarico di: COLETICA



Ing. Angelo GERBINO  
N. Iscriz. ALBO 488  
(a proprio e per gli altri)