



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

DOMANDA NUMERO	102007901530961
Data Deposito	11/06/2007
Data Pubblicazione	11/12/2008

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Titolo

VETTORI COLLOIDALI A STRUTTURA POLIAMMINOACIDICA PER IL RILASCIO ORALE DI PEPTIDI E PROTEINE E RELATIVO METODO DI PRODUZIONE.

DESCRIZIONE

a corredo di una domanda di brevetto per invenzione industriale avente per titolo:

"Vettori colloidali a struttura poliamminoacidica per il rilascio orale di peptidi e proteine e relativo metodo di produzione"

a nome: UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Inventori: Mariano LICCIARDI, Gaetano GIAMMONA, Gennara CAVALLARO, Giovanna PITARRESI

La presente invenzione riguarda vettori colloidali a struttura poliamminoacidica il rilascio orale di peptidi e proteine e il relativo metodo di produzione. Più in particolare, l'invenzione concerne sistemi di rilascio di principi attivi, in modo specifico peptidi e proteine, attraverso la loro incorporazione in nanoparticelle, nanoaggregati o complessi costituiti da poliamminoacidi sintetici opportunamente derivatizzati. Tali sistemi polimerici vengono proposti per rilasciare in maniera efficace farmaci peptidici e proteine da forme di dosaggio per la via orale, oltre che per aumentare la stabilità chimico-fisica di proteine in formulazioni farmaceutiche liquide e solide.

Come è noto, l'interesse nei confronti di peptidi e proteine ad attività terapeutica è cresciuto negli ultimi decenni in maniera estremamente significativa. Le ragioni di tale attenzione sono facilmente comprensibili: da un lato, la disponibilità di quantità sempre maggiori di peptidi e proteine, sia di origine naturale che di sintesi, e più comunemente di prodotti ottenuti con la tecnologia del DNA ricombinante, ha consenti-

to di superare, se pur con alcune riserve di carattere economico, le limitazioni quantitative del recente passato; dall'altro lato l'approfondimento delle conoscenze nell'ambito della biologia molecolare e delle biotecnologie farmaceutiche hanno dato input continui nell'identificare peptidi e proteine dotati di attività terapeutica in patologie di varia natura, tra cui anche tumori ed infezioni virali. I progressi biotecnologici sono stati peraltro, negli ultimi anni, ben supportati da successi in ambito tecnologico, nella progettazione e realizzazione di sistemi terapeutici in grado di veicolare in maniera sicura ed efficace i nuovi farmaci proteici.

La rilevanza dell'aspetto tecnologico e preformulativo è ben nota, dal momento che i farmaci proteici necessitano di un'attenzione particolare per le molteplici cause di instabilità sia di tipo fisico (denaturazione, aggregazione, adsorbimento su superfici) che chimico (deammidazione, ossidazione, racemizzazione, formazione di ponti disolfuro) che possono portare a diminuzione o a totale scomparsa dell'attività biologica.

Oltre alle limitazioni dovute all'instabilità di queste molecole, ulteriori problematiche scaturiscono dalla scelta di vie di somministrazione alternative a quella parenterale, che è in ogni caso a tutt'oggi la più praticata. Numerosi sono gli studi aventi come obiettivo la valutazione di forme di dosaggio non convenzionali che possano essere utili per la somministrazione di proteine per vie diverse da quella parenterale.

La via orale è la via di somministrazione che offre certamente i vantaggi più significativi, tra cui accuratezza di dosaggio, facilità di impiego ed elevata compliance da parte dei pazienti. Nonostante ciò, al-

cuni inconvenienti inerenti la somministrazione di peptidi e proteine per via orale sono di non facile soluzione. Oltre a dover tenere conto, infatti, degli eventuali fenomeni di instabilità chimica e fisica intrinseci alla molecola proteica, il transito attraverso il tratto gastrointestinale pone tali molecole a contatto con mezzi il cui pH e contenuto enzimatico risultano incompatibili con la loro permanenza in forma intatta in tale ambiente, e con il loro eventuale assorbimento. Per tali motivi la somministrazione per via orale potrebbe essere effettuata solo ricorrendo a forme gastroresistenti, e con l'eventuale co-somministrazione di inibitori enzymatici delle peptidasi.

Inoltre, bisogna tener conto del fatto che proteine e peptidi sono caratterizzati generalmente da un peso molecolare relativamente alto e da una discreta idrofilia e pertanto presentano limitata permeabilità attraverso le membrane cellulari e basso assorbimento.

È quindi di facile intuizione che, se pur estremamente interessante, la somministrazione per via orale di peptidi e proteine rappresenta ancora oggi un obiettivo di non facile realizzazione, nonostante la presenza di ampia ed autorevole letteratura, sia in termini di pubblicazioni scientifiche che di brevetti [rassegna in: des Rieux A., Fievez V., Grarinot M., Scheider Y-J., Préat V., Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach, *J. Control. Release* **116** (2006) 1-27].

Ad esempio, il brevetto US 5641515 (cessionaria Elan Corporation) descrive nanoparticelle biodegradabili per il rilascio controllato di insulina, che vengono proposte anche per la somministrazione orale di

questa proteina, convenzionalmente assunta dai pazienti diabetici più volte al giorno in forma di iniezione sottocutanea. Nella formulazione proposta dal brevetto citato, l'insulina è intrappolata all'interno di nanoparticelle di un policianoacrilato, attuando la polimerizzazione del monomero cianoacrilico di partenza in presenza di insulina, a basso pH.

È comunque una assunzione ampiamente condivisa che una possibile soluzione al problema di mettere a punto un efficiente sistema di rilascio per la somministrazione orale di principi attivi polipeptidici possa essere trovata nell'attenta combinazione tra sistemi terapeutici di differente natura chimica e di opportuna composizione.

Un approccio di rilevante interesse nella veicolazione di peptidi e proteine per via orale è rappresentato dall'impiego di carrier polimerici opportunamente derivatizzati, in cui la derivatizzazione è tale da conferire al sistema veicolante, da essi costituito, una serie di proprietà vantaggiose, tra cui la capacità di essere mucoadesivi e/o di essere essi stessi capaci di agire come inibitori delle proteasi [si veda, ad es., Valent C., Marschutz M.K., Egyed C., Bernkop-Schnurch A., Evaluation of the inhibitory effect of thiolated poly(acrylates) on vaginal membrane bound aminopeptidase N, *J. Pharm. Pharmacol.* **54** (2001) 603–610.; Bernkop-Schnurch A., Thaler S.C., Polycarbophil–cysteine conjugates as platforms for oral polypeptide delivery systems, *J. Pharm. Sci.* **89** (2000) 901–909]. Un'altra proprietà che può essere conferita ai polimeri dalla derivatizzazione è la capacità di agire essi stessi come promotori di assorbimento [si veda, ad es., Clausen A.E., Bernkop-Schnurch A., In vitro evaluation of the permeation-enhancing effect of thiolated pol-

ycarbophil, *J. Pharm. Sci.* **89** (2000) 1253–1261; Kast C.E., Bernkop-Schnurch A., Influence of the molecular mass on the permeation enhancing effect of different poly(acrylates), *STP Pharma Sci.* **12** (2002) 351–356]. Simili vettori polimerici offrono pertanto il vantaggio di una minore degradazione del farmaco proteico da essi veicolato nel tratto gastrointestinale e di un maggiore assorbimento.

La mucoadesività di un polimero, cioè la sua capacità di aderire alle membrane mucose dell'organismo (e, in particolare, alla mucosa del tratto gastrointestinale) costituisce una proprietà importante nello sviluppo di sistemi di rilascio di farmaci, specie di natura peptidica, dal momento che grazie alle proprietà mucoadesive si può instaurare un intimo contatto tra il sistema di veicolazione e la mucosa, prevenendo la metabolizzazione presistemica dei peptidi durante l'assorbimento nel tratto gastrointestinale. Conseguentemente aumenterà anche il tempo di permanenza del farmaco nel sito di assorbimento, dove si formerà un gradiente di concentrazione tale da consentire la diffusione del farmaco.

Un esempio di questi polimeri mucoadesivi è rappresentato dai polimeri tiolati (tiomeri, o tiopolimeri), cioè polimeri alla cui struttura centrale (o “backbone” polimerico) sono legati gruppi tiolici, da utilizzare quali eccipienti nella composizione di forme orali solide [Bernkop-Schnurch A., Krauland A.H., Leitner V.M., Palmberger T., Thiomers: potential excipients for non-invasive peptide delivery systems, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **58** (2004), 253-263]. Tali polimeri, tra cui la rassegna da ultimo citata menziona, ad esempio, chitosan-cisteina, polycarbophil-cisteamina, acido poliacrilico-omocisteina, presentano forti proprietà

mucocadesive grazie all'instaurarsi di legami covalenti (ponti S-S) tra i gruppi tiolici del polimero e i domini ricchi in cisteina delle glicoproteine di cui il muco è costituito. Non meno importanti sono i legami covalenti che si formano anche tra gli stessi tiomeri. Tale fenomeno, che porta alla diminuzione di gruppi tiolici liberi rispetto a quelli totali, comporta un aumento di viscosità del mezzo in cui essi sono dispersi. Questa ulteriore proprietà dei polimeri tiolati, ovvero la capacità di dare origine a ponti S-S, inter- e intramolecolari, può essere sfruttata positivamente, qualora essi vengano impiegati come eccipienti per la formazione di compresse [Bernkop-Schnurch A., Kast C.E, Richter M.F., Improvement in the mucochesive properties of alginate by the covalent attachment of cysteine, *J. Control. Release* **71** (2001) 277–285]. Infatti, il tempo di disintegrazione di tali compresse può essere prolungato notevolmente rispetto a quello osservato utilizzando lo stesso eccipiente non tiolato; ciò poiché i ponti disolfuro intercatena che si formano conferiscono alta stabilità al sistema farmaco–carrier a base di tiomeri e incrementano la viscosità del mezzo.

D'altro canto, sia polimeri ionici che neutri possono presentare la proprietà di interagire con molecole proteiche, formando aggregati macromolecolari: i primi, attraverso la formazione di legami a idrogeno, interazioni di van der Waal's ed elettrostatiche con i gruppi funzionali polari delle proteine; i secondi per l'instaurarsi prevalentemente di interazioni di natura idrofobica. La presenza di porzioni idrofobiche in un polimero può inoltre favorire la formazione di interazioni di natura idrofobica con le porzioni lipofile delle membrane biologiche, incrementan-

do in questo modo la permeabilità del complesso polimero-proteina.

Con riferimento a sistemi di rilascio proposti per la veicolazione di principi attivi preferibilmente di tipo peptidico e proteico in cui la catena polimerica centrale è derivatizzata con gruppi idrofobi e ionizzabili, il Brevetto europeo EP 0734720 (Flamel Technologies), corrispondente al brevetto US 5904936, descrive (micro)particelle di rilascio di tipo poliamminoacidico, basate su α -amminoacidi e ottenute per polimerizzazione a blocchi o statistica di due tipi diversi di α -amminoacidi: un tipo idrofobico o neutro (come Leu, Val, Ala, Pro, Phe) e un tipo avente una catena laterale ionizzabile (come acido aspartico e acido glutammico). In modo specifico, i polimeri poliamminoacidici preferiti descritti nel documento sono del tipo poli(Leu/Glu), con rapporto Leu/(Glu+Leu) non inferiore al 6% se si tratta di poliamminoacidi a blocchi, e non inferiore al 20% se si tratta di poliamminoacidi statistici, e peso molecolare non inferiore a 4000 Da. In pratica, negli esempi preferiti qui riferiti, la frazione di leucina deve essere sufficientemente alta da impedire che il polimero sia completamente solubile in acqua e fornire opportune proprietà idrofobiche, in modo che le catene polimeriche possano associarsi a formare sistemi nanoparticellari. Le particelle formatesi costituiscono una dispersione colloidale in mezzo acquoso, che può essere poi caricata con il principio attivo peptidico da veicolare. In alternativa, le particelle contenenti il principio attivo possono essere ottenute disperdendo direttamente gli α -poliamminoacidi nella soluzione di principio attivo, prima dell'aggregazione.

Come ulteriore evoluzione del sistema citato, il Brevetto euro-

peo EP 1131056 (Flamel Technologies), corrispondente al brevetto US 6630171, descrive un analogo sistema di rilascio, che è poi stato denominato “Medusa[®]” verosimilmente per richiamare il meccanismo d’azione dei vettori polimerici nell’incorporare i principi attivi polipeptidici, ovvero la loro capacità di interagire con il principio attivo e di “avvolgerlo” proteggendolo da fenomeni di degradazione e veicolandolo sotto forma di particella (nano- o micro-) fino al sito d’azione. In tale sistema i vettori poliamminoacidici che costituiscono la catena polimerica principale delle particelle sono costituiti da omopolimeri o copolimeri di acido glutammico (AcGlu) e/o acido aspartico (AcAsp) e loro sali (amminoacidi ricorrenti, entrambi del tipo ionizzabile), e una certa percentuale di essi porta una catena idrofobica laterale, legata alla funzione carbossilica di AcGlu o AcAsp attraverso legami esterei (o ammidici). La lunghezza della catena polimerica è variabile tra 200 e 1000 amminoacidi, che si traduce in un peso molecolare di 26000-65000 nell’ipotesi di un omopolimero di AcGlu e di 23000-57000 nell’ipotesi di un omopolimero di AcAsp.

I raggruppamenti idrofobi (R) legati al backbone polimerico possono essere catene carboniose lineari o ramificate o contenere doppi legami, e preferibilmente sono gruppi lineari C₂-C₁₈. La percentuale in moli di amminoacidi ricorrenti derivatizzati con funzioni idrofobe è variabile tra il 3 e il 70 %. Alcuni esempi di polimeri derivatizzati descritti nel brevetto sono: poliglutammato di sodio-bloc-glutammato di metile; poliglutammato di sodio-bloc-glutammato di esadecile; poliglutammato di sodio-co-glutammato di etile; poliaspartato di sodio-bloc-

aspartato di propile; poliaspartato di sodio-bloc-aspartato di benzile.

La preparazione delle particelle di rilascio a partire dai polimeri sopra descritti avviene sostanzialmente facendo diminuire la solubilità della frazione idrofoba, per aggiunta di soluzione salina, in modo tale che ciò induca la precipitazione del polimero formando delle particelle (nano). Per aumentare la dimensione delle particelle ed ottenere micro-particelle è prevista, nella preparazione della sospensione, una fase supplementare di aggregazione, con l'aiuto di un agente aggregante, come un sale, acido, base o un polimero ionico (polisina, polietilenimmina). Come nel caso precedente, le particelle possono essere caricate con il principio attivo proteico realizzando la formazione delle stesse direttamente in un mezzo contenente il principio attivo oppure per dispersione ed incubazione delle particelle vuote già formate, liofilizzate, in un mezzo contenente il principio attivo disciolto o disperso.

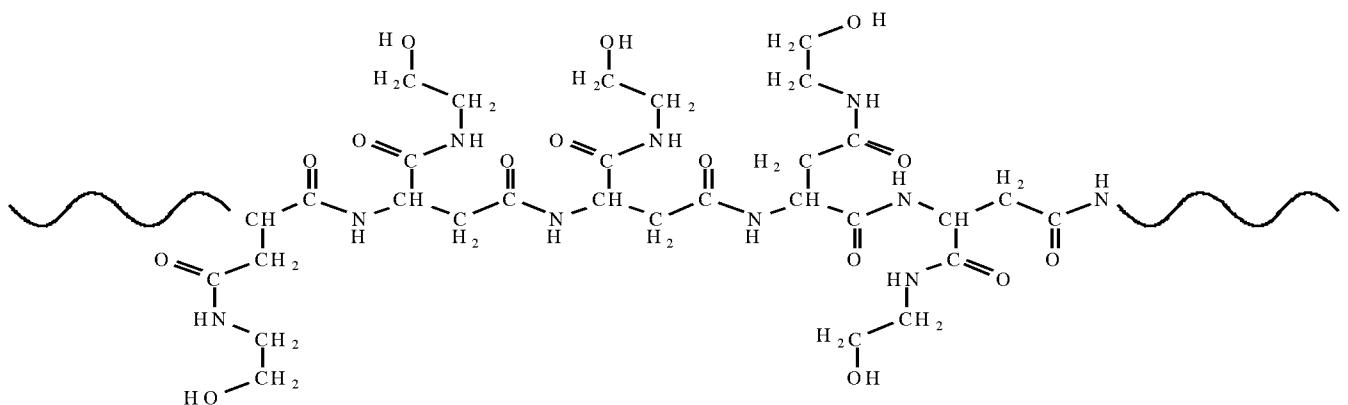
Alla luce di quanto precede, obiettivo principale dell'invenzione è quindi quello di aumentare la biodiponibilità orale di farmaci peptidici e proteine, come ad esempio l'insulina, sfruttando la capacità dei copolimeri carrier di interagire con le molecole proteiche, di ridurne la degradazione ad opera degli enzimi digestivi e del pH gastrico e di favorirne l'assorbimento.

Un ulteriore obiettivo della presente invenzione è quello di utilizzare i copolimeri proposti come eccipienti nella produzione di formulazioni farmaceutiche sia liquide che solide, contenenti molecole peptidiche o proteine al fine di prolungarne la stabilità nel tempo sia nella formulazione stessa che in ambiente fisiologico.

Come già notato, è evidente che per migliorare le prestazioni dei sistemi di rilascio di principi attivi peptidici o proteici basati su vettori polimerici colloidali (sia nel senso di aumentare la biodisponibilità di proteine dopo somministrazione per via orale, sia nel senso di aumentare la stabilità chimico-fisica di proteine in formulazioni farmaceutiche liquide e solide) appare necessario combinare su uno stesso polimero funzioni chimiche diverse, ognuna delle quali sia dotata di proprietà tecnologiche specifiche. In tal modo si può cercare di ottimizzare e modulare le proprietà favorevoli di polimeri biocompatibili per il loro impiego nella realizzazione di sistemi farmaceutici per il rilascio di peptidi e proteine, anche per la via orale.

A tale scopo la presente invenzione propone di utilizzare, per la realizzazione di vettori polimerici utili come carrier per principi attivi di tipo polipeptidico, particolari strutture polimeriche di tipo poliaspartamidico, a cui siano collegate come catene laterali sia funzioni idrofobiche che funzioni ionizzabili e tioliche, ciascuna singolarmente o in combinazione tra loro. In particolare, l'approccio utilizzato nella presente invenzione è stato quello di sintetizzare copolimeri a base di poliidrossietil-aspartammide o PHEA, più propriamente **α,β poli(**N-2-idrossietil)-D,L-aspartammide**, avente la seguente formula di struttura**

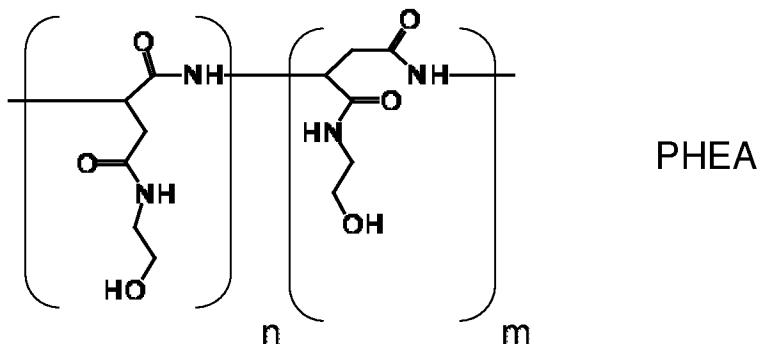
(segue formula)



o suoi copolimeri, che presentano nelle catene laterali, legate covalentemente attraverso la funzione ossidrilica che è presente in questi polimeri in ragione di una per ogni unità monomerica di partenza, funzioni idrofobiche, ionizzabili e tioliche. I copolimeri così formati sono capaci di formare sistemi farmaceutici per il rilascio di peptidi e proteine attraverso la loro incorporazione in nanoparticelle o nanoaggregati o complessi, costituiti appunto dall'interazione tra i copolimeri stessi e le proteine di interesse.

Come è noto, il PHEA è un derivato di una polisuccinimmide (PSI) ad alto peso molecolare ottenuto per amminolisi di quest'ultima, mediante reazione con etanolammina. Come si può rilevare nella formula di struttura che precede ed è più evidente in quella che segue, che rappresenta in una diversa forma grafica lo stesso polimero, a causa della struttura ciclica della polisuccinimmide di partenza, l'attacco dell'etanolammina può avvenire in modo da lasciare indifferentemente un gruppo metilenico nel corpo della catena principale oppure nel gruppo funzionale pendente. Pertanto, l'unità ripetitiva può avere una struttura

tura leggermente diversa nell'uno o nell'altro caso, pur avendo sempre lo stesso peso molecolare.



È noto che il PHEA è un polimero che possiede eccellenti proprietà biofarmaceutiche, in termini di biocompatibilità, tanto che è stato proposto in passato come plasma expander [Neri P., Antoni G., Benvenuti F., Cocola F., Gazzei G., Synthesis of α,β -poly[(2-hydroxyethyl)-DL-aspartamide], a new plasma expander, *J. Med. Chem.*, **16** (1973) 893-897; Antoni G., Arezzini G., Cocola F., Gazzei G., Neri P., Pharmacological and toxicological evaluation of poly-hydroxyethylaspartamide (PHEA) as a plasma substitute, *Il farmaco* **34** (1978) 146-156]. Il polimero è anche caratterizzato da una ottima reattività, dal momento che è dotato in catena laterale di gruppi ossidrilici.

La tecnologia proposta con la presente invenzione consiste nella incorporazione di molecole proteiche in nanoparticelle, nanoaggregati o complessi costituiti da poliamminoacidi lineari sintetici, in modo specifico del tipo delle poliaspartammidi, opportunamente derivatizzati con gruppi tiolici, idrofobi e ionizzabili. L'opportuna combinazione di queste funzioni in catena laterale al copolimero conferisce a quest'ultimo le proprietà di interagire con la proteina di interesse, attraverso interazioni

non covalenti di tipo idrofobico, elettrostatico e legami idrogeno, e di formare sistemi supramolecolari di dimensioni colloidali, dotati di elevata stabilità cinetica e mucoadesività, nonché di tutte le proprietà favorevoli dei tiomeri, quali la capacità di agire come inibitori delle proteasi e come promotori di assorbimento.

Oltre al PHEA, altri polimeri a struttura poliaspartammidica con gruppi nucleofili pendenti lungo la catena possono essere ugualmente utilizzati e opportunamente derivatizzati con funzioni idrofobiche, ionizzabili e tioliche, in modo tale da dare composizioni e materiali secondo l'invenzione, di volta in volta dotati di specifici requisiti.

Forma pertanto oggetto specifico della presente invenzione un vettore polimerico colloidale per la veicolazione e il rilascio di peptidi e proteine, in forma di nanoparticelle, aggregati o complessi, costituito da un polimero o copolimero a struttura poliaspartammidica portante in catena laterale, ciascuna singolarmente o in combinazione tra loro, funzioni idrofobiche, funzioni ionizzabili e funzioni tioliche.

I vettori polimerici proposti sono ottenuti a partire da macromolecole a struttura portante polipeptidica (in modo specifico, poliaspartammidica) aventi gruppi nucleofili in ragione di uno ogni unità ripetitiva della catena, e loro copolimeri. A tali gruppi nucleofili vengono legate covalentemente le fuzioni prima riportate, che nell'ambito della stessa macromolecola, sono sia di tipo idrofobico, sia di tipo ionizzabile sia di tipo tiolico, laddove ciascuna di dette funzioni può essere collegata al backbone polimerico individualmente oppure in combinazione con altre diverse di tali funzioni.

Preferibilmente, secondo l'invenzione, detto polimero o copolimero a struttura poliaspartammidica è l'alfa,beta-poli(N-2-idrossietil)aspartammide (PHEA, e i suoi copolimeri, portante in catena laterale funzioni idrofobiche, ionizzabili e tioliche, legate ai gruppi ossidrilici del polimero di partenza attraverso legami ammidici, enamminici, uretanici o esterei), a seconda del tipo di gruppo coniugato.

La lunghezza della catena poliamminoacidica è preferibilmente tale che il peso molecolare è compreso tra 10.000 e 60.000 dalton. Nel caso preferito del PHEA, ciò equivale ad un numero di unità ripetitive di idrossietil-aspartammide, compreso tra 63 e 315 unità.

I raggruppamenti idrofobici legati al backbone polimerico possono essere scelti, preferibilmente, dal gruppo consistente in: alchile lineare, ramificato o ciclico con fino a 18 atomi di carbonio, alchenile lineare, ramificato o ciclico con fino a 18 atomi di carbonio, alchinile lineare, ramificato o ciclico con fino a 18 atomi di carbonio, un gruppo aromatico o aralchilico isociclico con fino a 18 atomi di carbonio. Secondo alcune forme di realizzazione specifiche dell'invenzione, detti gruppi idrofobici sono scelti tra gruppi etilici (C_2), propilici (C_3), butilici (C_4), do-decilici (C_{12}) o esadecilici (C_{16}) lineari, gruppi propilici (C_3), butilici (C_4), dodecilici (C_{12}) o esadecilici (C_{16}) ramificati o contenenti doppi legami e gruppi aromatici. Il rapporto molare tra le moli di molecole portanti il gruppo idrofobico e le moli di unità ripetitive di polimero è preferibilmente compreso tra 0,01 e 0,6.

Le funzioni ionizzabili che preferibilmente sono legate alla struttura poliaspartammidica dell'invenzione sono costituite da gruppi alchili-

ci, alchenilici o alchiniclici lineari o ramificati con numero di atomi di carbonio compreso tra 2 e 20, portanti funzioni carbossiliche (-COOH); gruppi portanti funzioni fosforiche (-PO₃H₂), come o-fosfocolamina; funzioni solforiche (-SO₄H) o solfoniche (-SO₃H) come taurina; funzioni amminiche primarie (-NH₂), amminiche secondarie (-NHR) o amminiche terziarie (-NR'R'') o sali di ammonio quaternario [-⁺N(R)₃]. Il rapporto molare tra le moli di molecole portanti il gruppo ionizzabile e le moli di unità ripetitive di polimero è compreso tra 0,01 e 0,6.

Le funzioni tioliche legate al backbone polimerico possono essere derivate da molecole tiolate come cisteina, omocisteina, cisteamina e loro derivati (preferibilmente cisteina). Il rapporto molare tra le moli di molecole portanti il gruppo tilico e le moli di unità ripetitive di polimero è compreso tra 0,01 e 0,5.

Secondo una forma di realizzazione preferita dell'invenzione, il vettore polimerico colloidale, recante sulla catena poliaspartammidica funzioni idrofobiche di tipo alchilico lineare, funzioni ionizzanili di tipo carbossilico e funzioni tioliche derivate dalla cisteina, è costituito dal polimero (α,β -poli(N-2-idrossietil)-co-[N-2-(butilcarbammato)etilen]-co-[N-2(2'carbossisuccinil)etilen]-co-[N-2-(2'-L-cistein-succinilam-mide)etilen]aspartammide). Tale polimero è stato denominato sinteticamente PHEA-C₄-CS-Cist.

La preparazione di alcuni dei suddetti copolimeri può essere effettuata attraverso una serie di reazioni successive che consentono di legare ai gruppi ossidrilici del polimero poliaspartammidico di partenza, in sequenza, le seguenti molecole:

- gruppi idrofobici
- gruppi con funzioni ionizzabili;
- gruppi portanti funzioni tioliche.

Secondo un suo ulteriore aspetto, pertanto, la presente invenzione ha ad oggetto un procedimento per la produzione di vettori polimerici colloidali come sopra definiti, comprendente le seguenti operazioni in successione:

- a) attivazione dei gruppi reattivi di un polimero a struttura poliaspartammidica di partenza con agenti attivanti;
- b) reazione del polimero così attivato con ammine corrispondenti a dette funzioni idrofobiche desiderate nelle catene laterali, utilizzando un rapporto molare tra moli di ammina e moli di unità ripetitive di polimero compreso tra 0,01 e 0,6;
- c) coniugazione del polimero ottenuto dall'operazione precedente con molecole portanti dette funzioni ionizzabili, utilizzando un rapporto tra moli di molecole portanti le funzioni ionizzabili e moli di unità ripetitive di polimero compreso tra 0,01 e 0,6;
- d) coniugazione del polimero ottenuto dall'operazione precedente con molecole portanti dette funzioni tioliche, in presenza di agenti attivanti, utilizzando un rapporto tra moli di molecole portanti le funzioni tioliche e moli di unità ripetitive di polimero compreso tra 0,1 e 0,5.

Preferibilmente, come notato, il polimero a struttura poliaspartammidica di partenza è alfa,beta-poli(N-2-idrossietil)aspartammide o PHEA.

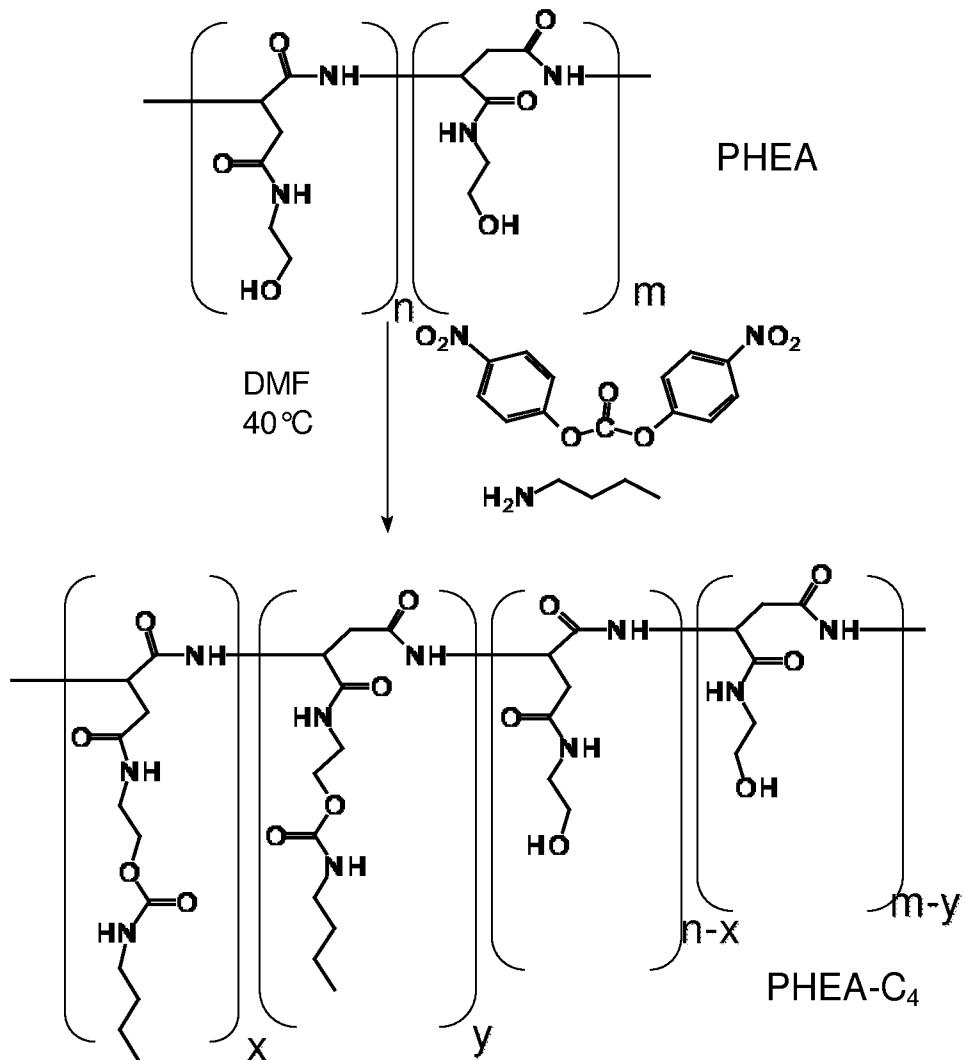
Secondo alcune soluzioni preferite per la metodica sintetica dell'invenzione, gli agenti attivanti dell'operazione a) sono costituiti da bis(4-nitrofenil)carbonato (4-NPBC) in soluzione di dimetilformammide (DMF), e detta operazione è condotta a temperatura costante, compresa tra 25 e 60°C. Preferibilmente, inoltre, gli agenti attivanti dell'operazione d) sono costituiti da N-idrossisuccinimmide (NHS) e N-3(3-dimetilamminopropil)-N-etil-carbodiimmide cloridrato (EDC-HCl) in soluzione aquosa, e detta operazione è condotta a temperatura compresa tra 15 e 40°C.

In un caso specifico riportato a titolo illustrativo, ai gruppi ossidrilici del polimero poliaspartammidico di partenza sono stati legati, in successione:

- una catena alifatica a quattro atomi di carbonio (C₄) (ottenendo il copolimero che è stato denominato PHEA-C₄);
- gruppi succinici (ottenendo il copolimero che è stato denominato PHEA-C₄-CS);
- molecole portanti gruppi tiolici quali la cisteina (ottenendo il copolimero denominato PHEA-C₄-CS-Cist).

Nel primo step della sintesi, i gruppi ossidrilici del PHEA sono stati attivati mediante reazione con bis(4-nitrofenil)carbonato (4-NPBC) in soluzione di dimetilformammide (DMF), a temperatura costante (preferibilmente tra 25 e 60°C). Di seguito la reazione con butilammina, utilizzando un rapporto molare tra moli di butilammina e moli di unità ripetitive di PHEA compreso tra 0,01 e 0,6, ha permesso di derivatizzare il polimero con gruppi butilici in catena laterale, ottenendo il copolimero

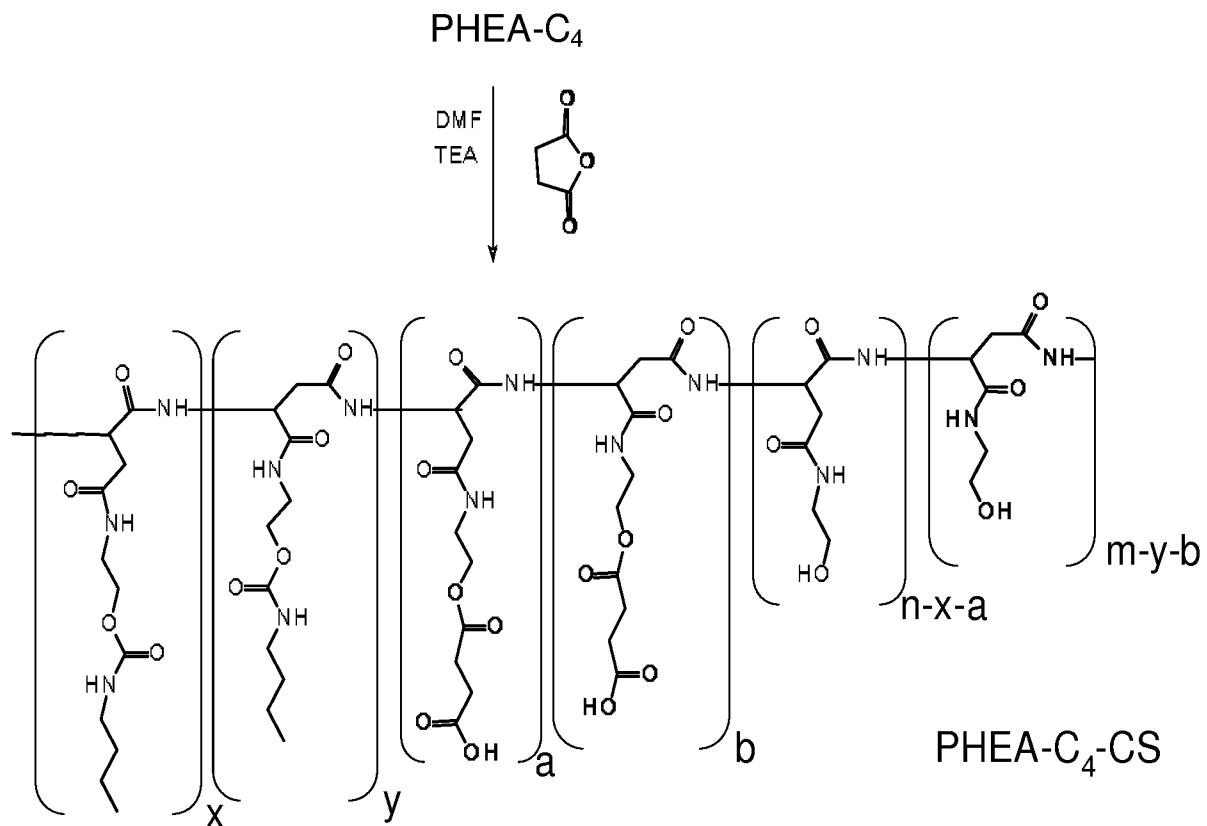
PHEA-C₄ (α,β -poli(N-2-idrossietil)-co-[N-2-(butilcarbammato)etilen]-aspartammide)



L'introduzione delle catene butilamminiche nel backbone polimerico del PHEA è stata confermata mediante analisi ¹H-NMR e FT-IR del polimero PHEA-C₄ dopo purificazione con dialisi esaustiva contro acqua distillata e liofilizzazione. La percentuale di funzioni alchilammine che legate nel copolimero PHEA-C₄ (espressa come numero di moli di butilammina legata/numero di moli di unità ripetitive del polimero x 100), determinata tramite ¹H-NMR, è variabile e può essere compresa tra l'1% e il 60% in moli (preferibilmente il 15-20 %).

Il peso molecolare medio del derivato PHEA-C₄, determinato tramite cromatografia ad esclusione molecolare (SEC) è compreso tra 30 e 50 kDa, a seconda del grado di derivatizzazione, rispetto ad una calibrazione effettuata con standard molecolari di PEO/PEG.

Nel secondo step della sintesi, il copolimero PHEA-C₄, ottenuto come precedentemente descritto, è stato posto a reagire in soluzione di DMF con anidride succinica (AS) in presenza di trietilammina (TEA) per un tempo compreso tra 4 e 24 ore, a seconda del rapporto tra moli di AS e moli di unità ripetitive del PHEA, e a temperatura costante, preferibilmente tra 15 e 40 °C. Il rapporto tra moli di AS e le moli di unità ripetitive del PHEA può essere compreso tra 0,01 e 0,6. In tali condizioni i gruppi ossidrilici ancora liberi del PHEA-C₄ reagiscono facilmente con l'anidride, secondo lo schema di seguito riportato.



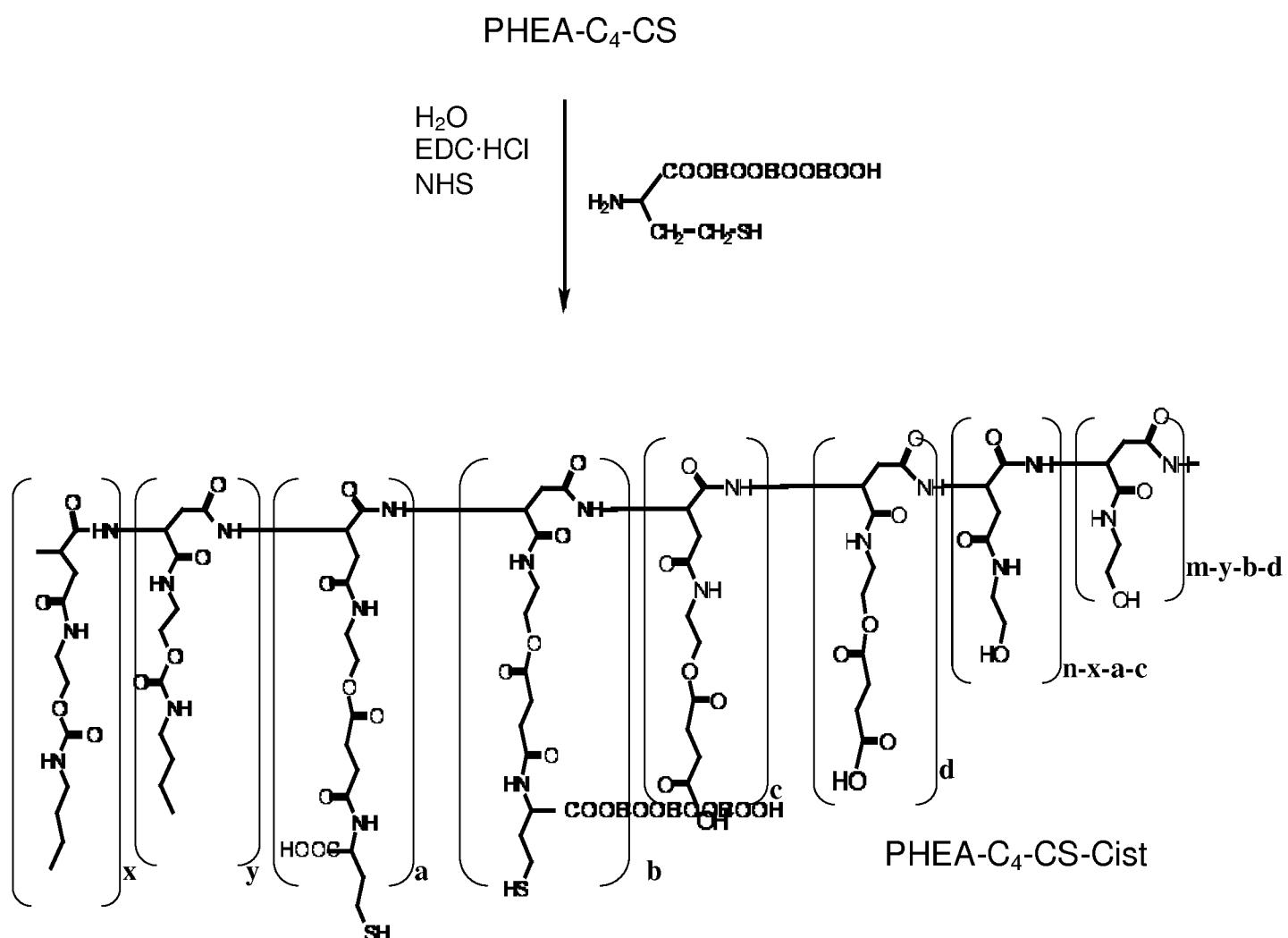
Dopo purificazione, tramite dialisi esaustiva contro acqua distillata, il copolimero PHEA-C₄-CS (**α,β -poli(N-2-idrossietil)-co-[N-2-(butilcarbammato)etilen]-co-[N-2(2'carbossisuccinil)etilen]-aspartammide**) ottenuto è stato caratterizzato tramite analisi FT-IR e ¹H-NMR. I dati spettroscopici confermano l'introduzione del gruppo succinico nel copolimero.

La percentuale di funzioni succiniche legate nel copolimero PHEA-C₄-CS (espressa come numero di moli di acido succinico legato/numero di moli di unità ripetitive del polimero x 100), determinata tramite ¹H-NMR, è variabile e può essere compresa tra l'1 e il 60% in moli (preferibilmente il 30-50 %).

Il peso molecolare medio del derivato PHEA-C₄-CS, determinato tramite cromatografia ad esclusione molecolare (SEC) è compreso tra 30 e 50 kDa, a seconda del grado di derivatizzazione, rispetto ad una calibrazione effettuata con standard molecolari di PEO/PEG.

Nel terzo step della sintesi, il copolimero PHEA-C₄-CS ottenuto come precedentemente descritto è stato fatto reagire in presenza degli attivanti N-idrossisuccinimmide (NHS) e N-3(3-dimetilamminopropil)-N-etyl-carbodiimmide cloridrato (EDC-HCl) in soluzione acquosa, per un tempo compreso tra 1 e 18 ore, a seconda del rapporto tra moli di cisteina e le moli di acido succinico legate al PHEA, a temperatura costante, preferibilmente tra 15 e 40°C. Il rapporto tra moli di cisteina e le moli di acido succinico legate al PHEA può essere compreso tra 0,5 e 2, corrispondente a un rapporto molare tra le moli di molecole portanti il

gruppo tiolico e le moli di unità ripetitive di polimero di 0,1-0,8. In queste condizioni i gruppi amminici della cisteina reagiscono con i gruppi carbossilici delle catene succiniche del PHEA-C₄-CS dando origine al copolimero PHEA-C₄-CS-Cist (**(α,β-poli(N-2-idrossietil)-co-[N-2-(butilcarbamato)etilen]-co-[N-2(2'carbossisuccinil)etilen]-co-[N-2-(2'-L-cistein-succinilammide)etilen]aspartammide**).



Dopo purificazione, tramite dialisi esaustiva contro acqua, il copolimero PHEA-C₄-CS-Cist ottenuto è stato caratterizzato tramite analisi FT-IR e ¹H-NMR.

La percentuale di funzioni tioliche legate nel copolimero PHEA-C₄-CS-Cist (espresso come numero di moli di cisteina legata/numero di moli di unità ripetitive del polimero x 100), è stata determinata mediante saggio di Ellman, che permette di determinare il numero di funzioni tioliche (SH) e quindi la percentuale di molecole di cisteina legate al polimero. Tale percentuale può essere compresa tra l'1 e il 50% in moli (preferibilmente il 10% in moli rispetto alle unità ripetitive del PHEA ovvero di circa il 30% rispetto ai gruppi succinici).

Il peso molecolare medio del derivato PHEA-C₄-CS-Cist, determinato tramite cromatografia ad esclusione molecolare (SEC) è compreso tra 30 e 50 kDa, a seconda del grado di derivatizzazione, rispetto ad una calibrazione effettuata con standard molecolari di PEO/PEG.

Per tutti i copolimeri sintetizzati le rese sono state nel campo 94-100% rispetto al copolimero di partenza.

Secondo un suo ulteriore aspetto, l'invenzione ha ad oggetto i preparati farmaceutici che si ottengono caricando i vettori polimerici proposti con i principi attivi, preferibilmente ma non esclusivamente di natura peptidica. L'invenzione pertanto concerne una composizione farmaceutica per il rilascio di uno o più principi attivi, in modo specifico di natura peptidica o proteica, in forma di nanoparticelle, aggregati o complessi, in cui detti uno o più principi attivi sono veicolati in un vettore polimerico colloidale come sopra definito.

Vantaggiosamente, la composizione farmaceutica proposta può essere formulata per la somministrazione orale. Detti uno o più principi

attivi inclusi ne vettore polimerico colloidale secondo l'invenzione possono essere accompagnati, inoltre, da uno o più eccipienti farmaceutici accettabili per la somministrazione orale.

L'invenzione concerne, ulteriormente, composizioni farmaceutiche a base di o di uno o più principi attivi di natura peptidica o proteica come sopra definiti, comunque formulata in una forma di rilascio liquida o solida.

L'interazione tra i copolimeri oggetto dell'invenzione e le molecole proteiche da essi veicolate consente di proteggere queste ultime da fenomeni di degradazione sia enzimatica che chimica e di rilasciarle intatte nel sito di somministrazione, offrendo quindi il vantaggio di una minore degradazione del farmaco proteico e di un maggiore assorbimento.

I sistemi di rilascio polimerici secondo l'invenzione si sono mostrati in grado di aumentare la biodisponibilità orale dell'insulina, impiegata come proteina modello, e di indurre un abbassamento dei livelli plasmatici di glucosio nei ratti pari al 30% dell'effetto ipoglicemizzante osservabile dopo somministrazione sottocutanea dell'insulina. In più tali vettori non hanno evidenziato alcuna citotossicità cellulare *in vitro* e ottima tollerabilità *in vivo* sui modelli impiegati. Inoltre, i sistemi proposti si sono mostrati capaci di aumentare la stabilità chimica dell'insulina in presenza di enzimi proteolitici come l' α -chimotripsina e in mezzi mimanti i fluidi gastrointestinali.

L'impiego dei vettori secondo l'invenzione, pertanto, consente di aumentare la biodiponibilità orale di farmaci peptidici e proteine, co-

me ad esempio l'insulina, e di prolungare la stabilità di molecole peptidiche e proteine quando siano impiegati come eccipienti in formulazioni sia liquide che solide.

Le caratteristiche specifiche dell'invenzione, così come i vantaggi della stessa e le relative modalità operative, risulteranno più evidenti con riferimento alla descrizione dettagliata presentata a titolo meramente esemplificativo nel seguito, assieme ai risultati delle sperimentazioni effettuate su di essa e ai dati di confronto con la tecnica anteriore. Alcuni risultati sperimentali sono anche illustrati nei disegni allegati, in cui:

la Figura 1 mostra l'andamento della vitalità cellulare, valutata mediante MTS test, di cellule di epitelio intestinale umano dopo 24 ore di incubazione con concentrazioni crescenti (0,1, 0,5 e 1 mg/ml) dei copolimeri PHEA-C₄-CS e PHEA-C₄-CS-Cist;

la Figura 2 mostra l'andamento della trasmittanza in funzione del tempo dei campioni insulina, PHEA-C₄ e dei complessi insulina/PHEA-C₄ nei diversi rapporti in peso (1/1, 1/3, 1/6);

la Figura 3 mostra l'andamento della trasmittanza in funzione del tempo dei campioni insulina, PHEA-C₄-CS e dei complessi insulina/PHEA-C₄-CS nei diversi rapporti in peso (1/1, 1/3, 1/6);

la Figura 4 mostra l'andamento della trasmittanza in funzione del tempo dei campioni insulina, PHEA-C₄-CS-Cist e dei complessi insulina/PHEA-C₄-CS-Cist nei diversi rapporti in peso (1/1, 1/3, 1/6);

la Figura 5 rappresenta l'elettroforesi su gel di agarosio di insulina, PHEA-C₄/insulina, PHEA-C₄-CS/insulina, PHEA-C₄-CS-

Cist/insulina per confermare l'integrità della struttura della proteina complessata;

la **Figura 6** mostra la percentuale di insulina intatta rilasciata nel tempo dai complessi insulina/copolimero dopo incubazione in presenza di α -chimotripsina;

la **Figura 7** mostra la percentuale di insulina rilasciata dalle compresse contenenti i diversi sistemi insulina/copolimero in mezzo mimante i fluidi g.i. (pH 1, fino a 120 min, pH 6.8 da 121 a 360 min); e

la **Figura 8** mostra l'andamento dei livelli sierici di glucosio in ratti dopo somministrazione orale di capsule contenenti il complesso insulina/PHEA-C₄-CS (P1); l'insulina non complessata (insulina os); il copolimero (P1 os) e l'insulina per via sottocutanea (insulina sc) come controllo positivo.

I copolimeri oggetto della presente invenzione sono stati sottoposti a studi di biocompatibilità in vitro su cellule di epitelio intestinale umano al fine di valutare gli eventuali effetti citotossici mediante saggio all'MTS. Come mostrato nella **Figura 1** allegata, i dati di vitalità cellulare dopo 24 ore di incubazione con concentrazioni di copolimero di 0,1, 0,5 e 1 mg/ml non hanno mostrato alcun effetto citotossico sul modello cellulare impiegato.

A solo titolo di esempio vengono riportati nel seguito i risultati relativi ad una serie di copolimeri, utilizzati come vettori di proteine modello per gli studi di interazione e di rilascio orale. Allo scopo di valutare la possibilità di utilizzare i copolimeri sintetizzati come agenti per la veicolazione di proteine, e tra queste l'insulina, scelta come proteina mo-

dello, sono stati effettuati studi sull'interazione tra i copolimeri secondo l'invenzione e l'insulina:

- studi turbidimetrici; elettroforesi su gel d'agarosio, misure di light scattering e potenziale zeta.

Alcuni risultati sperimentali sono illustrati nelle figure indicate.

Gli studi turbidimetrici sono stati effettuati registrando le trasmissione, a 500 nm, dell'insulina, dei singoli copolimeri e dei complessi insulina/copolimero a diversi rapporti in peso insulina/copolimero, in tampone fosfato pH 7,4.

I sistemi insulina/PHEA-C₄ o insulina/PHEA-C₄-CS descritti e semplificativamente sopra mostrano una diminuzione della trasmittanza in funzione del tempo. Molto più marcato è questo fenomeno nel caso del complesso insulina/PHEA-C₄-CS-Cist, con una drastica diminuzione della trasmittanza in funzione del tempo (fino alle 24 ore) e in funzione del rapporto insulina/copolimero. I dati sono riportati come trasmittanza in funzione del tempo nelle **Figure 2, 3 e 4**.

In tutti i casi tale comportamento può essere spiegato ipotizzando la formazione di aggregati colloidali tra la proteina e i copolimeri che, per le loro dimensioni, risultano essere "opachi" al raggio di luce incidente rispetto ai singoli copolimeri e alla proteina nuda, anche se invisibili ad occhio nudo. Nel caso del copolimero PHEA-C₄-CS-Cist in particolare, sono coinvolti nella formazione degli aggregati oltre a legami fisici, quali interazioni di Van der Waals e idrofobiche, anche legami chimici, quali ponti S-S tra le stesse catene di copolimero.

Al fine di verificare l'integrità strutturale della proteina complessata è stata effettuata l'analisi elettroforetica su gel di agarosio dei complessi insulina/copolimeri. Nella **Figura 5** allegata è riportato che la corsa elettroforetica, condotta per 30 min a 150 V non ha mostrato variazioni della mobilità elettroforetica dell'insulina complessata con i copolimeri rispetto all'insulina nativa (controllo) e non si evidenziano inoltre ulteriori bande, indice di eventuale degradazione della proteina.

Si deduce pertanto che in seguito all'interazione della proteina con tutti i copolimeri, la struttura chimica della stessa, nonché quella secondaria e terziaria rimangono inalterate.

Sono state infine eseguite delle analisi di *light scattering* e misure del potenziale zeta in tampone fosfato a pH 7,4 in funzione del tempo, al fine di valutare il diametro idrodinamico dei complessi polimerici e ottenere informazioni sulla carica superficiale degli stessi complessi.

I complessi con PHEA-C₄ e PHEA-C₄-CS mostrano dimensioni minori rispetto all'insulina tal quale, suggerendo il verificarsi di fenomeni di compattazione della proteina grazie all'interazione con i copolimeri stessi. Tale comportamento sembra essere tempo dipendente per il copolimero PHEA-C₄-CS-Cist. Infatti, le dimensioni dei complessi diminuiscono nel tempo in modo molto marcato, probabilmente per l'instaurarsi di ponti S-S tra le catene degli stessi copolimeri. Tali risultati sono peraltro in accordo con quelli ricavati dagli studi turbidimetrici.

Le misure di potenziale zeta inoltre, mostrano una diminuzione del potenziale superficiale nei complessi, rispetto all'insulina nativa. Ciò

conferma un effetto schermante della carica superficiale presente sulla molecola di insulina in seguito alla complessazione con il copolimero.

Stabilità dei complessi proteina/copolimero in presenza di α-chimotripsina

La capacità dei copolimeri oggetto della presente invenzione di migliorare la stabilità di molecole proteiche nei confronti della degradazione nell'ambiente intestinale, è stata valutata incubando i complessi proteina/polimero precedentemente preparati e liofilizzati, in presenza di α -chimotripsina e determinando, ad intervalli di tempo regolari, la percentuale di proteina intatta nel mezzo di reazione.

Come mostrato nella **Figura 6**, i copolimeri oggetto dell'invenzione presentano un effetto di protezione riducendo la degradazione enzimatica dell'insulina in presenza di α -chimotripsina. Questo effetto di protezione è risultato crescente nell'ordine PHEA-C4 < PHEA-C₄-CS < PHEA-C₄-CS-Cist. In quest'ultimo caso, infatti, si osserva la presenza di insulina intatta fino a 140 minuti dall'inizio dell'incubazione con l'enzima. Al contrario l'insulina nativa subisce una degradazione completa in presenza di α -chimotripsina nell'arco di 40 minuti.

La differente entità dell'effetto di protezione dei copolimeri, nei confronti dell'insulina può essere spiegata considerando una diversa natura e forza delle interazioni tra l'insulina e i tre copolimeri, ovvero principalmente interazioni idrofobiche con il PHEA-C₄, interazioni idrofobiche e legami a idrogeno con il PHEA-C₄-CS; interazioni idrofobiche, legami a idrogeno e legami disolfuro con il PHEA-C₄-CS-Cist.

Studi di rilascio in vitro in fluidi gastrointestinali simulati

La possibilità di utilizzare i complessi proteina/copolimero come sistemi per il rilascio di proteine da forme di dosaggio solide (es. compresse), è stata valutata determinando il rilascio di proteine modello in funzione del tempo in un mezzo mimante l'ambiente gastro-intestinale.

A titolo di esempio si riportano i dati relativi ad una formulazione di compresse contenenti i complessi insulina/copolimero a rapporti in peso insulina/copolimero di 1/6, utilizzando come eccipienti amido di riso e silice microcristallina. I risultati mostrano un lento rilascio di insulina intatta dalle compresse contenenti i complessi insulina/copolimero. Come mostrato nella **Figura 7**, tale ritardo è particolarmente evidente nel caso dei complessi PHEA-C₄-CS/insulina e PHEA-C₄-CS-Cist/insulina.

Da questi dati si evince che i copolimeri sintetizzati sono in grado di controllare la velocità di rilascio dell'insulina dalle compresse, nonché la loro velocità di disaggregazione nei fluidi gastrointestinali simulati.

Inoltre si evidenzia un effetto del pH sulla velocità di liberazione dell'insulina relativamente ai complessi dell'insulina con i copolimeri PHEA-C₄-CS e PHEA-C₄-CS-Cist. Questi copolimeri, infatti, possedendo una certa quantità di gruppi carbossilici liberi, presentano una solubilità in mezzo acquoso che aumenta all'aumentare del pH. Nei complessi, questo comportamento porta a una più facile liberazione dell'insulina complessata al pH intestinale (pH 6,8); al contrario un rilascio e una degradazione trascurabili al pH gastrico (pH 1).

Studi di rilascio in vivo su ratti

La possibilità di utilizzare i complessi proteina/copolimero come sistemi per il rilascio di proteine da forme di dosaggio solide orali, è stata valutata determinando il rilascio di insulina, utilizzata come proteina modello, dopo somministrazione orale a ratti di capsule contenenti insulina complessata con i copolimeri oggetto della presente invenzione.

A titolo di esempio si riportano i dati relativi alla somministrazione orale di capsule di gelatina contenenti i complessi insulina/copolimero a rapporti in peso insulina/copolimero di 1/6, utilizzando come excipiente silice microcristallina.

Gli esperimenti in vivo sono stati condotti su ratti maschi in condizioni di salute ottimali, del peso medio di 250 g, tipo Wistar. Gli animali sono stati mantenuti a digiuno per una notte (circa 12 ore) in modo tale da presentare tutti livelli costanti di glucosio nel sangue. Prima della somministrazione ad ogni animale sono stati prelevati 5 µl di sangue dalla vena della coda e i livelli di glucosio immediatamente misurati utilizzando un lettore dei livelli di glucosio nel sangue tipo Comelab 20 sistema Thermo (GODPOD).

Gli animali sono stati suddivisi in 4 gruppi da 3, ciascun gruppo trattato separatamente con differenti forme di dosaggio, previa sedazione con α_2 Agonisti, Medetomidina (Domitor) al dosaggio suggerito dalla casa farmaceutica. Le diverse formulazioni sono state somministrate sotto forma di capsula da 0,13 ml, posizionata nella parte interna della gola per stimolare il riflesso di deglutizione.

Al primo gruppo (denominato P1 os) è stata somministrata la forma di dosaggio costituita soltanto dagli excipienti inerti e priva di in-

sulina, mentre al secondo gruppo (denominato insulina SC) è stata somministrata una soluzione fisiologica sterile contenente 2 mg (56 USP units) (~ 8 mg/kg) di insulina bovina (pancreas, Sigma) per via sottocutanea (controllo positivo). Al terzo gruppo (denominato insulina/P1 os) è stata somministrata la formulazione preparata con il complesso insulina/PHEA-C₄-CS, contenente 2 mg (56 USP units) (~ 8 mg/kg) di insulina bovina (pancreas, Sigma). Infine, all'ultimo gruppo (denominato insulina os) sono stati somministrati 200 µl di una soluzione acquosa controllo di insulina contenente 2 mg (56 USP units) (~ 8 mg/kg) di insulina bovina (pancreas, Sigma), sempre per via orale (controllo negativo).

Tutti i ratti sono stati mantenuti a digiuno per 12 ore, lasciando libero accesso all'acqua, durante i quali, ad intervalli di tempo di 1 ora e per 8 ore sono stati prelevati 5 µl di sangue dalla coda previa anestesia locale con Lidocaina al 2% in gel (LUAN) e monitorati immediatamente i livelli di glucosio nel sangue. Dopo 12 ore dalla somministrazione, tutti i ratti sono stati nutriti; si è proceduto quindi, dopo 24 ore complessive ad effettuare un ultimo prelievo e dosaggio della glicemia.

I risultati di tale studio sono riportati in **Figura 8**.

Gli studi hanno evidenziato che l'insulina complessata con i copolimeri descritti nella presente invenzione induce un effetto ipoglicemizzante che si protrae fino a 5 ore successive alla somministrazione orale del complesso nei ratti. Il dato è significativo, tenuto conto che l'insulina si degrada in ambiente gastrico entro due ore dalla somministrazione a parità di dose. Inoltre, l'abbassamento del livello glicemico è

pari ad almeno il 30% dell'effetto osservato dopo somministrazione dell'insulina per la via tradizionale (S.C.) a parità di tempo; questi risultati rendono il sistema proponibile anche per la somministrazione orale di insulina in pazienti diabetici.

La presente invenzione è stata descritta con riferimento ad alcune sue forme di realizzazione specifiche, ma è da intendersi che variazioni o modifiche potranno essere ad essa apportate dagli esperti nel ramo senza per questo uscire dal relativo ambito di protezione.

RIVENDICAZIONI

1. Vettore polimerico colloidale per la veicolazione e il rilascio di peptidi e proteine, in forma di nanoparticelle, aggregati o complessi, costituito da un polimero o copolimero a struttura poliaspartammidica portante in catena laterale, ciascuna singolarmente o in combinazione tra loro, funzioni idrofobiche e funzioni ionizzabili e funzioni tioliche.

2. Vettore polimerico secondo la rivendicazione 1, in cui detto polimero o copolimero a struttura poliaspartammidica è alfa,beta-poli(N-2-idrossietil)aspartammide (PHEA).

3. Vettore polimerico secondo le rivendicazioni 1 o 2, cui detto polimero o copolimero a struttura poliaspartammidica ha peso molecolare compreso tra 10.000 e 60.000 dalton.

4. Vettore polimerico secondo ognuna delle rivendicazioni 1-3, in cui dette funzioni idrofobiche sono scelte dal gruppo consistente in: alchile lineare, ramificato o ciclico con fino a 18 atomi di carbonio, alchenile lineare, ramificato o ciclico con fino a 18 atomi di carbonio, alchinile lineare, ramificato o ciclico con fino a 18 atomi di carbonio, un gruppo aromatico o aralchilico isociclico con fino a 18 atomi di carbonio.

5. Vettore polimerico secondo la rivendicazione 4, in cui dette funzioni idrofobiche sono scelte dal gruppo consistente in: gruppi etilici (C_2), propilici (C_3), butilici (C_4), dodecilici (C_{12}) o esadecilici (C_{16}) lineari, gruppi propilici (C_3), butilici (C_4), dodecilici (C_{12}) o esadecilici (C_{16}) ramificati o contenenti doppi legami e gruppi aromatici.

6. Vettore polimerico secondo ognuna delle rivendicazioni 1-5, in cui dette funzioni ionizzabili sono scelte dal gruppo consistente in:

gruppi alchilici, alchenilici o alchiniclici lineari o ramificati con 2-20 atomi di carbonio portanti funzioni carbossiliche (-COOH); gruppi portanti funzioni fosforiche (-PO₃H₂); gruppi portanti funzioni solforiche (-SO₄H) o sulfoniche (-SO₃H); gruppi portanti funzioni amminiche primarie (-NH₂), amminiche secondarie (-NHR) o amminiche terziarie (-NR'R'') o sali di ammonio quaternario [-⁺N(R)₃].

7. Vettore polimerico secondo ognuna delle rivendicazioni 1-6, in cui dette funzioni tioliche sono derivate da cisteina, omocisteina o cisteamina e loro derivati.

8. Vettore polimerico secondo la rivendicazione 7, costituito dal polimero (α,β -poli(N-2-idrossietil)-co-[N-2-(butilcarbammato)etilen]-co-[N-2(2'carbossisuccinil)etilen]-co-[N-2-(2'-L-cistein-succinilam-mide)etilen]aspartammide) (PHEA-C₄-CS-Cist).

9. Procedimento per la produzione di vettori polimerici colloidali come definiti nelle rivendicazioni 1-8, comprendente le seguenti operazioni in successione:

- a) attivazione dei gruppi reattivi di un polimero a struttura poliaspartammidica di partenza con agenti attivanti;
- b) reazione del polimero così attivato con ammine corrispondenti a dette funzioni idrofobiche desiderate nelle catene laterali, utilizzando un rapporto molare tra moli di ammina e moli di unità ripetitive di polimero compreso tra 0,01 e 0,6;
- c) coniugazione del polimero ottenuto dall'operazione precedente con molecole portanti dette funzioni ionizzabili, utilizzando un rapporto tra moli di molecole portanti le funzioni ionizzabili e moli

di unità ripetitive di polimero compreso tra 0,01 e 0,6;

d) coniugazione del polimero ottenuto dall'operazione precedente con molecole portanti dette funzioni tioliche, in presenza di agenti attivanti, utilizzando un rapporto tra moli di molecole portanti le funzioni tioliche e moli di unità ripetitive di polimero compreso tra 0,1 e 0,5.

10. Procedimento secondo la rivendicazione 9, in cui detto polimero a struttura poliaspartammidica di partenza è alfa,beta-poli(N-2-idrossietil)aspartammide (PHEA).

11. Procedimento secondo le rivendicazioni 9 o 10, in cui detti agenti attivanti dell'operazione a) sono costituiti da bis(4-nitrofenil)carbonato (4-NPBC) in soluzione di dimetilformammide (DMF), e detta operazione è condotta a temperatura costante, compresa tra 25 e 60 °C.

12. Procedimento secondo ognuna delle rivendicazioni 9-11, in cui detti agenti attivanti dell'operazione d) sono costituiti da N-idrossisuccinimmide (NHS) e N-3(3-dimetilamminopropil)-N-etil-carbodiimmide cloridrato (EDC-HCl) in soluzione acquosa e detta operazione è condotta a temperatura compresa tra 15 e 40 °C.

13. Composizione farmaceutica per il rilascio di uno o più principi attivi, in forma di nanoparticelle, aggregati o complessi, in cui detti uno o più principi attivi sono veicolati in un vettore polimerico colloidale come definito nelle rivendicazioni 1-8.

14. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 13, in cui detti principi attivi sono di natura peptidica o proteica.

15. Composizione farmaceutica secondo le rivendicazioni 13 o 14, formulata per la somministrazione orale.

16. Composizione secondo la rivendicazione 15, cui detti uno o più principi attivi sono inclusi in detto vettore polimerico colloidale, comprendente inoltre uno o più eccipienti farmaceutici accettabili per la somministrazione orale.

17. Composizione farmaceutica per il rilascio di uno o più principi attivi di natura peptidica o proteica secondo le rivendicazioni 13 o 14, formulata in una forma di rilascio liquida o solida.

ROMA, 11 Giugno 2007

p.p.: UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

MB

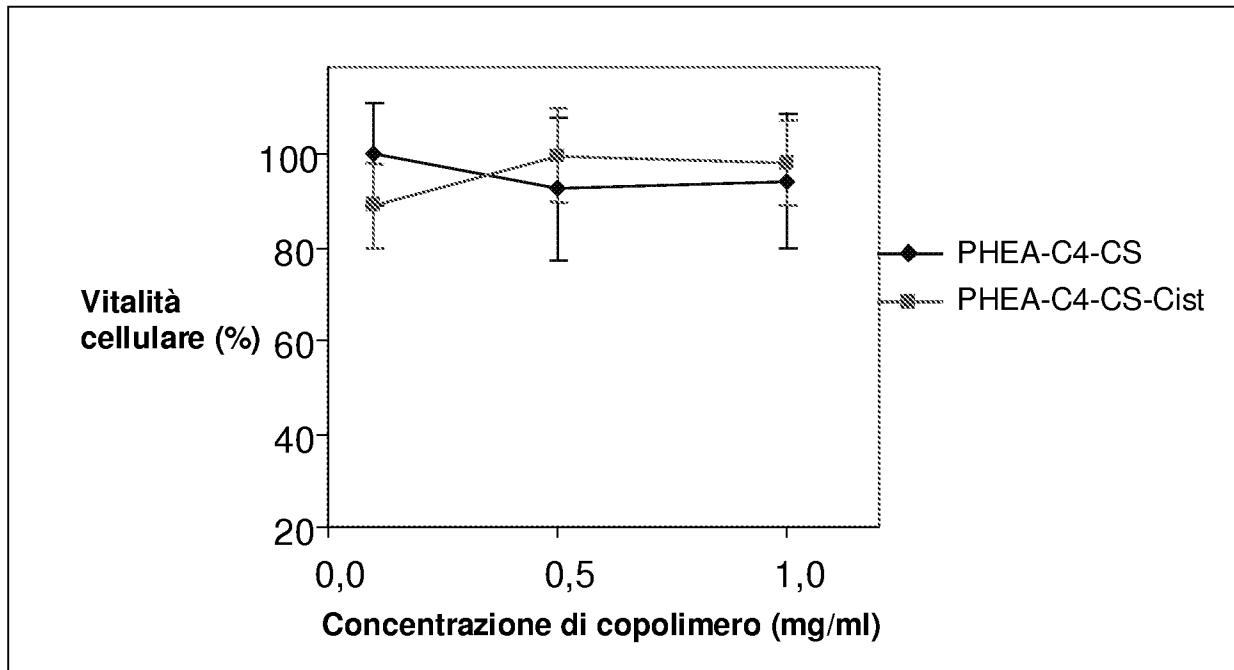


FIG. 1

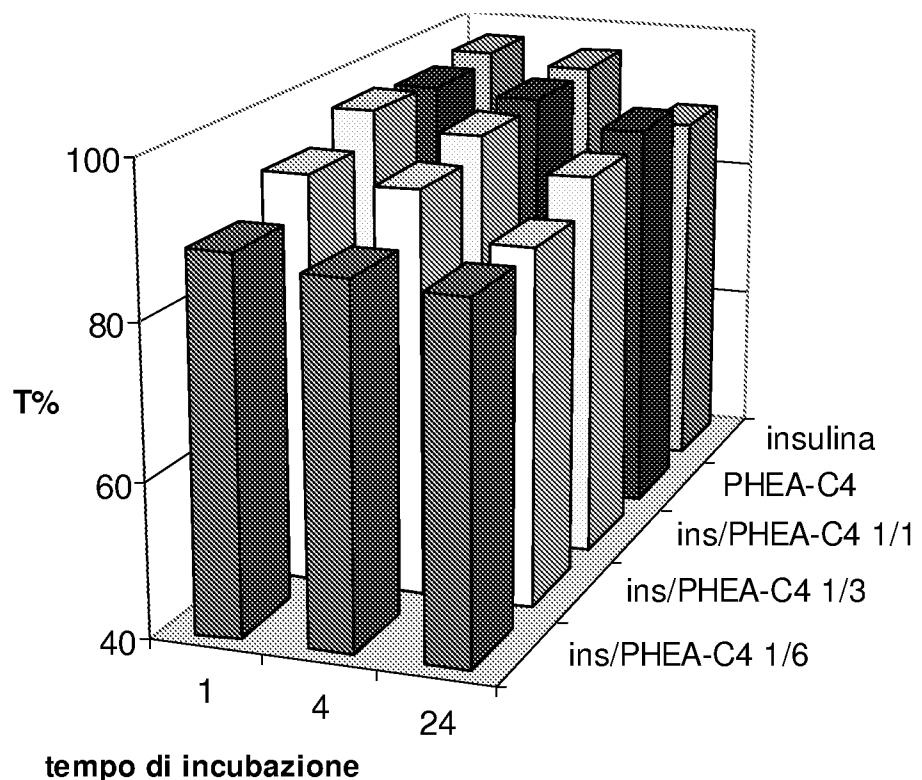


FIG. 2

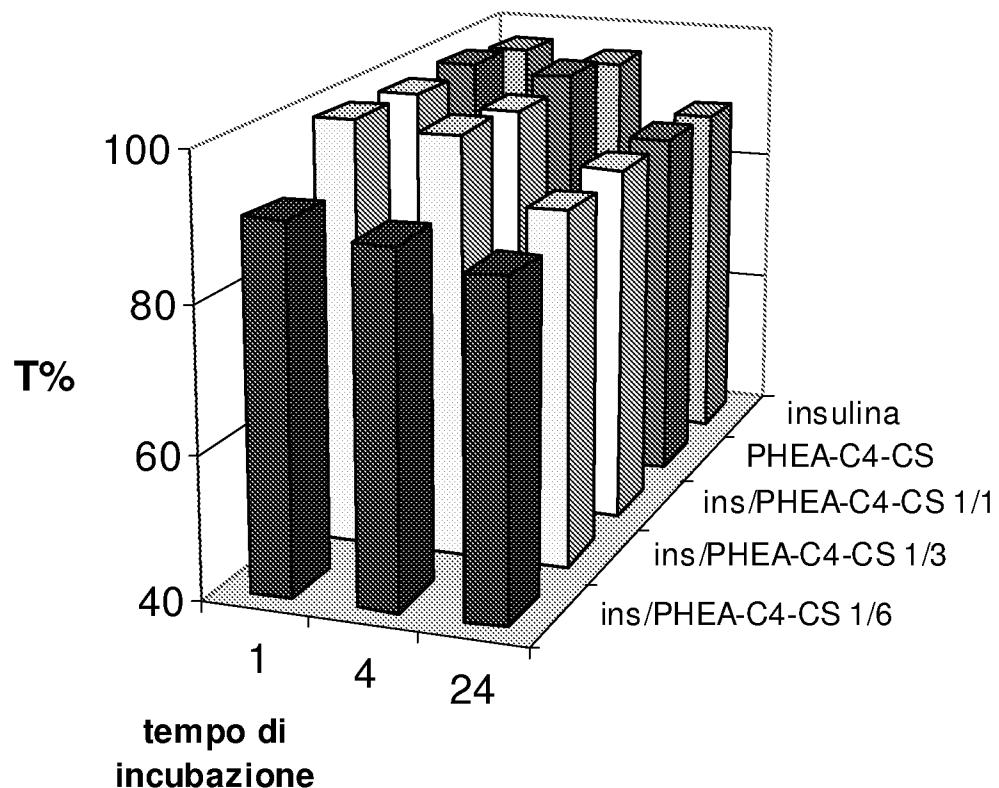


FIG. 3

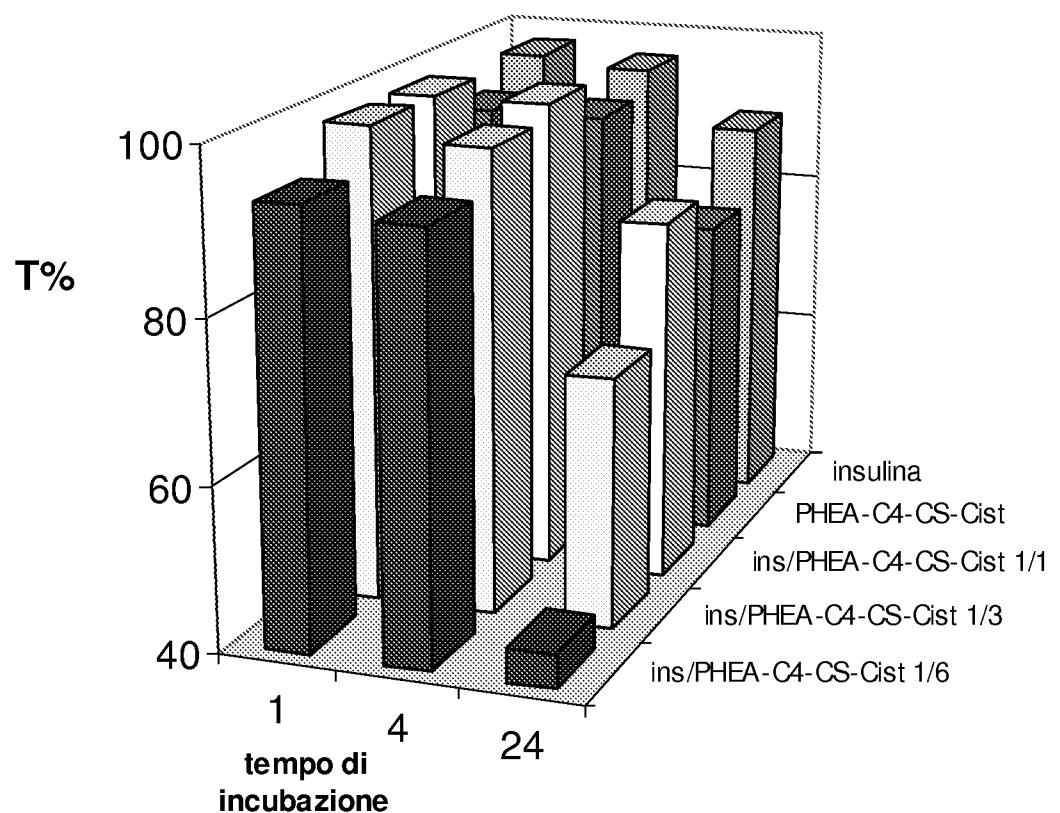


FIG. 4

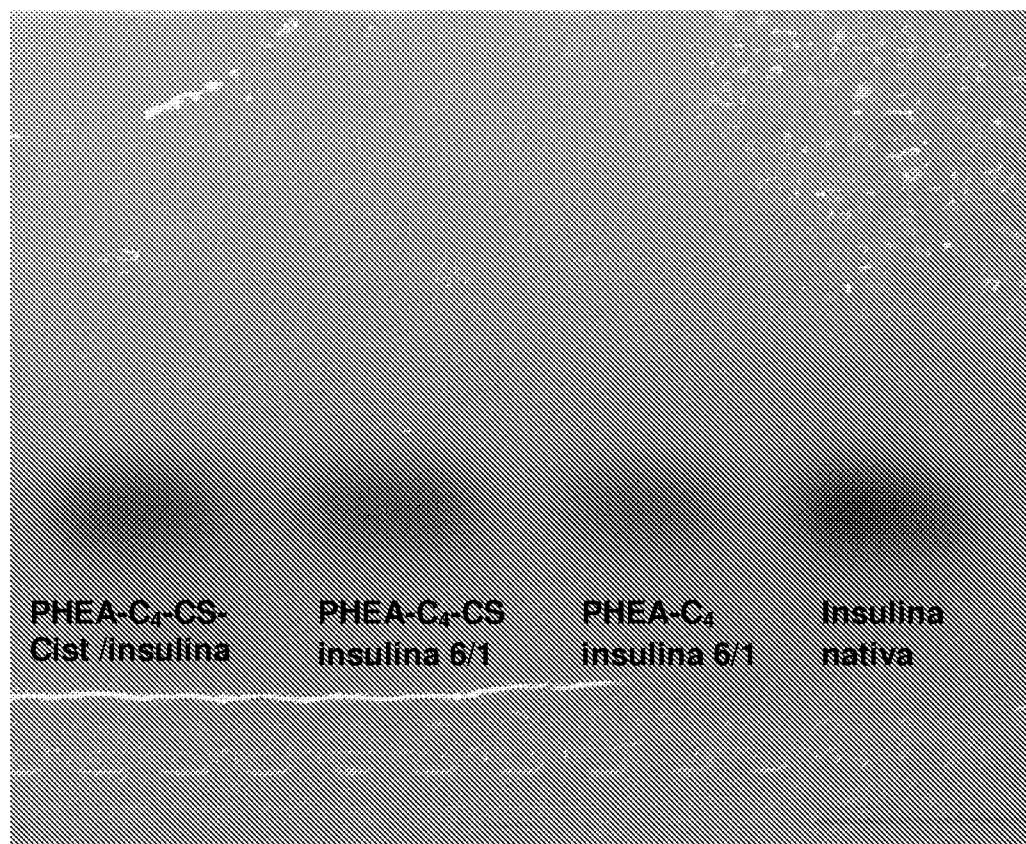


FIG. 5

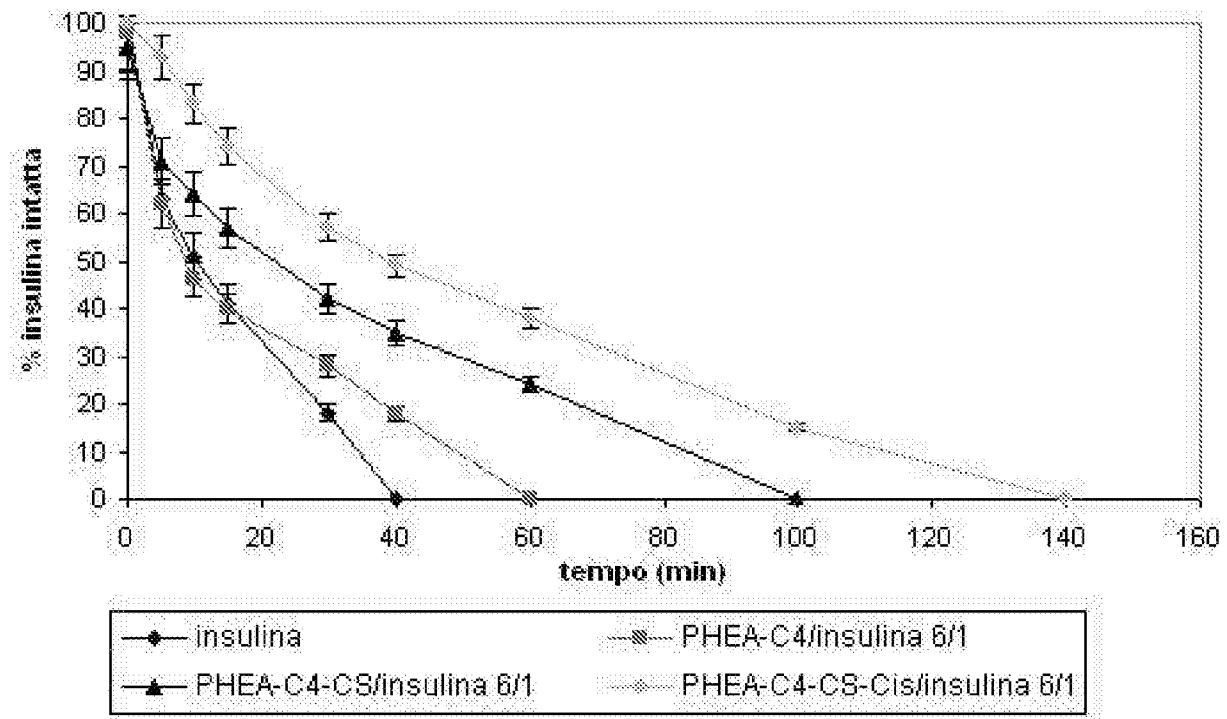


FIG. 6

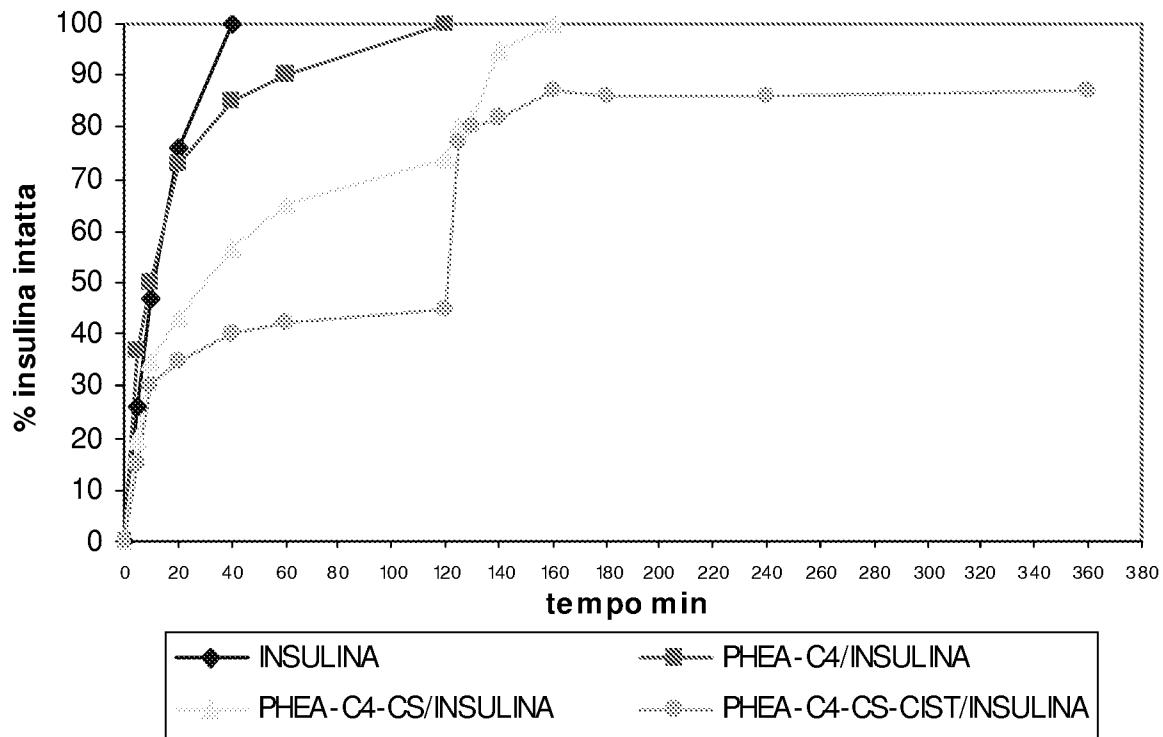


FIG. 7

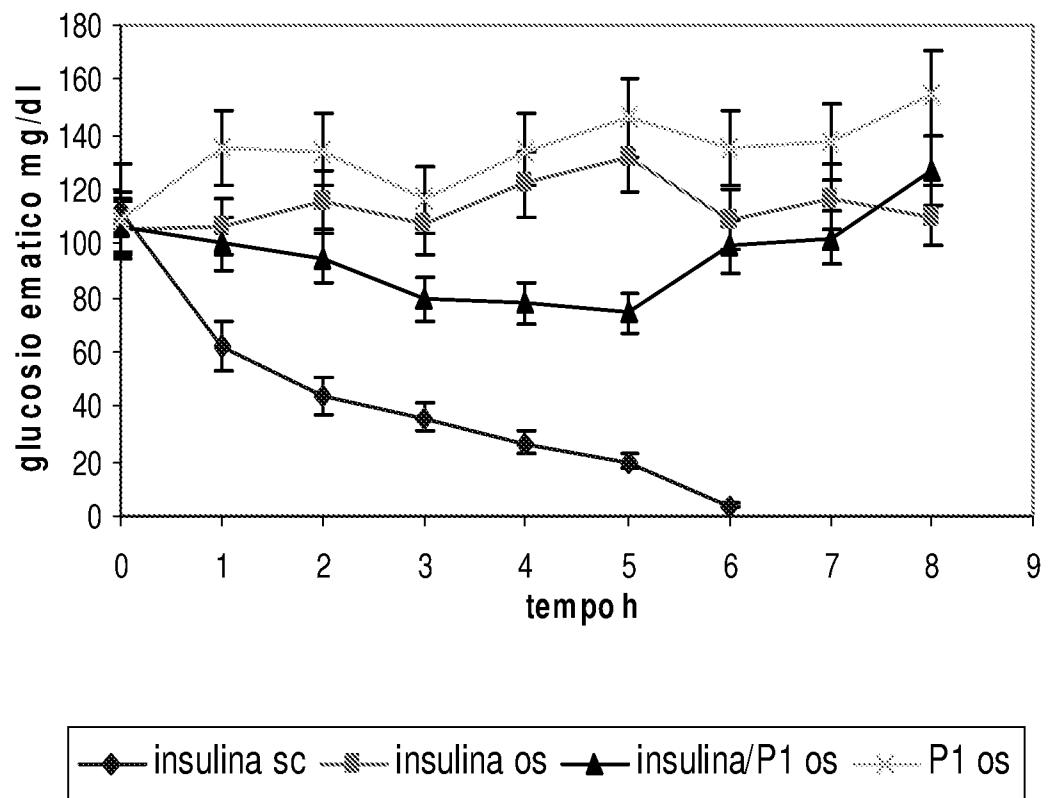


FIG. 8