



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO  
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETA' INDUSTRIALE  
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

# UIBM

|                           |                        |
|---------------------------|------------------------|
| <b>DOMANDA NUMERO</b>     | <b>101996900495372</b> |
| <b>Data Deposito</b>      | <b>05/02/1996</b>      |
| <b>Data Pubblicazione</b> | <b>05/08/1997</b>      |

| Sezione | Classe | Sottoclasse | Gruppo | Sottogruppo |
|---------|--------|-------------|--------|-------------|
| A       | 61     | K           |        |             |

Titolo

SOLUZIONI OFTALMICHE VISCOSIZZATE CON POLISACCARIDI DELLA GOMMA DI TAMARINDO

## DESCRIZIONE

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

"Soluzioni oftalmiche viscosizzate con polisaccaridi della gomma di tamarindo"

a nome: FARMIGEA S.p.A.

Inventori: Marco Fabrizio SAETTONI, Susi BURGALASSI, Boris GIANNACCINI, Enrico BOLDRINI, Pietro BIANCHINI, Giulio LUCIANI

-----

La presente invenzione concerne soluzioni oftalmiche viscosizzate con polisaccaridi della gomma di tamarindo. Più in particolare, l'invenzione riguarda l'uso di prodotti polisaccaridici naturali, contenuti in alto tenore nel materiale di origine naturale noto come gomma di tamarindo, come agenti viscosizzanti per preparati da applicare nel sacco congiuntivale sia come sostitutivi e stabilizzanti del fluido lacrimale fisiologico, sia come veicoli per farmaci oftalmici, con lo scopo di prolungare il tempo di permanenza degli stessi nel sito d'azione, migliorandone nel complesso l'efficacia.

Come è noto, il film lacrimale preoculare è una struttura liquida organizzata che ricopre la congiuntiva e la superficie esposta del globo oculare. In condizioni normali, il film lacrimale si presenta come una complessa struttura a tre strati, comprendente:

- uno strato interno di muco, costituito da una miscela di glicoproteine (mucina) prodotta da cellule specializzate (le goblet cells o cellule caliciformi congiuntivali) presenti negli epitelii congiuntivali - tale strato si adsorbe sulla cornea formando una superficie idrofila;

*Ing. Barrano & Fiorano*  
*Roma s.p.a.*

- un abbondante strato intermedio acquoso, che si distribuisce su detta superficie idrofila, composto essenzialmente da acqua, elettroliti, proteine, enzimi e mucina;
- un sottile strato esterno lipidico, che ha prevalentemente la funzione di regolare il tasso di evaporazione dell'acqua dal film lacrimale.

Il movimento palpebrale spreme il muco prodotto dalle cellule congiuntivali e lo immette nei fornici, e da qui esso viene uniformemente distribuito su tutta la superficie corneale attraverso i movimenti di ammiccamento delle palpebre.

La struttura a tre strati descritta costituisce un complesso sistema fisiologico, le cui funzioni principali sono quelle di proteggere la superficie dell'occhio, di mantenere l'idratazione, la lubrificazione e la pulizia della superficie corneale e di cooperare nel produrre una visione corretta, e il cui perfetto equilibrio e continuo rinnovamento è una condizione necessaria perché esso possa assolvere a tali funzioni. Perché ciò avvenga, si deve avere una costante ma non eccessiva evaporazione di acqua dal fluido lacrimale, tale da mantenerne l'osmolarità attorno al valore fisiologico di circa 300 mOsm/l, e il film lacrimale deve essere continuamente ridistribuito sulla superficie corneale per effetto degli ammiccamenti.

L'integrità dello strato interno di mucina rappresenta uno dei fattori essenziali nel mantenimento della stabilità del film lacrimale, perché la mucina migliora la bagnabilità della superficie corneale, permette al film acquoso di rimanere aderente alla superficie esposta in

*Ing. Barzani G. Riccardo*  
*Roma s.p.a.*

modo continuo ed omogeneo, assicurandone la stabilità, e aumenta la viscosità della fase fluida, impedendole di defluire troppo rapidamente dal sacco congiuntivale. Quando la mucina è assente o insufficiente la cornea diventa non bagnabile e, per effetto dello squilibrio tra elettroliti e glicoproteine presenti, il film lacrimale diviene instabile e soggetto a rompersi con formazione di zone secche.

Varie situazioni patologiche o anomale dell'occhio si manifestano con discontinuità del film lacrimale, in conseguenza, ad esempio, di una inadeguata velocità di ammiccamento, dell'uso prolungato di lenti a contatto, dell'impiego di alcuni farmaci sistemici e, più frequentemente, di una iposecrezione senile. In questo contesto, il termine "occhio secco" è comunemente utilizzato per indicare i problemi oculari connessi con la riduzione o l'instabilità del film lacrimale, mentre più propriamente le alterazioni caratteristiche della superficie corneale che così si manifestano vengono identificate con il termine di cheratocongiuntivite secca.

In tali situazioni, si determina una degenerazione delle cellule congiuntivali con aumento della desquamazione, perdita delle micropliche della superficie cellulare, rottura della membrana delle cellule epiteliali e riduzione del numero di cellule caliciformi produttrici della mucina. Questa degenerazione cellulare, essendo responsabile della riduzione delle goblet cells e della carenza di mucina, è ritenuta l'origine della maggior parte dei sintomi clinici in corso di occhio secco, come secchezza, irritazione, fotofobia e sensazione di corpo estraneo.

Un'altra manifestazione ritenuta concordemente un indice di

*Ing. Bassano G. Ranardo*  
*Roma s.p.a.*

anomalie del film lacrimale è la riduzione del fenomeno di felcizzazione del muco. In condizioni normali, infatti, quest'ultimo ha la caratteristica di cristallizzare sotto forma di felci per evaporazione a temperatura ambiente da una soluzione acquosa. Il fenomeno della felcizzazione, che si ritiene essere il risultato dell'interazione degli elettroliti con le glicoproteine ad alto peso molecolare del muco, si evidenzia dopo qualche istante dalla raccolta del muco lacrimale dal fornice inferiore dell'occhio, ed è accertato che i diversi aspetti di tale fenomeno (Tipo I, felcizzazione uniforme; Tipo II, felcizzazione abbondante con felci di dimensioni ridotte e spazi vuoti; Tipo III, felcizzazione presente ma in modo parziale; Tipo IV, felcizzazione assente) sono collegati allo stato normale o patologico del liquido lacrimale. Una fitta arborizzazione, ad esempio, è considerata espressione del perfetto equilibrio tra mucina ed elettroliti, mentre la presenza parziale o l'assenza della felcizzazione della lacrima, che si rileva in occhi con cheratocongiuntivite secca, indica una mancanza quantitativa del muco lacrimale o un'alterazione qualitativa delle glicoproteine e del loro ambiente (pH, idratazione, equilibrio elettrolitico).

Da un punto di vista diagnostico, oltre che con la valutazione dei sintomi che le sono propri, la sindrome dell'occhio secco può essere rilevata e monitorata attraverso procedure consolidate, tra cui le più comuni sono la misura della produzione lacrimale (test di Schirmer), del tempo di rottura del film lacrimale dopo un ammiccamento (break-up time, BUT) e la valutazione della colorazione della superficie oculare con il rosa bengala o con la fluoresceina.

*Ing. Barzani & Barzani*  
*Roma s.p.a.*

La cheratocongiuntivite secca viene normalmente trattata con preparati oftalmici liquidi da instillare in gocce, noti genericamente come "lacrime artificiali", che hanno lo scopo di sostituire e integrare la produzione lacrimale naturale. Nel caso più semplice tali preparati hanno unicamente un'azione umidificante, essendo costituiti da soluzioni saline fisiologiche, neutre e isotoniche con il fluido lacrimale, a base di solo cloruro di sodio o di miscele bilanciate di vari elettroliti. Un esempio di un simile preparato, comprendente almeno quattro diverse specie ioniche (potassio, sodio, cloruro e bicarbonato) in concentrazioni tali da riprodurre il più fedelmente possibile la composizione in elettroliti del fluido lacrimale, è descritto nel brevetto europeo No. 0 205 279. Tali formulazioni, al pari delle più semplici soluzioni fisiologiche, conseguono gli scopi di aumentare il volume lacrimale, umidificare la superficie oculare, diluire i depositi di muco e lavare detriti e corpi estranei ma, al pari delle prime, hanno una durata di azione ridottissima (dell'ordine di pochi minuti), perché la soluzione viene rapidamente drenata dal sacco congiuntivale. Ciò rende necessario ripetere l'instillazione almeno ogni 10-15 minuti, il che comporta la "non-compliance" dei pazienti, oltre che un effetto tossico sui tessuti oculari (congiuntiva e cornea) da parte dei conservanti normalmente presenti.

Per superare l'inconveniente citato sono state introdotte varie formulazioni di lacrime artificiali viscosizzate mediante l'aggiunta di agenti ad elevato peso molecolare, normalmente polimeri idrosolubili di origine sintetica, semisintetica o naturale. Ad esempio, il brevetto USA

*Ing. Barzani S. Riccardo*  
*Roma s.p.a.*

No. 4.409.205 descrive una composizione per uso oftalmico, utile sia come lacrima artificiale che come veicolo per prodotti ad attività terapeutica, in cui l'agente viscosizzante è un polimero sintetico non ionico, scelto tra alcool polivinilico, glicol polietilenico e loro miscele.

Tuttavia, si è rilevato che perché tali agenti viscosizzanti possano conferire caratteristiche vantaggiose ad una formulazione da utilizzare come lacrima artificiale non basta che essi aumentino genericamente la viscosità del prodotto, ma è necessario che le dispersioni da essi formate abbiano proprietà più simili possibile a quelle delle dispersioni di mucina, cioè che si comportino il più possibile come sostanze muco-mimetiche. Ciò richiede, prima di tutto, un comportamento reologico particolare, non-newtoniano, simile a quello delle lacrime naturali (si veda ad es. Bothner et al., Drug Dev. Ind. Pharm., 16, 755-768, 1990). Infatti, è stato sperimentalmente dimostrato che una lacrima artificiale, per avere un elevato tempo di permanenza precorneale ed essere allo stesso tempo tollerata dal paziente, non deve presentare una viscosità costante, come i fluidi newtoniani, ma deve comportarsi come un fluido pseudoplastico, con viscosità decrescente al crescere della sollecitazione tangenziale. Solo così, infatti, si può ottenere un alto valore della viscosità del film precorneale in condizioni di riposo, in modo tale che in assenza di sollecitazioni il film rimanga sulla superficie oculare senza gocciolare verso il basso e, contemporaneamente, un basso valore della viscosità nel corso di un ammiccamento, quando cioè il film è sottoposto ad uno sforzo di taglio, in modo tale che il preparato sia ben tollerato, e

*Ing. Barzani G. Riccardo*  
*Roma s.p.a.*

durante un ammiccamento si distribuisca omogeneamente su tutta la superficie oculare senza spostarsi in massa, per effetto della frizione, verso il bordo palpebrale inferiore.

I prodotti che hanno un tale comportamento (pseudoplastici) sono caratterizzati da una curva di flusso tipica (curva ottenuta riportando la tensione o sollecitazione tangenziale, shear stress, in funzione della velocità di deformazione o gradiente di velocità, shear rate, e la cui pendenza in ciascun punto corrisponde alla viscosità) che si discosta dalla retta con origine negli assi, corrispondente ad un comportamento newtoniano, per il fatto di essere curva con la concavità rivolta verso il basso. Ciò corrisponde ad una deviazione dal carattere newtoniano nel senso di una progressiva fluidificazione al crescere del gradiente di velocità del flusso.

Solo alcuni dei prodotti macromolecolari proposti finora come agenti viscosizzanti per lacrime artificiali sono realmente in grado di mostrare un comportamento non-newtoniano di tipo pseudoplastico: ad esempio, l'alcool polivinilico proposto dal brevetto USA sopra citato dà luogo, entro campi ordinari di pesi molecolari e di concentrazioni, a soluzioni praticamente newtoniane.

Esempi di formulazioni per lacrime artificiali aventi caratteristiche reologiche non-newtoniane sono descritti nella domanda di brevetto PCT No. 84/04681 e nel brevetto USA No. 5.106.615. Il primo documento propone l'uso, come agenti viscosizzanti per soluzioni oftalmiche, di polimeri carbossivinilici del tipo del Carbopol<sup>®</sup>, da includere nella formulazione in ragione dello 0,05-0,25% in peso. Le

*Ing. Borsano G. Riccardo*  
*Roma s.p.a.*

soluzioni risultanti presentano, secondo il testo, un comportamento reologico non-newtoniano definito correntemente come "plastico", caratterizzato da un valore di soglia per la sollecitazione tangenziale, al di sotto del quale il flusso non avviene affatto. Il brevetto USA No. 5.106.615 descrive invece composizioni utili sia come lacrime artificiali che come veicoli per prodotti terapeutici, viscosizzate con agenti polianionici a peso molecolare elevato (compreso tra 500.000 e 4.000.000), tra cui sono indicati come preferiti i polimeri carbossivinilici sopra menzionati e l'acido ialuronico. Quest'ultimo è un polisaccaride di origine naturale presente in molti tessuti e fluidi sia umani che animali, largamente utilizzato in preparati per uso oftalmico, in virtù dello spiccato comportamento pseudoplastico delle sue soluzioni acquose. Altrettanto diffusi come agenti viscosizzanti in grado di conferire alla formulazione risultante il desiderato carattere non-newtoniano sono gli esteri della cellulosa, come la metilcellulosa e i suoi derivati alcoolici, come l'idrossipropilcellulosa e l'idrossipropilmetilcellulosa.

Come risulta da quanto precede, perché un prodotto possa adeguatamente sostituire e mimare la componente mucinica del film lacrimale, oltre ad avere un comportamento reologico di tipo pseudoplastico esso deve presentare altre proprietà analoghe a quelle tipiche della mucina, tra cui la capacità di bagnare la superficie corneale, di per sé idrofoba, aumentando le caratteristiche di spargimento del fluido lacrimale, e di mantenere integro lo strato di fluido lacrimale che bagna la superficie oculare, tutto questo tenendo conto che l'occhio in cui

*Ing. Barzani & Barzani*  
*Roma s.p.a.*

viene somministrata una lacrima artificiale è normalmente un occhio con scarsa produzione di lacrime, che contengono una scarsa quantità di mucina. Benché i prodotti sopra menzionati presentino apprezzabili proprietà muco-mimetiche, la loro instillazione deve essere comunque abbondante e frequente (da 6 a 12 volte al giorno) e ciò espone comunque il paziente al rischio di danni ad opera dei conservanti presenti, spesso anche in associazione, nei flaconi multidose.

Per questi motivi sono anche stati proposti, per il trattamento della cheratocongiuntivite secca, inserti oculari erodibili da inserire nel sacco congiuntivale, costituiti, ad esempio, da cilindretti di idrossipropilcellulosa che sciogliendosi forniscono in continuo la sostanza muco-mimetica viscosizzante e lubrificante. Benché questi inserti abbiano il vantaggio di essere totalmente privi di conservanti, essi possono essere scomodi da applicare da parte del paziente, e la loro presenza nel sacco congiuntivale pronuncia la sensazione di corpo estraneo sempre presente nei casi di sindrome dell'occhio secco. Inoltre, gli inserti congiuntivali erodibili provocano transitori disturbi della visione per sovrabbondanza di polimero sulla superficie oculare.

Per ottenere un maggiore e più prolungato effetto lubrificante è stato anche proposto l'uso di prodotti in forma di gel (ad es. a base di acido ialuronico o di carbossimetilcellulosa). Questi preparati però presentano lo svantaggio di offuscare la visione, e quindi non sono praticamente impiegabili durante la veglia, ma solo nelle ore notturne.

Scopo della presente invenzione è pertanto quello di fornire un preparato per uso oftalmico da utilizzare in primo luogo come lacrima

*Ing. Barzani G. Romano*  
*Roma s.p.a.*

artificiale, dotato di adeguate proprietà muco-mimetiche, e in particolare di comportamento reologico pseudoplastico, il quale, pur essendo relativamente economico sia come materia prima che sotto il profilo del processo produttivo, fornisca prestazioni ottimali come sostituto del fluido lacrimale, e possa anche essere vantaggiosamente utilizzato come veicolo in farmaci oftalmici, per prolungare il tempo di ritenzione degli agenti terapeutici nel film lacrimale.

A tale scopo si propone, secondo l'invenzione, di utilizzare come agente viscosizzante un polimero polisaccaridico naturale ottenuto dai semi dell'albero del tamarindo, il *Tamarindus indica*. Le soluzioni acquose di tale prodotto mostrano infatti caratteristiche di flusso tipicamente pseudoplastico, con viscosità elevata in condizioni di riposo e sempre più bassa in condizioni di sforzo di taglio crescente, nonché ottime capacità di stabilizzazione del fluido lacrimale. A ciò si aggiunge il fatto che il polisaccaride in questione è dotato di proprietà mucoadesive molto marcate, che permettono il formarsi di legami di varia natura con le glicoproteine costituenti la mucina, in modo tale che il polimero stesso può rimanere molto a lungo nel fluido lacrimale, e riesce a concentrarsi laddove è naturalmente presente la mucina, esplicando al meglio le sue proprietà muco-mimetiche.

Come è noto, l'albero del tamarindo è ampiamente diffuso in India, in Africa e in tutto l'Estremo Oriente, dove viene coltivato essenzialmente a scopo alimentare, per la produzione di conserve, estratti, salse e dolciumi a partire dal frutto. Il seme, che rappresentava originariamente un sottoprodotto, ha trovato varie utilizzazioni, una

*Ing. Barzani & Zanardo*  
*Roma s.p.a.*

volta macinato in modo da ridurlo ad un prodotto farinoso (correntemente indicato come "gomma di tamarindo"), soprattutto nell'industria tessile e della carta, dove viene utilizzato rispettivamente come agente di imbozzimatura e di collatura, e nell'industria alimentare, dove serve come addensante, gelificante, stabilizzante e legante in prodotti di ogni tipo, in modo analogo ad altri prodotti polisaccaridici, come gli alginati, le pectine, la gomma guar o la farina di carruba. La gomma di tamarindo grezza, reperibile in commercio come tale, contiene, assieme ad un 65-73% in peso di polisaccaride, un 15-23% di materiale proteico, un 3-8% di oli e grassi e un 2-4% di ceneri, oltre a quantità minori di fibra grezza, tannini ed altre impurità.

Non risultano finora noti impieghi della gomma di tamarindo o del polisaccaride in essa contenuto come agente viscosizzante in formulazioni farmaceutiche per uso oftalmico o in lacrime artificiali. Il fatto che la gomma di tamarindo sia da lungo tempo utilizzata come additivo in campo alimentare, d'altra parte, è un buon indice della sua assenza di tossicità anche nei confronti dei tessuti oculari (studi di tossicità orale acuta, che ne confermano l'innocuità, sono stati pubblicati, ad esempio, da T. Noda et al. in *Seikatsu Eisei*, 32(3), pagg. 110-15, 1988).

Tra le proprietà muco-mimetiche di cui la gomma di tamarindo si è dimostrata in possesso, in base alla sperimentazione condotta nell'ambito della presente invenzione, si deve anche menzionare la capacità di "felcizzazione" precedentemente citata, grazie alla quale il prodotto polisaccaridico in esame è in grado di dare per evaporazione

*Ing. Bassano S. Riccardo*  
*Roma s.p.a.*

prodotti cristallini di morfologia del tutto analoga a quella tipica del fluido lacrimale. A questo proposito, è da notare che l'unico prodotto utilizzato attualmente come lacrima artificiale di cui è nota in letteratura la capacità di "felcizzazione" è l'acido ialuronico.

Un altro aspetto di non secondaria importanza che contribuisce a rendere il polisaccaride della gomma di tamarindo un prodotto di partenza ottimale per la formulazione di lacrime artificiali e preparati oftalmici in genere è nel fatto che le soluzioni di tale polisaccaride si prestano ad essere sterilizzate mediante passaggio in autoclave (ad es. per 20 minuti a 120 °C) senza che il prodotto subisca degradazioni termiche, al contrario di quanto avviene, ad esempio, per l'acido ialuronico. A causa della degradazione termica, infatti, le soluzioni per uso oftalmico vengono comunemente sterilizzate con processi di filtrazione sterilizzante, i quali si presentano di difficile attuazione per prodotti ad elevata viscosità, quali le lacrime artificiali o i veicoli per farmaci oftalmici a rilascio protratto. La possibilità di sterilizzazione per semplice passaggio in autoclave rende i preparati a base di polisaccaridi della gomma di tamarindo particolarmente convenienti sotto il profilo produttivo.

Formano pertanto oggetto specifico della presente invenzione l'uso della frazione polisaccaridica della gomma di tamarindo per la produzione di una soluzione oftalmica viscosizzata, utile come lacrima artificiale e come veicolo per farmaci oftalmici a rilascio protratto, nonché i preparati oftalmici così ottenuti. Con frazione polisaccaridica si intende, ai fini della presente descrizione, una frazione arricchita in

*Eng. Paravano G. Riccardo*  
*Roma s.p.a.*

polisaccaridi ottenibile per purificazione dalla gomma di tamarindo grezza, quest'ultima essendo il prodotto normalmente reperibile in commercio (ad esempio venduto con il nome di Glyloid® dalla Dainippon Pharmaceutical Co. LTD di Osaka, Giappone).

Le concentrazioni di polisaccaride della gomma di tamarindo vantaggiosamente utilizzabili, secondo l'invenzione, per la formulazione di soluzioni oftalmiche a bassa od alta viscosità sono generalmente comprese nel campo tra lo 0,1 e il 5,0% in peso, e preferibilmente tra lo 0,5 e il 3,0% in peso.

Per quanto riguarda in modo specifico i preparati da utilizzare come lacrime artificiali, la concentrazione di polimero polisaccaridico che fornisce le migliori prestazioni è compresa tra lo 0,7 e l'1,5% in peso, quella ottimale essendo pari all'1,0% in peso. A tale concentrazione la formulazione presenta un valore di viscosità che permette alla lacrima artificiale di essere ritenuta nell'occhio e di non essere rapidamente drenata dal dotto naso-lacrimale, fenomeno che, come già rilevato, si verifica con le soluzioni fisiologiche non viscosizzate. Detto valore di viscosità non è però tale da interferire con la visione, e quindi la formulazione non comporta gli inconvenienti propri dei geli. La viscosità delle soluzioni all'1%, inoltre, è adatta a permettere un facile dosaggio della lacrima artificiale in flaconi monodose, i quali, come è noto, evitano la necessità di aggiungere conservanti. Inoltre, tale valore di viscosità permette un'agevole filtrabilità (filtro da 0,8  $\mu\text{m}$ ) per la chiarificazione della soluzione prima del confezionamento.

*Ing. Bassano & Ranardo*  
*Roma s.p.a.*

La soluzione all'1,0% in peso di polisaccaride della gomma di tamarindo, presenta, inoltre, un valore di viscosità piuttosto stabile nell'intervallo di pH compreso tra 5,5 e 8, cioè intorno alla neutralità, che poi diminuisce repentinamente passando a valori di pH più acidi. Questo fenomeno si mostra estremamente favorevole all'uso come prodotto oftalmico, perché la soluzione può essere formulata e somministrata a pH acido (ad es., pH = 4,5) e quindi in condizioni di viscosità ridotta (ad es., 225 mPa-s), mentre nell'occhio, dato il maggior valore di pH delle lacrime (pH 7,4), la viscosità aumenta (ad es. 297 mPa-s). La caratteristica che precede è di notevole importanza perché, sommata alle proprietà mucoadesive del polimero polisaccaridico della gomma di tamarindo, permette un marcato prolungamento del tempo di residenza della soluzione nell'area precorneale.

Come già notato, la soluzione di polimero polisaccaridico secondo l'invenzione può anche essere usata in qualità di veicolo per farmaci oftalmici, con la funzione di aumentare il tempo di ritenzione dei farmaci nel film lacrimale (area precorneale). Il polimero viscoso e mucoadesivo presente nella formulazione, infatti, trattenerà il principio attivo somministrato a contatto con la zona d'azione del farmaco stesso per un periodo prolungato di tempo, migliorandone così l'efficacia. Nell'uso come veicolo farmaceutico a rilascio protratto si può vantaggiosamente utilizzare una concentrazione di polisaccaride della gomma di tamarindo compresa tra l'1 e il 4% in peso; tale concentrazione è preferibilmente del 3-4% in peso nel caso si desideri ottenere un veicolo in forma di gel.

*Ing. Parxano G. Ranardo*  
*Roma s.p.a.*

Il veicolo può essere vantaggiosamente utilizzato come "delivery system" per un'ampia serie di farmaci per uso oftalmico, che debbano essere somministrati per instillazione nel sacco congiuntivale e debbano avere un'elevata permanenza nell'area precorneale per esplicare al meglio la loro azione. Possibili farmaci che possono sfruttare il polimero della gomma di tamarindo come veicolo a rilascio protratto sono agenti antiglaucoma e miotici, come la pilocarpina e il timololo, antiinfiammatori steroidei, come il desametasone, e non-steroidi, come il diclofenac, antimicrobici come il cloramfenicolo o la gentamicina, prodotti decongestionanti e antiallergici come la nafazolina, nonché varie associazioni degli stessi.

Sia nell'uso come lacrima artificiale che in quello di veicolo per prodotti ad attività farmaceutica, al prodotto polisaccaridico proposto dovranno essere aggiunti, nella formulazione, uno o più agenti regolatori della tonicità che portino la soluzione al giusto valore di osmolarità, perché la soluzione contenente soltanto il polisaccaride, alle concentrazioni indicate, risulta ipotonica rispetto al fluido lacrimale. A tale scopo possono essere utilizzati i prodotti convenzionalmente usati nella tecnica farmaceutica, quali, ad esempio, il cloruro di sodio o di potassio, il mannitolo, il destrosio, l'acido borico, il glicol propilenico.

Altri ingredienti che possono essere aggiunti, analogamente a quanto già noto nella tecnica farmaceutica, sono acidi o basi con funzioni di correttori di pH, nonché tamponi, come ad esempio il sistema sodio fosfato monosodico - sodio fosfato bisodico o il sistema acetato - acido acetico. La composizione può anche comprendere

*Ing. Barzani G. Leonardo*  
*Roma s.p.a.*

conservanti e antimicrobici, come cloruro di benzalconio, sodio mertiolato o timerosale, metil-, etil- e propilparabene e clorobutanolo e, infine, agenti chelanti come gli edetati o EDTA. Nella formulazione ideale per lacrima artificiale, a causa dei problemi di intolleranza già ricordati, si preferisce non inserire conservanti, cosa che è senz'altro possibile quando il prodotto è confezionato in flacone monodose. In alcuni casi, tuttavia, e in particolare per prodotti in flaconi multidose, l'aggiunta di conservanti è indispensabile.

Il polimero polisaccaridico della gomma di tamarindo può essere ottenuto, come già notato, per purificazione dalla gomma di tamarindo commerciale (indicata in inglese come "tamarind gum", "tamarind kernel powder" o anche "TSKP", tamarind seed kernel powder). Quest'ultima viene prodotta per macinazione dai semi del *Tamarindus indica*, secondo tecnologie che hanno avuto i primi sviluppi in India. Secondo il brevetto indiano No. 29620, del 1943, i semi vengono riscaldati a 150°C per 10-15 minuti, allo scopo di essiccarne la scorza esterna, detta "testa". L'eliminazione della testa costituisce il problema principale del ciclo produttivo, a causa del fatto che tale scorza è tenacemente ancorata all'endosperma. Secondo il metodo descritto, per effetto dell'essiccamento la testa diviene fragile e può essere eliminata per pestatura e successiva spulatura. La polpa del seme così ottenuta viene lavata, essiccata e macinata, a dare la gomma di tamarindo grezza. Secondo i brevetti indiani Ni. 30321 e 30487, rispettivamente del 1943 e del 1944, l'essiccamento iniziale non è necessario, e il seme può essere macinato senza preventivo riscal-

*Ing. Barzani & Barzani*  
*Roma 1944*

damento, perché la differenza di friabilità tra la testa e i cotiledoni è tale che la macinazione dà luogo ad un materiale con due diverse granulometrie, da cui la polvere più fine, costituita dalla testa polverizzata, può essere facilmente separata per setacciatura o classificazione ad aria. I frammenti grossolani di endosperma risultanti dalla separazione vengono poi ulteriormente macinati.

La polvere così ottenuta ha la composizione media già precedentemente menzionata, e si presenta come un materiale poco scorrevole di colore crema-bruno, dal caratteristico odore grasso, disperdibile ma non completamente solubile in acqua fredda. Per l'uso proposto nella presente invenzione tale prodotto deve essere il più possibile privato delle componenti grassa e proteica e della fibra, in modo da arricchirne il tenore in polisaccaridi. Il polisaccaride praticamente puro si presenta come una polvere quasi bianca, facilmente scorrevole e senza alcun odore o sapore.

Un metodo di purificazione della gomma di tamarindo commerciale utilizzato per la produzione delle soluzioni oftalmiche della presente invenzione consiste nel disperdere il prodotto di partenza in acqua deionizzata fredda, mantenendo il tutto in agitazione per 12 ore per ottenere una dispersione omogenea, e quindi centrifugare per 30 minuti a 5000 r.p.m.. La soluzione soprannatante viene quindi raccolta e liofilizzata per ottenere un prodotto finale traslucido, di colore bianco, completamente solubile in acqua.

Altri processi di purificazione sono comunque noti nella tecnica anteriore, anche se connessi con l'uso della gomma di tamarindo in

*Ing. Barzani & Romano  
Roma s.p.a.*

altri settori produttivi. Per l'uso farmaceutico che è oggetto della presente invenzione il polisaccaride può anche essere vantaggiosamente purificato con processi di dialisi, o con altri processi tali da allontanare anche tracce di proteine o di altri contaminanti, che possono offrire prodotti a purezza particolarmente elevata.

Secondo numerosi studi condotti sull'argomento, la frazione polisaccaridica della gomma di tamarindo è costituita da catene principali di unità glucopiranosidiche legate l'una all'altra in posizione (1→4), a cui sono collegate brevi ramificazioni laterali costituite da unità di xilopiranosio legate in posizione (1→6), singole oppure a loro volta recanti singole unità di galattopiranosio collegate in posizione (1→2). La distribuzione dei gruppi laterali di xilosio e xilosio-galattosio non è stata determinata con certezza, e i rapporti glucosio : xilosio : galattosio sono stati riportati come pari a 3:2:1 da alcuni autori, a 4:3:1-1,5 da altri e a 2,8:2,25:1 da altri ancora. È anche stata riportata da alcuni la presenza di unità arabinofuranosiliche; il peso molecolare del polisaccaride è ritenuto compreso tra 50.000 e 55.000.

La presente invenzione viene descritta nel seguito, a titolo esemplificativo e non limitativo, con riferimento ad alcune sue forme di realizzazione specifiche relative a formulazioni utilizzabili rispettivamente come lacrima artificiale (serie 1) e come veicolo per farmaci oftalmici (serie 2). Negli esempi che seguono, la frazione arricchita in polisaccaride della gomma di tamarindo, il cui uso è l'oggetto della presente invenzione, verrà designata con il nome PPNP (polimero polisaccaridico naturale purificato).

*Ing. Barxano's. Barardo*  
*Roma s.p.a.*

## ESEMPI 1.1 - 1.4 - Formulazioni per lacrima artificiale

### Esempio 1.1

| Ingredienti       | concentrazione, % in peso    |
|-------------------|------------------------------|
| PPNP              | 1,00                         |
| mannitolo         | 5,04                         |
| acqua deionizzata | q.b. a 100                   |
| HCl 1N            | q.b. per ottenere pH 4,5±0,2 |

Il prodotto viene preparato secondo le seguenti fasi:

- la quantità necessaria di PPNP viene pesata in un adatto recipiente di vetro;
- si aggiunge il 90% dell'acqua disponibile e si lascia sotto agitazione per alcune ore fino a solubilizzazione completa del prodotto;
- si aggiunge, sempre sotto agitazione, la quantità indicata di mannitolo e si lascia sotto agitazione fino a dissoluzione completa;
- si aggiunge acqua deionizzata fino al peso finale (100%);
- si aggiunge acido cloridrico (soluzione 1N) fino al pH indicato;
- la soluzione così ottenuta viene sterilizzata in autoclave.

### Esempio 1.2

| Ingredienti       | concentrazione, % in peso |
|-------------------|---------------------------|
| PPNP              | 1,00                      |
| sodio cloruro     | 0,90                      |
| acqua deionizzata | q.b. a 100                |

Il prodotto viene preparato operando in modo analogo all'esempio 1.1, disciogliendo prima il PPNP, poi il sodio cloruro ed infine portando a peso con acqua deionizzata.

*Ing. Barzani G. Riccardo*  
*Roma s.p.a.*

Esempio 1.3

| Ingredienti         | concentrazione, % in peso |
|---------------------|---------------------------|
| PPNP                | 0,70                      |
| sodio cloruro       | 0,85                      |
| benzalconio cloruro | 0,01                      |
| acqua deionizzata   | q.b. a 100                |

Il prodotto viene preparato operando in modo analogo all'esempio 1.1, disciogliendo prima il PPNP, poi il sodio cloruro ed il benzalconio cloruro, ed infine portando a peso con l'acqua.

Esempio 1.4

| Ingredienti              | concentrazione, % in peso |
|--------------------------|---------------------------|
| PPNP                     | 1,50                      |
| sodio fosfato monosodico | 0,71                      |
| sodio fosfato bisodico   | 0,09                      |
| sodio cloruro            | 0,50                      |
| benzalconio cloruro      | 0,01                      |
| acqua deionizzata        | q.b. a 100                |

Il prodotto viene preparato operando in modo analogo all'esempio 1.1, disciogliendo prima il PPNP, poi il fosfato monosodico, il fosfato bisodico, il sodio cloruro ed il benzalconio cloruro, ed infine portando a peso con l'acqua.

**ESEMPI 2.1 - 2.5 - Formulazioni per veicolo oftalmico**

Esempio 2.1

| Ingredienti | concentrazione, % in peso |
|-------------|---------------------------|
| PPNP        | 3,00                      |

*Ing. Bassano & Zanardo  
Roma s.p.a.*

mannitolo q.b. a 300 mOsm/l

acqua deionizzata q.b. a 100

Il prodotto viene preparato secondo le seguenti fasi:

- la quantità necessaria di PPNP viene pesata in un adatto recipiente di vetro;
- si aggiunge il 90% dell'acqua disponibile e si lascia sotto agitazione per alcune ore fino a solubilizzazione completa del prodotto;
- si aggiunge, sempre sotto agitazione, la quantità indicata di mannitolo e si lascia sotto agitazione fino a dissoluzione completa;
- si mantiene l'agitazione aggiungendo la quantità opportuna del farmaco desiderato;
- si aggiunge acqua deionizzata fino al peso finale (100%);
- la soluzione così ottenuta viene sterilizzata in autoclave.

### Esempio 2.2

| Ingredienti         | concentrazione, % in peso |
|---------------------|---------------------------|
| PPNP                | 4,00                      |
| benzalconio cloruro | 0,01                      |
| sodio cloruro       | q.b. a 300 mOsm/l         |
| acqua deionizzata   | q.b. a 100                |

Il prodotto viene preparato operando in modo analogo all'esempio 2.1, aggiungendo sodio cloruro e benzalconio cloruro in luogo del mannitolo.

### Esempio 2.3

| Ingredienti | concentrazione, % in peso |
|-------------|---------------------------|
| PPNP        | 3,50                      |

*Ing. Bassano & Ranardo  
Roma s.p.a.*

|                          |                   |
|--------------------------|-------------------|
| sodio fosfato monosodico | 0,71              |
| sodio fosfato bisodico   | 0,09              |
| edetato disodico         | 0,01              |
| benzalconio cloruro      | 0,01              |
| sodio cloruro            | q.b. a 300 mOsm/l |
| acqua deionizzata        | q.b. a 100        |

Il prodotto viene preparato operando in modo analogo all'esempio 2.1, aggiungendo sodio fosfato monosodico, sodio fosfato bisodico, edetato disodico, sodio cloruro e benzalconio cloruro in luogo del mannitolo.

Esempio 2.4

| Ingredienti              | concentrazione, % in peso |
|--------------------------|---------------------------|
| PPNP                     | 2,00                      |
| sodio fosfato monosodico | 0,71                      |
| sodio fosfato bisodico   | 0,09                      |
| sodio mertiolato         | 0,002                     |
| edetato disodico         | 0,01                      |
| sodio cloruro            | q.b. a 300 mOsm/l         |
| acqua deionizzata        | q.b. a 100                |

Il prodotto viene preparato operando in modo analogo all'esempio 2.3, aggiungendo il sodio mertiolato al posto del benzalconio cloruro.

Esempio 2.5

| Ingredienti | concentrazione, % in peso |
|-------------|---------------------------|
| PPNP        | 1,00                      |

*Ing. Barzani & Zanardo*  
*Roma s.p.a.*

|                         |                   |
|-------------------------|-------------------|
| me-parabene sale sodico | 0,06              |
| mannitolo               | q.b. a 300 mOsm/l |
| NaOH                    | pH 7,4±0,2        |
| acqua deionizzata       | q.b. a 100        |

Il prodotto viene preparato secondo le seguenti fasi:

- la quantità necessaria di PPNP viene pesata in un adatto recipiente di vetro;
- si aggiunge il 90% dell'acqua disponibile e si lascia sotto agitazione per alcune ore fino a solubilizzazione completa del prodotto;
- si aggiungono, sempre sotto agitazione, le quantità indicate di mannitolo e di metil-parabene sale sodico e si lascia sotto agitazione fino a dissoluzione completa;
- si mantiene l'agitazione aggiungendo la quantità opportuna del farmaco desiderato;
- si aggiunge acqua deionizzata fino al peso finale (100%);
- si aggiunge sodio idrossido (soluzione 1N) fino al pH indicato;
- la soluzione così ottenuta viene sterilizzata in autoclave.

Alcuni risultati sperimentali relativi alle caratteristiche dei prodotti polisaccaridici della presente invenzione e alle prestazioni dei preparati che li contengono sono riportati nel seguito, assieme ad alcuni diagrammi rappresentati nelle figure allegate, in cui:

la figura 1 rappresenta alcune curve di flusso (sollecitazione tangenziale o shear stress  $\tau$ , in mPa, in funzione del gradiente di velocità o shear rate D, in  $\text{sec}^{-1}$ ) di soluzioni di polimero polisaccaridico purificato dell'invenzione (PPNP), a varie concentrazioni;

*Ing. Barzani & Ranardo*  
*Roma s.p.a.*

la figura 2 mostra l'andamento della viscosità apparente ( $\eta'$ ) di soluzioni di PPNP in funzione della sua concentrazione percentuale in peso;

la figura 3 mostra l'andamento della viscosità apparente ( $\eta'$ ) di una soluzione all'1% in peso di PPNP al variare del pH;

la figura 4 rappresenta due curve di flusso del tipo di quelle di figura 1 per una soluzione all'1% in peso di PPNP, prima e dopo la sterilizzazione in autoclave;

la figura 5 mostra i risultati del test di Schirmer per la produzione lacrimale su conigli con cheratocongiuntivite secca, trattati o meno con il prodotto dell'invenzione;

la figura 6 mostra l'andamento nel tempo della risposta miotica ( $\Delta$ diametro pupillare) in conigli trattati con formulazioni di pilocarpina contenenti o meno il prodotto dell'invenzione; e

la figura 7 mostra l'andamento nel tempo della concentrazione di pilocarpina nel fluido lacrimale di conigli trattati con formulazioni di pilocarpina contenenti o meno il prodotto dell'invenzione.

#### Studio delle caratteristiche reologiche

Soluzioni del prodotto polisaccaridico PPNP a varie concentrazioni (0,5, 1,0 e 3,0% in peso) sono state sottoposte a prove di viscosità impiegando un viscosimetro rotazionale Rheomat 115 (Contraves) montante un corpo di misura a cilindri coassiali MS-O. Le misure sono state effettuate a 25°C. I valori di sollecitazione tangenziale (shear stress)  $\tau$  rilevati per valori crescenti di gradiente di velocità (shear rate)  $D$ , per le due soluzioni a concentrazioni dello 0,5%

*Ing. Baranò G. Romano*  
Roma s.p.a.

e dell'1% in peso, sono riportati nella seguente tabella.

TABELLA 1  
Curve di flusso del prodotto PPNP

| D, shear rate (sec <sup>-1</sup> ) | $\tau$ , shear stress (mPa) |                   |
|------------------------------------|-----------------------------|-------------------|
|                                    | PPNP 0,5% in peso           | PPNP 1,0% in peso |
| 25,60                              | 357,12                      | 3273,60           |
| 36,64                              | 535,68                      | 4523,52           |
| 52,39                              | 714,24                      | 5832,96           |
| 75,01                              | 1011,84                     | 7797,12           |
| 107,38                             | 1368,96                     | 10177,92          |
| 153,62                             | 1964,16                     | 13094,40          |
| 220,23                             | 2678,40                     | 16725,12          |
| 315,19                             | 3630,72                     | 20891,52          |
| 450,91                             | 4642,56                     | 25712,64          |
| 645,29                             | 6011,52                     | 30652,80          |
| 923,69                             | 8035,20                     | 36307,20          |
| 1322,40                            | 10713,60                    | 42556,80          |
| 1894,11                            | 14165,76                    | 50592,00          |
| 2709,43                            | 18629,76                    | 59996,16          |
| 3877,71                            | 24224,64                    | 70590,72          |

Analoghe misure della sollecitazione tangenziale a valori crescenti del gradiente di velocità per il caso della soluzione di PPNP al 3,0% in peso sono riportate nella seguente tabella.

(segue tabella)

*Ing. Barzani & Zanardo*  
*Roma s.p.a.*

TABELLA 2  
Curva di flusso del prodotto PPNP al 3,0% in peso

| D, shear rate (sec <sup>-1</sup> ) | $\tau$ , shear stress (mPa) |
|------------------------------------|-----------------------------|
| 2,00                               | 9960                        |
| 2,86                               | 13280                       |
| 4,10                               | 16600                       |
| 5,86                               | 23240                       |
| 8,39                               | 29880                       |
| 12,01                              | 39840                       |
| 17,21                              | 53120                       |
| 26,64                              | 69720                       |
| 35,24                              | 86320                       |
| 50,44                              | 106240                      |
| 72,2                               | 129480                      |
| 103,36                             | 152720                      |
| 148,05                             | 179280                      |
| 211,77                             | 239040                      |
| 303,09                             | 275560                      |

I dati numerici che precedono sono rappresentati nella figura 1, da cui si può notare come a tutte e tre le concentrazioni considerate il prodotto mostri un comportamento reologico non-newtoniano di tipo pseudoplastico, caratterizzato da andamento curvo con concavità rivolta verso il basso. In pratica, la viscosità diminuisce fortemente quando il gradiente di velocità aumenta, in modo tale che il prodotto si presenta viscoso in condizioni di riposo, ma in condizioni di un alto valore del gradiente di velocità (come avviene nel film lacrimale durante un ammiccamento, in cui si raggiungono valori di 10.000 s<sup>-1</sup>) la viscosità appare notevolmente ridotta. Le soluzioni studiate non presentano tissotropia, cioè non subiscono diminuzioni della viscosità

*Ing. Barzani & Zanardo*  
*Roma s.p.a.*

se il fluido viene sottoposto per un lungo periodo di tempo allo stesso gradiente di velocità.

La figura 1 mostra, inoltre, come si abbia un brusco aumento della viscosità nel passare da concentrazioni dell'1% a concentrazioni del 3%. Questo fenomeno è meglio evidenziato nella figura 2, dove sono riportati i valori di viscosità apparente  $\eta'$ , in mPa.s, in funzione della concentrazione in PPNP delle soluzioni. Il valore di  $\eta'$  è stato calcolato da grafici logaritmici di  $D$  rispetto a  $\tau$ , per estrapolazione ad un gradiente di velocità  $D = 1$ . La curva che interseca i punti del grafico è ben descritta dalla seguente equazione polinomiale di secondo grado:  $y = 870,786x^2 - 271,859x - 54,297$ .

Il comportamento reologico dei prodotti secondo l'invenzione è stato anche studiato al variare del pH, rilevando un andamento piuttosto stabile della viscosità nell'intorno della neutralità, seguito da un repentino abbassamento della viscosità in condizioni di pH acido. La seguente tabella 3 e la corrispondente figura riportano appunto i valori di viscosità apparente rilevati a vari pH per una soluzione di prodotto PPNP alla concentrazione dell'1,0% in peso.

TABELLA 3  
Viscosità del prodotto PPNP all'1% al variare del pH

| pH  | viscosità $\eta'$ (mPa.s) |
|-----|---------------------------|
| 9   | 338,06                    |
| 8   | 301,99                    |
| 7,5 | 297,17                    |
| 7   | 301,3                     |
| 6   | 291,74                    |
| 5,5 | 291,07                    |
| 4,5 | 225,42                    |
| 4   | 189,23                    |
| 3   | 154,88                    |

*Ing. Barrano & Zanardo*  
*Roma s.p.a.*

Come già notato, tale fenomeno può essere vantaggiosamente sfruttato per realizzare il confezionamento e la somministrazione a pH acido, in condizioni di viscosità ridotta, tenendo conto che in seguito all'instillazione il prodotto si porta ad un pH circa neutro, ritornando immediatamente più viscoso.

Le soluzioni secondo l'invenzione sono anche state sottoposte a sterilizzazione in autoclave, a 120°C per 20 minuti, e se ne sono poi determinate le curve reologiche per verificare l'effetto del trattamento termico sulle caratteristiche di flusso del prodotto. La tabella seguente e, corrispondentemente, la figura 4 mostrano, per il caso di una soluzione di PPNP all'1% in peso, che le caratteristiche di flusso pseudoplastico dei prodotti polisaccaridici in esame non sono sostanzialmente influenzate dal trattamento termico. Si è già notato come questa proprietà si traduce in un notevole vantaggio sotto il profilo produttivo, perché rende possibile la sterilizzazione per via termica in luogo della più complessa sterilizzazione filtrante a cui normalmente si deve fare ricorso per i prodotti della tecnica anteriore.

(segue tabella)

*Ing. Barxano G. Riccardo*  
*Roma s.p.a.*

TABELLA 4

Curve di flusso di PPNP all'1% prima e dopo trattamento in autoclave

| D, shear rate (sec <sup>-1</sup> ) | $\tau$ , shear stress (mPa) |                      |
|------------------------------------|-----------------------------|----------------------|
|                                    | senza trattam. termico      | con trattam. termico |
| 25,60                              | 3273,60                     | 2856,96              |
| 36,60                              | 4523,52                     | 3868,80              |
| 52,4                               | 5832,96                     | 5237,76              |
| 75,02                              | 7797,12                     | 7142,40              |
| 107,38                             | 10177,92                    | 9404,16              |
| 153,62                             | 13094,40                    | 12320,64             |
| 220,23                             | 16725,12                    | 15891,84             |
| 315,19                             | 20891,52                    | 20117,76             |
| 450,91                             | 25712,64                    | 25117,44             |
| 645,29                             | 30652,80                    | 30414,72             |
| 923,69                             | 36307,20                    | 36604,80             |
| 1322,40                            | 42556,80                    | 43628,16             |
| 1894,11                            | 50592,00                    | 52556,16             |
| 2709,40                            | 59996,16                    | 63210,24             |
| 3877,70                            | 70590,72                    | 75471,36             |

Lacrima artificiale - Prove biologiche

Vengono descritte nel seguito alcune delle sperimentazioni su animali che sono state condotte al fine di verificare in vivo le prestazioni dei prodotti dell'invenzione come preparati per lacrima artificiale. Tutte le prove riportate nel seguito sono state eseguite su conigli albini New Zealand maschi del peso di 2-2,5 kg sui quali la cheratocongiuntivite secca veniva indotta per instillazione ripetuta di atropina solfato all'1% in peso (AS). Come prodotto dell'invenzione è stata utilizzata la formulazione già descritta nell'esempio 1.1. Come notato,

*Ing. Barzani & Zanardo  
Roma s.p.a.*

questa soluzione viene formulata a pH 4,5-5,0 per sfruttare l'aumento della viscosità dopo somministrazione.

In un primo esperimento, condotto su 12 conigli, in entrambi gli occhi degli animali è stata instillata una goccia di AS, 3 volte al giorno per 5 giorni consecutivi. Dopo 5 minuti dalla somministrazione venivano instillati, nel solo occhio destro, 50 µl (corrispondenti ad una goccia) di soluzione di prodotto PPNP all'1%, isotonica, pH 5,0. Al tempo = 2, 3, 4 e 5 giorni dall'inizio del trattamento gli animali sono stati sottoposti ad osservazione della superficie oculare dopo colorazione con fluoresceina sodica. L'osservazione della cornea è stata effettuata con lampada a fessura equipaggiata con filtro al blu cobalto. I risultati ottenuti, su almeno 10 animali, sono riportati nella seguente tabella 5 come numero di occhi fluopositivi (in cui sono stati osservati punti intensamente colorati, corrispondenti ad alterazioni epiteliali della cornea) rispetto al numero totale di occhi osservati.

TABELLA 5

Prove su animali - Test di colorazione con fluoresceina

| Tempo dall'inizio del trattam.<br>con AS (giorni) | 2                                       | 3    | 4    | 5    |
|---|---|------|------|------|
|   | numero di occhi fluopositivi sul totale |      |      |      |
| Occhio dx. - (trattato)                           | 0/12                                    | 0/12 | 0/10 | 0/10 |
| Occhio sin. - (non trattato)                      | 0/12                                    | 0/12 | 3/10 | 6/10 |

I risultati che precedono mostrano che negli occhi trattati con il prodotto PPNP non si sono mai osservate lesioni corneali, al contrario di quanto avviene negli occhi in cui la sindrome dell'occhio secco, indotta dall'atropina, non viene trattata.

*Ing. Barzani & Zanardo*  
*Roma s.p.a.*

In un'altra serie di prove, l'efficacia del prodotto PPNP all'1% come lacrima artificiale è stata valutata, rispetto a controlli non trattati e ad altri trattati con un prodotto commerciale della tecnica anteriore, per mezzo del test di Schirmer sulla secrezione lacrimale. Anche in questo caso la cheratocongiuntivite secca è stata indotta con somministrazioni di AS all'1%, 3 volte al giorno per 5 giorni consecutivi.

Gli animali sono stati suddivisi in tre gruppi, che sono stati trattati come segue:

- al 1° gruppo venivano somministrati, 5 minuti dopo l'instillazione di AS, 50 µl (corrispondenti ad una goccia) di soluzione di prodotto PPNP all'1%, isotonica, pH 5,0;
- al 2° gruppo venivano somministrati, 5 minuti dopo l'instillazione di AS, 50 µl (corrispondenti ad una goccia) di una lacrima artificiale commerciale viscosizzata con idrossipropilmetilcellulosa (HPMC) allo 0,5% in peso;
- al 3° gruppo non è stato praticato alcun trattamento.

Al tempo = 0, 2, 3, 4 e 5 giorni dall'inizio del trattamento gli animali sono stati sottoposti al test. Il punteggio arbitrario attribuito al test di Schirmer è stato così calcolato: 0,278 punti per ogni 5 secondi impiegati per la salita del fluido lacrimale fino a 10 mm (con un massimo di 10 punti in 3 minuti); trascorsi 3 minuti, se la carta bibula non si è imbevuta fino a 10 mm, vengono attribuiti 10 punti + 1 punto per ogni mm di carta non imbevuto.

I risultati numerici della prova sono riportati nella seguente tabella, e il corrispondente andamento grafico è rappresentato nella

*Ing. Barzani & Zanardo*  
*Roma s.p.a.*

figura 5 allegata.

TABELLA 6

Prove su animali - Test di Schirmer sulla secrezione lacrimale

| Tempo<br>(giorni) | PPNP 1% |           | HPMC 0,5% |          | non trattato |          |
|-------------------|---------|-----------|-----------|----------|--------------|----------|
|                   | punt.   | err. std. | punt      | err. std | punt         | err. std |
| 0                 | 6,079   | 0,39      | 6,079     | 0,39     | 6,079        | 0,39     |
| 2                 | 8,480   | 1,22      |           |          | 12,000       | 1,26     |
| 3                 | 9,230   | 1,24      | 8,430     | 1,12     | 10,320       | 1,28     |
| 4                 | 4,540   | 0,64      | 7,640     | 1,23     | 10,790       | 1,71     |
| 5                 | 5,190   | 0,92      | 7,950     | 1,09     | 11,290       | 1,57     |

Come si può notare dai dati che precedono e soprattutto dal diagramma di figura 5, il punteggio del test di Schirmer per i controlli aumenta in modo statisticamente significativo sin dal secondo giorno di trattamento con atropina solfato, confermando così la validità del metodo adottato per l'induzione della cheratocongiuntivite secca. È inoltre chiaramente evidenziato l'effetto di protezione contro l'occhio secco, esplicito dal prodotto dell'invenzione in misura anche superiore a quello della lacrima artificiale della tecnica anteriore. In effetti, con l'uso del PPNP la produzione lacrimale ritorna quasi al valore basale a partire dal quarto giorno di trattamento.

Veicolo per farmaci oftalmici - Prove biologiche

Le prove in vivo riportate nel seguito concernono la valutazione delle prestazioni del prodotto polisaccaridico dell'invenzione come veicolo mucoadesivo e viscosizzante per formulazioni oftalmiche del tipo a rilascio protratto. Per valutare tali prestazioni si è utilizzato a scopo esemplificativo un farmaco antiglaucoma ad attività miotica, la

*Ing. Barzani G. Ranardo*  
*Roma s.p.a.*

pilocarpina, rilevando il tempo di permanenza precorneale e l'attività miotica in funzione del tempo di vari preparati contenenti lo stesso principio attivo ma diversi per quanto riguarda la formulazione degli eccipienti. In modo specifico, tutte le formulazioni oftalmiche utilizzate contenevano il 2,0% in peso di pilocarpina nitrato ( $\text{PiNO}_3$ ), ma la formulazione di controllo indicata nella seguente tabella con SR era una soluzione acquosa priva di agente polimerico viscosizzante, mentre le altre tre contenevano ciascuna un diverso veicolo polimerico.

TABELLA 7

Formulazioni oftalmiche utilizzate nelle prove

| Formulazione | Principio attivo      | Tipo e concentrazione (% in p) di polimero |
|--------------|-----------------------|--|
| SR           | Pi $\text{NO}_3$ 2,0% | nessuno                                    |
| PPNP         | Pi $\text{NO}_3$ 2,0% | PPNP 3,0%                                  |
| PVA          | Pi $\text{NO}_3$ 2,0% | alcool polivinilico 13%                    |
| HPMC         | Pi $\text{NO}_3$ 2,0% | idrossipropilmetilcellulosa 14%            |

Tutte le prove che seguono sono state effettuate su conigli albini New Zealand maschi del peso di 3-3,5 kg, non anestetizzati e mantenuti in condizioni di stabulazione standard, alla temperatura di 18-20 °C. Sia l'effetto miotico che il tempo di permanenza del farmaco nel fluido lacrimale veniva valutato dopo instillazione (al tempo = 0) di 25  $\mu\text{l}$  del preparato allo studio nel sacco congiuntivale inferiore di un occhio dei conigli, mentre l'occhio consensuale costituiva il controllo.

La variazione del diametro pupillare veniva misurata con un micrometro ad intervalli opportuni di tempo, mantenendo costante l'intensità della sorgente luminosa. Il grafico che illustra la risposta

*Ing. Barzani & Barzani*  
*Roma s.p.a.*

miotica nel tempo dopo instillazione di ciascuna delle 4 soluzioni oftalmiche sopra definite, espressa in termini di variazione del diametro pupillare (in mm) in funzione del tempo (in min.) trascorso dall'instillazione del preparato è riportato nella figura 6, in cui le barre verticali sopra ogni punto sperimentale rappresentano l'errore standard. I valori numerici corrispondenti alle curve di fig. 6 sono riportati nella seguente tabella.

(segue tabella)

*Ing. Barzani & Zanardo*  
*Roma s.p.a.*

TABELLA 8

Risposta miotica nel tempo delle formulazioni allo studio

| Tempo<br>(min) | SR                  |           | PPNP                |           | PVA                 |           | HPMC                |           |
|----------------|---------------------|-----------|---------------------|-----------|---------------------|-----------|---------------------|-----------|
|                | $\Delta$ diam. (mm) | err. std. | $\Delta$ diam. (mm) | err. std. | $\Delta$ diam. (mm) | err. std. | $\Delta$ diam. (mm) | err. std. |
| 0              | 0,00000             | 0,00000   | 0,00000             | 0,00000   | 0,00000             | 0,00000   | 0,00000             | 0,00000   |
| 5              | 1,00000             | 0,10911   | 0,62500             | 0,13933   | 0,61111             | 0,11111   | 0,37500             | 0,23936   |
| 10             | 1,85710             | 0,23690   | 2,20830             | 0,18928   | 2,00000             | 0,16667   | 3,00000             | 0,54006   |
| 20             | 3,14290             | 0,35714   | 3,00000             | 0,22191   | 3,50000             | 0,23570   | 4,50000             | 0,00000   |
| 30             | 3,14290             | 0,28272   | 3,37500             | 0,19584   | 3,72220             | 0,20601   | 4,75000             | 0,25000   |
| 40             | 3,42860             | 0,17003   | 3,54170             | 0,17899   | 4,11110             | 0,27358   | 4,50000             | 0,00000   |
| 60             | 2,92860             | 0,17003   | 3,45830             | 0,17899   | 3,83330             | 0,20412   | 4,50000             | 0,35355   |
| 90             | 2,57140             | 0,20203   | 2,95830             | 0,19903   | 2,83330             | 0,28868   | 3,37500             | 0,31458   |
| 120            | 1,64290             | 0,26082   | 2,45830             | 0,30438   | 2,16670             | 0,31180   | 1,75000             | 0,32275   |
| 180            | 0,71429             | 0,14869   | 1,50000             | 0,19462   | 1,11890             | 0,28599   | 0,75000             | 0,14434   |
| 240            | 0,00000             | 0,00000   | 0,79167             | 0,15641   | 0,22222             | 0,12108   | 0,00000             | 0,00000   |
| 300            |                     |           | 0,00000             | 0,00000   |                     |           |                     |           |

Come si può rilevare dalle curve di fig. 6, sia le formulazioni della tecnica anteriore, PVA e HPMC, che quella a base di polisaccaride della gomma di tamarindo secondo l'invenzione, PPNP, provocano un aumento della risposta miotica rispetto alla soluzione di riferimento priva di agenti viscosizzanti (SR). L'effetto mucoadesivo del prodotto contenuto nella formulazione PPNP si manifesta con un aumento della durata della risposta miotica, che arriva a 300 min.. Tale fenomeno non si verifica, o si verifica in misura del tutto trascurabile, con gli altri veicoli, per i quali la durata della risposta miotica arriva a circa 240 min.. È da notare, a questo proposito, che l'HPMC è comunemente ritenuto un prodotto mucoadesivo.

Per verificare se il prodotto dell'invenzione era capace di prolungare, nei confronti di altri polimeri, la permanenza del farmaco nell'area precomeale, lo studio è stato così condotto: dopo instillazione di uno dei preparati allo studio venivano raccolti, ad opportuni intervalli di tempo, campioni di fluido lacrimale (1  $\mu$ l) dalla porzione marginale del sacco congiuntivale inferiore, utilizzando un microcapillare ed evitando ogni contatto con l'epitelio corneale. I campioni di fluido lacrimale, trasferiti in microprovette, venivano diluiti con acqua e analizzati mediante HPLC.

I risultati di tale prova sono riportati, in termini di concentrazione ( $\mu$ g/ $\mu$ l) di pilocarpina rilevata nel fluido lacrimale in funzione del tempo, nella tabella 9 che segue e nella corrispondente figura 7.

*Ing. Pavanò & Zanardo*  
*Roma s.p.a.*

TABELLA 9

Tempo di permanenza del farmaco nel fluido lacrimale

| Tempo<br>(min) | SR                                  |           | PPNP                                |           | PVA                                 |           | HPMC                                |           |
|----------------|-------------------------------------|-----------|-------------------------------------|-----------|-------------------------------------|-----------|-------------------------------------|-----------|
|                | conc. ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) | err. std. | conc. ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) | err. std. | conc. ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) | err. std. | conc. ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) | err. std. |
| 1              | 4,786000                            | 0,467000  |                                     |           |                                     |           |                                     |           |
| 3              | 1,194400                            | 0,226610  | 4,377900                            | 0,3063000 | 6,245000                            | 0,716710  | 3,894000                            | 0,320000  |
| 5              | 0,359860                            | 0,126810  | 2,720700                            | 0,2563300 | 4,322500                            | 0,262500  | 1,900000                            | 0,038000  |
| 10             | 0,152900                            | 0,039897  | 0,924170                            | 0,1997100 | 1,018200                            | 0,193710  | 1,030000                            | 0,086000  |
| 15             | 0,067674                            | 0,041353  | 0,590830                            | 0,1195000 | 0,330130                            | 0,149760  | 0,583000                            | 0,077000  |
| 30             |                                     |           | 0,175280                            | 0,0591650 | 0,059650                            | 0,019638  | 0,074000                            | 0,005500  |
| 45             |                                     |           | 0,060033                            | 0,0057391 | 0,028733                            | 0,011403  | 0,025000                            | 0,001800  |
| 60             |                                     |           |                                     |           |                                     |           | 0,016000                            | 0,001790  |

Come si può rilevare dalla fig. 7, dopo l'instillazione della soluzione acquosa di riferimento di  $\text{PiNO}_3$  (SR) si ha una rapida diminuzione della concentrazione di farmaco nel fluido lacrimale, mentre l'aggiunta di polimeri alla soluzione provoca, in tutti i casi, un aumento della biodisponibilità del farmaco. Le differenze nel comportamento dei vari veicoli sono meglio evidenziate dalla tabella seguente, in cui sono riportati i parametri farmacocinetici della pilocarpina nel fluido lacrimale per le varie formulazioni, ricavati dalla sperimentazione descritta. Detti parametri sono i seguenti:

- $K_e$  : costante di velocità di eliminazione apparente
- $\text{AUC}_{t_{3\text{min}} \rightarrow t_{\infty}}$  : area sotto la curva - concentrazione di farmaco nel fluido lacrimale in funzione del tempo - con intervallo di integrazione 3 min.  $\rightarrow \infty$
- $\text{AUC}_{\text{rel}}$  : AUC relativa alla soluzione di riferimento
- $t_{1/2}$  : tempo di emivita del farmaco nel fluido lacrimale
- MRT : tempo di residenza medio del farmaco nel fluido lacrimale.

TABELLA 10

Parametri farmacocinetici della pilocarpina nel fluido lacrimale

| Formulaz. | $K_e$<br>( $\text{min}^{-1}$ ) | $\text{AUC}_{t_{3\text{min}} \rightarrow t_{\infty}}$<br>( $\text{min} \cdot \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ ) | $\text{AUC}_{\text{rel}}$ | $t_{1/2}$<br>(min) | MRT<br>(min) |
|-----------|--------------------------------|--|---------------------------|--------------------|--------------|
| SR        | 0,220                          | 3,69   | 1,00                      | 3,15               | 6,12         |
| PPNP      | 0,114                          | 27,28  | 7,39                      | 6,08               | 9,18         |
| PVA       | 0,176                          | 34,05  | 9,23                      | 3,94               | 5,98         |
| HPMC      | 0,098                          | 23,13  | 6,27                      | 8,83               | 8,83         |

I valori che precedono mostrano che i veicoli maggiormente mucoadesivi (PPNP e HPMC) producono un aumento del tempo di

Ing. Bassano & Ranardo  
 Roma s.p.a.

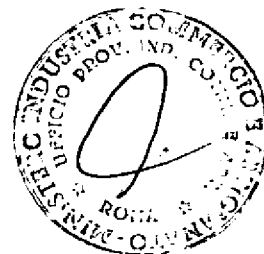
emivita di almeno due volte rispetto alla soluzione di riferimento. Un marcato aumento si nota anche nel tempo di residenza medio del principio attivo nel fluido lacrimale, tale aumento essendo comunque più elevato per il prodotto dell'invenzione che per gli altri veicoli esaminati. Questo risultato, assieme a quanto già osservato in relazione all'attività miotica, conferma che l'uso del polisaccaride della gomma di tamarindo come agente viscosizzante e mucoadesivo è in grado di protrarre la permanenza di farmaci oftalmici nell'area precorneale, prolungandone così l'efficacia per ogni singola applicazione.

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

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Marina Banchetti  
(N° d'iscr. 463)

*Marina Banchetti*

*Ing. Barzani & Barzani  
Roma s.p.a.*



RIVENDICAZIONI

1. Uso della frazione polisaccaridica della gomma di tamarindo per la produzione di una soluzione oftalmica viscosizzata, utile come lacrima artificiale e come veicolo per farmaci oftalmici a rilascio protratto.

2. Uso secondo la rivendicazione 1, in cui detta soluzione oftalmica contiene dallo 0,1 al 5,0% in peso di detta frazione polisaccaridica.

3. Uso secondo la rivendicazione 2, in cui detta soluzione oftalmica contiene dallo 0,5 al 3,0% in peso di detta frazione polisaccaridica.

4. Uso secondo la rivendicazione 3 in cui detta soluzione oftalmica è un preparato di lacrima artificiale, contenente dallo 0,7 all'1,5% in peso di frazione polisaccaridica della gomma di tamarindo.

5. Uso secondo la rivendicazione 4 in cui detto preparato contiene l'1% in peso di detta frazione polisaccaridica.

6. Uso secondo la rivendicazione 2 in cui detta soluzione oftalmica è un veicolo per farmaci oftalmici, contenente dall'1 al 4% in peso di frazione polisaccaridica della gomma di tamarindo.

7. Uso secondo la rivendicazione 6 in cui detto veicolo è in forma di gel, e contiene dal 3 al 4% in peso di detta frazione polisaccaridica.

8. Uso secondo ognuna delle rivendicazioni precedenti in cui detta frazione polisaccaridica è ottenuta per purificazione della gomma

*Ing. Barzani & Barzani*  
*Roma s.p.a.*

di tamarindo commerciale.

9. Uso secondo ognuna delle rivendicazioni 1-8 in cui detta soluzione oftalmica contiene, inoltre, uno o più agenti regolatori della tonicità.

10. Preparato oftalmico per l'uso come lacrima artificiale contenente, come agente viscosizzante, la frazione polisaccaridica della gomma di tamarindo.

11. Preparato secondo la rivendicazione 10, contenente dallo 0,7 all'1,5% in peso di detta frazione polisaccaridica.

12. Preparato oftalmico ad attività terapeutica contenente, come veicolo, la frazione polisaccaridica della gomma di tamarindo.

13. Preparato secondo la rivendicazione 12 in forma di gel, contenente dal 3 al 4% in peso di detta frazione polisaccaridica.

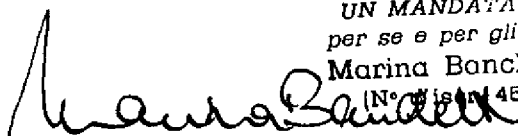
14. Preparato secondo le rivendicazioni 10-13 contenente, inoltre, uno o più agenti regolatori della tonicità.

15. Uso della frazione polisaccaridica della gomma di tamarindo in soluzioni oftalmiche e relativi preparati secondo le rivendicazioni 1-14, sostanzialmente come in precedenza illustrato e descritto.

ROMA, - 5 FEB. 1998

p.p. FARMIGEA S.p.A.

ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

*UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Marina Bonchetti  
(N° di iscr. 463)*  


MB

*Ing. Barzano' & Zanardo  
Roma s.p.a.*

FIG. 1

RM96A000075

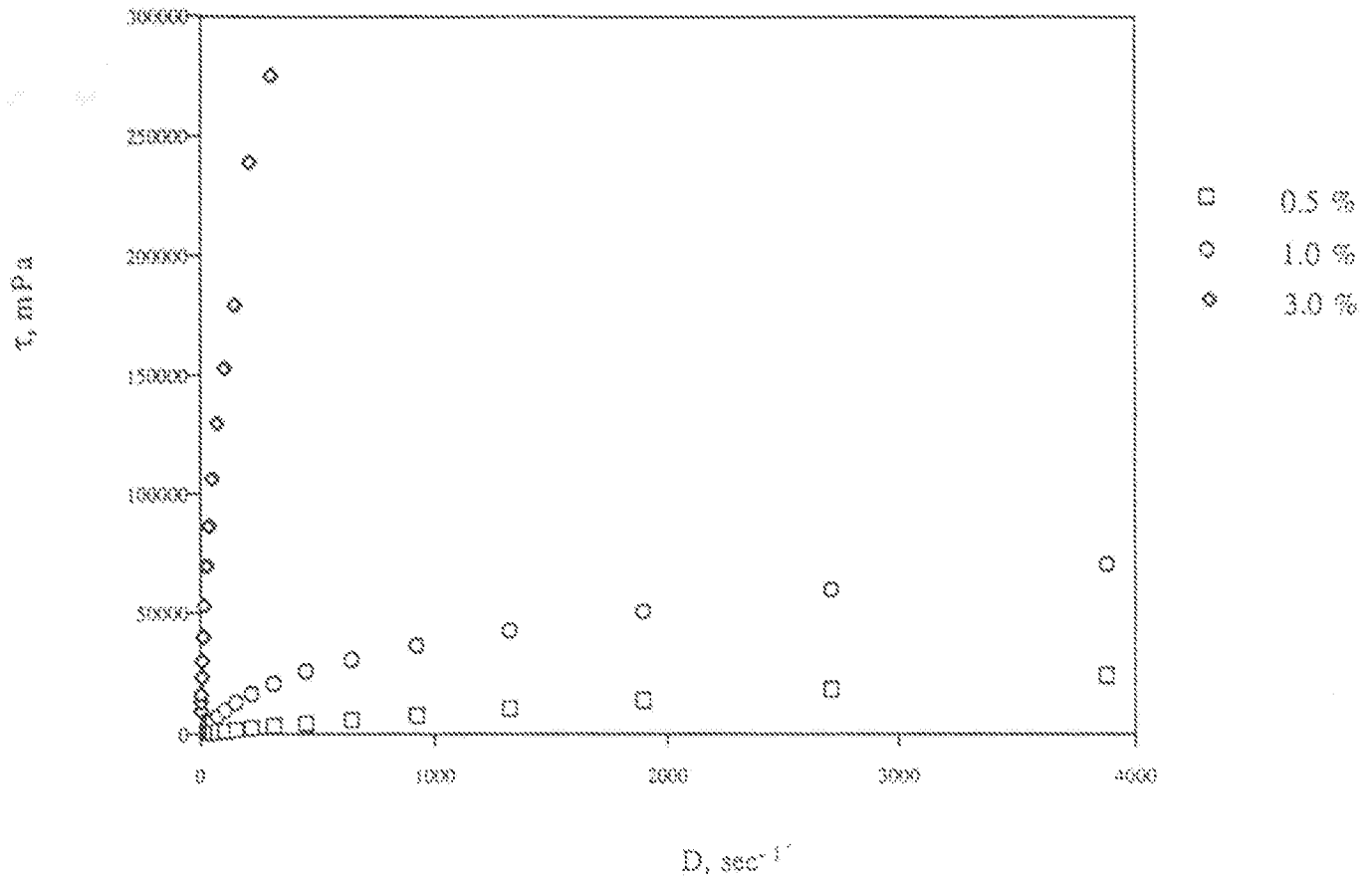
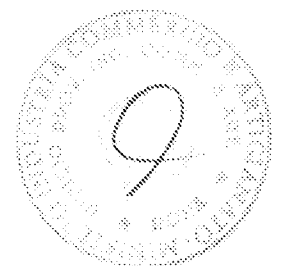
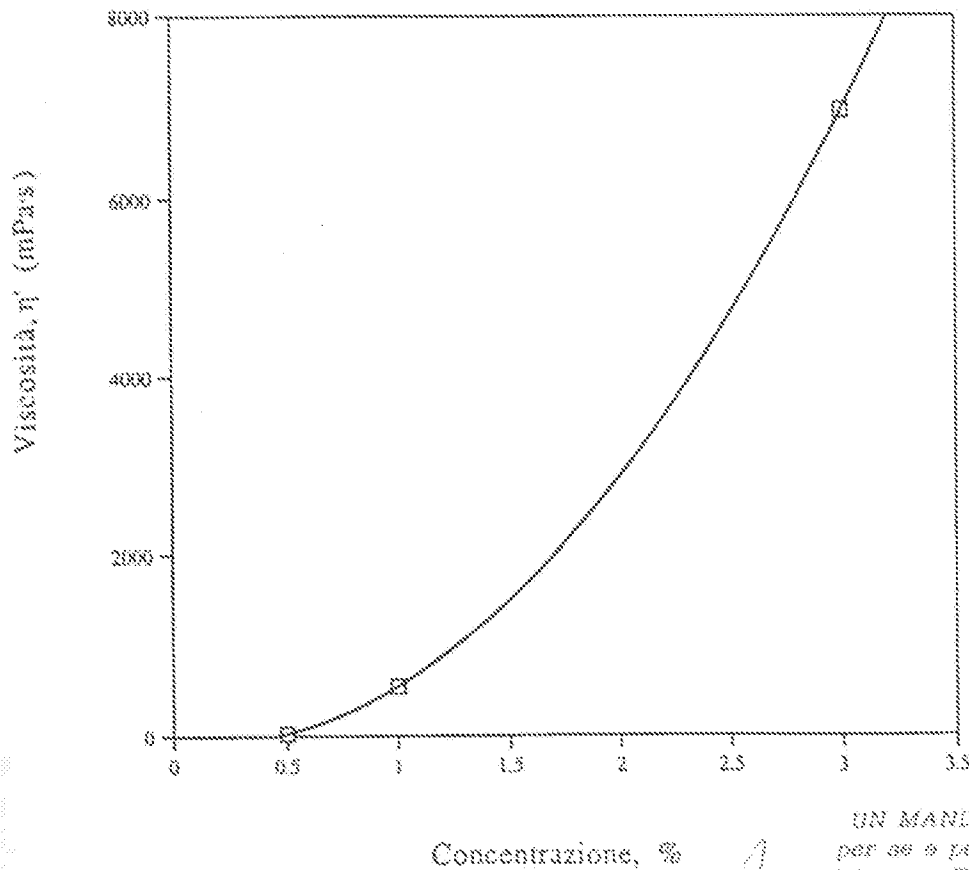


FIG. 2



D.P.I.: FARMIGEA S.p.A.  
ING. BARZANO & ZANARDO ROMA S.p.A.

Concentrazione, %

UN MANDALINO  
per se e per gli altri  
Marino Bonchetti  
(19° C 1983)

*Marino Bonchetti*

FIG. 3 RM 96 A 000075

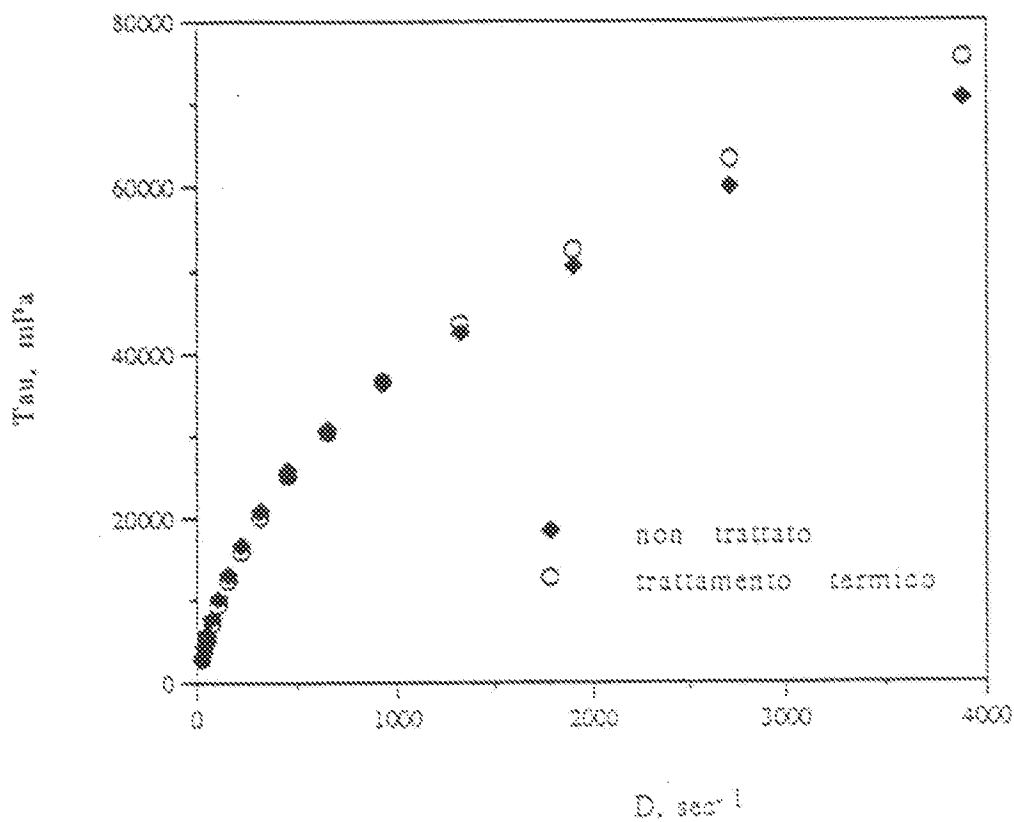
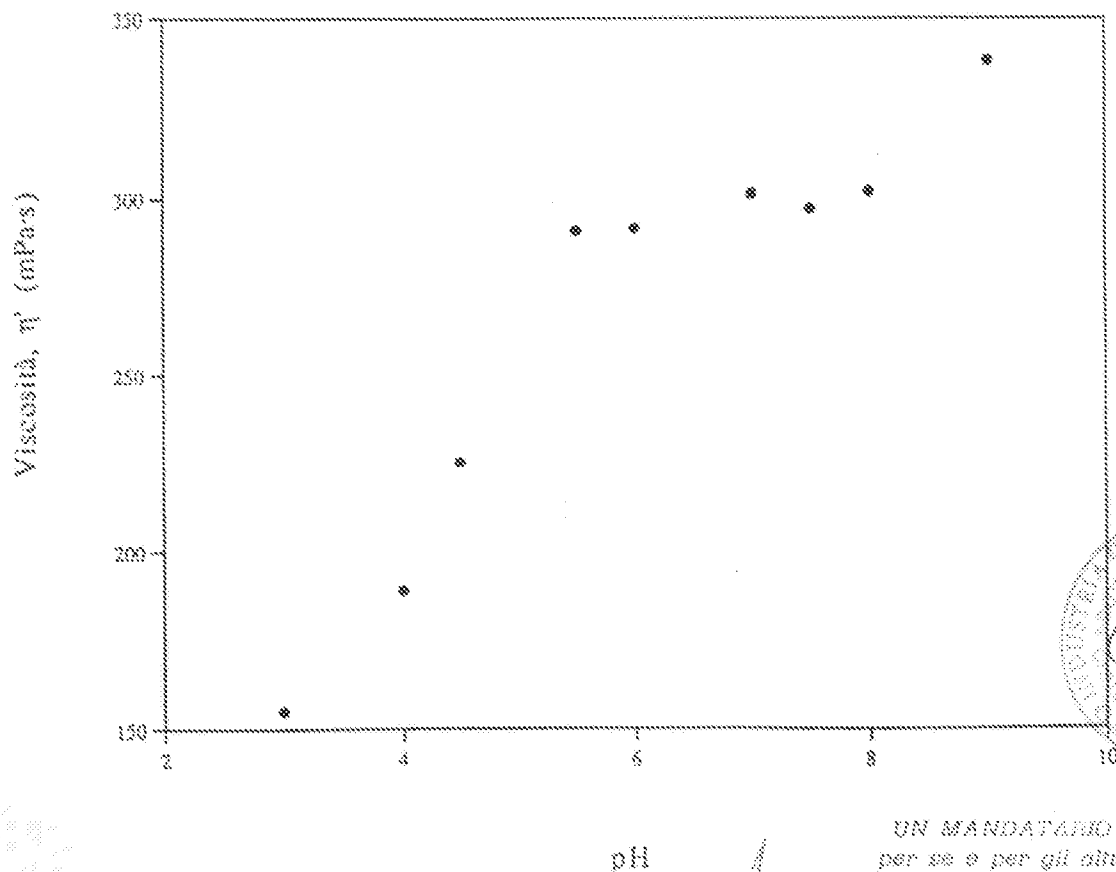


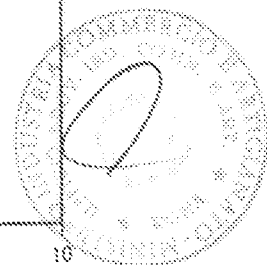
FIG. 4



D.P.: FARMIGEA S.p.A.  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

pH

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Marina Bonchetti  
IN. d. 27/4/53



RM96 A 000075

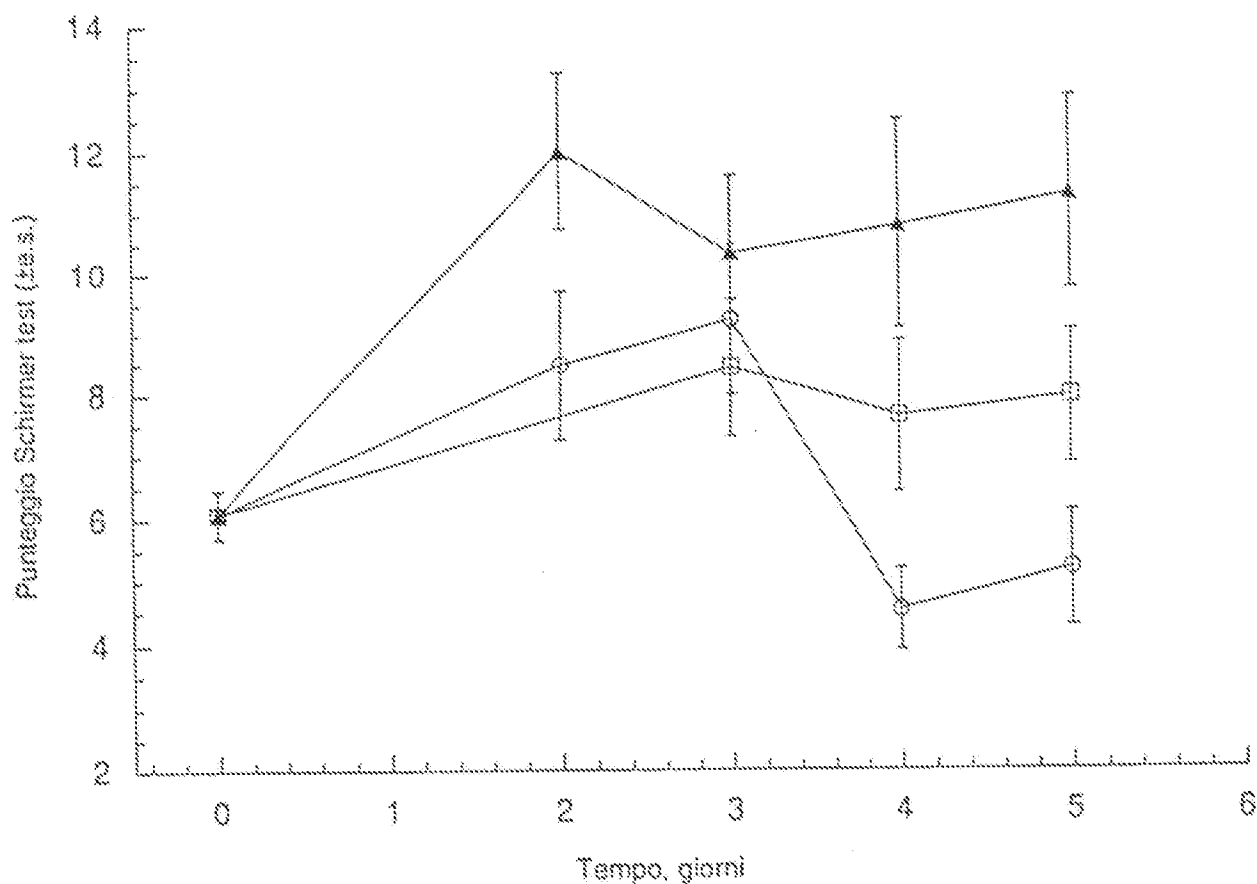
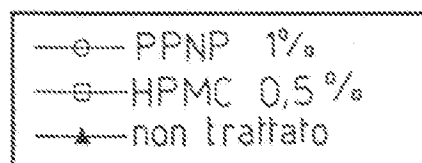


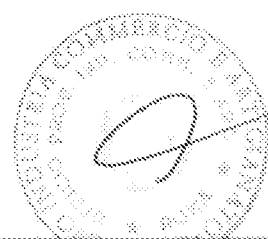
FIG. 5



D.P.: FARNIGEA S.p.A.  
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Marino Bonchetti  
(N° 44444)

*Marino Bonchetti*



*Marino Bandolin*

RM96A000075

FIG. 6

UN MANDATARIO  
per se e per i suoi  
Marino Bandolin  
(N° d'iscr. 453)

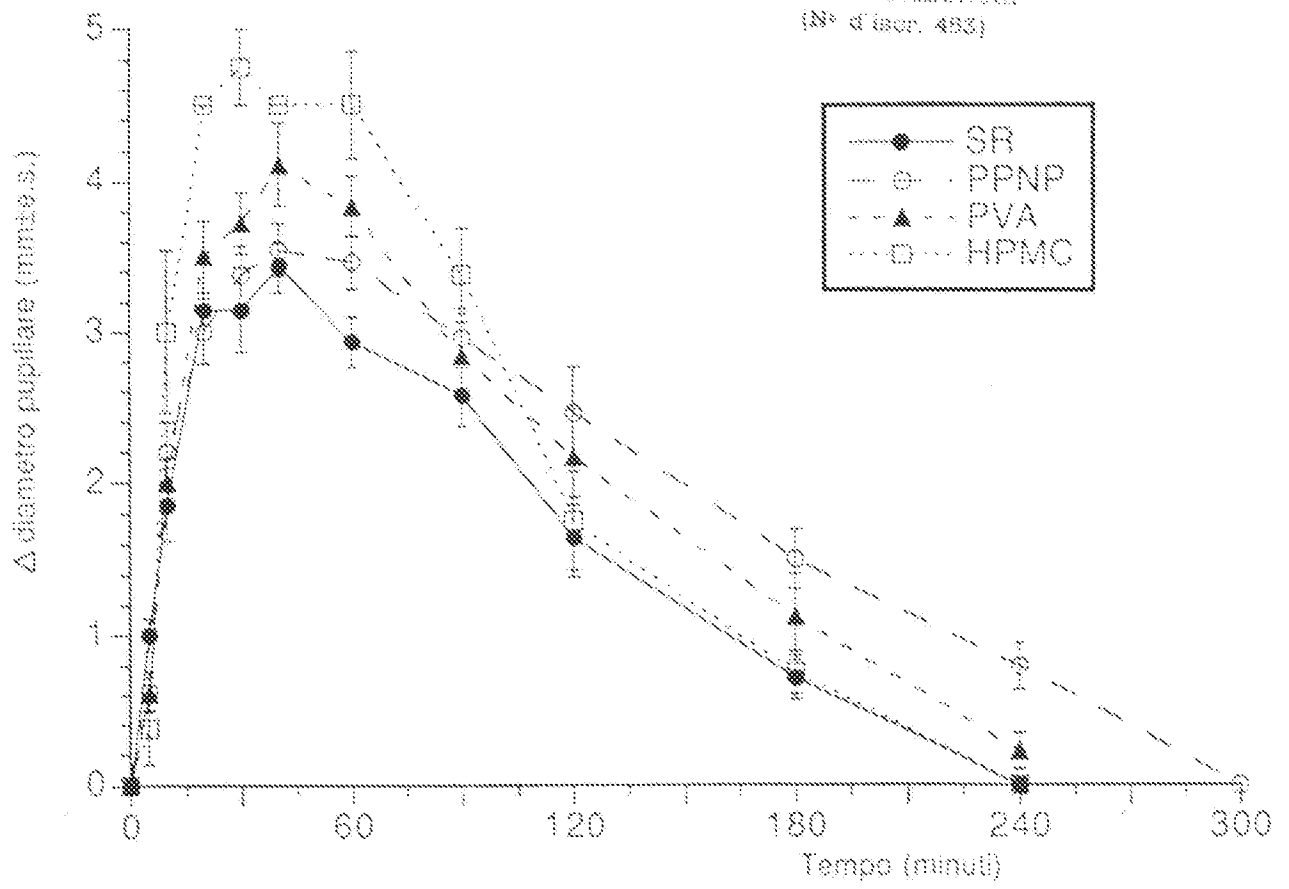


FIG. 7

