

TRADUZIONE DEL TESTO DEL BREVETTO EUROPEO N. 2343982

DAL TITOLO:

“COMPOSIZIONI FARMACEUTICHE E RELATIVI METODI DI
SOMMINISTRAZIONE”

*** **

Descrizione

Rivendicazione della priorità

Questa domanda rivendica la priorità delle domande U.S.S.N. 61/097,716, depositata il 17 settembre, 2008, U.S.S.N. 61/141,686, depositata il 31 dicembre, 2008, e U.S.S.N. 61/161,387, depositata il 18 marzo, 2009, ciascuna delle quali è incorporata nel presente documento a titolo di riferimento per intero.

Campo della tecnologia

La presente invenzione riguarda generalmente composizioni farmaceutiche che permettono una somministrazione migliorata per es. somministrazione orale e metodi per usare tali composizioni.

Stato dell'arte

Le tecniche che permettono un trasferimento efficiente di una sostanza di interesse attraverso una barriera biologica sono di notevole interesse nei campi della biotecnologia e della medicina. Per esempio, tali tecniche possono essere usate per il trasporto di una varietà di sostanze diverse attraverso una barriera biologica regolato da giunzioni occludenti (ovvero, gli epitelii mucosali, che includono gli epitelii intestinali e respiratori, e gli endotelii vascolari, che includono la barriera

ematoencefalica, la membrana nasale, la cornea e altre membrane oculari e le membrane genitourinarie). In particolare, vi è un grande interesse per la somministrazione orale degli agenti terapeutici per evitare l'uso di mezzi di somministrazione più invasivi e quindi migliorare la comodità e la compliance del paziente.

Sono stati impiegati diversi veicoli di somministrazione di farmaci, tra cui liposomi, nanoparticelle lipidiche o nanoparticelle polimeriche, e microemulsioni. Questi hanno migliorato la biodisponibilità di alcuni farmaci, per lo più per l'effetto protettivo che offrono. Tuttavia, per i farmaci più importanti, la biodisponibilità rimane molto bassa e non raggiunge gli obiettivi terapeutici minimi.

La domanda di brevetto statunitense US 2007/0219131 divulga composizioni farmaceutiche comprendenti una quantità terapeuticamente efficace di una molecola effettrice, uno o più agenti di fluidificazione della membrana e un mezzo idrofobo, in cui la composizione, quando somministrata a un soggetto, fornisce una traslocazione efficace dell'effettore attraverso una barriera biologica. US 2007/0219131 non divulga octreotide come molecola effettrice.

Quindi, sussiste la necessità di un mezzo efficiente, specifico, non invasivo, a basso rischio per bersagliare varie barriere biologiche per la somministrazione non invasiva di vari agenti terapeutici quali peptidi e polipeptidi, farmaci macromolecolari e altri agenti terapeutici che includono piccole molecole con biodisponibilità ridotta.

Sommario

Gli inventori della presente invenzione hanno scoperto che l'assorbimento di alcuni agenti terapeutici in un soggetto può essere migliorato quando sono somministrati in una descrizione descritta nel presente documento. Per esempio, un agente terapeutico somministrato in una formulazione descritta nel presente documento presenta una biodisponibilità migliorata (BA) rispetto allo stesso agente terapeutico somministrato attraverso un'analogia via di somministrazione ma in una composizione sostanzialmente priva del componente di sale di acido grasso a catena media descritto nel presente documento o avente una quantità inferiore del componente di sale di acido grasso a catena media descritto nel presente documento. Tale miglioramento di BA relativa può essere dell'ordine di almeno circa 1,5, 2, 3, 5, 10, 50 o 100 volte. Una composizione descritta nel presente documento può migliorare l'assorbimento nel tratto gastrointestinale (GI) di un agente terapeutico che è caratterizzato generalmente da biodisponibilità orale e/o assorbimento ridotti o nulli. Questi agenti terapeutici possono avere biodisponibilità ridotta o nulla, per es., in soluzione acquosa, e in altre formulazioni orali note dell'arte. Una composizione descritta nel presente documento può migliorare la biodisponibilità migliorando la permeabilità della parete/barriera GI alle molecole di farmaco. Per esempio, una composizione descritta nel presente documento può facilitare l'assorbimento permeando la parete/barriera GI principalmente dissigillando le giunzioni occludenti

tra le cellule epiteliali del GI, sebbene possa funzionare anche per assorbimento transcellulare.

I presenti inventori hanno ideato un processo per produrre una composizione farmaceutica (prodotto farmaceutico sfuso) che comporta preparare una composizione idrosolubile comprendente una quantità terapeuticamente efficace di almeno un agente terapeutico e un sale di acido grasso a catena media (e altri ingredienti, vedere sotto), essiccare (per es. tramite liofilizzazione) la composizione idrosolubile per ottenere una polvere solida, e sospendere il materiale liofilizzato (la polvere solida) in un mezzo idrofobo (oleoso), preferibilmente olio di ricino o gliceril tricaprilato (includente altri ingredienti per es. PVP e tensioattivi e modificatori di viscosità, vedere sotto), per produrre una sospensione contenente in forma solida l'agente terapeutico e il sale di acido grasso a catena media, producendo in tal modo il prodotto farmaceutico sfuso, che deve contenere almeno il 10% in peso di sale di acido grasso a catena media. La forma solida può comprendere una particella (per es., è costituita essenzialmente da particelle, o è costituita da particelle). La particella può essere prodotta tramite liofilizzazione o tramite granulazione. Il prodotto farmaceutico sfuso può poi essere incapsulato in capsule che saranno rivestite con un rivestimento sensibile al pH e può essere usato per la somministrazione orale. Un processo per produrre una formulazione descritta nel presente documento è mostrato in Figura 1, in cui l'insulina è esemplificata come ingrediente farmaceutico attivo (API) e il sale di

acido grasso a catena media è ottanoato di sodio (Na-C8), altresì definito caprilato di sodio.

La presente invenzione dimostra il rilascio del prodotto nell'intestino, che è un modello per la somministrazione orale, e da lì al circolo ematico con elevata biodisponibilità.

Perciò in un aspetto l'invenzione è caratterizzata da una composizione. La composizione include un agente terapeutico, che è octreotide, e un sale di acido grasso a catena media associato a un mezzo sostanzialmente idrofobo, preferibilmente olio di ricino, in cui l'agente terapeutico e il suo sale di acido grasso a catena media sono in forma solida, per es. nella stessa forma solida quale una particella, ottenuta tramite essiccazione da un mezzo acquoso, per es. liofilizzando il mezzo acquoso, e in cui il sale di acido grasso a catena media è presente al 10% in peso o più, preferibilmente al 12 -15%, per es., circa 12%, circa 13%, circa 14%, o circa 15% o circa 16%, o circa 17%, e in cui la composizione contiene altri ingredienti (come descritti nel presente documento) ma è sostanzialmente priva di un "agente di fluidificazione della membrana". Gli "agenti di fluidificazione della membrana" sono definiti come vari alcoli a catena media lineari, ramificati, aromatici e ciclici, in particolare geraniolo e ottanolo.

Le presenti composizioni dell'invenzione non sono emulsioni. Quasi tutte le presenti composizioni sono sospensioni oleose e la quantità di acqua nelle composizioni è molto ridotta; poche delle

presenti composizioni che non sono sospensioni incorporano una quantità elevata (circa il 78% di acido ottanoico) e sono soluzioni.

Nelle composizioni dell'invenzione, l'agente terapeutico e il sale di acido grasso a catena media sono in contatto intimo con il mezzo sostanzialmente idrofobo. Per esempio, una polvere comprendente l'agente terapeutico e il sale di acido grasso a catena media viene rivestita, immersa o sospesa nel mezzo sostanzialmente idrofobo.

Durante il processo di produzione il mezzo acquoso che contiene l'agente terapeutico e il sale di acido grasso a catena media e gli altri ingredienti viene essiccato (per es. tramite liofilizzazione) per ottenere la frazione idrofila che è una polvere (per es., una forma solida comprendente una pluralità di particelle), e una particella in tale polvere contiene tutti gli ingredienti ovvero l'agente terapeutico e il sale di acido grasso a catena media sono insieme in un'unica particella. La forma solida può essere, per esempio, una particella granulata o una particella liofilizzata.

Secondo l'invenzione, l'agente terapeutico è octreotide.

In alcune forme di realizzazione, la composizione include una pluralità di sali di acido grasso a catena media e loro derivati. Per esempio, la particella solida può includere inoltre una pluralità di sali di acido grasso a catena media e loro derivati.

In alcune forme di realizzazione, il sale di acido grasso a catena media è selezionato dal gruppo costituito da esanoato di sodio, eptanoato di sodio, ottanoato di sodio, nonanoato di sodio, decanoato

di sodio, undecanoato di sodio, dodecanoato di sodio, tridecanoato di sodio, e tetradecanoato di sodio o una loro combinazione. Secondo una o più forme di realizzazione, la composizione è sostanzialmente priva di dodecanoato di sodio, tridecanoato di sodio, e tetradecanoato di sodio. In alcune forme di realizzazione, l'acido grasso a catena media è ottanoato di sodio e l'ottanoato di sodio è presente in una concentrazione superiore al 10% per es. tra circa l'11% e circa il 50% peso/peso (p/p).

In alcune forme di realizzazione, il mezzo sostanzialmente idrofobo comprende un trigliceride. Per esempio, il trigliceride può essere selezionato dal gruppo costituito da tributirato di glicerile, monooleato di glicerile, monocaprilato di glicerile e tricaprilato di glicerile.

In alcune forme di realizzazione, il mezzo sostanzialmente idrofobo comprende olio minerale, olio di ricino, olio di oliva, olio di mais, olio di cocco, olio di arachidi, olio di soia, olio di cotone, olio di sesamo od olio di colza, o loro combinazioni.

In alcune forme di realizzazione la composizione idrosolubile contiene un sale di acido grasso a catena media e il mezzo idrofobo contiene il corrispondente acido grasso a catena media; in alcune forme di realizzazione particolari il sale di acido grasso a catena media è un sale di acido ottanoico quale ottanoato di sodio e l'acido grasso a catena media è acido ottanoico.

In alcune forme di realizzazione la composizione idrosolubile contiene un sale di acido grasso a catena media e il mezzo idrofobo contiene il monogliceride a catena media corrispondente o il trigliceride a catena media corrispondente o una loro combinazione; in alcune forme di realizzazione particolari il sale di acido grasso a catena media è ottanoato di sodio e il monogliceride è gliceril monocaprilato e il trigliceride è gliceril tricaprilato.

In alcune forme di realizzazione, la composizione include inoltre uno o più eccipienti. Gli eccipienti possono essere un sale per es. $MgCl_2$ o un composto contenente ammina o mannitolo. In alcune forme di realizzazione, l'eccipiente è nella stessa forma solida dell'agente terapeutico.

In alcune forme di realizzazione l'eccipiente è uno stabilizzante. Gli inventori hanno trovato inaspettatamente che sebbene il polivinilpirrolidone (PVP) in particolare PVP-12 sia noto nell'arte come stabilizzante, nelle formulazioni dell'invenzione esso serve per aumentare l'effetto del miglioratore di permeabilità sull'assorbimento dell'agente terapeutico.

In alcune forme di realizzazione, la composizione include inoltre uno o più tensioattivi. Per esempio, il tensioattivo può essere selezionato dal gruppo costituito da monopalmitato di sorbitano (Span-40®), monooleato di poliossietilensorbitano (Tween80), lecitina, e gliceril monooleato (GMO). In una o più forme di realizzazione, il

tensioattivo comprende da circa lo 0,1% a circa il 6% in peso della composizione.

Nelle forme di realizzazione, la composizione è una forma di dosaggio orale. Per esempio, la composizione può essere introdotta in una capsula dura o molle. In alcune forme di realizzazione, la composizione è sotto forma di una supposta. Secondo una o più forme di realizzazione, la composizione può essere sotto forma di un clisma.

In alcune forme di realizzazione, la biodisponibilità dell'agente terapeutico, quando somministrato a un soggetto, è almeno dell'1,5-2% rispetto alla somministrazione parenterale (sottocutanea o endovenosa). In alcune forme di realizzazione, la composizione, quando somministrata a un soggetto, fornisce oltre il 2%, oltre il 3%, oltre il 5%, oltre il 10%, o oltre il 20% od oltre 30% di assorbimento dell'agente terapeutico attraverso una barriera biologica. I livelli di assorbimento ottenuti producono i livelli terapeutici necessari per l'indicazione in questione.

In un aspetto, l'invenzione è caratterizzata da una qualsiasi delle composizioni descritte nel presente documento per l'uso nel trattamento di un disturbo in un soggetto.

In alcune forme di realizzazione, la composizione viene somministrato per via orale. In altre forme di realizzazione, la composizione viene somministrata per via rettale, sublinguale o tramite somministrazione orale.

Come descritto nel presente documento, il disturbo può essere anemia, osteoporosi, può essere infertilità femminile, deficit di crescita o deficit di ormone della crescita, perdita di peso o cachessia HIV correlata, acromegalia o diabete.

Secondo l'invenzione, l'agente terapeutico è octreotide e in alcune forme di realizzazione, il disturbo è acromegalia, anormale motilità gastrointestinale, gastroparesi, diarrea o ipertensione portale.

In alcune forme di realizzazione, il metodo può includere incapsulare la sospensione per formare una capsula. Il metodo può includere inoltre rivestire la capsula.

In alcune forme di realizzazione, il metodo può includere fornire istruzioni per somministrare la capsula a un soggetto. Le istruzioni possono riguardare la somministrazione della capsula a un soggetto per qualsiasi indicazione qui descritta. In un aspetto, l'invenzione è caratterizzata da capsule provviste di istruzioni relative alla somministrazione della capsula a un soggetto per qualsiasi indicazione qui descritta.

Ancora altri aspetti, forme di realizzazione e vantaggi di questi aspetti e forme di realizzazione esemplificativi, sono discussi in dettaglio sotto. Inoltre, occorre comprendere che sia le precedenti informazioni sia la seguente descrizione dettagliata sono semplicemente esempi illustrativi di vari aspetti e forme di realizzazione, e sono destinati a fornire una panoramica o un quadro per comprendere la natura e il carattere degli aspetti e delle forme di

realizzazione rivendicati. I disegni allegati sono inclusi per fornire illustrazione e un'ulteriore comprensione dei vari aspetti e forme di realizzazione, e sono incorporati in e costituiscono una parte di questa descrizione. I disegni, insieme al resto della descrizione, servono a spiegare i principi e le operazioni degli aspetti e delle forme di realizzazione descritti e rivendicati.

Nella presente domanda, varie pubblicazioni, inclusi brevetti statunitensi, sono indicate con l'autore e l'anno e brevetti e domande con il numero.

Breve descrizione dei disegni

Vari aspetti della presente divulgazione sono discussi sotto in riferimento alle figure allegate. Nelle figure, volutamente non disegnate in scala, ogni componente identico o quasi identico che è illustrato in varie figure è rappresentato da un numero uguale. A scopo di chiarezza, non tutti i componenti possono essere contrassegnati in ogni disegno. Le Figure sono fornite a scopo illustrativo ed esplicativo e non sono intese come definizione dei limiti dell'invenzione. Nelle Figure:

la FIG. 1 presenta un processo per la produzione di una formulazione di insulina di una composizione come indicata negli Esempi annessi;

le FIGG. 2-5 presentano dati indicati negli Esempi da 3 a 6 annessi;

la FIG. 6 presenta dati indicati nell'Esempio 8 annesso;

la FIG. 7 presenta dati di permeabilità di marcatori di peso molecolare indicati nell'Esempio 33 annesso;

la FIG. 8 presenta dati di decorso temporale della permeabilità indicati nell'Esempio 34 annesso; e

le FIGG. 9 e 10 presentano dati relativi alla somministrazione di octreotide a scimmie indicata nell'Esempio 35 annesso.

Descrizione dettagliata

Le composizioni descritte nel presente documento possono essere somministrate a un soggetto per fornire una biodisponibilità migliorata di un agente terapeutico.

Composizioni farmaceutiche: Le composizioni farmaceutiche descritte nel presente documento includono un agente terapeutico che è octreotide e un sale di acido grasso a catena media in contatto intimo o in associazione con un mezzo sostanzialmente idrofobo. Per esempio, l'agente terapeutico e l'acido grasso a catena media o suo derivato possono essere rivestiti, sospesi, spruzzati o immersi in un mezzo sostanzialmente idrofobo formando una sospensione. Le composizioni dell'invenzione non sono emulsioni. Quasi tutte le composizioni sono sospensioni oleose e la quantità di acqua nelle composizioni è molto ridotta; poche delle presenti composizioni che non sono sospensioni incorporano una quantità elevata (circa il 78% di acido ottanoico) e sono soluzioni secondo l'analisi visiva. La sospensione può essere una sospensione liquida che incorpora

materiale solido, o una sospensione semi-solida che incorpora materiale solido (un unguento).

Molte delle composizioni descritte nel presente documento comprendono una sospensione che comprende una miscela di un mezzo idrofobo e una forma solida in cui la forma solida comprende una quantità terapeuticamente efficace dell'agente terapeutico e almeno un sale di un acido grasso a catena media, e in cui il sale di acido grasso a catena media è presente nella composizione in una quantità del 10% o più in peso. La forma solida può comprendere una particella (per es., essere costituita essenzialmente da particelle, o essere costituita da particelle). La particella può essere prodotta tramite liofilizzazione o tramite granulazione. In alcune forme di realizzazione, preferibilmente dopo la macinatura, il 90% (v/v) delle particelle sono inferiori a 130 micron, e il 50% (v/v) delle particelle sono inferiori a 45 micron.

Un composto cargo è un agente terapeutico o un composto di test (per es. destrano ad alto peso molecolare) che è formulato come descritto nel presente documento nelle composizioni dell'invenzione.

Gli inventori sono stati scrupolosi nell'includere in molte delle composizioni dell'invenzione soltanto eccipienti che sono generalmente riconosciuti come sicuri, in base ai dati disponibili sull'uso umano, sulla sicurezza degli animali e alle linee guida di legge (per es. eccipienti GRAS). Alcune composizioni dell'invenzione possono avere altri tipi di eccipienti (per es. non-GRAS). In alcune forme di realizzazione le

composizioni dell'invenzione hanno quantità di eccipienti che sono entro le dosi giornaliere massime indicate nei dati disponibili per ogni eccipiente specifico.

Il sale di acido grasso a catena media può generalmente facilitare o migliorare la permeabilità e/o l'assorbimento dell'agente terapeutico. In alcune forme di realizzazione i sali di acido grasso a catena media includono derivati di sali di acido grasso a catena media. L'agente terapeutico e il sale di acido grasso a catena media sono in forma solida, per esempio, una particella solida quale una particella liofilizzata, una particella granulata, un pellet o una micro-sfera. In forme di realizzazione preferite, l'agente terapeutico e il sale di acido grasso a catena media sono entrambi nella stessa forma solida, per es., entrambi nella stessa particella. In altre forme di realizzazione, l'agente terapeutico e il sale di acido grasso a catena media possono essere ciascuno in una forma solida diversa, per es. ciascuno in una particella distinta. Le composizioni descritte nel presente documento sono sostanzialmente prive di "agenti di fluidificazione di membrana" definiti come alcoli lineari, ramificati, a catena media aromatici e ciclici, in particolare geraniolo e ottanolo. Per esempio le composizioni preferibilmente non includono agenti di fluidificazione di membrana ma alcune forme di realizzazione possono includere per esempio meno dell'1% o meno dello 0,5% o meno dello 0,1% in peso di agenti di fluidificazione di membrana.

A differenza delle emulsioni, dove l'acqua è un costituente essenziale della formulazione, le composizioni descritte nel presente documento forniscono una forma solida quale una particella contenente l'agente terapeutico, che viene poi associata al mezzo idrofobo (oleoso). La quantità di acqua nelle composizioni è generalmente inferiore al 3% in peso, solitamente inferiore a circa il 2% o circa l'1% o meno in peso.

Le composizioni descritte nel presente documento sono sospensioni che comprendono una miscela di un mezzo idrofobo e una forma solida in cui la forma solida comprende una quantità terapeuticamente efficace di un agente terapeutico e almeno un sale di un acido grasso a catena media. La forma solida può essere una particella (per es., essere costituita essenzialmente da particelle, o essere costituita da particelle). La particella può essere prodotta tramite liofilizzazione o tramite granulazione. Il sale di acido grasso a catena media è generalmente presente nelle composizioni descritte nel presente documento in una quantità del 10% o più in peso. In alcune forme di realizzazione il sale di acido grasso a catena media è presente nella composizione in una quantità del 10%-50%, preferibilmente 11%-18% o circa 11%-17% o 12%-16% o 12%-15% o 13%-16% o 13%-15% o 14%-16% o 14%-15% o 15%-16% o più preferibilmente 15% o 16% in peso, e l'acido grasso a catena media ha una lunghezza di catena tra circa 6 e circa 14 atomi di carbonio preferibilmente 8, 9 o 10 atomi di carbonio.

In alcune forme di realizzazione nelle composizioni descritte sopra, la forma solida includente l'agente terapeutico include anche uno stabilizzante (per es., uno stabilizzante di struttura proteica). Gli stabilizzanti di struttura proteica sono composti che stabilizzano la struttura proteica in condizioni acquose o non acquose o possono ridurre o impedire l'aggregazione dell'agente terapeutico, per esempio durante un processo di essiccazione quale liofilizzazione o un'altra fase di trattamento. Gli stabilizzanti di struttura possono essere molecole polianioniche, quali acido fitico, ioni polivalenti quali Ca, Zn o Mg, saccaridi come un disaccaride (per es., trealosio, maltosio) o un oligo- o polisaccaride quali destrina o destrano, o un alcol di zucchero quale mannitolo, o un amminoacido quale glicina, o molecole policationiche, quale spermina, o tensioattivi quali polioossietilene sorbitan monooleato (Tween 80) o acido pluronico. I polimeri non carichi, quali mannitolo, metil cellulosa e alcol polivinilico, sono anch'essi stabilizzanti adatti.

Anche se il polivinilpirrolidone (PVP) è noto nell'arte come stabilizzante, gli inventori hanno trovato inaspettatamente che, nelle composizioni dell'invenzione descritte nel presente documento, il PVP, in particolare PVP-12, serve per aumentare l'effetto del miglioratore di permeabilità in modo sinergico; aumentando, inoltre, il livello di PVP-12 al 10% si aumentava l'assorbimento dell'agente terapeutico nel sangue per via dell'attività migliorata delle formulazioni. Gli inventori hanno dimostrato che il destrano aveva un effetto simile (ma inferiore) al PVP. Altri polimeri formanti una matrice hanno un effetto simile.

In alcune forme di realizzazione, si può aggiungere un agente di carica, per esempio, mannitolo o glicina.

In forme di realizzazione delle composizioni descritte nel presente documento l'agente terapeutico è octreotide.

In una forma di realizzazione particolare delle composizioni descritte nel presente documento il sale dell'acido grasso è ottanoato di sodio e il mezzo idrofobo è olio di ricino; in un'altra forma di realizzazione particolare la composizione comprende inoltre gliceril monooleato e sorbitan monopalmitato o gliceril monocaprilato e gliceril tricaprilato e poliossietilenesorbitan monooleato; in un'altra forma di realizzazione particolare la composizione comprende inoltre gliceril tributirato, lecitina, etilisovalerato e almeno uno stabilizzante. In tutte le forme di realizzazione l'agente terapeutico è octreotide.

Agenti terapeutici:

In alcune forme di realizzazione, la composizione farmaceutica include una pluralità di agenti terapeutici (effettori) incluso l'octreotide. Gli agenti terapeutici possono essere nella stessa forma solida (per es., nella stessa particella), oppure gli agenti terapeutici possono essere ciascuno in una forma solida indipendente (per es., ciascuno in particelle diverse). In alcune forme di realizzazione, l'agente terapeutico è sotto forma di una particella, per esempio, una particella granulata o solida. La particella è associata a o è in contatto intimo con un mezzo sostanzialmente idrofobo, per esempio, un mezzo idrofobo descritto nel presente documento.

Agenti terapeutici che possono essere usati nelle composizioni descritte nel presente documento includono qualsiasi molecola o composto che serve, per esempio, come un agente biologico, terapeutico, farmaceutico, o diagnostico incluso un agente di *imaging*. Gli agenti terapeutici includono farmaci e altri agenti inclusi, ma senza limitazione, quelli elencati nella farmacopea statunitense e in altre farmacopee note. Gli agenti terapeutici sono incorporati nelle formulazioni dell'invenzione senza alcuna modificazione chimica. Gli agenti terapeutici includono proteine, polipeptidi, peptidi, polinucleotidi, polisaccaridi e piccole molecole.

L'espressione "piccola molecola" è intesa ad indicare un composto organico a basso peso molecolare che può essere prodotto sinteticamente o ottenuto da fonti naturali e tipicamente ha un peso molecolare inferiore a 2000 Da, o inferiore a 1000 Da o anche inferiore a 600 Da per es. inferiore a o di circa 550 Da o inferiore a o di circa 500 Da o inferiore a o di circa 400 Da; o tra circa 400 Da e circa 2000 Da; o tra circa 400 Da e circa 1700 Da. Esempi di piccole molecole sono ergotamina (peso molecolare =582 Da), fondaparinux (peso molecolare = 1727 Da), leuprolide (peso molecolare = 1209 Da), vancomicina (peso molecolare = 1449 Da), gentamicina (peso molecolare = 478 Da) e doxorubicina (peso molecolare =544).

Il termine "polinucleotide" si riferisce a qualsiasi molecola composta da nucleotidi di DNA, nucleotidi di RNA o una combinazione di entrambi i tipi che comprende due o più delle basi guanidina,

citosina, timidina, adenina, uracile o inosina, tra le altre cose. Un polinucleotide può includere nucleotidi naturali, nucleotidi modificati chimicamente e nucleotidi sintetici, o loro analoghi chimici e può essere monofilamento o a doppio filamento. Il termine include "oligonucleotidi" e comprende "acidi nucleici".

Con "piccolo RNA interferente" (siRNA) s'intende una molecola di RNA (ribonucleotide) che riduce o silenzia (impedisce) l'espressione di un gene/ mRNA della sua controparte endogena o cellulare. Il termine è inteso a comprendere "interferenza genetica mediata da RNA" (RNAi), e "RNA a doppio filamento" (dsRNA).

Con "polipeptide" s'intende una molecola composta da amminoacidi legati in modo covalente e il termine include peptidi, polipeptidi, proteine e peptidomimetici. Un peptidomimetico è un composto contenente elementi strutturali non peptidici che è in grado di mimare l'una o più azioni biologiche di un peptide originario naturale. Alcune delle caratteristiche convenzionali dei peptidi come legami peptidici scissili enzimaticamente non sono normalmente presenti in un peptidomimetico. Il termine "amminoacido" si riferisce a una molecola costituita da uno qualsiasi dei 20 amminoacidi presenti in natura, amminoacidi che sono stati modificati chimicamente o amminoacidi sintetici.

Con "polisaccaride" s'intende un polimero lineare o ramificato composto da monosaccaridi legati in modo covalente; glucosio è il monosaccaride più comune e vi sono normalmente almeno otto unità di

monosaccaride in un polisaccaride e solitamente molte di più. I polisaccaridi hanno una formula generale di $C_x(H_2O)_y$ dove x è solitamente un numero grande tra 200 e 2500. Considerando che le unità di ripetizione nella dorsale polimerica sono spesso monosaccaridi con sei atomi di carbonio, la formula generale può anche essere rappresentata come $(C_6H_{10}O_5)_n$ dove $40 \leq n \leq 3000$ ovvero vi sono normalmente tra 40 e 3000 unità di monosaccaride in un polisaccaride.

Un "glicosamminoglicano" è un polisaccaride che contiene zuccheri contenenti ammino. L'octreotide è un octapeptide ciclico.

In alcune forme di realizzazione, la composizione può includere una pluralità di agenti terapeutici (farmaci combinati).

In alcune forme di realizzazione delle composizioni descritte nel presente documento, la composizione include una combinazione di una proteina o peptide con piccole molecole che hanno o meno un buon assorbimento o biodisponibilità. Per esempio, una composizione può includere almeno un agente terapeutico che può essere generalmente caratterizzato come scarsamente assorbibile o scarsamente biodisponibile. La composizione può anche essere usata per la somministrazione di agenti terapeutici che vengono assorbiti nello stomaco e/o nell'intestino, ma causano irritazione dello stomaco e/o dell'intestino e pertanto sono difficili da tollerare. In tale situazione, un soggetto potrebbe beneficiare se la biodisponibilità dell'agente terapeutico fosse migliorata o se una maggiore quantità dell'agente terapeutico fosse direttamente assorbita nel circolo ematico; se viene

somministrata una minore quantità di agente terapeutico vi sarà chiaramente una minore probabilità di causare irritazione dello stomaco e/o dell'intestino. Perciò si prevedono composizioni dell'invenzione che comprendono al loro interno due o più agenti terapeutici.

In generale, la composizione può includere da circa lo 0,01% a circa il 50% in peso dell'agente terapeutico per es. circa 0,01, 0,02 0,05, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, o 50% in peso. Il massimo incluso nella composizione è spesso nell'intervallo tra circa il 6% e il 33% in peso dell'agente terapeutico.

In alcune forme di realizzazione delle composizioni descritte nel presente documento, la forma solida includente l'agente terapeutico include anche uno stabilizzante (per es., uno stabilizzante di struttura proteica). Gli stabilizzanti di struttura proteica sono composti che stabilizzano la struttura proteica in condizioni acquose o non acquose o possono ridurre o impedire l'aggregazione dell'agente terapeutico, per esempio durante un processo di essiccazione quale liofilizzazione o un'altra fase di trattamento. Gli stabilizzanti di struttura possono essere molecole polianioniche, quali acido fitico, ioni polivalenti quali Ca, Zn o Mg, saccaridi come un disaccaride (per es., trealosio, maltosio) o un oligo- o polisaccaride quali destrina o destrano, o un alcol di zucchero quale mannitolo, o un amminoacido quale glicina, o molecole policationiche, quale spermina, o tensioattivi quali Tween 80 o Span 40 o acido pluronico. I polimeri non carichi, quali metil cellulosa e alcol polivinilico, sono anch'essi stabilizzanti adatti.

Sale di acido grasso a catena media:

Le composizioni descritte nel presente documento includono il sale di un acido grasso a catena media o un suo derivato in una forma solida. Per esempio, il sale dell'acido grasso a catena media è sotto forma di una particella quale una particella solida. In alcune forme di realizzazione, la particella può essere caratterizzata come una particella granulata. In almeno alcune forme di realizzazione, la forma solida può risultare generalmente da un processo di essiccazione a spruzzo o evaporazione. In forme di realizzazione preferite, il sale dell'acido grasso a catena media è nella stessa particella dell'agente terapeutico. Per esempio, l'agente terapeutico e il sale dell'acido grasso a catena media possono essere preparati insieme preparando dapprima una soluzione come una soluzione acquosa comprendente sia l'agente terapeutico sia il sale dell'acido grasso a catena media e co-liofilizzando la soluzione per fornire una forma solida o particella che comprende sia l'agente terapeutico sia il sale dell'acido grasso a catena media (e altri ingredienti). Come descritto sopra, le particelle solide risultanti sono associate a un mezzo idrofobo. Per esempio, le particelle solide possono essere sospese o immerse in un mezzo idrofobo

In forme di realizzazione diverse delle composizioni descritte nel presente documento il sale di acido grasso a catena media può essere nella stessa particella o in una particella diversa da quella dell'API. È stato trovato che la biodisponibilità di un composto cargo era inferiore se l'acido grasso a catena media era in una particella diversa

rispetto all'agente terapeutico ovvero vi era una biodisponibilità migliorata se il sale di acido grasso a catena media e il composto cargo erano essiccati dopo la solubilizzazione insieme nella frazione idrofila. Si ritiene che se il sale di acido grasso a catena media e il composto cargo sono essiccati dopo la solubilizzazione insieme nella frazione idrofila allora si trovano nella stessa particella nella polvere finale.

I sali di acidi grassi a catena media includono quelli aventi una lunghezza di catena di carbonio compresa tra circa 6 e circa 14 atomi di carbonio. Esempi di sali di acidi grassi sono esanoato di sodio, eptanoato di sodio, ottanoato di sodio (altresì definito caprilato di sodio), nonanoato di sodio, decanoato di sodio, undecanoato di sodio, dodecanoato di sodio, tridecanoato di sodio, e tetradecanoato di sodio. In alcune forme di realizzazione, il sale di acido grasso a catena media contiene un catione selezionato dal gruppo costituito da potassio, litio, ammonio e altri cationi monovalenti per es. il sale di acido grasso a catena media è selezionato da ottanoato di litio o ottanoato di potassio od ottanoato di arginina o altri sali monovalenti degli acidi grassi a catena media. Gli inventori hanno trovato che aumentando la quantità di sale di acido grasso a catena media si aumentava la biodisponibilità della formulazione risultante. In particolare, aumentando la quantità di sale di acido grasso a catena media, in particolare ottanoato di sodio, al di sopra del 10% a un intervallo tra circa il 12% e il 15% si aumentava la biodisponibilità degli agenti terapeutici nelle composizioni farmaceutiche descritte nel presente documento.

In generale, la quantità di sale di acido grasso a catena media nelle composizioni descritte nel presente documento può essere dal 10% fino a circa il 50% in peso della composizione farmaceutica sfusa. Per esempio, il sale di acido grasso a catena media può essere presente in una quantità di circa il 10%-50%, preferibilmente circa l'11%-40% più preferibilmente circa l'11%-28% in peso per esempio circa il 12%-13%, 13%-14%, 14%-15%, 15%-16%, 16%-17%, 17%-18%, 18%-19%, 19%-20%, 20%-21%, 21%-22%, 22%-23%, 23%-24%, 24%-25%, 25%-26%, 26%-27%, o 27%-28% in peso della composizione farmaceutica sfusa. In altre forme di realizzazione il sale di acido grasso a catena media può essere presente in una quantità di almeno circa l'11%, almeno circa il 12%, almeno circa il 13%, almeno circa il 14%, almeno circa il 15% almeno circa il 16%, almeno circa il 17%, almeno circa il 18%, almeno circa il 19%, almeno circa il 20%, almeno circa il 21%, almeno circa il 22%, almeno circa il 23%, almeno circa il 24%, almeno circa il 25%, almeno circa il 26%, almeno circa il 27% o almeno circa il 28% in peso della composizione farmaceutica sfusa. In forme di realizzazione specifiche il sale di acido grasso a catena media (sale di sodio, potassio, litio o ammonio o una loro miscela) è presente almeno circa al 12%-21% in peso della composizione farmaceutica sfusa preferibilmente all'11%-18% o circa all'11%-17% o al 12%-16% o al 12%-15% o al 13%-16% o al 13%-15% o al 14%-16% o al 14%-15% o al 15%-16% o più preferibilmente al 15% o 16%. In forme di realizzazione specifiche il sale di acido grasso

a catena media (avente una lunghezza di catena di carbonio compresa tra circa 6 e circa 14 atomi di carbonio in particolare 8, 9 o 10 atomi di carbonio) è presente a circa il 12%-21% in peso della composizione farmaceutica sfusa preferibilmente all'11%-18% circa l'11%-17% o 12%-16% o 12%-15% o 13%-16% o 13%-15% o 14%-16% o 14%-15% o 15%-16% o più preferibilmente 15% o 16%. In forme di realizzazione specifiche il sale di acido grasso a catena media (per esempio sali di acido ottanoico, sali di acido suberico, sali di acido geranico) è presente almeno circa al 12%-21% in peso della composizione farmaceutica sfusa preferibilmente all'11%-18% circa all'11%-17% o al 12%-16% o al 12%-15% o al 13%-16% o al 13%-15% o al 14%-16% o al 14%-15% o al 15%-16% o più preferibilmente al 15% o 16%. In alcune forme di realizzazione il sale di acido grasso a catena media è presente nella polvere solida in una quantità tra circa il 50% e il 90%, preferibilmente in una quantità tra il 70% e l'80%.

Una forma di realizzazione dell'invenzione comprende una composizione comprendente una sospensione costituita essenzialmente da una miscela di un mezzo idrofobo e una forma solida in cui la forma solida comprende una quantità terapeuticamente efficace di un agente terapeutico e almeno un sale di un acido grasso a catena media, e in cui il sale di acido grasso a catena media non è un sale di sodio. Il sale può essere il sale di un altro catione per es. litio, potassio o ammonio; un sale di ammonio è preferito.

Polimero formante una matrice:

In alcune forme di realizzazione la composizione dell'invenzione comprende una sospensione che comprende una miscela di un mezzo idrofobo e una forma solida in cui la forma solida comprende una quantità terapeuticamente efficace di un agente terapeutico, almeno un sale di un acido grasso a catena media e un polimero formante una matrice, e in cui il polimero formante una matrice è presente nella composizione in una quantità del 3% o più in peso. In alcune forme di realizzazione la composizione comprende una sospensione che è costituita essenzialmente da una miscela di un mezzo idrofobo e una forma solida in cui la forma solida comprende una quantità terapeuticamente efficace di un agente terapeutico, almeno un sale di un acido grasso a catena media e un polimero formante una matrice, e in cui il polimero formante una matrice è presente nella composizione in una quantità del 3% o più in peso. In particolari forme di realizzazione il polimero formante una matrice è destrano o polivinilpirrolidone (PVP). In particolari forme di realizzazione il polivinilpirrolidone è presente nella composizione in una quantità tra circa il 2% e circa il 20% in peso, preferibilmente in una quantità tra circa il 3% e circa il 18% in peso, più preferibilmente in una quantità tra circa il 5% e circa il 15% in peso, preferibilmente in assoluto in una quantità di circa il 10% in peso. In alcune forme di realizzazione particolari il polivinilpirrolidone è PVP-12 e/o ha un peso molecolare di circa 3000. Altri polimeri formanti una matrice hanno un effetto simile nelle composizioni dell'invenzione; tali polimeri formanti una matrice includono polisaccaridi ionici (per

esempio acido alginico e alginati) o polisaccaridi neutri (per esempio destrano e HPMC), derivati di acido poliacrilico e polimetacrilico e alcoli organici ad alto peso molecolare (per esempio alcol polivinilico).

Inibitori di proteasi:

È generalmente accettato nell'arte della somministrazione di proteine, polipeptidi e peptidi che gli inibitori di proteasi devono normalmente essere aggiunti alla formulazione per impedire la degradazione dell'API. Tuttavia nelle formulazioni della presente invenzione non è necessario aggiungere inibitori di proteasi. Le formulazioni dell'invenzione risultano conferire stabilità dell'agente terapeutico alla degradazione di proteasi entro il lasso di tempo di attività ovvero le formulazioni dell'invenzione sono apparentemente inibitrici a livello ambientale per l'attività enzimatica. Inoltre, gli inventori hanno condotto un esperimento in cui l'inibitore di proteasi aprotinina è stato aggiunto a una formulazione e questo non ha avuto un effetto benefico sull'attività. È stato condotto un esperimento analogo in cui l'inibitore di proteasi acido ϵ -amminocaproico è stato aggiunto a una formulazione e anche questo non ha avuto un effetto benefico sull'attività. Pertanto, in alcune forme di realizzazione, una composizione farmaceutica descritta nel presente documento è sostanzialmente priva di un inibitore di proteasi.

Frazione idrofila:

In forme di realizzazione dell'invenzione, i composti di cui sopra, inclusi l'agente terapeutico e il sale di acido grasso a catena

media sono solubilizzati in un mezzo acquoso e poi essiccati per produrre una polvere. Il processo di essiccazione può essere ottenuto per esempio tramite liofilizzazione o granulazione. La polvere ottenuta è definita come "frazione idrofila". Nella frazione idrofila l'acqua è normalmente presente in una quantità inferiore al 6%.

La liofilizzazione può essere effettuata come mostrato negli Esempi nel presente documento e attraverso metodi noti nell'arte per es. come descritto in *Lyophilization: Introduction and Basic Principles*, Thomas Jennings, pubblicato da Interpharm/CRC Press Ltd (1999, 2002). Il liofilizzato può essere facoltativamente macinato (per es. sotto 150 micron) o tritato in un mortaio. Durante la produzione industriale il liofilizzato è preferibilmente macinato prima della miscelazione della frazione idrofila e del mezzo idrofobo al fine di produrre una riproducibilità da un lotto all'altro.

La granulazione può essere effettuata come mostrato negli Esempi nel presente documento con metodi noti nell'arte per es. come descritto in *Granulation*, Salman et al, eds., Elsevier (2006) e in *Handbook of Pharmaceutical Granulation Technology*, seconda edizione, Dilip M. Parikh, ed., (2005

Vari leganti possono essere usati nel processo di granulazione quali cellulose (incluse le cellulose microcristalline), lattosio (per es. lattosio monoidrato), destrosio, amido e mannitolo e altri leganti come descritto nei due documenti di riferimento precedenti.

Mezzo idrofobo:

Olio: Come descritto sopra, nelle composizioni dell'invenzione descritte nel presente documento l'agente terapeutico e il sale di acido grasso a catena media sono in contatto intimo o in associazione con un mezzo idrofobo. Per esempio, uno o entrambi possono essere rivestiti, sospesi, immersi o altrimenti in associazione con un mezzo idrofobo. Mezzi idrofobi adatti possono contenere, per esempio, molecole alifatiche, cicliche o aromatiche. Esempi di un mezzo idrofobo alifatico adatto includono, ma senza limitazione, olio minerale, monogliceridi di acido grasso, digliceridi, trigliceridi, eteri, esteri, e loro combinazioni. Esempi di un acido grasso adatto sono acido ottanoico, acido decanoico e acido dodecanoico, anche acidi grassi C7 e C9 e biacidi quali acido sebacico e acido suberico, e loro derivati. Esempi di trigliceridi includono, ma senza limitazione, trigliceridi a catena lunga, trigliceridi a catena media, e trigliceridi a catena corta. Per esempio, il trigliceride a catena lunga può essere olio di ricino o olio di cocco o olio di oliva, e il trigliceride a catena corta può essere gliceril tributirato e il trigliceride a catena media può essere gliceril tricaprilato. I monogliceridi sono considerati tensioattivi e sono descritti sotto. Esteri esemplificativi includono etil isovalerato e butil acetato. Esempi di un mezzo idrofobo ciclico adatto includono, ma senza limitazione, terpenoidi, colesterolo, derivati di colesterolo (per es., solfato di colesterolo), ed esteri di colesterolo di acidi grassi. Un esempio non limitativo di un mezzo idrofobo aromatico include benzil benzoato.

In alcune forme di realizzazione delle composizioni descritte nel presente documento, è desiderabile che il mezzo idrofobo includa una pluralità di molecole idrofobe. In alcune forme di realizzazione delle composizioni descritte nel presente documento il mezzo idrofobo include anche uno o più tensioattivi (vedere sotto).

In alcune forme di realizzazione delle composizioni descritte nel presente documento, il mezzo idrofobo include anche uno o più polimeri adesivi quali metilcellulosa, etilcellulosa, idrossipropilmetilcellulosa (HPMC), o derivato di poli(acrilato) Carbopol®934P (C934P). Tali polimeri adesivi possono agevolare il consolidamento della formulazione e/o contribuire alla sua adesione alle superfici mucose.

Agentitensioattivi (tensioattivi): Le composizioni di questa invenzione descritte nel presente documento possono includere inoltre un agente tensioattivo. Per esempio, l'agente tensioattivo può essere un componente del mezzo idrofobo come descritto sopra, e/o l'agente tensioattivo può essere un componente di una forma solida come descritto sopra, per esempio in forma solida o di particella che include l'agente terapeutico.

Agenti tensioattivi adatti includono tensioattivi ionici e non ionici. Esempi di tensioattivi ionici sono lecitina (fosfatidil colina), sali biliari e detergenti. Esempi di tensioattivi non ionici includono monogliceridi, cremoforo, un etere di alcol grasso di polietilenglicole, un estere di acido grasso di sorbitano, un estere di acido grasso di poliossietilene sorbitano, Solutol HS 15, o un polossamero o una loro combinazione.

Esempi di monogliceridi sono gliceril monocaprilato (altresì definito gliceril monoottanoato), gliceril monodecanoato, gliceril monolaurato, gliceril monomiristato, gliceril monostearato, gliceril monopalmitato, e gliceril monooleato. Esempi di esteri di acido grasso di sorbitano includono monolaurato di sorbitano, monooleato di sorbitano, e monopalmitato di sorbitano (Span 40), o una loro combinazione. Esempi di esteri di acido grasso di poliossietilene sorbitano includono poliossietilene sorbitan monooleato (Tween 80), poliossietilene sorbitan monostearato, poliossietilene sorbitan monopalmitato o una loro combinazione. I preparati commerciali di monogliceridi che sono stati usati contengono anche varie quantità di digliceridi e trigliceridi.

Le composizioni descritte nel presente documento includenti un agente tensioattivo includono generalmente meno di circa il 12% in peso di agente tensioattivo totale (per es., meno di circa il 10%, meno di circa l'8%, meno di circa il 6%, meno di circa il 4%, meno di circa il 2%, o meno di circa l'1%). In forme di realizzazione particolari dell'invenzione la somma totale di tutti i tensioattivi è di circa il 6%.

Metodi per preparare composizioni farmaceutiche e le composizioni prodotte:

Sono altresì inclusi nell'invenzione metodi per produrre le composizioni descritte nel presente documento. Perciò una forma di realizzazione dell'invenzione è un processo per produrre una composizione farmaceutica che comprende preparare una composizione idrosolubile comprendente una quantità

terapeuticamente efficace di almeno un agente terapeutico e un sale di acido grasso a catena media (come descritto sopra), essiccare la composizione idrosolubile per ottenere una polvere solida, e sospendere la polvere solida in un mezzo idrofobo, per produrre una sospensione contenente in forma solida l'agente terapeutico e il sale di acido grasso a catena media, producendo in tal modo la composizione farmaceutica, in cui la composizione farmaceutica contiene il 10% o più in peso di sale di acido grasso a catena media.

Una forma di realizzazione è un processo per produrre una composizione farmaceutica che comprende fornire una polvere solida di una quantità therapeuticamente efficace di almeno un agente terapeutico e una polvere solida comprendente un sale di acido grasso a catena media, e sospendere le polveri solide in un mezzo idrofobo, per produrre una sospensione contenente in forma solida l'agente terapeutico e il sale di acido grasso a catena media, producendo in tal modo la composizione farmaceutica, in cui la composizione farmaceutica contiene il 10% o più in peso di sale di acido grasso a catena media.

In una forma di realizzazione dei processi e delle composizioni descritti nella presente invenzione, la composizione idrosolubile è una soluzione acquosa. In alcune forme di realizzazione l'essiccazione della composizione idrosolubile si ottiene tramite liofilizzazione o tramite granulazione. Nel processo di granulazione un legante può essere aggiunto alla composizione idrosolubile prima dell'essiccazione. In

alcune forme di realizzazione la fase di essiccazione rimuove acqua sufficiente in modo che il contenuto di acqua nella composizione farmaceutica è minore di circa il 6% in peso, circa il 5% in peso, circa il 4% in peso, circa il 3% o circa il 2% o circa l'1% in peso. In alcune forme di realizzazione dei processi e delle composizioni descritti nel presente documento la fase di essiccazione rimuove una quantità di acqua in modo che il contenuto di acqua nella polvere solida sia minore del 6% o del 5% o del 4% o del 3% o preferibilmente minore del 2% in peso. Il contenuto di acqua è normalmente ridotto e l'acqua può essere assorbita nella fase solida durante la liofilizzazione ovvero l'acqua può essere trattenuta da legami intramolecolari. In alcune forme di realizzazione la composizione idrosolubile comprende inoltre uno stabilizzante per esempio metil cellulosa. In forme di realizzazione preferite dei processi e delle composizioni decritti nel presente documento il mezzo idrofobo è olio di ricino o gliceril tricaprilato o gliceril tributirato o una loro combinazione e può contenere inoltre acido ottanoico; in alcune forme di realizzazione il mezzo idrofobo comprende un composto alifatico, olefinico, ciclico o aromatico, un olio minerale, una paraffina, un acido grasso quale acido ottanoico, un monogliceride, un digliceride, un trigliceride, un etere o un estere, o una loro combinazione. In alcune forme di realizzazione dei processi e delle composizioni descritti nel presente documento il trigliceride è un trigliceride a catena lunga, un trigliceride a catena media preferibilmente gliceril tricaprilato o un trigliceride a catena corta

preferibilmente gliceril tributirato, e il trigliceride a catena lunga è olio di ricino o olio di cocco o una loro combinazione. In alcune forme di realizzazione dei processi e delle composizioni descritti nel presente documento il mezzo idrofobo comprende olio di ricino o gliceril tricaprilato o gliceril tributirato o una loro combinazione o miscela, e può comprendere inoltre acido ottanoico. In alcune forme di realizzazione dei processi e delle composizioni descritti nel presente documento il mezzo idrofobo comprende gliceril tricaprilato o un estere a basso peso molecolare per esempio etil isovalerato o butil acetato. In alcune forme di realizzazione dei processi e delle composizioni descritti nel presente documento il componente principale in peso del mezzo idrofobo è olio di ricino e può comprendere inoltre gliceril tricaprilato. In alcune forme di realizzazione dei processi e delle composizioni descritti nel presente documento il componente principale in peso del mezzo idrofobo è gliceril tricaprilato e può comprendere inoltre olio di ricino.

Una formulazione basica è fornita come una forma di realizzazione in cui il mezzo idrofobo è costituito essenzialmente da olio di ricino, gliceril monooleato e gliceril tributirato; in una forma di realizzazione ulteriore della formulazione basica la frazione idrofila è costituita essenzialmente da agente terapeutico, PVP-12 e ottanoato di sodio.

Una formulazione particolare è fornita come una forma di realizzazione in cui il mezzo idrofobo è costituito essenzialmente da gliceril tricaprilato, olio di ricino, gliceril monocaprilato, e Tween 80, e la

frazione idrofila è costituita essenzialmente da agente terapeutico (per es. octreotide), PVP-12 e ottanoato di sodio. Un'altra formulazione particolare è fornita come una forma di realizzazione in cui il mezzo idrofobo comprende gliceril tricaprilato, olio di ricino, gliceril monocaprilato, e Tween 80, e la frazione idrofila comprende agente terapeutico (per es. octreotide), PVP-12 e ottanoato di sodio. In alcune forme di realizzazione il mezzo idrofobo è costituito essenzialmente da gliceril tricaprilato e in alcune forme di realizzazione contiene inoltre olio di ricino e/o gliceril monocaprilato.

In alcune forme di realizzazione la composizione comprende una sospensione che è costituita essenzialmente da una miscela di un mezzo idrofobo e una forma solida in cui la forma solida comprende una quantità terapeuticamente efficace di un agente terapeutico e almeno un sale di un acido grasso a catena media, e in cui il sale di acido grasso a catena media è presente nella composizione in una quantità del 10% o più in peso. In alcune forme di realizzazione il mezzo idrofobo è costituito essenzialmente da olio di ricino, gliceril monooleato e gliceril tributirato; o il mezzo idrofobo è costituito essenzialmente da gliceril tricaprilato e gliceril monocaprilato; o il mezzo idrofobo è costituito essenzialmente da olio di ricino, gliceril tricaprilato e gliceril monocaprilato. In alcune forme di realizzazione il mezzo idrofobo comprende un trigliceride e un monogliceride e in alcune forme di realizzazione particolari il monogliceride ha lo stesso radicale di acido grasso del trigliceride. In alcune di queste forme di

realizzazione il trigliceride è gliceril tricaprilato e il monogliceride è gliceril monocaprilato. In alcune forme di realizzazione il sale di acido grasso a catena media nella composizione idrosolubile ha lo stesso radicale di acido grasso del monogliceride a catena media o del trigliceride a catena media o una loro combinazione. In alcune di queste forme di realizzazione il sale di acido grasso a catena media è caprilato di sodio (ottanoato di sodio) e il monogliceride è glicerile monocaprilato e il trigliceride è glicerile tricaprilato.

Molte delle composizioni descritte nel presente documento comprendono una sospensione che comprende una miscela di un mezzo idrofobo e una forma solida in cui la forma solida comprende una quantità terapeuticamente efficace di un agente terapeutico e almeno un sale di un acido grasso a catena media, e in cui il sale di acido grasso a catena media è presente nella composizione in una quantità del 10% o più in peso. La forma solida può essere una particella (per es., essere costituita essenzialmente da particelle, o essere costituita da particelle). La particella può essere prodotta tramite liofilizzazione o tramite granulazione.

In una forma di realizzazione particolare la formulazione è costituita essenzialmente da una sospensione che comprende una miscela di un mezzo idrofobo e una forma solida in cui la forma solida comprende una quantità terapeuticamente efficace di un agente terapeutico e circa il 10-20% preferibilmente il 15% di sale di acido grasso a catena media preferibilmente ottanoato di sodio, e circa il 5-

10% preferibilmente il 10% di PVP-12; e in cui il mezzo idrofobo comprende circa il 20-80%, preferibilmente il 30-70% di trigliceride preferibilmente gliceril tricaprilato o gliceril tributirato o olio di ricino o una loro miscela, circa il 3-10% di tensioattivi, preferibilmente circa il 6%, preferibilmente gliceril monocaprilato e Tween 80 e circa l'1% di acqua; in forme di realizzazione particolari l'agente terapeutico è presente in una quantità inferiore al 33%, o inferiore al 25%, o inferiore al 10%, o inferiore all'1% o inferiore allo 0,1% . La forma solida può essere una particella (per es., essere costituita essenzialmente da particelle, o essere costituita da particelle). La particella può essere prodotta tramite liofilizzazione o tramite granulazione. In una forma di realizzazione particolare la forma solida può essere una particella e può essere prodotta tramite liofilizzazione o tramite granulazione.

In un'ulteriore forma di realizzazione la formulazione è costituita essenzialmente da una sospensione che comprende una miscela di un mezzo idrofobo e una forma solida in cui la forma solida comprende una quantità terapeuticamente efficace di un agente terapeutico e circa il 10-20% preferibilmente il 15% di sale di acido grasso a catena media preferibilmente ottanoato di sodio, e circa il 5-10% preferibilmente il 10% di PVP-12; e in cui il mezzo idrofobo comprende circa il 20-80%, preferibilmente il 30-70% di trigliceride a catena media o corta preferibilmente gliceril tricaprilato o gliceril tributirato, circa lo 0-50% preferibilmente lo 0-30% di olio di ricino, circa il 3-10% di tensioattivi, preferibilmente circa il 6%, preferibilmente gliceril monocaprilato e

Tween 80 e circa l'1% di acqua; in forme di realizzazione particolari l'agente terapeutico è presente in una quantità inferiore al 33%, o inferiore al 25%, o inferiore al 10%, o inferiore all'1% o inferiore allo 0,1%.

In una forma di realizzazione particolare la formulazione è costituita essenzialmente da una sospensione che comprende una miscela di un mezzo idrofobo e una forma solida in cui la forma solida comprende una quantità terapeuticamente efficace di un agente terapeutico e circa il 15% di ottanoato di sodio e circa il 10% di PVP-12; e in cui il mezzo idrofobo comprende circa il 41% di gliceril tricaprilato, circa il 27% di olio di ricino, circa il 4% di gliceril monocaprilato, circa il 2% di Tween 80, circa l'1% di acqua e l'1% o meno di agente terapeutico; quando l'agente terapeutico è octreotide è presente a circa lo 0,058%.

In un'altra forma di realizzazione particolare la formulazione è costituita essenzialmente da una sospensione che comprende una miscela di un mezzo idrofobo e una forma solida in cui la forma solida comprende una quantità terapeuticamente efficace di un agente terapeutico e circa il 15% di ottanoato di sodio e circa il 10% di PVP-12; e in cui il mezzo idrofobo comprende circa il 68% di gliceril tricaprilato, circa il 4% di gliceril monocaprilato, circa il 2% di Tween 80, circa il 15% di ottanoato di sodio, circa il 10% di PVP-12, circa l'1% di acqua e meno dell'1% di agente terapeutico; quando l'agente terapeutico è octreotide esso è presente a circa lo 0,058%.

Una forme di realizzazione è una composizione comprendente una sospensione che comprende una miscela di un mezzo idrofobo e una forma solida in cui la forma solida comprende una quantità terapeuticamente efficace di octreotide e almeno un sale di un acido grasso a catena media; in una forma di realizzazione ulteriore il sale di acido grasso a catena media è presente nella composizione in una quantità del 10% o più in peso, preferibilmente il 15% in peso; in una forma di realizzazione ulteriore la forma solida comprende inoltre un polimero formante una matrice. In un'ulteriore forma di realizzazione il polimero formante una matrice è destrano o polivinilpirrolidone (PVP). In una forma di realizzazione specifica il polimero formante una matrice è polivinilpirrolidone e il polivinilpirrolidone è presente nella composizione in una quantità tra circa il 2% e circa il 20% in peso, preferibilmente circa il 10% in peso. In una forma di realizzazione specifica il polivinilpirrolidone è PVP-12 e/o il polivinilpirrolidone ha un peso molecolare di circa 3000. In forme di realizzazione specifiche il mezzo idrofobo è costituito essenzialmente da gliceril tricaprilato e la forma solida è costituita inoltre da PVP-12 e ottanoato di sodio. In forme di realizzazione più specifiche il mezzo idrofobo è costituito inoltre da olio di ricino o gliceril monocaprilato o una loro combinazione e un tensioattivo. In ulteriori forme di realizzazione specifiche il mezzo idrofobo è costituito da gliceril tricaprilato, gliceril monocaprilato, e poliossietilene sorbitan monooleato (Tween 80). In un'ulteriore forma di realizzazione la forma solida è costituita essenzialmente da octreotide,

PVP-12 e ottanoato di sodio. In una forma di realizzazione particolare la composizione contiene circa il 41% di gliceril tricaprilato, circa il 27% di olio di ricino, circa il 4% di gliceril monocaprilato, circa il 2% di Tween 80, circa il 15% di ottanoato di sodio, circa il 10% di PVP-12, circa l'1% di acqua e circa lo 0,058% di octreotide. In un'altra forma di realizzazione particolare la composizione contiene circa il 68% di gliceril tricaprilato, circa il 4% di gliceril monocaprilato, circa il 2% di Tween 80, circa il 15% di ottanoato di sodio, circa il 10% di PVP-12, circa l'1% di acqua e circa lo 0,058% di octreotide.

In tutte le formulazioni di cui sopra, le percentuali indicate sono peso/peso e la forma solida può essere una particella (per es., essere costituita essenzialmente da particelle, o è costituita da particelle). Le particelle possono essere prodotte tramite liofilizzazione o tramite granulazione.

Nelle normali condizioni di conservazione, l'agente terapeutico all'interno delle formulazioni dell'invenzione è stabile per un periodo di tempo prolungato. Lo stato chimico e fisico della formulazione è stabile. Una volta somministrato nell'intestino l'agente terapeutico è protetto dal danneggiamento dell'ambiente gastrointestinale poiché le formulazioni sono a base di olio e pertanto un ambiente locale separato viene creato nell'intestino dove l'agente terapeutico è contenuto in goccioline di olio, il che conferisce stabilità *in vivo*.

In alcune forme di realizzazione il processo produce una composizione costituita essenzialmente da un agente terapeutico e un

sale di acido grasso a catena media e un mezzo idrofobo. In forme di realizzazione dell'invenzione la polvere solida (forma solida) è costituita essenzialmente da un agente terapeutico e da un sale di acido grasso a catena media. Ulteriori forme di realizzazione dell'invenzione sono composizioni farmaceutiche prodotte attraverso il processo descritto nel presente documento. In alcune composizioni farmaceutiche l'agente terapeutico è una proteina, un polipeptide, un peptide, un glicosamminoglicano, un polisaccaride, una piccola molecola o un polinucleotide e in forme di realizzazione particolari l'agente terapeutico è insulina, ormone della crescita, ormone paratiroideo, teriparatide, interferone-alfa (IFN- α), una eparina a basso peso molecolare, leuprolide, fondaparinux, octreotide, exenatide, terlipressina, vancomicina o gentamicina. Forme di realizzazione particolari dell'invenzione comprendono una forma di dosaggio orale comprendente la composizione farmaceutica, in particolare una forma di dosaggio orale che è dotata di rivestimento gastroprotettivo. Ulteriori forme di realizzazione dell'invenzione comprendono una capsula contenente le composizioni dell'invenzione, e in varie forme di realizzazione la capsula è una capsula di gel duro o una capsula di gel molle, e generalmente la capsula è dotata di rivestimento gastroprotettivo. Altre forme di realizzazione dell'invenzione comprendono una forma di dosaggio rettale comprendente la composizione farmaceutica, in particolare una supposta, o una forma di

dosaggio orale. Un kit comprendente istruzioni e la forma di dosaggio è altresì previsto.

L'agente terapeutico o sale di acido grasso a catena media, o qualsiasi combinazione di agente terapeutico e altri componenti, quali stabilizzanti proteici, possono essere preparati in una soluzione di una miscela (per es., formando una soluzione o miscela acquosa) che può essere liofilizzata insieme e poi sospesi in un mezzo idrofobo. Altri componenti della composizione possono anche essere facoltativamente liofilizzati o aggiunti durante la ricostituzione dei materiali solidi.

In alcune forme di realizzazione, l'agente terapeutico è solubilizzato in una miscela, per esempio, includente uno o più componenti aggiuntivi quali un sale di acido grasso a catena media, uno stabilizzante e/o un agente tensioattivo, e il solvente viene rimosso per fornire una polvere solida risultante (forma solida), che è sospesa in un mezzo idrofobo. In alcune forme di realizzazione, l'agente terapeutico e/o il sale di acido grasso a catena media possono essere formati in una particella granulata che viene poi associata al mezzo idrofobo (per esempio sospesa nel mezzo idrofobo o rivestita con il mezzo idrofobo). In generale, le composizioni descritte nel presente documento sono sostanzialmente prive di "agenti di fluidificazione di membrana" quali alcoli a catena media.

Gli "agenti di fluidificazione di membrana" sono definiti come alcoli a catena media che hanno una lunghezza di catena di carbonio compresa tra 4 e 15 atomi di carbonio (per es., includenti da 5 a 15, da

5 a 12, 6, 7, 8, 9, 10, o 11 atomi di carbonio). Per esempio, un agente di fluidificazione di membrana può essere un alcol lineare (per es., saturo o insaturo), ramificato (per es., saturo o insaturo), ciclico (per es., saturo o insaturo), o aromatico. Esempi di alcoli lineari adatti includono, ma senza limitazione, butanolo, pentanolo, esanolo, eptanolo, ottanolo, nonanolo, decanolo, undecanolo, dodecanolo, tridecanolo, tetradecanolo, e pentadecanolo. Esempi di alcoli ramificati includono, ma senza limitazione, geraniolo, farnesolo, rodinolo, citronellolo. Un esempio di un alcol ciclico include, ma senza limitazione, mentolo, terpineolo, mirtenolo, perillile e alcol. Esempi di alcoli aromatici adatti includono, ma senza limitazione, alcol benzilico, acido 4-idrossicinnamico, timolo, stirene glicole, e composti fenolici. Esempi di composti fenolici includono, ma senza limitazione, fenolo, m-cresolo, e m-clorocresolo.

Se desiderato, la composizione farmaceutica può anche contenere quantità minori di sostanze ausiliarie non tossiche quali agenti di tamponamento del pH, e altre sostanze quali per esempio, acetato di sodio e trietanolamina oleato.

In almeno una forma di realizzazione, un agente terapeutico, quale una proteina, può essere modificata chimicamente per migliorare la sua emivita di circolazione. Per esempio, l'agente terapeutico può subire un processo come la peghilazione.

In alcune forme di realizzazione il processo per produrre una composizione farmaceutica comprende preparare una composizione

idrosolubile comprendente una quantità terapeuticamente efficace di almeno un agente terapeutico e un sale di acido grasso a catena media, essiccare la composizione idrosolubile per ottenere una polvere solida, e dissolvere la polvere solida in una soluzione costituita essenzialmente da acido ottanoico, producendo in tal modo la composizione farmaceutica, che è una soluzione. In alcune forme di realizzazione, la forma solida può essere una particella (per es., essere costituita essenzialmente da particelle, o essere costituita da particelle). In alcune forme di realizzazione, la particella può essere prodotta tramite liofilizzazione o tramite granulazione. In alcune forme di realizzazione di questo processo l'acido ottanoico è presente nella composizione a un livello tra circa il 60% e circa il 90% o a un livello tra circa il 70 e circa l'85% preferibilmente circa il 78%. In alcune forme di realizzazione di questo processo il sale di acido grasso è ottanoato di sodio; in forme di realizzazione ulteriori di questo processo il sale di acido grasso a catena media è presente nella composizione in una quantità tra circa l'11% e circa il 40% in peso o in una quantità tra circa l'11% e circa il 28% in peso o in una quantità di circa il 15% in peso. In alcune forme di realizzazione di questo processo la composizione comprende inoltre un polimero formante una matrice e in forme di realizzazione particolari di questo processo il polimero formante una matrice è destrano o polivinilpirrolidone (PVP); in forme di realizzazione ulteriori di questo processo il polivinilpirrolidone è presente nella composizione in una quantità tra circa il 2% e circa il 20% in peso o in

una quantità tra circa il 5% e circa il 15% in peso, preferibilmente in una quantità di circa il 10% in peso. In alcune forme di realizzazione di questo processo il polivinilpirrolidone è PVP-12 e/o ha un peso molecolare di circa 3000. La composizione può inoltre includere tensioattivi come descritti sopra. I prodotti farmaceutici di questi processi sono ulteriori forme di realizzazione dell'invenzione per es. una composizione contenente acido ottanoico a un livello tra circa il 60% e circa il 90% o a un livello tra circa il 70 e circa l'85% preferibilmente circa 78%; sale di acido grasso, preferibilmente ottanoato di sodio, presente nella composizione in una quantità tra circa l'11% circa il 40% in peso o in una quantità tra circa l'11% e circa il 28% in peso o in una quantità di circa il 15% in peso; di polimero formante una matrice per es. polivinilpirrolidone, preferibilmente PVP-12, presente nella composizione in una quantità tra circa il 2% e circa il 20% in peso o preferibilmente una quantità tra circa il 5% e circa il 15% in peso, preferibilmente in una quantità di circa il 10% in peso; e tensioattivi come descritti sopra. Possono anche esserci piccole quantità di altri costituenti idrofobi come descritti sopra.

Capsule: Composizioni farmaceutiche preferite sono forme di dosaggio orali o supposte. Forme di dosaggio esemplificative includono gelatina o capsule per vegetariani come capsule di idrossilpropilmetilcellulosa di amido ("HPMC"), con rivestimento gastroprotettivo, contenenti il prodotto farmaceutico sfuso. Le capsule che possono essere usate per incapsulare le composizioni di questa invenzione sono

note nell'arte e sono descritte per esempio in *Pharmaceutical Capsules*, Podczech and Jones eds., Pharmaceutical Press (2004) e *in* *Hard gelatin capsules today - and tomorrow*, 2nd edition, Steggeman ed. pubblicato da Capsugel Library (2002).

Formulazioni aggiuntive: Le composizioni dell'invenzione possono essere formulate usando metodi aggiuntivi noti nell'arte, per esempio come descritto nelle seguenti pubblicazioni: *Pharmaceutical Dosage Forms Vol. 1-3* Lieberman, Lachman and Schwartz eds., pubblicato da Marcel Dekker Inc, New York(1989); *Water-insoluble Drug Formulation* 2nd edition, Liu, ed., pubblicato da CRC Press, Taylor and Francis Group (2008); *Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing and Delivery Systems*, seconda edizione di Ajay K. Banga (autore) pubblicato da CRC Press , Taylor and Francis Group (2006); *Protein Formulation and Delivery*, seconda edizione, McNally and Hasted eds., pubblicato da Informa Healthcare USA Inc(2008); e *Advanced Drug Formulation to Optimize Therapeutic Outcomes*, Williams et al eds., pubblicato da Informa Healthcare USA (2008).

Le composizioni dell'invenzione possono essere formulate usando la tecnologia delle microparticelle per esempio come descritto in *Microparticulate Oral Drug Delivery*, Gerbre-Selassie ed., pubblicato da Marcel Dekker Inc (1994) e in Dey et al, *Multiparticulate Drug Delivery Systems for Controlled Release*, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, settembre 2008; 7 (3): 1067-1075.

Uso delle composizioni nel trattamento: Le composizioni descritte nel presente documento presentano un rilascio enterico efficace di una sostanza biologicamente attiva inalterata (ovvero un agente terapeutico) e perciò hanno molti usi.

-L'octreotide è stato sintetizzato per la prima volta nel 1979, ed è un octapeptide che mima la somatostatina naturale farmacologicamente, anche se è un inibitore dell'ormone della crescita, del glucagone e dell'insulina più potente dell'ormone naturale. Octreotide o altri analoghi della somatostatina possono essere somministrati secondo una o più forme di realizzazione dell'invenzione per l'uso nel trattare o prevenire una malattia o un disturbo in un soggetto affetto da un disturbo quali acromegalia, anormale motilità gastrointestinale, episodi di arrossamento della faccia associati a sindrome carcinoide, ipertensione portale, un tumore endocrino (quali carcinoidi, VIPoma), gastroparesi, diarrea, fistola pancreatica o una pseudocisti pancreatica. La diarrea può risultare da radioterapia o può verificarsi per esempio in soggetti con tumori a cellule secernenti il peptide intestinale vasoattivo (VIPomi). In aggiunta, i pazienti sottoposti a interventi chirurgici al pancreas possono soffrire di secrezione pancreatica estrinseca e sono vulnerabili allo sviluppo di fistola o pseudocisti pancreatiche che possono essere trattate con i prodotti a base di octreotide dell'invenzione. Alcune forme di realizzazione preferite sono dirette a un metodo per trattare un soggetto avente un disturbo quale acromegalia, anormale motilità gastrointestinale, episodi

di arrossamento della faccia associati a sindrome carcinoide, ipertensione portale, un tumore endocrino (quali carcinoidi, VIPoma), gastroparesi, diarrea, fistola pancreatica o una pseudocisti pancreatica, che comprende somministrare al soggetto una composizione dell'invenzione, in cui l'agente terapeutico è octreotide, in una quantità sufficiente per trattare il disturbo. Le formulazioni di octreotide dell'invenzione possono anche essere usate per la profilassi primaria e secondaria di sanguinamento delle varici, che può essere causato da ipertensione portale; le varici possono essere gastriche o esofagee. Altri usi delle formulazioni di octreotide dell'invenzione sono nel trattamento dello shock di origine ipovolemica (per es. emorragico) o vasodilatatoria (per es. settico), sindrome epatorenale (HRS), rianimazione cardiopolmonare e ipotensione indotta da anestesia. Altri analoghi della somatostatina possono essere usati nei metodi e nelle composizioni in cui si utilizza l'octreotide.

Una forma di realizzazione dell'invenzione riguarda una composizione dell'invenzione per l'uso nel trattamento di un soggetto affetto da una malattia o da un disturbo in cui una quantità della composizione sufficiente per trattare la condizione viene somministrata al soggetto. Un'altra forma di realizzazione dell'invenzione riguarda l'uso di un agente terapeutico nella fabbricazione di un medicamento attraverso il processo dell'invenzione per il trattamento di un disturbo.

Il regime posologico che utilizza i composti è selezionato in conformità con una serie di fattori inclusi tipo, specie, età, peso, sesso e

condizione medica del paziente; gravità della condizione da trattare; via di somministrazione; funzionalità renale ed epatica del paziente; e il particolare composto o suo sale impiegato. Un medico o veterinario di competenze ordinarie può determinare e prescrivere facilmente la quantità efficace del farmaco necessaria per prevenire, contrastare o arrestare il progresso della condizione. Le forme farmaceutiche orali della presente invenzione, quando usate per gli effetti indicati, possono essere fornite sotto forma di capsule contenenti 0,001, 0,0025, 0,005, 0,01, 0,025, 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0 o 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 o 1000 mg di agente terapeutico.

I composti della presente invenzione possono essere somministrati in una singola dose giornaliera, o il dosaggio giornaliero totale può essere somministrato in dosi divise di due, tre, quattro, cinque o sei volte al giorno. In alcune forme di realizzazione, la composizione viene somministrata in una dose giornaliera compresa tra circa 0,01 e circa 5000 mg/giorno, per es., somministrata una volta al giorno (per es., al mattino o prima di coricarsi) o due volte o più al giorno (per es. al mattino e prima di coricarsi).

Un prodotto rappresentativo dell'invenzione è una formulazione a base di API somministrata oralmente come capsule dotate di rivestimento gastroprotettivo: ogni capsula contiene API co-liofilizzato con PVP-12 e ottanoato di sodio, e sospeso in un mezzo idrofobo (lipofilo) contenente: gliceril tricaprilato, gliceril monocaprilato, e Tween

80; in un altro prodotto rappresentativo dell'invenzione è inoltre presente olio di ricino. Le composizioni descritte nel presente documento possono essere somministrate a un soggetto ovvero un essere umano o un animale, al fine di trattare il soggetto con una quantità farmacologicamente o terapeuticamente efficace di un agente terapeutico descritto nel presente documento. L'animale può essere un mammifero per es. un topo, ratto, maiale, cavallo, mucca o pecora. Come usata nel presente documento l'espressione "quantità farmacologicamente o terapeuticamente efficace" indica quella quantità di un farmaco o un agente farmaceutico (l'agente terapeutico) che susciterà la risposta biologica o medica di un tessuto, sistema, animale o essere umano ricercata da un ricercatore o clinico medico.

Le formulazioni dell'invenzione consentono l'incorporazione dell'agente terapeutico nella formulazione senza modificazione chimica dell'agente terapeutico. Inoltre, le formulazioni dell'invenzione consentono un'elevata flessibilità nel carico dell'agente terapeutico. La capacità di carico dipende dall'agente terapeutico. Ad oggi, i limiti di capacità di carico non sono stati raggiunti; tuttavia è stato raggiunto un carico fino all'1,5% p/p (polipeptidi) e fino al 6% p/p (piccole molecole) ed è contemplato un carico superiore fino al 33%. Infine, le formulazioni dell'invenzione proteggono i composti cargo dall'inattivazione nell'ambiente gastrointestinale per via, ad esempio, della degradazione proteolitica e dell'ossidazione.

La funzione e i vantaggi di queste e altre forme di realizzazione saranno compresi più appieno dai seguenti esempi. Questi esempi sono destinati a essere di natura illustrativa e non vanno considerati come limitativi della portata dei sistemi e dei metodi discussi nel presente documento.

Esempi

Esempio 1 (comparativo): Formulazioni

A. Composizione di una formazione di insulina

La Tabella 1A presenta un esempio di una composizione come divulgata nel presente documento. Più specificamente, questa composizione è una formulazione di insulina. L'insulina è stata ottenuta da Diosynth Biotechnology; ottanoato di sodio e NaOH da Merck; MgCl₂, MC400, Span40, lecitina e olio di ricino da Spectrum; PVP-12 da BASF; etil isovalerato da Merck/Sigma; gliceril tributirato da Acros/Penta; e glicerolo monooleato da Abitec Corp.

Tabella 1A

	Ingrediente	% p/p
Frazione idrofila	Derivato	0,417
	NaOH	0,029
	MgCl ₂	0,104
	PVP-12	2,083
	Ottanoato di sodio	3,125

	Metil cellulosa	0,104
Mezzo idrofobo	Olio di ricino	52,858
	Gliceril tributirato	28,466
	Etil isovalerato	8,195
	Glicerolo monooleato	1,779
	Lecitina	1,893
	Span-40	0,946

B. Formulazione A per leuprolide: La Tabella 1B presenta un esempio di una composizione per un principio attivo farmaceutico (API, Active Pharmaceutical Ingredient) come divulgato nel presente documento. Più specificamente, questa composizione è una formulazione di leuprolide.

Tabella 1B

	Ingrediente	% p/p
Frazione idrofila	Leuprolide	0,072
	NaOH	0,038
	MgCl ₂	0,137
	PVP-12	2,740
	Ottanoato di sodio	12,002
	Metil cellulosa	0,137

	Acqua	0,605
Mezzo idrofobo	Span-40	1,21
	Lecitina	2,43
	Etil isovalerato	10,52
	Glicerolo monooleato	2,28
	Gliceril tributirato	23,74
	Olio di ricino	44,09

C. Una formulazione con quantità ridotta di mezzo idrofobo (50% di mezzo idrofobo)

La Tabella 1C presenta un esempio di una composizione per un principio attivo farmaceutico come divulgato nel presente documento. Più specificamente, questa composizione è una formulazione per destrano (FD4). L'FD4 è destrano marcato con FITC con un PM di 4,4kDa (Sigma, FD4) e questo è il destrano che è stato utilizzato negli esempi salvo altrimenti indicato. Questa particolare formulazione contiene olio di cocco (Sigma) anziché GTB.

Tabella 1C

	Ingrediente	% p/p
Frazione idrofila	Destrano	0,939
	NaOH	0,001
	MgCl ₂	0,235

	PVP-12	4,693
	Ottanoato di sodio	20,662
	Metil cellulosa	0,235
	Acqua	1,071
Mezzo idrofobo	Span-40	1,04
	Lecitina	2,08
	Etil isovalerato	9,01
	Glicerolo monooleato	1,95
	Olio di cocco	20,33
	Olio di ricino	37,75

Le formulazioni di cui sopra sono usate per un'ampia varietà di agenti terapeutici e conferiscono una buona biodisponibilità al composto cargo nei modelli animali descritti sotto.

Si noti che la quantità netta di agente terapeutico può variare come appropriato in qualsiasi delle formulazioni e possono esservi variazioni minori nelle formulazioni; per esempio non si utilizza sempre NaOH; l'olio di cocco può essere utilizzato al posto del gliceril tributirato; non si utilizza sempre MgCl₂ (per es. con hGH non viene utilizzato); tutti gli ingredienti possono essere sostituiti come descritto sopra nella descrizione.

Esempio 2 (comparativo): Rappresentazione schematica della produzione della formulazione di insulina

La FIG. 1 illustra un metodo per produrre una composizione come divulgata nel presente documento. Per esempio, questo metodo può essere implementato per realizzare le composizioni presentate sopra nell'esempio 1.

Esempio 3 (comparativo): La combinazione di particelle solide contenenti ottanoato di sodio e mezzo idrofobo è critica per l'attività di permeazione.

La FIG. 2 presenta dati relativi ai livelli sierici di insulina dopo la somministrazione rettale ai ratti. I ratti sono stati anestetizzati e sono stati somministrati loro 100 μ L di formulazione farmaceutica sfusa contenente una dose di insulina di 328 μ g/ratto (9 IU/ratto). Sono stati prelevati campioni di sangue a 0, 3, 6, 10, 15, 25, 30, 40, 60 e 90 minuti dalla somministrazione e il siero è stato preparato per la determinazione dell'insulina umana con un kit di immunodosaggio senza reattività crociata tra ratto e insulina umana.

I dati sono presentati come MEDIA \pm DS, n=5. Il pannello di sinistra di FIG. 2 si riferisce alla somministrazione di insulina umana con ottanoato di sodio (Na-C8) o frazione idrofila solida sospesa in acqua (particelle solide in acqua). Il pannello di destra di FIG. 2 si riferisce alla somministrazione della formulazione di insulina completa (particelle solide in mezzo idrofobo). La Tabella 2 di seguito presenta un sunto dei valori di AUC calcolati a partire dalle curve della concentrazione in rapporto al tempo.

Tabella 2

Composto di test	AUC_(0-∞)
Na-C8	5753 ± 3569
Particelle solide in acqua	4083 ± 2569
Insulina in formulazione (particelle solide in mezzo idrofobo)	280933 ± 78692

I dati sono MEDIA±DS

L'esposizione media (espressa dai valori di AUC) all'insulina dopo la somministrazione rettale di insulina-SCD era all'incirca 50 volte superiore all'esposizione dopo la somministrazione senza un mezzo idrofobo. Un'esposizione minima è stata rilevata in ratti a cui è stata somministrata l'insulina con ottanoato di sodio da solo o come parte delle particelle solide della frazione idrofila (come elencato nell'esempio 1) sospesa in acqua. Questi dati dimostrano una sinergia tra l'ottanoato di sodio solido e un mezzo idrofobo.

Esempio 4 (comparativo): Assorbimento intestinale di insulina dopo la somministrazione GI di insulina a ratti

La FIG. 3 presenta dati relativi ai livelli sierici di insulina e ai livelli ematici di glucosio dopo la somministrazione rettale di soluzione di insulina e insulina in formulazione ai ratti. I ratti sono stati anestetizzati e sono stati somministrati loro 100 µL di articolo di test (insulina in formulazione o insulina in PBS) contenente una dose di insulina di 328 µg/ratto (9 IU/ratto). Sono stati prelevati campioni di sangue a 0, 3, 6, 10, 15, 25, 30, 40, 60 e 90 minuti dalla

somministrazione. Il livello di glucosio è stato determinato immediatamente con un glucometro e il siero è stato preparato per la determinazione di insulina umana con un kit di immunodosaggio senza reattività crociata tra ratto e insulina umana.

I livelli di glucosio sono presentati come i livelli basali in forma percentuale misurati prima della somministrazione (tempo 0). I dati di FIG. 3 sono presentati come $MEAN \pm SD$, $n=5$.

I livelli di insulina (panello sinistro in FIG. 3) e glucosio (panello destro di FIG. 3) dopo la somministrazione rettale di insulina umana solubilizzata in PBS (soluzione di insulina) o incorporata nella formulazione vengono presentati. I livelli di insulina sono aumentati rapidamente nel siero di ratto dopo la somministrazione rettale di insulina nella formulazione. I livelli massimi sono stati misurati entro 6 minuti dalla somministrazione e una diminuzione graduale è stata rilevata fino al raggiungimento dei livelli basali a circa 90 min dalla somministrazione. Questo aumento netto e significativo di insulina era accompagnato da un calo significativo dei livelli di glucosio che hanno raggiunto una media del 20% dei livelli iniziali già a 30 min dalla somministrazione. Di contro, la somministrazione rettale di insulina in PBS ha causato solo una riduzione molto lieve del glucosio, che è identica a quella osservata in seguito al trattamento con il controllo di PBS da solo.

Esempio 5 (comparativo): Assorbimento di insulina dopo la somministrazione rettale di insulina in formulazione ai ratti

La FIG. 4 presenta dati relativi a variazioni nelle concentrazioni ematiche di glucosio e sieriche di insulina in seguito alla somministrazione SC (sottocutanea) di soluzione di insulina (a 20 µg/ratto) e alla somministrazione rettale di insulina in formulazione (a 328 µg/ratto). Sono stati prelevati campioni di sangue a 0, 3, 6, 10, 15, 25, 30, 40, 60 e 90 minuti dalla somministrazione rettale e a 0, 15, 30, 45, 60, 90 min, 2, 3, e 4 ore dalla somministrazione sottocutanea. Il glucosio è stato determinato immediatamente con un glucometro e l'insulina con un kit di immunodosaggio. I livelli di glucosio sono presentati come i livelli basali in forma percentuale misurati prima della somministrazione (tempo 0). I dati di FIG. 4 sono presentati come MEAN±SD, n=5.

I livelli di assorbimento di insulina dal colon di ratto dopo la somministrazione dell'insulina nella formulazione sono stati confrontati con i livelli di insulina assorbita dopo la somministrazione sottocutanea. L'esposizione all'insulina è stata calcolata dall'area sotto la curva della concentrazione sierica in rapporto al tempo (AUC) e l'attività calcolata come biodisponibilità relativa (rBA) secondo l'equazione seguente:

$$rBA = (\text{rectal AUC}_{(0-x)} / \text{SC AUC}_{(0-x)}) * (\text{SC dose} / \text{rectal dose})$$

"Rectal" = rettale

"Dose" = dose

"Rectal dose" = dose rettale

La penetrazione di insulina nel circolo ematico avviene durante una finestra temporale ristretta, generalmente entro circa 10 minuti

dalla somministrazione rettale dell'insulina in formulazione. L'aumento di insulina sierica va di pari passo con una diminuzione dei livelli di glucosio nel sangue.

Al fine di ottenere informazioni sulla biodisponibilità dell'insulina quando l'insulina formulata viene presentata nel colon, l' $AUC_{(0-\infty)}$ è stata determinata per la somministrazione rettale e SC e il valore rBA dell'insulina umana era $29,4 \pm 3,4\%$ con coefficiente di varianza (CV) = 11,4%.

La somministrazione rettale di varie formulazioni contenenti insulina è stata condotta su centinaia di animali. Il saggio è stato ulteriormente sviluppato e qualificato come saggio biologico per supportare lo sviluppo di una piattaforma e test di rilascio di lotti con un intervallo lineare di 10-200 $\mu\text{g}/\text{ratto}$, ripetibilità del 39% e precisione intermedia del 33%.

La formulazione di insulina descritta nel presente documento è stata testata in cinque studi diversi usando un totale di 25 ratti. L'rBA era $34,1 \pm 12,6\%$ con CV del 28,9%.

Esempio 6 (comparativo): Assorbimento di insulina dopo la somministrazione intradiurnale di insulina in formulazione ai ratti

Il sito bersaglio di assorbimento della piattaforma somministrata oralmente dell'invenzione è generalmente l'intestino tenue. Per testare l'attività della formulazione di insulina nell'intestino di ratto, sono stati affrontati due ostacoli principali: 1. Non sono disponibili capsule con rivestimento gastroprotettivo per i ratti e quindi è necessario un bypass

a livello dello stomaco che permetta la somministrazione intradigiunale diretta. 2. L'insulina è metabolizzata ampiamente dal fegato; negli esseri umani il 50-80% dell'insulina endogena, secreta dalle cellule β pancreatiche, viene sequestrata dal fegato e pertanto non può essere rilevata nella circolazione sistemica. L'insulina somministrata attraverso la via intestinale (per via della formulazione di insulina) imita la via endogena dell'insulina in quanto il flusso sanguigno intestinale viene scaricato nella vena porta che conduce direttamente al fegato. Quindi, per determinare l'assorbimento di insulina, i campioni di sangue devono essere prelevati dalla vena porta (circolazione portale, prima del fegato) nonché dalla vena giugulare (circolazione sistemica, dopo il fegato).

È stato sviluppato un modello di ratto specializzato in cui sono state impiantate chirurgicamente tre diverse cannule in ratti anestetizzati: 1. Cannula digiunale - il bypass a livello dello stomaco, permette la somministrazione della formulazione di insulina, 2. Cannula inserita nella vena porta - prelievo del sangue prima del fegato, determinazione dell'insulina che attraversa la parete gastrointestinale entrando nel sangue, e 3. Cannula inserita nella vena giugulare - per determinare i livelli sistemici di insulina. Usando questo modello, è stata determinata la biodisponibilità di insulina in formulazione (rBA).

La FIG. 5 presenta dati da un rispettivo studio relativo ai livelli di insulina nella circolazione portale e sistemica dopo la somministrazione intradigiunale di controllo di insulina e formulazione di insulina a ratti. I ratti (8 ratti per gruppo) sono stati anestetizzati e il loro digiuno è stato

esposto tramite chirurgia addominale. L'ansa intestinale contenente il digiuno è stata collocata su garza e mantenuta umido e completamente integra per tutto lo studio. Una cannula temporanea è stata inserita nel digiuno ed è stata somministrata insulina formulata. Il sangue è stato prelevato sia dalla vena porta sia dalla vena giugulare negli stessi punti temporali, con approssimativamente 4 punti temporali per ratto. Il valore $MEDIA \pm DS$ di ogni punto temporale è stato usato per creare una curva di concentrazione plasmatica in rapporto al tempo. È stata determinata l'AUC e si è calcolata la rBA.

I livelli di insulina nella circolazione sia portale sia sistemica sono aumentati drasticamente dopo la somministrazione intradigiunale di insulina in formulazione. Questo è in contrasto con l'assorbanza di insulina minima rilevata quando è stato somministrato il controllo di insulina. La finestra di assorbimento era breve e i livelli di insulina hanno raggiunto un picco entro 6 minuti. Questo profilo è simile a quello osservato dopo la somministrazione rettale di insulina formulata (vedere sopra). Livelli di insulina superiori sono stati rilevati nella circolazione portale in confronto alla circolazione sistemica, con rBA del 10,1% in confronto al 5,6%, rispettivamente.

Esempio 7 (comparativo): Formulazioni aggiuntive comprendenti vari composti cargo

La Tabella 3A indica in dettaglio i componenti di una gamma di formulazioni di destrano che sono state preparate come descritto nei seguenti esempi. Il caprato di sodio è stato ottenuto da Fluka/Sigma,

l'olio di oliva da Fluka, l'acido ottanoico da Sigma e l'olio minerale da Acros.

Tabella 3A

	Cargo	Destrano							
		A	B	C	D	E	F	G	H
Formulazione									
Ingrediente		(%p/p)	(%p/p)	(%p/p)	(%p/p)	(%p/p)	(%p/p)	(%p/p)	(%p/p)
Frazione idrofila	Cargo	0,545	0,939	0,565	0,546	0,565	0,565	0,565	0,551
	NaOH	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
	MgCl ₂	0,136	0,235	0,141	0,156	0,141	0,141	0,141	0,138
	PVP-12	2,726	4,693	2,823	3,117	2,823	2,823	2,823	2,754
	Ottanoato di sodio	12,001	20,662	-	-	9,002	9,002	9,002	12,125
	Caprato di sodio	-	-	9,002	-	-	-	-	-
	MC 400	0,136	0,235	0,141	0,156	0,141	0,141	0,141	0,138
	Acqua	0,622	1,071	0,507	0,159	0,507	0,507	0,507	0,661
Mezzo idrofobo	Span40	1,21	1,04	1,25	1,38	1,25	1,25	1,25	-
	Lecitina	2,42	2,08	2,50	2,76	2,50	2,50	2,50	-
	Etilisovalerato	10,46	9,01	10,83	11,96	10,83	10,83	10,83	11,23

Gliceril monooleato	2,27	1,95	2,35	2,60	2,35	2,35	2,35	-
Gliceril tributirato	23,62	20,33	24,46	24,29	24,46	24,46	24,46	25,35
Olio di cocco	-	-	-	-	-	-	-	-
Olio di ricino	43,86	37,75	45,42	45,07	45,42	-	-	47,08
Acido ottanoico	-	-	-	7,80	-	-	-	-
Olio minerale	-	-	-	-	-	45,42	-	-
Olio d'oliva	-	-	-	-	-	-	45,42	-

La Tabella 3B indica in dettaglio i componenti di una gamma di formulazioni di teriparatide acetato e leuprolide che sono state preparate come descritto nei seguenti esempi. Teriparatide è stato ottenuto da Novetide, e leuprolide è stato ottenuto da Bambio.

Tabella 3B

	Cargo	Teriparatide		Leuprolide	
		I	J	K	L
	Formulazione	(%p/p)	(%p/p)	(%p/p)	(%p/p)
	Ingrediente	(%p/p)	(%p/p)	(%p/p)	(%p/p)
Frazione idrofila	Cargo	0,118	0,118	0,050	0,050
	NaOH	-	-	0,040	0,04
	MgCl ₂	0,137	0,137	0,142	0,15

	PVP-12	2,740	2,740	2,838	2,99
	Ottanoato di sodio	12,001	12,001	9,012	-
	Caprato di sodio	-	-	-	4,48
	MC 400	0,137	0,137	0,142	0,15
	Acqua	0,605	0,605	0,489	0,33
Mezzo idrofobo	Span40	1,214	1,214	1,26	1,32
	Lecitina	2,428	2,428	2,52	2,65
	Etil-iso-valerato	10,515	10,515	10,89	11,46
	Gliceril monooleato	2,283	2,283	2,36	2,49
	Gliceril tributirato	23,740	-	24,59	25,87
	Olio di cocco	-	23,740	-	-
	Olio di ricino	44,082	44,082	45,66	48,04

La Tabella 3C indica in dettaglio i componenti di formulazioni di hGH che sono state preparate come descritto e i seguenti esempi. L'hGH è stato ottenuto da PLR, Israele (GHP-24).

Tabella 3C

	Cargo	hGH	
		O(%p/p)	P(%p/p)
Frazione idrofila	Cargo	0,298	0,303
	NaOH	-	-

	MgCl ₂	-	-
	PVP-12	2,836	2,738
	Ottanoato di sodio	9,006	12,007
	Caprato di sodio	-	-
	MC 400	0,142	0,137
	Acqua	0,492	0,607
Mezzo idrofobo	Span40	1,257	1,213
	Lecitina	2,514	2,427
	Etil-iso-valerato	10,885	10,508
	Gliceril monooleato	2,363	2,281
	Gliceril tributirato	24,575	23,725
	Olio di cocco	-	-
	Olio di ricino	45,633	44,054

Il processo di produzione per tutte queste formulazioni di cui sopra è essenzialmente come descritto in Figura 1 e nell'esempio 11.

Esempio 8 (comparativo): Effetto della dose di ottanoato di sodio incorporata nella formulazione sull'attività della formulazione

L'effetto dell'aumento della quantità di ottanoato di sodio (Na-C8) nella formulazione sull'attività della formulazione è stato testato usando formulazioni contenenti destrano (PM medio = 4,4 kDa, marcato con FITC) come composto cargo e diverse dosi di Na-C8,

segnatamente la formulazione A nella Tabella 3A (che contiene il 12% di ottanoato di sodio in peso) e simili composizioni di destrano contenenti diverse dosi di Na-C8: 9%, 6% e 3% rispettivamente.

Per testare l'attività di queste formulazioni nel digiuno di ratti non anestetizzati, è stato stabilito un modello di ratto in cui due cannule diverse sono impiantate chirurgicamente in ratti Sprague-Dowley maschi.

1. Cannula digiunale per bypassare lo stomaco e permettere la somministrazione diretta della formulazione nel digiuno.

2. Cannula inserita nella vena giugulare per determinare i livelli sistemici del destrano somministrato in seguito alla somministrazione digiunale. Ai ratti viene consentito un recupero di 4 giorni prima dello studio e sono privati del cibo per 18 ore prima dell'inizio dello studio.

La figura 6 presenta i dati di uno studio che determina la biodisponibilità di destrano marcato con FITC (4,4 kDa) in ratti non anestetizzati dopo la somministrazione intra-digiunale di formulazioni contenenti diverse quantità di Na-C8 o destrano marcato con FITC solubilizzato con l'Na-C8 in soluzione salina (controllo).

La biodisponibilità delle diverse formulazioni di destrano e del controllo è stata valutata somministrando le diverse formulazioni direttamente nel digiuno di ratti non anestetizzati e misurando i livelli plasmatici di destrano a 3, 6, 10, 25, 60 e 90 minuti dalla somministrazione. I livelli plasmatici di destrano in seguito alla

somministrazione di destrano in formulazione o in soluzione salina sono stati confrontati con i livelli plasmatici di destrano dopo la somministrazione endovenosa. I valori di esposizione, AUC (0-90), sono stati determinati per la somministrazione digiunale ed endovenosa e la biodisponibilità assoluta (aBA) è stata calcolata secondo l'equazione seguente:

$$aBA = (jcjunal\ AUC(0-90)) / (iv\ AUC\ (0-90)) * (iv\ dose / jcjunal\ dose).$$

"Jejunal" = digiunale

"Dose" = dose

"Jejunal dose" = dose digiunale

I dati sono presentati come media \pm DS (n \geq 5 ratti per gruppo). I risultati mostrano che aumentando la quantità di Na-C8 incorporato nella formulazione si migliora la biodisponibilità del destrano in una modalità di risposta alla dose, raggiungendo quasi il 30% di aBA alla dose del 12% (p/p). Il destrano somministrato con Na-C8 a dosi simili e sospeso in una soluzione salina (ovvero non formulato) mostrava una biodisponibilità molto inferiore (\sim 6% aBA). Ulteriori risultati dose-risposta sono mostrati nell'esempio 26.

Esempio 9 (comparativo): Effetto del rapporto di frazione idrofila/mezzo idrofobo sull'attività della formulazione

L'effetto sull'attività della formulazione della variazione del rapporto (peso/peso) tra la frazione idrofila e il mezzo idrofobo è stato testato usando formulazioni contenenti destrano (PM medio = 4,4 kDa, marcato con FITC) come cargo (formulazioni A e B nella Tabella 3A). Il

modello di ratto non anestetizzato *in vivo* descritto nell'esempio 8 è stato usato al fine di confrontare l'attività delle formulazioni descritte.

La Tabella 4 presenta i dati di biodisponibilità dopo la somministrazione intra-digiunale di formulazioni comprendenti un rapporto diverso tra frazione idrofila e mezzo idrofobo.

Tabella 4

Cargo	Formulazione	Rapporto in peso tra mezzo idrofilo/idrofobo	Modello animale	Via di somministrazione	N	%aBA ± DS
Destrano	A	1 / 5.2	Ratto non anestetizzato	Digiunale	17	28,0 ± 6,8
	B	1 / 2.6			19	24,8 ± 25

Le formulazioni A e B sono state somministrate direttamente nel digiuno di ratti non anestetizzati e i livelli plasmatici di destrano sono stati misurati a 3, 6, 10, 25, 60 e 90 minuti dalla somministrazione della formulazione. I livelli di assorbimento di destrano dal digiuno di ratto dopo la somministrazione di destrano in formulazione sono stati confrontati con i livelli di destrano assorbito dopo la somministrazione endovenosa. I valori di esposizione, AUC (0-90), sono stati determinati

per la somministrazione digiunale ed endovenosa e la biodisponibilità assoluta (aBA) è stata determinata secondo l'equazione seguente:

$$aBA = (jcjunal\ AUC(0-90)) / (iv\ AUC\ (0-90)) * (iv\ dose / jcjunal\ dose).$$

“Jejunal” = digiunale

“Dose” = dose

“Jejunal dose” = dose digiunale

I dati sono presentati come media \pm DS (n \geq 5 ratti per gruppo).

I risultati mostrano che la variazione del rapporto tra la frazione idrofila e il mezzo idrofobo in queste formulazioni con un basso peso % di agente terapeutico non aveva un effetto significativo sulla biodisponibilità del cargo il che fornisce una flessibilità di carico nell'elaborazione di formulazioni aggiuntive.

Esempio 10 (comparativo): Attività di formulazioni contenenti diversi composti cargo

Al fine di testare la capacità della piattaforma di formulazione, l'attività di formulazioni contenenti tre diversi composti cargo (API) è stata testata in tre diversi modelli animali: somministrazione digiunale a ratti non anestetizzati, somministrazione rettale a ratti anestetizzati e somministrazione digiunale a maiali non anestetizzati. La Tabella 5 riassume i risultati di esperimenti rappresentativi che testano la biodisponibilità delle formulazioni contenenti diversi API nei tre diversi modelli animali descritti sopra.

Tabella 5

	API	Formulazione	Modello animale	Via di somministrazione	N	%BA	± DS
I		I	Ratto non anestetizzato	Digiunale	5	14,0**	±10,8
II	Teriparatide	I	Maiale non anestetizzato	Digiunale	5	15,0**	±9,3
III	Leuprolide	K	Ratto non anestetizzato	Digiunale	4	10,1*	±7,5
I V	hGH	P	Ratto anestetizzato	Rettale	5	17,9**	±3,9
* BA assoluta (in confronto a IV) ** BA relativa (in confronto a SC)							

A. Assorbimento di leuprolide dopo la somministrazione digiunale di leuprolide in formulazione ai ratti

La Tabella 5-III presenta dati da uno studio rappresentativo relativo alla aBA % di leuprolide in seguito alla somministrazione IV (endovenosa) di soluzione di leuprolide (a 75 µg/Kg) e alla somministrazione digiunale di leuprolide in formulazione (a 450 µg/Kg; formulazione K, Tabella 3B) a ratti non anestetizzati, come descritto precedentemente nell'esempio 8.

Sono stati prelevati campioni di sangue dalla vena giugulare a 3, 6, 10, 15, 25, 40, 60 e 90 minuti dalla somministrazione digiunale e a

3, 10, 25, 40, 90 min, 2, 3,3 e 5 ore dalla somministrazione IV, è stato preparato il plasma e i livelli di leuprolide sono stati determinati in ogni campione. I livelli di leuprolide nella circolazione sistemica sono aumentati drasticamente dopo la somministrazione digiunale di leuprolide in formulazione. I livelli ematici di leuprolide hanno raggiunto un picco entro 3 minuti dalla somministrazione. La aBA media ottenuta dopo la somministrazione digiunale di leuprolide in formulazione è stata calcolata come descritto negli esempi di cui sopra ed era del 10,1%. In un esperimento di controllo, la somministrazione digiunale di leuprolide in PBS ha dimostrato una penetrazione trascurabile nel circolo ematico.

È stata preparata una formulazione di leuprolide simile contenente il 12% di ottanoato di sodio come descritto nella Tabella 1B; è stata testata nel modello di cui sopra e mostrava biodisponibilità come segue:

$$\text{rBA (compared to SC)} = 21.1\% \pm 12.0 \text{ (CV=57\%).}$$

"Compared to SC" = in confronto a SC

B. Assorbimento di teriparatide dopo la somministrazione digiunale di teriparatide in formulazione ai ratti

La Tabella 5-I presenta dati da uno studio rappresentativo relativo ai profili plasmatici di concentrazione-tempo di teriparatide in seguito alla somministrazione SC di soluzione di teriparatide (a 85 µg/formulazione e alla somministrazione digiunale di teriparatide (teriparatide) in formulazione (a 550 µg/Kg; formulazione I, Tabella 3B) a ratti non anestetizzati, come descritto precedentemente nell'esempio

8. Sono stati prelevati campioni di sangue dalla vena giugulare a 3, 6, 10, 25, 60 e 90 minuti dalla somministrazione digiunale e a 3, 10, 30, 60, 90 min, 2 e 3 ore dalla somministrazione SC, è stato preparato il plasma e i livelli di teriparatide sono stati determinati in ogni campione. I livelli di teriparatide nella circolazione sistemica sono aumentati drasticamente dopo la somministrazione digiunale di teriparatide in formulazione. I livelli di teriparatide hanno raggiunto un picco entro 3 minuti dalla somministrazione. La rBA media ottenuta dopo la somministrazione digiunale di teriparatide in formulazione è stata calcolata come descritto negli esempi di cui sopra ed era del 14,0%. In un esperimento di controllo, la somministrazione digiunale di teriparatide in soluzione salina ha dimostrato l'assenza di penetrazione nel circolo ematico.

C. Assorbimento di teriparatide dopo la somministrazione digiunale di teriparatide in formulazione ai maiali

La Tabella 5-II presenta dati da uno studio rappresentativo relativo ai profili plasmatici di concentrazione-tempo di teriparatide in seguito alla somministrazione SC di soluzione di teriparatide (a 10,65 µg/kg) e alla somministrazione digiunale di teriparatide in formulazione (a 100 µg/Kg; formulazione I, Tabella 3B) a maiali non anestetizzati.

È stato stabilito un modello di maiale in cui sono state impiantate in modo permanente due diverse cannule in maiali domestici femmina:

1. cannula digiunale per bypassare lo stomaco e permettere la somministrazione diretta della formulazione nel digiuno.

2. cateterizzazione della vena giugulare per determinare i livelli sistemici del cargo somministrato in seguito alla somministrazione digiunale.

Ai maiali è stato consentito un recupero di 7 giorni prima dell'esperimento e sono stati privati del cibo per 18-20 ore prima dell'inizio dell'esperimento.

Sono stati prelevati campioni di sangue dalla vena giugulare a 0, 3, 6, 10, 15, 25, 40, 60, 90 minuti, 2, 2,5 e 3 ore dalla somministrazione digiunale e a 0, 3, 6, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 min, 2, 2,5, 3 e 4 ore dalla somministrazione SC, è stato preparato il plasma e i livelli di teriparatide sono stati determinati in ogni campione. I livelli di teriparatide nella circolazione sistemica sono aumentati drasticamente dopo la somministrazione digiunale di teriparatide in formulazione. I livelli ematici di teriparatide hanno raggiunto un picco entro 10 minuti dalla somministrazione. La rBA media ottenuta dopo la somministrazione digiunale di teriparatide in formulazione è stata calcolata come descritto negli esempi di cui sopra ed era del 15,0%.

Un esperimento analogo sui maiali è stato condotto usando destrano (FD4, formulazione A nella Tabella 3A) ed è stato determinato che la biodisponibilità media di destrano era del 20% nei maiali in confronto all'IV.

D. Assorbimento di hgh dopo la somministrazione rettale di hgh in formulazione ai ratti

La Tabella 5-IV presenta dati da uno studio rappresentativo relativo ai profili plasmatici di concentrazione-tempo di hGH in seguito alla somministrazione SC di soluzione di hGH (a 81 µg/kg) e alla somministrazione rettale di hGH in formulazione (a 800 µg/Kg; formulazione P, Tabella 3C) a ratti anestetizzati.

Ratti maschi Sprague-Dowley sono stati privati del cibo per 18 ore prima dell'inizio dell'esperimento. I ratti sono stati anestetizzati con una soluzione di ketamina: xilazina. La formulazione (100µL/ ratto) è stata somministrata per via rettale usando un venflon 14G. Sono stati prelevati campioni di sangue dalla vena giugulare a 3, 6, 10, 15, 40, 60 e 90 minuti dalla somministrazione rettale e a 15, 30, 45, 60, 90 min, 2, 3, e 4 ore dalla somministrazione SC, è stato preparato il plasma e i livelli di hGH sono stati determinati in ogni campione. I livelli di hGH nella circolazione sistemica sono aumentati drasticamente dopo la somministrazione rettale di hGH in formulazione. I livelli di hGH hanno raggiunto un picco entro 15 minuti. La rBA media ottenuta dopo la somministrazione rettale di hGH in formulazione è stata calcolata come descritto negli esempi di cui sopra ed era del 17,9%. In un esperimento separato hGH è stato somministrato nel digiuno e la aBA era inferiore. In un esperimento di controllo, la somministrazione rettale di hGH in PBS ha dimostrato l'assenza di penetrazione nel circolo ematico.

Quindi i risultati presentati nella Tabella 5 dimostrano che è stata ottenuta un'esposizione sostanziale per tutti i composti cargo testati in tutti i modelli animali testati.

I risultati di cui sopra dimostrano che le formulazioni descritte nel presente documento consentono il rilascio di un'ampia gamma di macromolecole diverse attraverso l'epitelio intestinale in diversi modelli animali.

Esempio 11 (comparativo): Processo di produzione dettagliato di una formulazione di teriparatide

Produzione della frazione idrofila: A 200 mL di acqua i seguenti ingredienti sono stati aggiunti lentamente uno ad uno (con 2-3 minuti di miscelazione tra ciascun ingrediente): 172 mg di teriparatide, 200 mg di MgCl₂, 4,0 g di PVP-12, 17,52 g di ottanoato di sodio e 10,0 g di soluzione acquosa al 2% di MC-400, preparata come segue: 1 g di polvere di MC-400 sono stati aggiunti a 50 mL di acqua a 60±2°C miscelando. Dopo 5 min di miscelazione, il bicchiere è stato trasferito in ghiaccio fino a ottenere una soluzione trasparente.

Dopo l'aggiunta della soluzione di MC-400, la soluzione è stata miscelata per altri 5 minuti e poi liofilizzata per circa 24 ore. Questa procedura ha prodotto circa 22g di frazione idrofila.

Produzione del mezzo idrofobo: 2 g di Span 40, 4 g di lecitina e 3,8 g di GMO sono stati dissolti in 17,3 g di etil isovalerato miscelando. A questa soluzione sono stati aggiunti 39,1 g di GTB e

72,6 g di olio di ricino. Questa procedura ha prodotto circa 136-138 g di mezzo idrofobo.

Produzione del prodotto farmaceutico sfuso: La miscelazione della frazione idrofila e del mezzo idrofobo è stata effettuata a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$.

15,7 g della frazione idrofila sono stati aggiunti lentamente durante la miscelazione a 84,3 g di mezzo idrofobo a 600 ± 50 RPM. Dopo l'aggiunta di tutta la frazione idrofila, la velocità di miscelazione è stata aumentata a 2000 ± 200 RPM per 2-10 min seguiti da 4-8 cicli di 15 min di miscelazione a 600 ± 50 RPM e 2 min di miscelazione a 2000 ± 200 RPM.

Degassamento tramite vuoto è stato poi applicato come segue: 5 min a 600 mBar, 5 min a 500 mBar e 30 - 120 min a 400 mBar. La sospensione risultante è stata versata in una bottiglia scura da 100 ml e conservata a $2-8^{\circ}\text{C}$. Questa è la formulazione di teriparatide designata con "I" descritta nella Tabella 3B.

Tutte le altre formulazioni descritte nel presente documento sono state prodotte con questo metodo, variando gli ingredienti e le quantità in base ai dettagli forniti nelle relative tabelle (vedere per es. l'esempio 29). Uno schema di questo metodo (con insulina come cargo) è mostrato in Figura 1.

Esempio 12 (comparativo): Effetto dell'olio incorporato nella formulazione sull'attività della formulazione

È stato testato l'effetto del tipo di olio incorporato nella formulazione (nel mezzo idrofobo) sull'attività della formulazione. Formulazioni contenenti destrano (PM medio = 4,4 kDa, marcato con FITC) come composto cargo e diversi tipi di oli nel mezzo idrofobo (formulazioni E, F e G nella Tabella 3A) sono state testate nei ratti.

Per testare l'attività di queste formulazioni nel digiuno di ratti non anestetizzati, è stato stabilito un modello di ratto in cui due cannule diverse sono impiantate chirurgicamente in ratti Sprague-Dowley maschi:

1. Cannula digiunale per bypassare lo stomaco e permettere la somministrazione diretta della formulazione nel digiuno.

2. Cannula inserita nella vena giugulare per determinare i livelli sistemici del destrano somministrato in seguito alla somministrazione digiunale. Ai ratti viene consentito un recupero di 4 giorni prima dello studio e sono privati del cibo per 18 ore prima dell'inizio dello studio.

La Tabella 6 presenta i dati di uno studio in ratti non anestetizzati dopo la somministrazione intra-digiunale di formulazioni contenenti oli diversi nel mezzo idrofobo

Tabella 6

Cargo	Formulazione	Olio	N	% aBA \pm DS
Destrano	E	Olio di ricino +GTB	14	19,8 \pm 5,5
	F	Olio minerale + GTB	5	12,2 \pm 5,0

Cargo	Formulazione	Olio	N	% aBA ± DS
	G	Olio di oliva + GTB	5	12,0 ± 9,9

Formulazioni contenenti oli diversi sono state somministrate direttamente nel digiuno di ratti non anestetizzati e i livelli plasmatici di destrano sono stati misurati a 3, 6, 10, 25, 60 e 90 minuti dalla somministrazione della formulazione. I livelli di assorbimento di destrano dal digiuno di ratto dopo la somministrazione di destrano in formulazione sono stati confrontati con i livelli di destrano assorbito dopo la somministrazione endovenosa. I valori di esposizione, AUC (0-90), sono stati determinati per la somministrazione digiunale ed endovenosa e la Biodisponibilità assoluta (aBA) è stata determinata secondo l'equazione seguente:

$$aBA = (\text{jejunal AUC}(0-90)) / (\text{iv AUC}(0-90)) * (\text{iv dose} / \text{jejunal dose}).$$

“Jejunal” = digiunale

“Dose” = dose

“Jejunal dose” = dose digiunale

I dati sono presentati come media ± DS (n≥5 ratti per gruppo).

Una biodisponibilità simile è stata ottenuta quando il destrano è stato incorporato nelle formulazioni contenenti olio di ricino od olio di cocco. Una buona biodisponibilità è stata ottenuta anche nel digiuno di ratti quando è stato utilizzato teriparatide come composto cargo usando le formulazioni I e J; queste formulazioni contengono olio di ricino e GTB, e olio di ricino e olio di cocco, rispettivamente.

I risultati mostravano che le formulazioni contenenti diversi tipi di oli nel loro mezzo idrofobo sono attive, permettendo la penetrazione del cargo (destrano, teriparatide) trasportato dalla formulazione. Quindi i dati hanno dimostrato che tutti gli oli testati consentono la biodisponibilità del cargo trasportato dalla formulazione. L'olio di ricino e l'olio di cocco possono essere superiori agli altri oli testati.

Esempio 13 (comparativo): Preparazione di una formulazione usando la granulazione anziché la liofilizzazione

Produzione della frazione idrofila: In un sacchetto di plastica sono stati aggiunti i seguenti ingredienti: 1,00 g di PVP-30, 6,70 g di ottanoato di sodio e 13,00 g di lattosio monoidrato come legante. Dopo 5 min di miscelazione, tutta la polvere è stata trasferita in un mortaio con pestello.

Una soluzione acquosa di destrano FD4 è stata preparata come segue: 0,42 g di destrano sono stati dissolti in 1,2g di WFI. Tutta la soluzione di destrano è stata poi aggiunta lentamente alla polvere utilizzando un'agitazione a basso sforzo di taglio in un mortaio con pestello; l'agitazione è durata circa 45 minuti. La miscela è stata quindi trasferita in un vassoio di liofilizzazione ed è stata essiccata in forno per circa 20 h a 50°C. Questa procedura ha prodotto circa 20 g di frazione idrofila, che era un granulato fine.

Produzione del mezzo idrofobo: 2 g di Span 40, 4 g di lecitina e 3,8 g di GMO sono stati dissolti in 17,3 g di etil isovalerato miscelando. A questa soluzione sono stati aggiunti 39,1 g di GTB e

72,6 g di olio di ricino. Questa procedura ha prodotto circa 136-138 g di mezzo idrofobo.

Produzione del prodotto farmaceutico sfuso: La miscelazione della frazione idrofila e del mezzo idrofobo è stata effettuata a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$.

19,00 g (29,58% del BDP finale) della frazione idrofila sono stati aggiunti lentamente durante la miscelazione a 45,23 g (70,42% del BDP finale) di mezzo idrofobo a 600 ± 50 RPM. Dopo l'aggiunta di tutta la frazione idrofila, la velocità di miscelazione è stata aumentata a 2000 ± 200 RPM per 2-10 min seguiti da 4-8 cicli di 15 min di miscelazione a 600 ± 50 RPM e 2 min di miscelazione a 2000 ± 200 RPM.

Degassamento tramite vuoto è stato poi applicato come segue: 5 min a 600 mBar, 5 min a 500 mBar e 30 - 120 min a 400 mBar. La sospensione risultante è stata versata in una bottiglia scura da 100 ml e conservata a $2-8^{\circ}\text{C}$.

Studio sui ratti: La sospensione di cui sopra è stata somministrata per via rettale ai ratti come sopra descritto negli esempi e i risultati sono stati i seguenti: 35% BA, 12,9% DS. Un altro lotto di sospensione preparato tramite granulazione come sopra descritto è stato preparato ed è stato somministrato al digiuno dei ratti come sopra descritto negli esempi e i risultati sono stati i seguenti: 21,8% BA, 4,0% DS. Una gamma di formulazioni viene preparata in modo simile usando la granulazione e incorporando una selezione di agenti terapeutici e variando la quantità di ottanoato di sodio.

Esempio 14 (comparativo): Selezione di capsule

Gli esperimenti *in vitro* sono stati effettuati usando separatamente tre tipi di soluzioni: il mezzo idrofobo come descritto nei precedenti esempi, solo etil isovalerato ed etil isovalerato contenente il 5% di ciascuno dei seguenti tensioattivi: lecitina, span 40 e gliceril monooleato. 3 tipi di capsule non sigillate, gelatina, amido e HPMC, sono state riempite ciascuna con ciascuna di queste soluzioni. Le capsule riempite sono state poi mantenute *in vitro* per 29 giorni a $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, umidità relativa al 30-50%. Le capsule di gelatina e HPMC hanno dato i migliori risultati, cioè nessuna deformazione della capsula.

Esperimenti simili sono stati condotti utilizzando le stesse tre soluzioni, e le capsule di gelatina e HPMC. Le capsule sono state riempite con le soluzioni, sigillate (unite) e poi mantenute per 8 giorni a $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, al 30-50% di umidità relativa. Entrambi i tipi di capsule hanno mostrato stabilità alle soluzioni testate, cioè non vi erano fuoriuscite e deformazione delle capsule.

Esempio 15 (comparativo): Effetto della variazione del catione nel sale di acido grasso a catena media

Sono state preparate formulazioni con destrano (FD4) simili alla formulazione A della Tabella 3A ad eccezione del fatto che il 12% di ottanoato di sodio (0,722M) è stato sostituito con una molarità equivalente di ottanoato di litio o ottanoato di potassio o ottanoato di arginina (l'ultimo come modello per un sale di ammonio). Queste formulazioni sono mostrate di seguito nella Tabella 7A.

Tabella 7A

Formulazione, carga =destrano		Ottanoato di K	Ottanoato di Li	Ottanoato di Arg
	Ingrediente	(%p/p)	(%p/p)	(%p/p)
Frazione idrofila	API	0,545	0,546	0,546
	MgCl ₂	0,134	0,136	0,124
	PVP-12	2,673	2,722	2,475
	Ottanoato di potassio	13,617	0,00	0,00
	Ottanoato di litio	0,00	10,826	0,00
	Ottanoato di arginina	0,00	0,00	22,989
	MC 400	0,134	0,136	0,124
	Acqua	0,684	0,627	0,919
Mezzo idrofobo	Span40	1,185	1,206	1,097
	Lecitina	2,369	2,412	2,193
	Etil isovalerato	10,26	10,45	9,50
	Gliceril monooleato	2,227	2,268	2,062

	Gliceril tributirato	23,16	23,58	21,44
	Olio di ricino	43,01	43,79	39,82

Queste formulazioni sono state testate nel modello digiunale di ratto descritto nell'esempio 8. I risultati sono stati ottenuti e la biodisponibilità è stata calcolata. I risultati sono mostrati di seguito nella Tabella 7B.

Tabella 7B

Sale di acido grasso a catena media nella formulazione testata	N	%BA\pm DS
Ottanoato di sodio (Formulazione A)	18	22,2 \pm 10,8
Ottanoato di litio	11	8,4 \pm 3,8
Ottanoato di potassio	10	7,9 \pm 6,4
Ottanoato di arginina	12	17,5 \pm 7,4

La formulazione A utilizzata nell'esperimento precedente era un lotto diverso da quello utilizzato nell'esempio 8 e quindi i risultati di BA qui indicati per la formulazione A differiscono leggermente da quelli elencati nella Tabella 4.

I risultati di cui sopra mostrano che quando il 12% di ottanoato di sodio è stato sostituito nella formulazione con una molarità equivalente di ottanoato di litio od ottanoato di potassio, la formulazione

aveva ancora una biodisponibilità ma a un livello più basso. La formulazione di ottanoato di arginina aveva un'attività simile alla formulazione di ottanoato di sodio al 12%.

Esempio 16 (comparativo): Effetto dell'aggiunta di alcoli a catena media (geraniolo e ottanolo) al mezzo idrofobo.

Le formulazioni contenenti geraniolo (BASF) e ottanolo (Spectrum/MP) sono state preparate come descritto sopra, usando gli ingredienti mostrati sotto nella Tabella 8. Il dodecanoato di sodio è stato ottenuto da Spectrum/Acros).

Formulazione Q- bassa % di sale di acido grasso a catena media: Una formulazione di destrano (FD4) è stata preparata essenzialmente come descritto nell'esempio 11, contenente un totale del 2,9% di sale di acido grasso a catena media - (ottanoato di sodio 1,042% + dodecanoato di sodio 1,869%) - e contenente anche geraniolo e ottanolo nel mezzo idrofobo, tutto come mostrato nella Tabella 8 sotto.

Formulazione R- oltre il 10% di sale di acido grasso a catena media: Una formulazione di destrano è stata preparata essenzialmente come descritto per la Formulazione A ad eccezione del fatto che sono stati aggiunti geraniolo e ottanolo al mezzo idrofobo, tutto come mostrato nella Tabella 8.

Tabella 8

	Formulazione, cargo	Destrano Q	Destrano R
	Ingrediente	(%p/p)	(%p/p)

Frazione idrofila	API	0,545	0,456
	NaOH	0,029	0,000
	MgCl ₂	0,104	0,114
	PVP-12	2,083	2,282
	Ottanoato di sodio	1,042	10,046
	Dodecanoato di sodio	1,869	-
	MC 400	0,104	0,114
	Acqua	0,231	0,521
Mezzo idrofobo	Geraniolo	9,148	8,39
	Ottanolo	8,627	7,92
	Span40	1,041	0,96
	Lecitina	2,081	1,91
	Etil isovalerato	9,012	8,27
	Gliceril monooleato	1,956	1,80
	Gliceril tributirato	21,825	20,03
	Olio di ricino	40,532	37,20

La formulazione Q (bassa % di sale di MCFA) è stata testata nel modello di ratto intradigunale descritto sopra e la biodisponibilità è stata calcolata: aBA= 4,4%, DS= 3,8 (n=12). La formulazione R (oltre il 10% di sale di MCFA) è stata testata nel modello di ratto intradigunale

descritto sopra e la biodisponibilità è stata calcolata: aBA= 22,7%. DS= 1,6 (n=6). La BA di queste formulazioni non differisce significativamente dalle formulazioni simili descritte negli esempi di cui sopra, che non contengono geraniolo.

Esempio 17 (comparativo): Formulazioni per gentamicina e per RNA

Delle formulazioni sono state preparate per gentamicina e per RNA essenzialmente come descritto nell'esempio 11, con gli ingredienti del prodotto farmaceutico sfuso come mostrato sotto nella Tabella 9. La gentamicina è stata ottenuta da Applichem e l'RNA era sale sodico dell'acido polinosinico-policitidilico (Sigma).

Tabella 9A

	Formulazione, API	Gentamicina	RNA
	Ingrediente	(%p/p)	(%p/p)
Frazione idrofila	API	6,000	0,100
	NaOH	0,670	-
	MgCl ₂	0,127	0,137
	PVP-12	2,545	2,741
	Ottanoato di sodio	12,026	12,001
	MC 400	0,127	0,137
	Acqua	0,860	0,605

Mezzo idrofobo	Span40	1,119	1,214
	Lecitina	2,238	2,429
	Etil isovalerato	9,69	10,52
	Gliceril monooleato	2,103	2,283
	Gliceril tributirato	21,88	23,74
	Olio di ricino	40,62	44,09

La formulazione di gentamicina è stata testata nel modello digiunale di ratto descritto sopra e nel modello rettale di ratto descritto sopra (per es. esempi 4 e 5). La gentamicina è stata saggiata usando un immunodosaggio (ELISA). I risultati sono mostrati nella Tabella 9B sotto; la % di BA è calcolata in confronto alla somministrazione IV. È stato mostrato che le formulazioni forniscono biodisponibilità alla gentamicina.

Tabella 9B

Cargo	Formulazione	ROA	N	% BA ± DS
Gentamicina	Come Tabella 9A	digiunale	6	12,9 ± 4,5
	Come Tabella 9A	rettale	5	50,1 ± 5,8

Analogamente, la formulazione di RNA della Tabella 9A viene testata nel modello digiunale di ratto e nel modello rettale di ratto descritti sopra. L'RNA viene saggiato e si prevede che la formulazione fornisca biodisponibilità all'RNA.

Esempio 18 (comparativo): Effetto sull'attività della formulazione dei tensioattivi nel mezzo idrofobo

L'effetto sull'attività della formulazione della rimozione dei tensioattivi dal mezzo idrofobo è stato testato usando formulazioni contenenti destrano (PM medio = 4,4 kDa, marcato con FITC) come cargo (formulazioni A e H nella Tabella 3A).

La Tabella 10 presenta i dati di uno studio in ratti non anestetizzati dopo la somministrazione intra-digiunale di formulazioni con o senza tensioattivi (per es. Span40, lecitina, gliceril monooleato) nel mezzo idrofobo.

Tabella 10

Cargo	Formulazione	Tensioattivi in mezzo idrofobo	N	% aBA \pm DS
Destrano	A	+	17	28,0 \pm 6,8
	H	-	4	11,1 \pm 8,2

Formulazioni con o senza tensioattivi in mezzo idrofobo sono state somministrate direttamente nel digiuno di ratti non anestetizzati e i livelli plasmatici di destrano sono stati misurati a 3, 6, 10, 25, 60 e 90 minuti dalla somministrazione della formulazione. I livelli di assorbimento di destrano dal digiuno di ratto dopo la somministrazione di destrano in formulazione sono stati confrontati con i livelli di destrano assorbito dopo la somministrazione endovenosa.

I valori di esposizione, AUC (0-90), sono stati determinati per la somministrazione digiunale ed endovenosa e la biodisponibilità assoluta (aBA) è stata determinata secondo l'equazione seguente: $aBA = (AUC \text{ digiunale}(0-90)) / (AUC \text{ iv}(0-90)) * (\text{dose iv} / \text{dose digiunale})$. I dati sono presentati come media aBA \pm DS.

Una biodisponibilità inferiore è stata ottenuta quando il destrano è stato incorporato in una formulazione non contenente tensioattivi nel mezzo idrofobo (formulazione H) in confronto a una formulazione contenente tensioattivi nel mezzo idrofobo (formulazione A). I risultati dimostrano che la rimozione dei tensioattivi dal mezzo idrofobo influenza negativamente l'attività della formulazione.

Esempio 19: Effetto sull'attività della formulazione della rimozione degli acidi grassi a catena media dalla frazione idrofila.

L'effetto sull'attività della formulazione della rimozione degli acidi grassi a catena media (MCFA) dalla frazione idrofila è stato testato usando formulazioni contenenti destrano (PM medio = 4,4 kDa, marcato con FITC) come cargo.

La Tabella 11 presenta i dati di uno studio in ratti non anestetizzati dopo la somministrazione intra-digiunale di formulazioni con o senza ottanoato di sodio nella frazione idrofila (formulazioni A e D nella Tabella 3A, rispettivamente).

Tabella 11

Cargo	Formulazione	MCFA in frazione idrofila	N	% aBA \pm DS
Destrano	A	+	17	28,0 \pm 6,8

	D	-	5	0,6 ± 1,0
--	---	---	---	-----------

Le formulazioni descritte sopra sono state somministrate direttamente nel digiuno di ratti non anestetizzati e i livelli plasmatici di destrano sono stati misurati a 3, 6, 10, 25, 60 e 90 minuti dalla somministrazione della formulazione. I livelli di assorbimento di destrano dal digiuno di ratto dopo la somministrazione di destrano in formulazione sono stati confrontati con i livelli di destrano assorbito dopo la somministrazione endovenosa. I valori di esposizione, AUC (0-90), sono stati determinati per la somministrazione digiunale ed endovenosa e la biodisponibilità assoluta (aBA) è stata determinata secondo l'equazione seguente:

$$aBA = (\text{jejunal AUC}(0-90)) / (\text{iv AUC}(0-90)) * (\text{IV dose} / \text{jejunal dose}).$$

"Jejunal" = digiunale

"Dose" = dose

"Jejunal dose" = dose digiunale

I dati sono presentati come media aBA ± DS.

Una penetrazione trascurabile del destrano è stata ottenuta quando il destrano è stato incorporato in una formulazione priva di acidi grassi a catena media nella frazione idrofila (formulazione D, % aBA= 0,6 ± 1,0) in confronto a una formulazione contenente ottanoato di sodio al 12% p/p nella frazione idrofila (formulazione A, % aBA= 28,0 ± 6,8). I risultati dimostrano che una formulazione senza acidi grassi a catena media nella frazione idrofila non è attiva.

Un esperimento analogo è stato eseguito usando l'octreotide come cargo nella formulazione migliorata (vedere sotto). La rBA era dello 0,11% (CV= 158%)

Esempio 20: Effetto sull'attività della formulazione della semplificazione della formulazione

L'effetto sull'attività della formulazione della semplificazione della formulazione è stato testato usando formulazioni contenenti destrano (PM medio = 4,4 kDa, marcato con FITC) od octreotide (Novetide) come cargo. La formulazione basica descritta nei precedenti esempi (per es. formulazioni designate con A, I e P) è stata semplificata non aggiungendo MgCl₂ e MC 400 alla frazione idrofila e non aggiungendo span40, lecitina ed etil iso-valerato al mezzo idrofobo. Vi è un aumento concomitante nelle quantità di gliceril monooleato (tensioattivo) e gliceril tributirato aggiunti al mezzo idrofobo. Tali formulazioni sono mostrate nella Tabella 12A di seguito. Queste formulazioni semplificate non mostrano precipitazione visivamente anche se le particelle sono visibili microscopicamente, cioè sono sospensioni stabili.

Tabella 12A

	Formulazione, API	Destrano semplificata	Octreotide semplificata
	Ingrediente	(%p/p)	(%p/p)
Frazione	API	0,545	0,058

idrofila	NaOH	0,001	0,000
	MgCl ₂	0,000	0,000
	PVP-12	2,735	2,750
	Ottanoato di sodio	12,000	12,019
	MC 400	0,000	0,000
	Acqua	0,611	0,593
Mezzo idrofobo	Span40	0,00	0,000
	Lecitina	0,00	0,000
	Etil isovalerato	0,00	0,000
	Gliceril monooleato	5,91	5,947
	Gliceril tributirato	34,19	34,385
	Olio di ricino	44,00	44,248

Il processo di produzione per queste formulazioni sopra esemplificate è essenzialmente come descritto nella figura 1 e nell'esempio 11 per le formulazioni basiche. La formulazione basica di octreotide è mostrata nella Tabella 12B di seguito.

Tabella 12B

	Cargo	Octreotide basica
--	--------------	--------------------------

	Formulazione	M
	Ingrediente	(%p/p)
Frazione idrofila (HFP)	Cargo	0,058
	NaOH	0,000
	MgCl ₂	0,137
	PVP-12	2,742
	Ottanoato di sodio	12,003
	MC 400	0,137
	Acqua	0,603
Frazione idrofoba (LFP)	Span40	1,215
	Lecitina	2,430
	Etil-iso-valerato	10,522
	Gliceril monooleato	2,284
	Gliceril tributirato	23,756
	Olio di ricino	44,113

La Tabella 13 presenta i dati di uno studio in ratti non anestetizzati dopo la somministrazione intra-digiunale di due diverse formulazioni di destrano - la formulazione A della Tabella 3A e la formulazione semplificata mostrata nella Tabella 12A.

Tabella 13

Cargo	Formulazione	N	AUC (0-60 min)/dose/kg in p. \pm DS
Destrano	A(basica)	28	67062 \pm 27368
	Semplificata	12	63897 \pm 24210

I risultati di cui sopra mostrano che valori di AUC simili sono stati ottenuti quando il destrano è stato incorporato in una formulazione contenente la formulazione basica (formulazione A) in confronto a una formulazione semplificata.

La Tabella 14 presenta i dati di uno studio in ratti non anestetizzati dopo la somministrazione intra-digiunale di due diverse formulazioni di octreotide - la formulazione basica mostrata nella Tabella 12B e la formulazione semplificata mostrata nella Tabella 12A. Sono stati ottenuti i livelli di assorbimento di octreotide dal digiuno di ratto dopo la somministrazione di octreotide in formulazione basica e formulazione semplificata. I valori di esposizione, AUC (0-25), sono stati determinati.

Tabella 14

Cargo	Formulazione	N	AUC (0-25 min)/dose/kg in p. \pm DS
Octreotide	Basica	13	2,8 \pm 1,4
	Semplificata	13	2,3 \pm 0,8

I risultati di cui sopra nella Tabella 14 mostrano che i valori di AUC erano leggermente inferiori quando l'octreotide è stato incorporato in una formulazione semplificata in confronto alla formulazione completa.

Esempio 21 (comparativo): Effetto sull'attività della formulazione della sostituzione di olio di ricino con acido ottanoico.

L'effetto sull'attività della formulazione della sostituzione dell'olio di ricino (e del gliceril tributirato e dell'etil iso-valerato) con acido ottanoico (Aldrich) è stato testato utilizzando una formulazione contenente destrano come cargo. Ciò è stato fatto per mantenere il motivo C8 nella formulazione, vale a dire che potrebbe essere vantaggioso avere acido C8 nel mezzo idrofobico oltre al sale C8 nella frazione idrofila.

L'effetto dell'aggiunta di acido ricinoleico (Spectrum) è stato altresì testato preparando una formulazione di destrano contenente acido ottanoico/acido ricinoleico. L'acido ricinoleico è stato scelto poiché il principale componente trigliceride in olio di ricino è formato da acido ricinoleico. Tre formulazioni di destrano sono state preparate come mostrato nella Tabella 15A di seguito. La formulazione basica di destrano è stata preparata essenzialmente come descritto negli esempi di cui sopra. La formulazione di destrano ottanoico è stata preparata essenzialmente come descritto negli esempi di cui sopra ma in cui l'olio di ricino, il gliceril tributirato e l'etil iso-valerato sono stati sostituiti con acido ottanoico. È stato trovato che questa formulazione era una soluzione tramite analisi visiva ma una reale analisi della solubilità non è stata effettuata. Sembra che l'acido ottanoico in concentrazione elevata (circa il 78% di questa formulazione) dissolva la frazione idrofila solida, il PVP e l'ottanoato di sodio essendo solubili in acido ottanoico a

concentrazione elevata. La formulazione di destrano acido ricinoleico/ottanoico è stata preparata essenzialmente come descritto negli esempi di cui sopra ma in cui l'olio di ricino, il gliceril tributirato e l'etil iso-valerato sono stati sostituiti con una miscela di acido ottanoico e acido ricinoleico. Questa formulazione era una sospensione come è usuale per la maggior parte delle formulazioni di questa invenzione.

Tabella 15A

	Formulazione, API	Destrano basica	Destrano acido ottanoico	Destrano acido ricinoleico/ottanoico
	Ingrediente	(%p/p)	(%p/p)	(%p/p)
Frazione idrofila	API	0,545	0,545	0,545
	NaOH	0,001	0,001	0,001
	MgCl ₂	0,136	0,136	0,136
	PVP-12	2,726	2,726	2,726
	Ottanoato di sodio	12,001	12,002	12,002
	MC 400	0,136	0,136	0,136
	Acqua	0,622	0,622	0,622
Mezzo idrofobo	Span40	1,208	1,207	1,207
	Lecitina	2,416	2,414	2,414

Etil isovalerato	10,46	0,00	0,00
Gliceril monooleato	2,271	2,272	2,272
Gliceril tributirato	23,62	0,00	0,00
Olio di ricino	43,86	0,00	0,00
Acido ottanoico	0,000	77,94	23,38
Acido ricinoleico	0,000	0,00	46,76
Etil ottanoato	0,000	0,00	7,80

Le formulazioni descritte sopra nella Tabella 15A sono state somministrate direttamente nel digiuno di ratti non anestetizzati, e i livelli plasmatici di destrano sono stati misurati dopo la somministrazione della formulazione. I valori di esposizione, AUC, sono stati determinati per le diverse formulazioni. Questi risultati sono mostrati di seguito nella Tabella 15B.

Tabella 15B

Cargo	Formulazione	N	AUC (0-60)/dose/kg in p. ± DS
Destrano	Basica	12	72385 ± 37827
	Acido ottanoico	11	180824 ± 32778

	Acido ricinoleico/ ottanoico	11	113204 ± 33057
--	---------------------------------	----	----------------

I risultati mostrati sopra nella Tabella 15B dimostrano che l'assorbimento di destrano è stato molto migliorato (più di due volte) nella formulazione contenente acido ottanoico. Inoltre, la forma del grafico è stata modificata mostrando un rilascio più lento ma più lungo. Questo può essere vantaggioso in quanto ciò consente all'API di agire più a lungo nell'organismo. I risultati di destrano ricinoleico/ottanoico mostravano minore attività della formulazione di acido ottanoico, ma erano comunque migliorati rispetto alla formulazione basica.

Poiché le formulazioni di acido ottanoico e acido ricinoleico/acido ottanoico mostravano un'attività elevata, formulazioni simili sono state preparate con exenatide come cargo. Tre formulazioni di exenatide sono state prodotte come mostrato nella Tabella 16A di seguito. La formulazione basica di exenatide è stata preparata essenzialmente come descritto negli esempi di cui sopra. La formulazione di exenatide ottanoico è stata preparata essenzialmente come descritto negli esempi di cui sopra ma in cui l'olio di ricino, il gliceril tributirato e l'etil iso-valerato sono stati sostituiti con acido ottanoico. Si è trovato che questa formulazione contenente circa il 78% di acido ottanoico era una soluzione tramite analisi visiva, così come la formulazione di destrano analoga di cui sopra. La formulazione di exenatide acido ricinoleico/ottanoico è stata preparata essenzialmente come descritto negli esempi di cui sopra ma in cui l'olio di ricino, il

gliceril tributirato e l'etil iso-valerato sono stati sostituiti con una miscela di acido ottanoico e acido ricinoleico.

Tabella 16A

	Formulazione , API	Exenatide basica	Exenatide acido ottanoico	Exenatide acido ricinoleico/ottanoic o
	Ingrediente	(%p/p)	(%p/p)	(%p/p)
Frazion e idrofila	API	0,055	0,055	0,055
	NaOH	0,000	0,000	0,000
	MgCl ₂	0,137	0,137	0,137
	PVP-12	2,742	2,742	2,742
	Ottanoato di sodio	12,003	12,003	12,003
	MC 400	0,137	0,137	0,137
	Acqua	0,603	0,603	0,603
Mezzo idrofobo	Span40	1,213	1,214	1,214
	Lecitina	2,434	2,429	2,429
	Etil isovalerato	10,522	0,000	0,000
	Gliceril monooleato	2,283	2,285	2,285

	Gliceril tributirato	23,759	0,000	0,000
	Olio di ricino	44,112	0,000	0,000
	Acido ottanoico	0,000	78,395	47,035
	Acido ricinoleico	0,000	0,000	23,518
	Etil ottanoato	0,000	0,000	7,842

Le formulazioni descritte sopra nella Tabella 16A sono state somministrate direttamente nel digiuno di ratti non anestetizzati, e i livelli plasmatici di exenatide sono stati misurati dopo la somministrazione della formulazione. I valori di esposizione, AUC, sono stati determinati per le diverse formulazioni. Questi risultati sono mostrati di seguito nella Tabella 16B.

Tabella 16B

Cargo	Formulazione	N	AUC (0-90) ± DS	% BA ± DS
Exenatide	Basica	10	1961 ± 1791	8,8 ± 8,2
	Acido ottanoico	11	612 ± 350 [AUC (0-180) ± DS]	3,1 ± 1,8
	Acido ricinoleico/ ottanoico	9	476 ± 321	2,2 ± 1,5

I risultati mostrati sopra nella Tabella 16B dimostrano che la formulazione di exenatide contenente acido ottano mostrava biodisponibilità, ma l'assorbimento di exenatide è diminuito in confronto alla formulazione basica. La forma del grafico è stata modificata mostrando un rilascio più lento ma più lungo, come nel caso della formulazione di destrano acido ottanoico di cui sopra; questo profilo di PK prolungato può essere vantaggioso. Si noti che nel caso della formulazione di acido ottanoico, AUC 0-180 min è stata usata per i calcoli di BA per via del profilo PK prolungato. La formulazione di exenatide acido ricinoleico/ottanoico aveva una biodisponibilità ancora inferiore alla formulazione di acido ottanoico.

Esempio 22: Dose-risposta per l'acido ottanoico.

A. Formulazioni di octreotide: L'effetto sull'attività della formulazione della variazione della quantità di acido ottanoico è stato testato usando formulazioni contenenti octreotide come cargo. Quattro formulazioni di octreotide sono state preparate usando lo 0%, il 5%, 10% o 15% di acido ottanoico come mostrato nella Tabella 17 di seguito. Le formulazioni sono formulazioni basiche di octreotide preparate essenzialmente come descritto sopra in cui la quantità di acido ottanoico varia come descritto e la quantità di altri ingredienti nel mezzo idrofobo. (etil isovalerato e gliceril tributirato) è stata ridotta contemporaneamente. (In queste formulazioni la frazione idrofila è stata semplificata omettendo $MgCl_2$ e MC400).

Tabella 17

	Formulazione, API	Octreotid e 0% Ottanoico	Octreotid e 5% Ottanoico	Octreotid e 10% Ottanoico	Octreotid e 15% Ottanoico
		(%p/p)	(%p/p)	(%p/p)	(%p/p)
Frazione idrofila	API	0,058	0,057	0,057	0,057
	PVP-12	2,750	2,750	2,750	2,750
	Ottanoato di sodio	12,019	12,034	12,034	12,034
	Acqua	0,593	0,594	0,594	0,594
Mezzo idrofobo	Span40	1,217	1,219	1,219	1,219
	Lecitina	2,441	2,437	2,437	2,437
	Etil isovalerato	10,554	0	0	0
	Acido ottanoico	0	5,053	10,553	15,021
	Gliceril monooleato	2,290	2,291	2,291	2,291
	Gliceril tributirato	23,832	29,325	23,825	19,357
	Olio di ricino	44,246	44,241	44,241	44,241

B. Formulazioni di exenatide: L'effetto sull'attività della formulazione della variazione della quantità di acido ottanoico è stato testato usando formulazioni contenenti exenatide come cargo. Cinque formulazioni di exenatide sono state preparate usando lo 0%, il 10%, 15%, 20% o 35% di acido ottanoico come mostrato nella Tabella 18 di seguito. Le formulazioni sono formulazioni basiche di exenatide preparate essenzialmente come descritto sopra in cui la quantità di acido ottanoico varia come descritto e la quantità di altri ingredienti nel mezzo idrofobo (etil isovalerato e gliceril tributirato) è stata ridotta contemporaneamente.

Tabella 18

	Formulazione, API	Exenatide 0% Ottanoico	Exenatide 10% Ottanoico	Exenatide 15% Ottanoico	Exenatide 20% Ottanoico	Exenatide 35% Ottanoico
	Ingrediente	(%p/p)	(%p/p)	(%p/p)	(%p/p)	(%p/p)
Frazione idrofila	API	0,055	0,055	0,055	0,055	0,055
	MgCl ₂	0,137	0,137	0,137	0,137	0,137
	PVP-12	2,742	2,742	2,742	2,742	2,742
	Ottanoato di sodio	12,003	12,003	12,003	12,003	12,003
	MC 400	0,137	0,137	0,137	0,137	0,137

	Acqua	0,603	0,603	0,603	0,603	0,603
Mezzo idrofob o	Span40	1,213	1,213	1,213	1,213	1,213
	Lecitina	2,434	2,434	2,434	2,434	2,434
	Etil isovalerato	10,522	0	0	0	0
	Acido ottanoico	0	10,522	15,081	20,085	34,282
	Gliceril monoleato	2,283	2,283	2,283	2,283	2,283
	Gliceril tributirrato	23,759	23,759	19,201	14,197	0,000
	Olio di ricino	44,112	44,112	44,112	44,112	44,112

Le formulazioni descritte sopra nelle Tabelle 17 e 18 di cui sopra sono state somministrate direttamente nel digiuno di ratti non anestetizzati, e i livelli plasmatici di octreotide o exenatide sono stati misurati dopo la somministrazione della formulazione. I valori di esposizione, AUC, sono stati determinati per le diverse formulazioni. Questi risultati sono mostrati di seguito nella Tabella 19.

Tabella 19

Cargo	Formulazione	N	AUC (0-60)/dose/kg in p. ± DS
Octreotide	Basica	14	2,8 ± 1,0

	Basica 5% acido ottanoico	12	2,7 ± 1,2
	Basica) 10% acido ottanoico	12	3,2 ± 1,2
	Basica 15 % acido ottanoico	12	4,5 ± 2,3
Exenatide	Basica	10	3,9 ± 3,8
	Basica, 10% acido ottanoico	15	4,6 ± 2,8
	Basica, 15% acido ottanoico	6	3,0 ± 1,8
	Basica, 20 % acido ottanoico	5	2,2 ± 0,5
	Basica, 35 % acido ottanoico	6	1,9 ± 0,7

I risultati mostrati sopra nella Tabella 19 dimostrano che la formulazione di octreotide mostra un'attività aumentata in confronto alla formulazione basica con l'aumento della quantità di acido ottanoico al 15% (la quantità massima testata). Inoltre, i risultati mostrati sopra nella Tabella 19 dimostrano che la formulazione di exenatide mostra un'attività aumentata in confronto alla formulazione basica con l'aumento della quantità di acido ottanoico al 15% e la diminuzione dell'attività a livelli superiori di acido ottanoico.

Esempio 23: Effetto di diversi sali di acido grasso a catena media.

A. Sebacato di sodio (sale disodico dell'acido decandioico):

L'effetto sull'attività della formulazione della sostituzione di ottanoato di sodio con sebacato di sodio (sale disodico C10) in una formulazione di destrano è stato testato. Il sebacato di sodio è stato preparato in situ da acido sebacico (Aldrich) e idrossido di sodio. La formulazione prodotta è descritta nella Tabella 20 di seguito. La formulazione è stata preparata essenzialmente come descritto sopra ma il 12% di ottanoato di sodio è stato sostituito con sebacato di sodio, alla stessa concentrazione molare dell'ottanoato di sodio ovvero è stata utilizzata una quantità equimolare di sebacato di sodio (ossia, 0,72M).

Tabella 20

	Formulazione, API	Destrano sebacato di Na
	Ingrediente	(%p/p)
Frazione idrofila	API	0,545
	NaOH	0,000
	MgCl ₂	0,129
	PVP-12	2,589
	Sebacato di sodio	16,190
	MC 400	0,129
	Acqua	0,783
Mezzo idrofobo	Span40	1,147

	Lecitina	2,295
	Etil isovalerato	9,94
	Gliceril monooleato	2,157
	Gliceril tributirato	22,44
	Olio di ricino	41,66

La formulazione descritta sopra nella Tabella 20 è stata somministrata direttamente nel digiuno di ratti non anestetizzati, e i livelli plasmatici di destrano sono stati misurati dopo la somministrazione della formulazione. Il valore di esposizione, AUC, è stato determinato per la formulazione e questo viene confrontato con una formulazione analoga preparata con ottanoato di sodio. Questi risultati sono mostrati di seguito nella Tabella 21.

Tabella 21

Cargo	Formulazione	N	AUC (0-60)/dose/kg in p. ± DS
Destrano	Con ottanoato di Na	12	72385 ± 37827
	Con sebacato di Na	9	18691 ± 11887

I risultati mostrati nella Tabella 21 dimostrano che la formulazione di destrano contenente sebacato di sodio mostrava attività, ma l'assorbimento del destrano è diminuito in confronto alla formulazione contenente una quantità equimolare di ottanoato di sodio.

B. Suberato monosodico e o suberato disodico

Sono state preparate formulazioni contenenti octreotide in cui il 12% di ottanoato di sodio è stato sostituito da una quantità equimolare (0,72M) di suberato monosodico o di suberato disodico, che sono sali C8. Questi sali di sodio sono stati preparati in situ da acido suberico (Tokyo Chemical Industry Co.) e idrossido di sodio.

Tabella 22A

	Formulazione, API	Octreotide suberato monosodico (0,72M)	Octreotide suberato disodico (0,72M)
	Ingrediente	(%p/p)	(%p/p)
Frazione idrofila	API	0,058	0,059
	PVP-12	2,650	2,620
	Suberato monosodico	15,087	0
	Suberato disodico	0	15,996
	Acqua	0,712	0,747
Mezzo idrofobo	Span40	1,173	1,159
	Lecitina	2,352	2,325
	Etil isovalerato	10,169	10,055

	Gliceril monooleato	2,206	2,181
	Gliceril tributirato	22,962	22,704
	Olio di ricino	42,632	42,152

Le formulazioni descritte sopra nella Tabella 22 sono somministrate direttamente nel digiuno di ratti non anestetizzati, e i livelli plasmatici di octreotide sono misurati dopo la somministrazione della formulazione. I valori di esposizione, AUC, sono determinati per le formulazioni e questo viene confrontato con una formulazione analoga preparata con ottanoato di sodio.

C. Sale di acido geranico

Due formulazioni contenenti octreotide sono state preparate essenzialmente come descritto sopra in cui il 12% di ottanoato di sodio è stato sostituito con il 18% di sale sodico di acido geranico (0,95M) e 14,6% (0,77M) di sale sodico di acido geranico, che è acido 3,7-dimetil-2,6-ottadienoico (ottenuto da SAFC.). Le formulazioni prodotte sono descritte nella Tabella 22B di seguito.

Tabella 22B

	Formulazione, API	Octreotide NaGeranato A	Octreotide NaGeranato B
	Ingrediente	(%p/p)	(%p/p)
Frazione	API	0,057	0,057

idrofila	NaOH	0	0,543
	PVP 12	10,006	9,833
	Geranato di sodio	18,053	14,625
	Acqua	1,183	1,084
Mezzo idrofobo	Tween 80	2,001	1,970
	Gliceril monocaprilato	4,001	3,923
	Gliceril tricaprilato	63,235	65,927
	Olio di ricino	0,000	0

Le formulazioni descritte sopra nella Tabella 22B sono state somministrate direttamente nel digiuno di ratti non anestetizzati, e i livelli plasmatici di octreotide sono stati misurati dopo la somministrazione della formulazione. I valori di esposizione, AUC, sono stati determinati per le formulazioni e questo è stato confrontato con una formulazione analoga preparata con ottanoato di sodio. I risultati sono mostrati sotto nella Tabella 22C e dimostrano che la formulazione con il 18% di geranato di sodio aveva attività simile alla formulazione di ottanoato di sodio al 12%, e la formulazione con il 14,6% di geranato di sodio aveva un'attività aumentata.

Tabella 22C

Cargo	Formulazione	N	AUC (0-60)/dose/kg in p. ± DS
Octreotide	Geranato di sodio A	9	4,48 ± 1,79

Cargo	Formulazione	N	AUC (0-60)/dose/kg in p. ± DS
	Geranato di sodio B	9	6,33 ± 2,1
	Migliorata	9	4,38 ± 1,66

Esempio 24: Effetto di PVP (polivinilpirrolidone) sull'attività della formulazione

L'effetto sull'attività della formulazione della sostituzione di PVP-12 con mannitolo (Sigma) è stato testato usando formulazioni contenenti exenatide come cargo. Era inteso nell'arte che il PVP-12 è uno stabilizzante e poteva essere sostituito nella formulazione con un altro stabilizzante quale mannitolo. È stata preparata la formulazione mostrata nella Tabella 23 di seguito. Questa formulazione è una formulazione basica di exenatide preparata essenzialmente come descritto sopra, ma in cui il PVP-12 è sostituito con mannitolo.

Tabella 23

	Formulazione, API	Exenatide mannitolo
	Ingrediente	(%p/p)
Frazione idrofila	API	0,055
	MgCl ₂	0,137
	Mannitolo	2,742
	Ottanoato di sodio	12,003
	MC 400	0,137

	Acqua	0,603
Mezzo idrofobo	Span40	1,213
	Lecitina	2,434
	Etil isovalerato	10,522
	Gliceril monooleato	2,283
	Gliceril tributirato	23,759
	Olio di ricino	44,112

La formulazione descritta sopra nella Tabella 23 è stata somministrata direttamente nel digiuno di ratti non anestetizzati, e i livelli plasmatici di exenatide sono stati misurati dopo la somministrazione della formulazione. I valori di esposizione, AUC, sono stati determinati per la formulazione in confronto alla formulazione basica. Questi risultati sono mostrati di seguito nella Tabella 24.

Tabella 24

Cargo	Formulazione	N	AUC (0-60)/dose/kg in p. ± DS
Exenatide	Basica	10	3,9 ± 3,8
	Mannitolo invece di PVP-12	6	1,6 ± 1,7

I risultati mostrati sopra nella Tabella 24 dimostrano il risultato sorprendente e inaspettato che la formulazione di exenatide senza PVP-12 avesse un'attività significativamente ridotta in confronto alla

formulazione basica. Si è quindi deciso di indagare ulteriormente l'effetto del PVP sulla biodisponibilità.

L'effetto sull'attività della formulazione della variazione del peso molecolare del PVP stato testato usando formulazioni contenenti exenatide come cargo. Tre formulazioni di exenatide sono state preparate utilizzando PVP-12, PVP-17 o PVP-25 (tutti ottenuti da BASF). PVP-12, PVP-17 e PVP-25 sono tutti polimeri di polivinilpirrolidone; i pesi molecolari medi sono circa 2500-3000, 10000 e 30000 rispettivamente. Le formulazioni sono formulazioni basiche di exenatide preparate essenzialmente come descritto sopra in cui il PVP varia come descritto e in cui la frazione idrofila è stata semplificata omettendo MgCl₂ e MC400.

Tabella 25

	Formulazione, API	Exenatide PVP-12/17/25
	Ingrediente	(%p/p)
Frazione idrofila	API	0,022
	PVP 12/ 17/ 25	2,752
	Ottanoato di sodio	12,005
	Acqua	0,602
Mezzo idrofobo	Span40	1,218
	Lecitina	2,442
	Etil isovalerato	10,561

	Gliceril monooleato	2,291
	Gliceril tributirato	23,846
	Olio di ricino	44,272

Le tre formulazioni descritte sopra nella Tabella 25 sono state somministrate direttamente nel digiuno di ratti non anestetizzati, e i livelli plasmatici di exenatide sono stati misurati dopo la somministrazione della formulazione. I valori di esposizione, AUC, sono stati determinati per le formulazioni. I risultati sono mostrati di seguito nella Tabella 26.

Tabella 26

Cargo	Formulazione	N	AUC (0-60)/dose/kg in p. \pm DS
(a) Exenatide	PVP-12	11	8,0 \pm 7,7
	PVP-17	6	3,4 \pm 2,9
	PVP-25	5	2,6 \pm 2,3

I risultati mostrati sopra nella Tabella 26 dimostrano che le formulazioni di exenatide contenenti PVP-12 mostravano un'attività molto superiore a quella delle formulazioni di exenatide contenenti PVP-17 e PVP-25. Quindi l'effetto di PVP-12 è stato ulteriormente studiato e si è deciso di eseguire uno studio di dose-risposta con PVP-12. L'effetto dell'aumento della quantità di PVP-12 nella formulazione sull'attività della formulazione è stato testato usando formulazioni contenenti octreotide come composto cargo e diverse dosi di PVP-12

come mostrato nella Tabella 27 di seguito. Le dosi di PVP-12 testate erano il 2,75% (la dose standard utilizzata nelle formulazioni di cui sopra) e il 5,0%, il 7,5% e il 10,0% di PVP-12; la frazione idrofila è stata semplificata omettendo MgCl₂ e MC400. La formulazione contenente il 10% di PVP era semi-solida ovvero era apparentemente una sospensione semi-solida.

Tabella 27

	Formulazione, API	Octreotid e PVP 2,75%	Octreotid e PVP 5,0%	Octreotid e PVP 7,5%	Octreotid e PVP 10,0%
	Ingrediente	(%p/p)	(%p/p)	(%p/p)	(%p/p)
Frazione idrofila	API	0,058	0,057	0,057	0,057
	PVP-12	2,750	5,013	7,514	10,046
	Ottanoato di sodio	12,019	12,031	12,037	12,018
	Acqua	0,593	0,684	0,784	0,885
Mezzo idrofobo	Span40	1,217	1,183	1,145	1,108
	Lecitina	2,441	2,373	2,297	2,222
	Etil isovalerato	10,554	10,259	9,934	9,608
Mezzo idrofobo	Gliceril monooleato	2,290	2,226	2,155	2,084

	Gliceril tributirato	23,832	23,166	22,431	21,694
	Olio di ricino	44,246	43,009	41,645	40,278

Le formulazioni descritte sopra nella Tabella 27 sono state somministrate direttamente nel digiuno di ratti non anestetizzati, e i livelli plasmatici di octreotide sono stati misurati dopo la somministrazione della formulazione. I valori di esposizione, AUC, sono stati determinati per le quattro diverse formulazioni. Questi risultati sono mostrati di seguito nella Tabella 28A.

Tabella 28A

Cargo	Formulazione	N	AUC (0-60)/dose/kg in p. \pm DS
Octreotide	2,75% PVP-12	14	2,8 \pm 1,0
	5,0% PVP-12	12	3,7 \pm 1,6
	7,5% PVP-12	12	4,2 \pm 1,5
	10,0% PVP-12	11	4,7 \pm 1,4

I risultati mostrati sopra nella Tabella 28A dimostrano che l'assorbimento di octreotide aumentava drasticamente con l'aumento della quantità di PVP nella formulazione. La formulazione contenente il 10% di PVP-12 aveva un assorbimento di octreotide circa 1,7 volte maggiore di quello della formulazione contenente il 2,75% di PVP-12. Una formulazione migliorata di octreotide in cui vi era il 10% di PVP-12

ma senza ottanoato di sodio non mostrava praticamente alcuna attività. La rBA era dello 0,11% (CV= 158%) n=5.

Sembra che il sale di acido grasso a catena media funga da miglioratore di permeabilità (agevolando o aumentando la permeabilità e/o l'assorbimento dell'agente terapeutico) e che il PVP serva ad aumentare l'effetto del miglioratore di permeabilità in modo sinergico poiché il PVP da solo non ha praticamente alcun effetto. Si veda anche l'esempio 31.

Un ulteriore esperimento è stato condotto per indagare se il 10% di PVP-12 potesse essere sostituito con destrano e mantenere ancora l'attività della formulazione. Il destrano era fabbricato da Fluka; il peso molecolare medio è -6000. Le formulazioni sono state preparate sostanzialmente come descritto sopra in cui il PVP e il destrano variano come descritto e in cui la frazione idrofila è stata semplificata omettendo MgCl₂ e MC400 e in cui l'ottanoato di sodio è stato aumentato al 15%; cfr. esempio 26.

Tabella 28B

	Formulazione, API	Octreotide 10%PVP	Octreotide 10%destrano senza PVP	Octreotide 5%destrano senza PVP
	Ingrediente	(%p/p)	(%p/p)	(%p/p)
Frazione	API	0,058	0,058	0,058
idrofila	PVP-12	10,011	0,0	0,0

	Destrano	0,0	10,011	5,011
	Ottanoato di sodio	15,008	15,008	15,015
	Acqua	1,003	1,003	0,803
Mezzo idrofobo	Tween 80	2,027	2,027	2,169
	Gliceril monocaprilato	4,036	4,036	4,319
	Gliceril tricaprillato	40,714	40,714	43,574
	Olio di ricino	27,143	27,143	29,049

Le tre formulazioni descritte sopra nella Tabella 28B sono state somministrate direttamente nel digiuno di ratti non anestetizzati, e i livelli plasmatici di octreotide sono stati misurati dopo la somministrazione della formulazione. I valori di esposizione, AUC, sono stati determinati per le formulazioni. I risultati sono mostrati di seguito nella Tabella 28C.

Tabella 28C

Cargo	Formulazione	N	AUC (0-25)/dose/kg in p. \pm DS
Octreotide	10%PVP	9	4,4 \pm 1,7
	10% Destrano; senza PVP	5	3,3 \pm 1,6

Cargo	Formulazione	N	AUC (0-25)/dose/kg in p. ± DS
	5% Destrano; senza PVP	9	3,2 ± 1,5

I risultati mostrati sopra nella Tabella 28C dimostrano che l'assorbimento di octreotide diminuiva quando il PVP nella formulazione è stato sostituito con destrano ma l'attività era ancora significativa. La formulazione contenente il 10% di destrano aveva un assorbimento di octreotide di circa il 75% della formulazione contenente il 10% di PVP, e la formulazione contenente il 5% di destrano aveva un assorbimento di octreotide di circa il 73% della formulazione contenente il 10% di PVP.

Esempio 25: Uno studio comparativo di sali di acido grasso a catena media C8, C9 e C10 in rapporto ad ottanoato di sodio, nonanoato di sodio e decanoato di sodio

L'effetto sull'attività della formulazione della sostituzione di ottanoato di sodio con altri sali di sodio di acido grasso a catena media è stato testato usando formulazioni contenenti octreotide come cargo. Tre formulazioni di octreotide sono state preparate, come mostrato nella Tabella 29 di seguito. Queste sono tutte formulazioni basiche preparate essenzialmente come descritto sopra in cui la frazione idrofila è stata semplificata omettendo MgCl₂ e MC400 e in cui il sale di acido grasso a catena media è una quantità equimolare di ottanoato di sodio, nonanoato di sodio o decanoato di sodio.

Tabella 29

	Formulazione, API	Octreotide NaC8 12% (0,72M)	Octreotide NaC9 13% (0,72M)	Octreotide NaC10 14% (0,72M)
	Ingrediente	(%p/p)	(%p/p)	(%p/p)
Frazione idrofila	API	0,058	0,057	0,058
	PVP-12	2,750	2,718	2,685
	Ottanoato di sodio	12,019	0	0
	Nonanoato di sodio	0	13,023	0
	Decanoato di sodio	0	0	14,019
	Acqua	0,593	0,632	0,670
Mezzo idrofobo	Span40	1,217	1,203	1,188
	Lecitina	2,441	2,412	2,383
	Etil isovalerato	10,554	10,428	10,303
	Gliceril monooleato	2,290	2,262	2,235
	Gliceril tributirato	23,832	23,547	23,265
	Olio di ricino	44,246	43,718	43,194

--	--	--	--	--

Le formulazioni descritte sopra nella Tabella 29 sono state somministrate direttamente nel digiuno di ratti non anestetizzati, e i livelli plasmatici di octreotide sono stati misurati dopo la somministrazione della formulazione. I valori di esposizione, AUC, sono stati determinati per le formulazioni. I risultati sono mostrati di seguito nella Tabella 30.

Tabella 30

Cargo	Formulazione	N	AUC (0-25)/dose/kg in p. ± DS
Octreotide	ottanoato di sodio NaC8	9	2,1 ± 0,8
	nonanoato di sodio NaC9	10	2,5 ± 0,4
	decanoato di sodio NaC10	10	1,7 ± 0,4

I risultati mostrati sopra nella Tabella 30 dimostrano che quando l'ottanoato di sodio nella formulazione viene sostituito con nonanoato di sodio o con decanoato di sodio vi è un'attività simile. In base all'analisi statistica, non vi è differenza di attività tra tutte e tre le formulazioni.

Esempio 26: Dose-risposta dell'ottanoato di sodio

La dose-risposta dell'ottanoato di sodio al 12%, 15% e 18% è stata testata preparando le formulazioni mostrate nella Tabella 31. Queste sono tutte formulazioni basiche preparate essenzialmente come

descritto sopra in cui la frazione idrofila è stata semplificata omettendo $MgCl_2$ e MC400 e il composto cargo era octreotide. Inoltre, la formulazione è stata corretta per la viscosità ovvero una viscosità uguale o simile è stata mantenuta per tutte e tre le formulazioni; questo è stato ottenuto variando le quantità di olio di ricino e gliceril tributirato.

Tabella 31

	Formulazione, API	Octreotide NaC8 12%	Octreotide NaC8 15%	Octreotide NaC8 1,8%
	Ingrediente	(%p/p)	(%p/p)	(%p/p)
Idrofila	API	0,058	0,058	0,058
Frazione	PVP-12	2,750	2,652	2,554
(semplificata)	Ottanoato di sodio	12,019	15,040	18,016
	Acqua	0,593	0,710	0,825
	Span40	1,217	1,173	1,130
	Lecitina	2,441	2,353	2,267
	Etil isovalerato	10,554	10,175	9,802
Mezzo idrofobo	Gliceril monooleato	2,290	2,207	2,126
	Gliceril tributirato	23,832	32,816	41,090

	Olio di ricino	44,246	32,816	22,132
--	----------------	--------	---------------	---------------

Le formulazioni descritte sopra nella Tabella 31 sono state somministrate direttamente nel digiuno di ratti non anestetizzati, e i livelli plasmatici di octreotide sono stati misurati dopo la somministrazione della formulazione. I valori di esposizione, AUC, sono stati determinati per le formulazioni. I risultati sono mostrati di seguito nella Tabella 32.

Tabella 32

Cargo	Formulazione	N	AUC (0-60)/dose/kg in p. \pm DS
Octreotide	NaC8 12%	14	2,8 \pm 1,0
	NaC8 15%	12	4,1 \pm 1,9
	NaC8 18%	12	3,6 \pm 1,1

I risultati mostrati sopra nella Tabella 32 dimostrano che quando l'ottanoato di sodio nella formulazione viene aumentato dal 12% al 15% vi è un aumento dell'attività ma un aumento ulteriore dell'ottanoato di sodio al 18% non porta a un'attività maggiore di quella ottenuta al 15%. Perciò, circa il 15% di ottanoato di sodio risulta essere la quantità preferita.

Esempio 27: Indagine sull'effetto della variazione del bilancio idrofilo-lipofilo dei tensioattivi nella formulazione

La Tabella 33 di seguito descrive varie formulazioni di octreotide. La prima colonna, formulazione (a), è la formulazione basica preparata essenzialmente come descritto sopra in cui la frazione idrofila

è stata semplificata omettendo MgCl₂ e MC400, e il composto cargo è octreotide. I tensioattivi sono Span 40, lecitina e gliceril monooleato, e secondo il calcolo l'HLB è approssimativamente 5-6. Nelle altre formulazioni (formulazioni b, c e d) l'HLB è stato variato come indicato (a 3,5, 6,7 e 14) sostituendo Span 40 e lecitina con quantità diverse di Tween 80 e variando la quantità di gliceril monooleato.

Tabella 33

	<u>Formulazione</u> <u>API</u> Ingrediente	Octreotide	Octreotide	Octreotide	Octreotide
		HLB 5-6 [a]	HLB 3,5[b]	HLB 6,7[c]	HLB 14[d]
		(%p/p)	(%p/p)	(%p/p)	(%p/p)
Frazione idrofila	API	0,058	0,057	0,057	0,057
	PVP-12	2,750	2,748	2,748	2,748
	Ottanoato di sodio	12,019	12,027	12,027	12,027
	Acqua	0,593	0,594	0,594	0,594
Mezzo idrofobo	Span40	1,217	0	0	0
	Lecitina	2,441	0	0	0
	Etil isovalerato	10,554	10,547	10,546	10,547
	Tween 80	0	0,502	2,003	5,500

Gliceril monooleato	2,290	5,500	4,002	0,502
Gliceril tributirato	23,832	23,811	23,811	23,811
Olio di ricino	44,246	44,215	44,215	44,215

Le formulazioni descritte sopra nella Tabella 33 sono state somministrate direttamente nel digiuno di ratti non anestetizzati, e i livelli plasmatici di octreotide sono stati misurati dopo la somministrazione della formulazione. I valori di esposizione, AUC, sono stati determinati per le formulazioni. I risultati sono mostrati di seguito nella Tabella 34.

Tabella 34

Cargo	Formulazione	N	AUC (0-25)/dose/kg in p. ± DS
Octreotide	HLB 5-6 - [a]	9	2,1 ± 0,8
	HLB 3,5 - [b]	12	3,3 ± 0,9
	HLB 6,7 - [c]	11	3,8 ± 0,9
	HLB 14 - [d]	10	3,7 ± 0,9

I risultati mostrati sopra nella Tabella 34 dimostrano che tutte e tre le nuove formulazioni con la sostituzione di Span 40 e lecitina con Tween 80 [b, c e d] avevano un'attività molto migliore della formulazione basica [a], anche se l'HLB in [b] era minore, in [c] era leggermente maggiore e in [d] era molto maggiore dell'HLB dei

tensioattivi in (a). Inoltre, le attività di tutte le nuove formulazioni [(b, c, e d] erano statisticamente molto simili. Perciò l'HLB da solo dei tensioattivi non risulta influenzare l'attività ma è evidente che le caratteristiche dei tensioattivi svolgono un ruolo importante. In particolare, sostituire Span 40 e lecitina con Tween 80 è vantaggioso per l'attività in queste formulazioni di octreotide.

Esempio 28: Formulazioni di octreotide con diversi rapporti tra gliceril tricaprilato e olio di ricino.

In base all'accumulo dei risultati descritti sopra inclusi i risultati di dose-risposta del PVP-12, i risultati di dose-risposta dell'ottanoato di sodio e i risultati del tensioattivo tra le altre cose, una serie di formulazioni di octreotide sono state preparate usando il 10% di PVP-12 e il 15% di ottanoato di sodio, e variando il rapporto tra gliceril tricaprilato e olio di ricino. Inoltre, il gliceril monooleato e il gliceril tributirato sono stati sostituiti (se utilizzati) con gliceril monocaprilato e gliceril tricaprilato (forniti entrambi da Abitec). Ciò è per mantenere il motivo C8 all'interno della formulazione. Perciò la frazione idrofila contiene un sale di un acido C8 (ottanoato) e il mezzo idrofobo contiene monogliceridi e trigliceridi che incorporano lo stesso acido C8. Gli inventori ritengono che l'uso di composti C-8 sia nella frazione idrofila sia nel mezzo idrofobo possa essere vantaggioso per la biodisponibilità. Le quantità di Tween 80 e gliceril monocaprilato sono state anch'esse variate nelle formulazioni. Le formulazioni sono state preparate come mostrato nella Tabella 35A di seguito. Le formulazioni I, II, V e VI erano

semi-solide (apparentemente sospensioni) e le formulazioni III e IV erano le sospensioni liquide usuali.

Tabella 35A

	Formulazione, API	Octreotide I	Octreotide II	Octreotide III	Octreotide IV	Octreotide V	Octreotide VI
	Ingrediente	(%p/p)	(%p/p)	(%p/p)	(%p/p)	(%p/p)	(%p/p)
Frazione idrofila	API	0,058	0,058	0,058	0,058	0,058	0,058
	PVP-12	10,011	10,011	10,011	10,011	10,011	10,011
	Ottanoato di sodio	15,008	15,008	15,008	15,008	15,008	15,008
	Acqua	1,003	1,003	1,003	1,003	1,003	1,003
Mezzo idrofobo	Tween 80	2,027	2,027	2,027	2,027	6,063	6,062
	Gliceril monocaprilato	4,036	4,036	4,036	4,036	0	0
	Gliceril tricaprillato	40,714	13,571	61,071	67,857	40,714	0
	Olio di ricino	27,143	54,286	6,786	0,000	27,143	67,857

Le formulazioni descritte sopra nella Tabella 35A sono state somministrate direttamente nel digiuno di ratti non anestetizzati, e i livelli plasmatici di octreotide sono stati misurati dopo la somministrazione della formulazione. I valori di esposizione, AUC, sono

stati determinati per le formulazioni. I risultati sono mostrati di seguito nella Tabella 35B.

Tabella 35B

Cargo	Formulazione	N	AUC (0-25)/dose/kg in p. \pm DS
Octreotide	Formulazione I(GTC:olio di ricino 6:4)	9	4,4 \pm 1,7
	Formulazione II(GTC:olio di ricino 2:8)	8	3,0 \pm 1,7
	Formulazione III (GTC:olio di ricino 9:1)	9	3,1 \pm 0,5
	Formulazione IV(GTC:olio di ricino 10:0)	7	4,1 \pm 2,1
	Formulazione V-senza GMC (GTC:olio di ricino 6:4)	6	1,6 \pm 1,0
	Formulazione VI-senza GMC e GTC (GTC:olio di ricino 0:10)	7	1,1 \pm 0,6

I risultati mostrati sopra nella Tabella 35B dimostrano che le formulazioni 1 e IV hanno la massima attività. Poiché l'olio di ricino è assente nella formulazione IV questo dimostra che l'olio di ricino non è essenziale per l'attività. Sembra che un rapporto elevato di GTC:olio di ricino ratio per es. 6:4 sia vantaggioso per l'attività. Inoltre, poiché la

formulazione V (che ha un'attività ridotta) ha lo stesso rapporto di GTC:olio di ricino della formulazione I è evidente che GMC in aggiunta (o altro monogliceride) è desiderabile per l'attività. Inoltre, è stata preparata una formulazione simile alla formulazione I della Tabella 36 ma l'ottanoato di sodio è stato omissso. Questa formulazione non mostrava praticamente alcuna attività, rBA=0,1%.

Il prodotto farmaceutico sfuso della formulazione IV (migliorata, senza olio di ricino) è stato macinato con un setaccio di 150 micron, e poi la granulometria è stata determinata usando la tecnologia di diffrazione laser Malvern. I risultati preliminari indicavano che il 90% (v/v) delle particelle era al di sotto di 130 micron, e il 50% (v/v) delle particelle era al di sotto di 45 micron.

Esperimenti preliminari utilizzando formulazioni simili alla formulazione I, ma con varie quantità aumentate di octreotide, hanno dato tutti una BA analoga, cioè vi era un'esposizione approssimativamente lineare indipendente dal carico dell'API. Un esperimento preliminare usando una formulazione simile alla formulazione IV a un carico ancora superiore di octreotide, 1,5% (p/p), ha fornito anch'esso una BA analoga.

Una formulazione migliorata analoga alla formulazione I di cui sopra è stata preparata usando FD4 come cargo anziché octreotide, ed è stata confrontata con una formulazione basica. Queste formulazioni sono descritte nella Tabella 36A di seguito.

Tabella 36A

	Formulazione, API	FD4 Basica (senza Mg, MC)	FD4 Migliorata
	Ingrediente	(%p/p)	(%p/p)
Frazione idrofila	API	0,545	0,545
	NaOH	0,001	0
	PVP-12	2,734	10,012
	Ottanoato di sodio	12,036	15,009
	Acqua	0,613	1,023
Mezzo idrofobo	Tween 80	0	2,013
	Gliceril monocaprilato	0	4,008
	Gliceril tricaprilato	0	40,434
	Span40	1,21	0
	Lecitina	2,42	0
	Etil-iso-valerato	10,49	0
	Gliceril monooleato	2,28	0
	Gliceril tributirato	23,69	0
Olio di ricino	43,98	26,956	

Le formulazioni descritte sopra nella Tabella 36A sono state somministrate direttamente nel digiuno di ratti non anestetizzati, e i

livelli plasmatici di FD4 sono stati misurati dopo la somministrazione della formulazione. I valori di esposizione, AUC, sono stati determinati per le formulazioni. I risultati sono mostrati di seguito nella Tabella 36B.

Tabella 36B

Cargo	Formulazione	N	AUC (0-90)/dose/kg in p. ± DS
FD 4 (destrano)	Basica	6	67448 ± 16977
	Migliorata	6	95374 ± 47490

I risultati mostrati sopra nella Tabella 36B dimostrano che la formulazione migliorata ha un'attività molto maggiore della formulazione basica.

Esempio 29: Processo di produzione dettagliato per una formulazione di octreotide selezionata (migliorata)

La formulazione di octreotide nell'esempio 28 (Tabella 6, prima colonna) è stata preparata essenzialmente come descritto negli esempi di cui sopra. Di seguito viene descritto il processo di produzione dettagliato per questa formulazione.

Produzione della frazione idrofila:

A 150 mL di acqua i seguenti ingredienti sono stati aggiunti lentamente e miscelati: 24,05 g di ottanoato di sodio, 16,04 g di PVP-12 e 92,4 g di soluzione acquosa di octreotide 10 mg/mL. La soluzione risultante è stata liofilizzata.

Produzione del mezzo idrofobo:

3,25 g di Tween 80, 6,47 g di gliceril monocaprilato, 65,25 g di gliceril tricaprilato e 43,50 g di olio di ricino sono stati miscelati insieme.

Produzione del prodotto farmaceutico sfuso:

26,08 g della frazione idrofila sono stati aggiunti lentamente a 73,92 g del mezzo idrofobo a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ agitando. Dopo l'aggiunta dell'intera frazione idrofila, la velocità di miscelazione è stata aumentata. Degassamento tramite vuoto è stato poi applicato e la sospensione risultante è stata conservata a $2-8^{\circ}\text{C}$.

Per permettere la dissoluzione di quantità maggiori di octreotide è stato creato il seguente metodo:

1. La quantità di acqua della preparazione della frazione idrofila era la stessa del volume calcolato del prodotto farmaceutico sfuso finale.
2. PVP-12 è stato dissolto in metà della quantità di acqua di cui sopra.
3. Ottanoato di sodio è stato dissolto nella seconda mezza quantità di acqua.
4. Octreotide è stato dissolto nella soluzione di PVP-12 (dal paragrafo 2).
5. La soluzione di ottanoato di sodio è stata aggiunta alla soluzione di octreotide e PVP-12. A questo stadio vi è stata una certa precipitazione, ma è diventata solubile dopo la miscelazione.

Esempio 30: Esperimenti in maiali usando capsule

Al fine di testare l'attività delle formulazioni dell'invenzione quando somministrate in capsule, è stato stabilito un modello animale che consente la somministrazione di capsule ai maiali (suino domestico). Per bypassare lo stomaco e consentire una somministrazione diretta di capsule nell'intestino tenue del maiale, un modello consolidato nei cani ("Nipple Valve model"; Wilsson-Rahmberg & O. Jonsson, Laboratory Animals (1997), 31, 231-240) è stato applicato al maiale commerciale.

Sono state preparate le due formulazioni di octreotide mostrate sotto nella Tabella 37. La formulazione di octreotide (x) è stata preparata essenzialmente come descritto sopra per la formulazione basica in cui la frazione idrofila è stata semplificata omettendo MgCl₂ e MC400. La formulazione di octreotide (y) è stata preparata essenzialmente come descritto sopra per la formulazione di octreotide migliorata. Le formulazioni sono state introdotte in capsule di gelatina (di Capsugel), formulazione basica (x) a 0,42 mL/capsula e formulazione migliorata (y) a 0,44mL/capsula, dando come risultato 5mg netti di contenuto di octreotide in entrambi i tipi di capsule riempite. Le capsule erano prive di rivestimento gastroprotettivo ovvero erano non rivestite.

Tabella 37

	Formulazione, ingrediente API	Octreotide (x)	Octreotide(y)
		basica	migliorata
		(%p/p)	(%p/p)

Frazione idrofila	API	1,357	1,277
	PVP-12	2,717	10,011
	Ottanoato di sodio	12,011	15,008
	Acqua	0,643	1,052
Mezzo idrofobo	Tween 80	0	1,992
	Gliceril monocaprilato	0	3,967
	Gliceril tricaprilato	0	40,016
	Olio di ricino	43,562	26,677
	Span40	1,198	0
	Lecitina	2,403	0
	Etil isovalerato	10,391	0
	Gliceril monooleato	2,254	0
Gliceril tributirato	23,463	0	

Le formulazioni descritte sopra nella Tabella 37 sono state somministrate direttamente nell'intestino tenue di maiali non anestetizzati per mezzo del bypass gastrico descritto sopra, e i livelli plasmatici di octreotide sono stati misurati dopo la somministrazione. I valori di esposizione, AUC, sono stati determinati per le formulazioni. La BA % è stata calcolata in confronto all'esposizione all'octreotide dopo la somministrazione sottocutanea. I risultati ottenuti sono mostrati di seguito nella Tabella 38.

Tabella 38

Cargo	Formulazione	N	AUC (0-240) \pm DS	% BA \pm DS
Octreotide	Octreotide(x)	4	896 \pm 305	2,1 \pm 0,7
	Octreotide(y)	4	2574 \pm 889	6,2 \pm 2,1

I risultati di cui sopra nella Tabella 38 mostrano che vi era biodisponibilità nel modello di maiale per le formulazioni incapsulate, per le formulazioni sia basiche sia migliorate. La biodisponibilità di octreotide della formulazione migliorata era circa tre volte il livello della biodisponibilità della formulazione basica.

I risultati qui forniti per la biodisponibilità sono sottovalutati poiché il tempo di prelievo non era sufficiente per far tornare i livelli di octreotide alla linea base (0 ng/mL). Ciò era dovuto al tempo di esposizione inaspettatamente più lungo nei maiali rispetto a quello che era stato precedentemente misurato nei ratti. La forma del grafico è stata modificata rispetto ai risultati nei ratti con un tempo più lungo per raggiungere i livelli di picco massimi e un tempo prolungato in cui l'octreotide è residente nel sangue. Questo può essere vantaggioso in quanto ciò consente all'octreotide di agire più a lungo nell'organismo. Pertanto la biodisponibilità effettiva nei maiali deve essere superiore ai numeri indicati.

In base ai risultati nei ratti, il livello di biodisponibilità nei maiali di octreotide somministrato in soluzione acquosa è estrapolato a circa

lo 0,1%. Questo livello di biodisponibilità è inferiore al livello di sensibilità del saggio biologico usato per i maiali.

Esempio 31: Risultati di dose-risposta per PVP nella formulazione migliorata.

Oltre ai risultati di PVP nell'esempio 24, è stato studiato l'effetto sull'attività dell'aumento della quantità di PVP-12 nella formulazione migliorata. Le formulazioni migliorate, realizzate sostanzialmente come descritto sopra, contenevano l'octreotide come composto cargo e diverse dosi di PVP-12 come mostrato nella Tabella 39 di seguito. Le dosi di PVP-12 testate erano il 7,5%, il 10,0% e il 15,0% di PVP-12. Le formulazioni contenenti PVP al 10% e al 15,0% erano semi-solidi, cioè erano sospensioni apparentemente semi-solidi e la formulazione contenente PVP al 7,5% era una sospensione viscosa.

Tabella 39

	Formulazione, API	Octreotide PVP 7,5%	Octreotide PVP 10,0%	Octreotide PVP 15,0%
	Ingrediente	(%p/p)	(%p/p)	(%p/p)
Frazione idrofila	API	0,058	0,058	0,058
	PVP-12	7,506	10,011	15,009
	Ottanoato di sodio	15,012	15,008	15,009
	Acqua	0,903	1,003	1,203

Mezzo idrofobo	Tween 80	2,098	2,027	1,884
	Gliceril monocaprilato	4,178	4,036	3,752
	Gliceril tricaprilato	42,147	40,714	37,851
	Olio di ricino	28,098	27,143	22,234

Le formulazioni descritte sopra nella Tabella 39 sono state somministrate direttamente nel digiuno di ratti non anestetizzati, e i livelli plasmatici di octreotide sono stati misurati dopo la somministrazione della formulazione. I valori di esposizione, AUC, sono stati determinati per le tre formulazioni. Questi risultati sono mostrati di seguito nella Tabella 40.

Tabella 40

T			
Cargo	Formulazione	N	AUC (0-25)/dose/kg in p. \pm DS
Octreotide	7,5% PVP-12	7	2,9 \pm 2,2
	10,0% PVP-12	9	4,4 \pm 1,7
	15% PVP-12	10	2,1 \pm 1,2

I risultati mostrati sopra nella Tabella 40 dimostrano che l'assorbimento di octreotide era massimo quando il PVP nella formulazione era del 10%, e un aumento della quantità al 15% produce

una riduzione significativa di attività. Questo conferma la scelta di 10% di PVP nella formulazione migliorata.

Esperimento 32 (comparativo): Attività di API impaccato in formulazione in confronto ad API somministrato contemporaneamente alla formulazione

Sono state preparate tre formulazioni basiche diverse di tre composti cargo diversi (destrano, gentamicina ed exenatide), essenzialmente come descritto sopra (in cui la formulazione base è la frazione idrofila non semplificata base). Ciascuna di queste tre formulazioni è stata somministrata direttamente nel digiuno di ratti non anestetizzati, e i livelli plasmatici di cargo sono stati misurati dopo la somministrazione della formulazione. I valori di esposizione, AUC, sono stati determinati per le formulazioni. Inoltre, una formulazione simile è stata preparata con un composto cargo non rilevante (una formulazione mock). Separatamente, la formulazione mock è stata somministrata contemporaneamente a destrano, gentamicina o exenatide in soluzione acquosa e i valori di esposizione, AUC, sono stati determinati. La somministrazione concomitante è stata ottenuta somministrando il cargo in soluzione acquosa seguito immediatamente dalla somministrazione di una formulazione mock attraverso una cannula impiantata nel digiuno (bypass gastrico). Per ogni composto, l'esposizione dopo la somministrazione del cargo formulato è stata confrontata con l'esposizione dopo la somministrazione del cargo non formulato (concomitante). I risultati comparativi sono mostrati di seguito

nella Tabella 41. I risultati mostrano che vi è un'attività superiore (biodisponibilità) quando il cargo è formulato in confronto al caso non formulato (concomitante) in tutti e tre i casi, e che l'exenatide mostrava di gran lunga l'aumento maggiore di attività dovuto alla formulazione. Si noti che destrano e gentamicina sono composti che non sono sensibili alla degradazione di proteasi, mentre l'exenatide essendo un peptide è soggetto a degradazione ad opera degli enzimi intestinali. La grande differenza tra l'exenatide formulato in confronto con l'exenatide non formulato può essere dovuta all'effetto protettivo della formulazione contro la degradazione.

Tabella 41

API/cargo	Formulato in rapporto a non formulato (attività in volte)
Destrano	1,7
Gentamicina	1,5
Exenatide	4,4

Esempio 33 (comparativo): Valutazione dell'iperpermeabilità intestinale

A. Limitazione dimensionale: La tecnologia e le formulazioni descritte sopra sono destinate a migliorare la permeabilità dell'intestino, consentendo il rilascio specifico di proteine, peptidi e altre molecole altrimenti impermeabili attraverso questa barriera. Un certo grado di penetrazione non specifica del contenuto intestinale può risultare come

effetto collaterale di questo miglioramento della permeabilità specifica. La dimensione delle molecole che potrebbero eventualmente penetrare nell'intestino in modo non specifico è stata valutata usando diversi marcatori molecolari.

Allo scopo di valutare il limite di dimensione molecolare della permeabilità del GI aumentata, sono stati scelti cinque diversi destrani marcati con FITC di diverso peso molecolare per servire da marcatori molecolari per testare una l'aumentata permeabilità intestinale; il peso molecolare medio dei cinque destrani era di 4,4, 10, 20, 40 e 70 kDa, equivalenti ad un raggio di 14, 23, 33, 45 e 60 Å rispettivamente. Questi diversi marcatori di dimensione sono stati somministrati direttamente nel digiuno di ratti non anestetizzati, attraverso una cannula impiantata nell'intestino, e non mostravano praticamente nessuna penetrazione intestinale basale quando testati da soli. Ciascuno di questi marcatori è stato poi somministrato direttamente nel digiuno di ratti non anestetizzati insieme a 300L di formulazione basica, e il grado della sua penetrazione è stato valutato testando i livelli di destrano nel sangue.

I livelli plasmatici di destrano sono stati misurati prima della somministrazione e a 3', 6', 10', 25', 60', 90' minuti dalla somministrazione della formulazione. I valori di esposizione, AUC (0-90), sono stati determinati e i risultati sono mostrati nella figura 7. I dati sono presentati come MEDIA±DS, n≥4.

I risultati mostrano che sebbene il marcatore molecolare più piccolo testato (destrano di PM medio=4,4 kDa), penetri nell'intestino

quando somministrato contemporaneamente ad una formulazione, con l'aumento delle dimensioni della molecola, il grado di penetrazione diminuisce: una molecola di marcatore di 10 kDa penetra in misura minore e un marcatore di 20 kDa in misura ancora minore. Una molecola di marcatore di 40 kDa mostra una minima penetrazione, mentre una molecola di marcatore di 70 kDa non mostra alcuna penetrazione (penetrazione basale). Questi risultati indicano che 40-70 kDa è una dimensione di cutoff per il miglioramento di permeabilità non specifico attraverso le formulazioni dell'invenzione. Perciò la somministrazione di un grande volume di formulazione (300µL) nel digiuno di ratti ha dato come risultato un miglioramento della permeabilità della barriera intestinale, e questa permeabilità migliorata è limitata dalla dimensione molecolare, mostrando una dimensione di cutoff di 40-70kDa e una penetrazione minima a 40kDa.

I valori pubblicati della dimensione delle molecole pericolose (peso molecolare e raggio) che potrebbero essere presenti potenzialmente nell'intestino sono mostrati di seguito nella Tabella 42.

Tabella 42

	PM (kDa)	Raggio (Å)
Macromolecole	>4	14 o più
LPS	>100	Corto - 100 Lungo - 1000
Tossine enterobatteriche	70 - 900	-
Virus	-	600 - 1000

	PM (kDa)	Raggio (Å)
Batteri	-	10.000 o più

La Tabella 42 dimostra che le molecole potenzialmente pericolose presenti nell'intestino sono al di sopra della dimensione di cutoff del miglioramento della permeabilità attraverso le formulazioni testate, come mostrato in precedenza. Quindi questi risultati suggeriscono che le formulazioni testate non faciliteranno la penetrazione di molecole pericolose attraverso la barriera intestinale e queste formulazioni possono pertanto essere considerate sicure. Altre formulazioni dell'invenzione danno risultati simili.

B. Somministrazione ripetuta della formulazione: Al fine di studiare se la somministrazione ripetuta della formulazione influenzi la permeabilità intestinale, la formulazione migliorata di octreotide (12% di ottanoato di sodio con olio di ricino) è stata somministrata a ratti per 14 giorni consecutivi usando il modello *in vivo* di cui sopra (ratto con due cannule impiantate nel digiuno). Ai giorni 1, 7 e 14 della somministrazione, un marcatore di permeabilità di destrano (FITC-destrano di PM pari a 4,4 kDa; FD4), è stato somministrato 60 minuti dopo la somministrazione della formulazione. Ciò era per valutare la permeabilità dell'intestino attraverso la penetrazione del FD4 dall'intestino al sangue. Non è stata riscontrata alcuna differenza significativa nell'esposizione a FD4 dopo 14 giorni di somministrazione ripetuta della formulazione. Questi risultati suggeriscono che non vi è alcun aumento della permeabilità intestinale a seguito di questo periodo

di somministrazione ripetuta della formulazione e la permeabilità intestinale migliorata rimane un processo reversibile durante questo periodo.

I risultati suggeriscono che la formulazione non provoca danni al tessuto intestinale, ma agisce aprendo specificamente la barriera intestinale, senza mostrare alcun effetto di miglioramento della permeabilità aggiuntivo.

Esempio 34 (comparativo): Valutazione dell'iperpermeabilità intestinale: decorso temporale e reversibilità

Oltre allo studio nell'esempio precedente, è stato progettato uno studio per definire il decorso temporale della permeabilità intestinale aumentata grazie alle formulazioni dell'invenzione e la reversibilità di questo processo, utilizzando il destrano come marcatore di permeabilità.

Per definire la finestra temporale di una permeabilità intestinale aumentata, è stato sviluppato un modello *in vivo* nei ratti, in cui una o due cannule sono impiantate nel digiuno dei ratti. Destrano marcato con FITC (peso molecolare medio 4,4kDa, FD4), che non presenta praticamente alcuna penetrazione intestinale basale, è servito da marcatore molecolare per testare la permeabilità intestinale. È stato progettato un esperimento in cui il marcatore di destrano è stato somministrato contemporaneamente alla formulazione (tramite una cannula impiantata nel digiuno), o a intervalli di tempo diversi dalla somministrazione della formulazione (tramite una seconda cannula

impiantata nel digiuno separata). La permeabilità intestinale è stata valutata testando la penetrazione di FD4 nel sangue. Ai ratti è stata somministrata una formulazione basica contemporaneamente al marcatore di destrano, o la formulazione basica e poi il marcatore di destrano a intervalli di tempo diversi (10, 30 e 60 minuti). I campioni di sangue sono stati analizzati per la concentrazione di destrano pre-somministrazione e a 3, 6, 10, 25, 60 e 90 min dalla somministrazione di destrano. I risultati sono mostrati in Figura 8. I dati sono presentati come media \pm DS, $n \geq 5$.

La figura 8 dimostra che il marcatore di destrano penetra nell'intestino nella misura maggiore quando somministrato insieme alla formulazione. Un intervallo di 10 minuti tra la somministrazione della formulazione e la somministrazione del marcatore di destrano porta ad una quantità significativamente ridotta di penetrazione del marcatore e l'aumento dell'intervallo determina ulteriormente una riduzione esponenziale della penetrazione del marcatore.

Questi risultati mostrano che, sebbene esista un certo grado di miglioramento della permeabilità non specifico ad opera della formulazione, esso è limitato ad un breve periodo di tempo dopo la somministrazione della formulazione. La permeabilità dell'intestino diminuisce notevolmente con il tempo, e a 60 minuti dalla somministrazione della formulazione non vi è più penetrazione del marcatore. Pertanto la somministrazione della formulazione all'intestino del ratto produce un periodo molto breve di iperpermeabilità della

barriera intestinale. Altre formulazioni dell'invenzione hanno dato risultati simili.

Esempio 35: Somministrazione orale di octreotide alle scimmie

Per testare la farmacocinetica dell'octreotide dopo la somministrazione orale di octreotide formulato a scimmie, delle capsule contenenti una formulazione con olio di ricino migliorata di octreotide (simile alla formulazione I della Tabella 35, ma con un carico superiore di octreotide) sono state somministrate per via orale a cinque scimmie *Cynomologus*. Le capsule utilizzate erano capsule di gelatina di dimensione 1 rivestite con il 6,7% di rivestimento gastroprotettivo Acryl-EZE®; questo rivestimento impedisce la disintegrazione della capsula nello stomaco e permette l'apertura delle capsule nell'intestino tenue degli animali trattati. La dose di octreotide utilizzata era di 5mg/capsula.

Le scimmie sono state tenute a digiuno per tutta la notte prima della somministrazione della capsula. Dopo la somministrazione orale, sono stati prelevati campioni di sangue per un periodo di 9,75 ore, trattati per il plasma e analizzati per il contenuto di octreotide tramite il metodo LC/MS/MS: vedere la figura 9. Esperimenti simili sono stati eseguiti con la formulazione migliorata senza olio di ricino/GTC (simile alla formulazione IV della Tabella 35, ma con un carico superiore di API) e sono stati ottenuti risultati simili. Esperimenti simili sono stati eseguiti anche con svariati rivestimenti gastroprotettivi diversi e sono stati ottenuti risultati simili.

Al fine di confrontare la farmacocinetica di octreotide dopo la somministrazione della formulazione di octreotide migliorata, con la farmacocinetica dell'octreotide iniettato, una soluzione di acetato di octreotide (0,1 mg/scimmia) è stata somministrata per via sottocutanea a due scimmie del gruppo di cui sopra per servire da riferimento. Sono stati prelevati campioni di sangue per un periodo di quattro ore, trattati per il plasma e analizzati per il contenuto di octreotide tramite il metodo LC/MS/MS.

La farmacocinetica dell'octreotide in seguito alla somministrazione di octreotide orale e di soluzione di octreotide iniettata per via sottocutanea sono state confrontate (cfr. figure 9 e 10). I risultati della formulazione orale hanno mostrato assorbimento per un periodo di poche ore. La forma del grafico è stata modificata rispetto all'iniezione sottocutanea, mostrando un rilascio più lento ma più lungo di octreotide nel sangue. Questo può essere vantaggioso in quanto ciò consente la persistenza di octreotide per un tempo più lungo nel sangue prolungando potenzialmente la finestra di attività.

Una dose approvata per l'acetato di octreotide iniettato negli esseri umani è di 0,1mg/paziente. I risultati di cui sopra nelle scimmie suggeriscono che la formulazione migliorata contenente circa 10 mg di octreotide per dose genererà un'esposizione terapeutica negli esseri umani.

Esempio 36: Dati di stabilità

Le formulazioni di octreotide basiche e migliorate dell'invenzione sono state mantenute entrambe a 4°C e a 25°C e sono state testate periodicamente per il contenuto di octreotide. Si è trovato che entrambe le formulazioni erano stabili.

Esempio 37 (comparativo): Formulazioni incorporanti vancomicina, interferone-alfa e terlipressina

A. Vancomicina: La Tabella 43 di seguito descrive una formulazione migliorata di vancomicina contenente il 10% di PVP e il 15% di ottanoato di sodio nella frazione idrofila e contenente gliceril tricaprilato come costituente principale del mezzo idrofobo. La vancomicina è stata ottenuta da Gold Biotechnology.

Tabella 43

	Formulazione, ingrediente API	Vancomicina
		(%p/p)
Frazione idrofila	API	6,267
	NaOH	0,082
	PVP-12	10,005
	Ottanoato di sodio	15,016
	Acqua	1,216
Mezzo idrofobo	Tween 80	2,004
	Gliceril monocaprilato	4,008
	Gliceril tricaprilato	61,400

	Olio di ricino	0,000
--	----------------	-------

In un esperimento preliminare, la formulazione descritta sopra nella Tabella 43 è stata somministrata direttamente nel digiuno di ratti non anestetizzati, e i livelli plasmatici di vancomicina sono stati misurati dopo la somministrazione della formulazione. Il valore di esposizione, AUC, è stato determinato per la formulazione. I risultati sono che la BA assoluta è intorno al 5% (in confronto a IV, n=6). Quando vancomicina in soluzione salina è stata somministrata nel digiuno di ratti non anestetizzati non è stata rilevata BA.

Interferone-alfa: La Tabella 44 di seguito descrive una formulazione migliorata di interferone-alfa contenente il 10% di PVP e il 15% di ottanoato di sodio nella frazione idrofila e contenente gliceril tricaprilato come costituente principale del mezzo idrofobo. L'interferone-alfa è fornito in un tampone (di Intas Biopharmaceuticals) e gli ingredienti del tampone di interferone-alfa nella formulazione sono contrassegnati con un asterisco (*).

Tabella 44

	Formulazione, ingrediente API	IFN- α
		(%p/p)
Frazione idrofila	API	0,050
	*Na ₂ HPO ₄	0,032
	*NaH ₂ PO ₄	0,030

	*Polisorbato (Tween) 80	0,002
	*Disodio EDTA	0,002
	PVP-12	10,026
	Ottanoato di sodio	14,997
	Acqua	1,006
Mezzo idrofobo	Tween 80	2,005
	Gliceril monocaprilato	4,005
	Gliceril tricaprilato	67,84
	Olio di ricino	0

La formulazione descritta sopra nella Tabella 44 viene somministrata direttamente nel digiuno di ratti non anestetizzati. I livelli plasmatici di interferone-alfa sono misurati dopo la somministrazione della formulazione.

C. Terlipressina: La Tabella 45 di seguito descrive una formulazione basica di terlipressina e una formulazione migliorata di terlipressina contenente il 10% di PVP e il 15% di ottanoato di sodio nella frazione idrofila e contenente gliceril tricaprilato come costituente principale del mezzo idrofobo. La terlipressina è stata ottenuta da Bambio. La formulazione basica è stata preparata essenzialmente come descritto sopra e anche la formulazione migliorata viene preparata essenzialmente come descritto sopra.

Tabella 45

	Formulazione, API	Terlipressina basica	Terlipressina migliorata
	Ingrediente	(%p/p)	(%p/p)
Frazione idrofila	API	0,235	0,235
	MgCl ₂	0,137	0,000
	PVP 12	2,736	10,004
	Ottanoato di sodio	12,004	15,015
	MC 400	0,137	0,000
	Acqua	0,610	1,010
Mezzo idrofobo	Span40	1,211	0,000
	Lecitina	2,428	0,000
	Etil isovalerato	10,500	0,000
	Gliceril monooleato	2,278	0,000
	Gliceril tributirato	23,708	0,000
	Olio di ricino	44,016	0,000
	Tween 80	0,000	2,002
GMC	0,000	4,004	

	GTC	0,000	67,731
--	-----	-------	--------

Le formulazioni descritte sopra nella Tabella 45 vengono somministrate direttamente nel digiuno di ratti non anestetizzati. I livelli plasmatici di terlipressina sono misurati dopo la somministrazione della formulazione.

Esempio 38: Inibizione dell'ormone della crescita *in vivo* mediante octreotide

Uno degli effetti meglio caratterizzati dell'octreotide è l'inibizione del rilascio dell'ormone della crescita. Al fine di testare l'efficacia di una formulazione di octreotide dell'invenzione sull'inibizione dell'ormone della crescita, è stato usato un modello di ratto in cui i livelli di ormone della crescita di ratto endogeno (rGH) sono stati monitorati in seguito alla somministrazione della formulazione di octreotide nel digiuno del modello di ratto non anestetizzato (descritto sopra). È stato mostrato che la somministrazione di una formulazione di octreotide basica (contenente il 12% di ottanoato di sodio) nei digiuno dei ratti riduceva i livelli di rGH dell'87,4% in confronto alla somministrazione di un controllo di soluzione salina.

Questo risultato dimostra che le formulazioni di octreotide descritte nel presente documento permettono il rilascio di octreotide nella sua forma attiva dal lume intestinale nel circolo ematico.

Esempio 39 (comparativo): Studi tossicologici

È stato condotto uno studio di somministrazione di tossicità di controllo di formulazione (solo eccipienti, senza cargo) di 28 giorni in

ratti Wistar. Agli animali nel gruppo di test è stata somministrata giornalmente per via rettale la dose massima applicabile di formulazione (100 µL/animale/giorno) per 28 giorni consecutivi. Il gruppo di test è stato confrontato con due gruppi di controllo: un gruppo naive (non trattato) e un gruppo a cui è stata somministrata soluzione salina, (n= 15/ gruppo).

Le osservazioni cliniche generali sono state fatte due volte al giorno e le osservazioni cliniche dettagliate sono state eseguite settimanalmente. Il peso corporeo e il consumo di cibo sono stati misurati settimanalmente. Patologia clinica e patologia macroscopica sono state condotte un giorno dopo l'ultimo trattamento. Un esame istologico è stato eseguito su retto, colon, fegato e reni, e non è stato rilevato nessun effetto tossico. L'istopatologia era pulita senza esiti GI locali o sistemici, nessun esito clinico correlato alla formulazione, nessuna variazione nei parametri ematologici e chimici del sangue, nessun esito macroscopico alla necrosi e nessuna mortalità. In conclusione, questo esperimento ha dimostrato che non vi è stata osservata tossicità durante una somministrazione rettale giornaliera della formulazione nei ratti per 28 giorni consecutivi.

Avendo così descritto diversi aspetti di almeno una forma di realizzazione, si apprezzerà che svariati cambiamenti, modifiche e miglioramenti verranno in mente immediatamente ai tecnici del ramo. Tali cambiamenti, modifiche e miglioramenti sono destinati a fare parte di questa divulgazione e sono destinati a rientrare nella portata

dell'invenzione. Di conseguenza, la precedente descrizione e i disegni sono a solo titolo esemplificativo e la portata dell'invenzione deve essere determinata dalla corretta interpretazione delle rivendicazioni allegare e dei loro equivalenti.

RIVENDICAZIONI

1. Composizione comprendente una sospensione che comprende una miscela di un mezzo idrofobo e una forma solida in cui la forma solida comprende una quantità terapeuticamente efficace di un agente terapeutico e almeno un sale di un acido grasso a catena media, e in cui il sale di acido grasso a catena media è presente nella composizione in una quantità del 10% o più in peso,

in cui l'agente terapeutico è octreotide.

2. Composizione della rivendicazione 1, in cui la forma solida comprende una particella e/o una polvere.

3. Composizione delle rivendicazioni 1-2 in cui il contenuto di acqua nella composizione farmaceutica è inferiore a circa il 6% in peso o inferiore a circa il 2% in peso, o

in cui il contenuto di acqua nella forma solida è inferiore a circa il 6% in peso o inferiore a circa il 2% in peso.

4. Composizione delle rivendicazioni da 1 a 3 in cui il sale di acido grasso a catena media ha una lunghezza di catena tra circa 6 e circa 14 atomi di carbonio, o

in cui il sale di acido grasso a catena media è esanoato di sodio, eptanoato di sodio, ottanoato di sodio, nonanoato di sodio, decanoato di sodio, undecanoato di sodio, dodecanoato di sodio, tridecanoato di sodio o tetradecanoato di sodio, o un sale di potassio o litio o ammonio corrispondente o una loro combinazione.

5. Composizione delle rivendicazioni da 1 a 4 in cui il sale di acido grasso a catena media è presente nella composizione in una quantità tra l'11% e il 40% in peso o tra il 12% e il 18% in peso, o

in cui il sale di acido grasso a catena media è presente nella forma solida in una quantità tra il 50% e il 90% in peso o tra il 70% e l'80% in peso.

6. Composizione delle rivendicazioni da 1 a 5 che comprende inoltre un polimero formante una matrice, presente nella composizione in una quantità del 3% o più in peso.

7. Composizione della rivendicazione 6 in cui il polimero formante una matrice è destrano, polivinilpirrolidone (PVP), polisaccaridi ionici o neutri, acido poliacrilico, derivati di acido polimetacrilico o alcol polivinilico.

8. Composizione della rivendicazione 7 in cui il polivinilpirrolidone è presente nella composizione in una quantità tra circa il 2% e circa il 20% in peso, tra il 5% e il 15% in peso o circa il 10% in peso.

9. Composizione della rivendicazione 7 o 8 in cui il polivinilpirrolidone è PVP-12 e/o il polivinilpirrolidone ha un peso molecolare di circa 3000.

10. Composizione delle rivendicazioni da 1 a 9 in cui il mezzo idrofobo comprende olio di ricino o gliceril tricaprillato o gliceril tributirato o una loro combinazione.

11. Composizione delle rivendicazioni da 1 a 10 in cui il componente principale in peso del mezzo idrofobo è gliceril tricaprilato, o in cui il mezzo idrofobo è costituito essenzialmente da gliceril tricaprilato.

12. Composizione delle rivendicazioni da 1 a 11 in cui il mezzo idrofobo comprende un composto alifatico, olefinico, ciclico o aromatico, o in cui il mezzo idrofobo comprende un olio minerale, una paraffina, un acido grasso quale acido ottanoico, un monogliceride, un digliceride, un trigliceride, un etere o un estere, o una loro combinazione, preferibilmente in cui il mezzo idrofobo comprende un trigliceride che è un trigliceride a catena lunga, un trigliceride a catena media, un trigliceride a catena corta o una loro miscela.

13. Composizione delle rivendicazioni da 1 a 12 in cui il mezzo idrofobo comprende inoltre un tensioattivo ionico o un tensioattivo non ionico.

14. Composizione della rivendicazione 13 in cui il tensioattivo è lecitina o un sale biliare o un detergente, o in cui il tensioattivo è un monogliceride, un cremoforo, un etere di alcol grasso di polietilenglicole, un estere di acido grasso di sorbitano, un estere di acido grasso di poliossietilene sorbitano, esteri di poliossietilene di acido 12-idrossistearico, o un polossamero o una loro combinazione, preferibilmente

- in cui il monogliceride è gliceril monocaprilato, gliceril monoottanoato, gliceril monodecanoato, gliceril monolaurato, gliceril

monomiristato, gliceril monopalmitato o gliceril monooleato o gliceril monostearato o una loro combinazione, o

- in cui l'estere di acido grasso di sorbitano comprende sorbitan monolaurato, sorbitan monooleato o sorbitan monopalmitato o una loro combinazione, o

- in cui l'estere di acido grasso di poliossietilene sorbitano comprende poliossietilene sorbitan monooleato, poliossietilene sorbitan monostearato o poliossietilene sorbitan monopalmitato o una loro combinazione.

15. Composizione della rivendicazione 11 in cui il mezzo idrofobo contiene inoltre olio di ricino e/o gliceril monocaprilato.

16. Processo per produrre una composizione farmaceutica come rivendicato in una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 15 che comprende fornire una forma solida di una quantità terapeuticamente efficace di octreotide e una forma solida comprendente un sale di acido grasso a catena media, e sospendere le forme solide in un mezzo idrofobo, per produrre una sospensione contenente in forma solida l'octreotide e il sale di acido grasso a catena media, producendo in tal modo la composizione farmaceutica, in cui la composizione farmaceutica contiene il 10% o più in peso di sale di acido grasso a catena media.

17. Composizione delle rivendicazioni da 1 a 15, comprendente il 10-20%, preferibilmente il 12-21%, preferibilmente il 15% di sale di acido grasso a catena media preferibilmente ottanoato di sodio, il 5-

10%, preferibilmente il 10% di PVP-12, e in cui il mezzo idrofobo comprende il 20-80%, preferibilmente il 30-70% di trigliceride preferibilmente gliceril tricaprilato o gliceril tributirato o olio di ricino o una loro miscela, il 3-10% di tensioattivi, preferibilmente il 6% di gliceril monocaprilato e poliossietilene sorbitan monooleato e circa l'1% di acqua e in cui l'octreotide è presente in una quantità inferiore al 33%, o inferiore al 25%, o inferiore al 10%, o inferiore all'1% o inferiore allo 0,1%.

18. Forma di dosaggio orale contenente la composizione delle rivendicazioni da 1 a 15 o 17 che può essere facoltativamente una capsula e può essere una capsula di gel dura o una capsula di gel molle e che può essere facoltativamente dotata di un rivestimento gastroprotettivo.

19. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 15 o 17 per l'uso nel trattamento dell'acromegalia.

20. Composizione per uso secondo la rivendicazione 19 in cui la composizione è una forma di dosaggio orale.

*** **

Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede.

LEGENDA DELLE TAVOLE DEI DISEGNI

TAVOLA 1/10

Figura 1

“Hydrophilic fraction” = frazione idrofila

“Mixing” = miscelazione

“Insulin” = insulina

“NaOH solution” = soluzione di NaOH

“Adding MC” = aggiunta di MC

“Freeze drying” = crioessiccazione

“Lyophilization” = liofilizzazione

“Hydrophobic medium” = mezzo idrofobo

“Lecithin” = lecitina

“Span” = Span

“GMO with Ethyl isovalerate” = GMO con etil isovalerato

“Adding” = aggiunta

“Castor oil” = olio di ricino

“Mixing Hydrophilic + Hydrophobic” = miscelazione frazione idrofila e mezzo idrofobo

“Capsules filling & sealing” = riempimento e sigillatura capsule

“Enteric coating” = rivestimento gastroprotettivo

TAVOLA 2/10

Figura 2

“Insulin” = insulina

“Time post administration” = tempo dalla somministrazione

“Particles in water” = particelle in acqua

“Insulin formulation” = formulazione di insulina

TAVOLA 3/10

Figura 3

“Human insulin” = insulina umana

“Insulin” = insulina

“Formulation” = formulazione

“Time post administration” = tempo dalla somministrazione

“Glucose response” = risposta di glucosio

“Glucose” = glucosio

TAVOLA 4/10

Figura 4

“Rectal administration” = somministrazione rettale

“Insulin” = insulina

“Glucose” = glucosio

“Time post administration” = tempo dalla somministrazione

“SC administration” = somministrazione SC

TAVOLA 5/10

Figura 5

“Insulin in formulation” = insulina in formulazione

“Insulin” = insulina

“Portal” = portale

“Jugular” = giugulare

“Time post administration” = tempo dalla somministrazione

“Insulin control” = controllo di insulina

TAVOLA 6/10

Figura 6

“Dextran in saline” = destrano in soluzione salina

“Dextran bioavailability” = biodisponibilità del destrano

“Dextran-formulated” = destrano formulato

TAVOLA 7/10

Figura 7

“Figure” = figura

“FITC-labeled dextran average size” = dimensione media del destrano

marcato con FITC

TAVOLA 8/10

Figura 8

“Figure” = figura

“Plasma” = plasma

“Concomitant” = contemporaneo

“Formulation” = formulazione

“Time” = tempo

TAVOLA 9/10

Figura 9

“Figure” = figura

“Plasma octreotide” = octreotide plasmatico

“Time post administration (hrs)” = tempo dalla somministrazione (ore)

TAVOLA 10/10

Figura 10

“Figure” = figura

“Plasma octreotide” = octreotide plasmatico

“Time post administration (hrs)” = tempo dalla somministrazione (ore)

*** **

Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede.

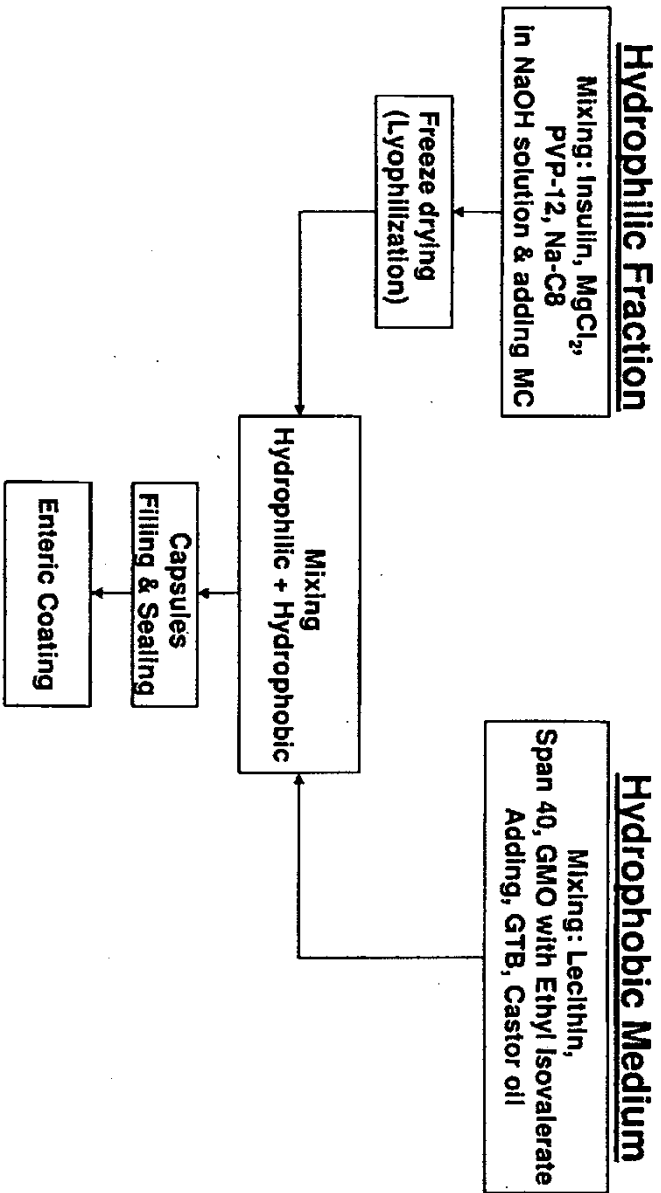


FIG. 1

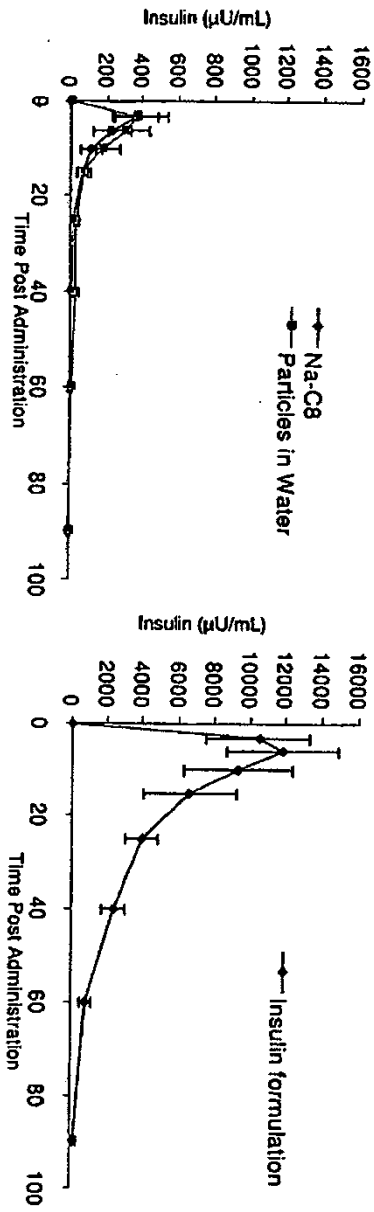


FIG. 2

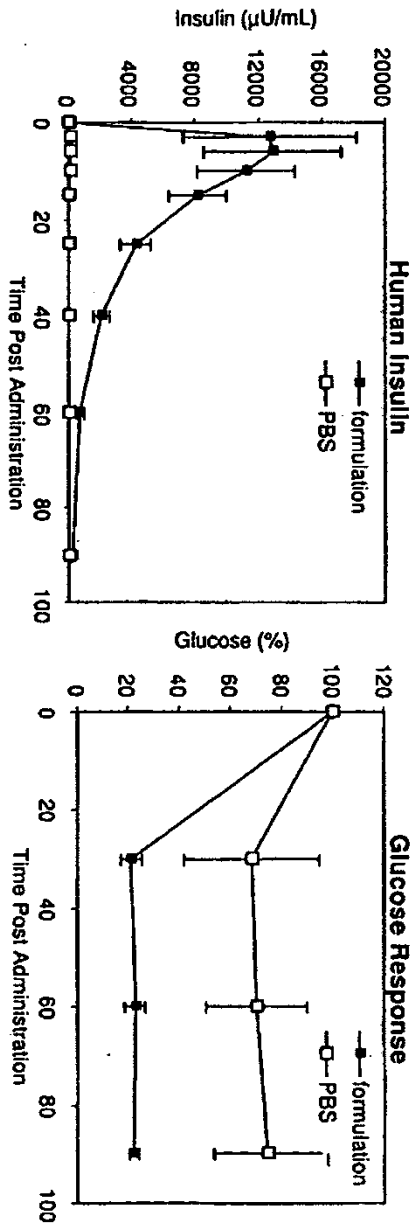


FIG. 3

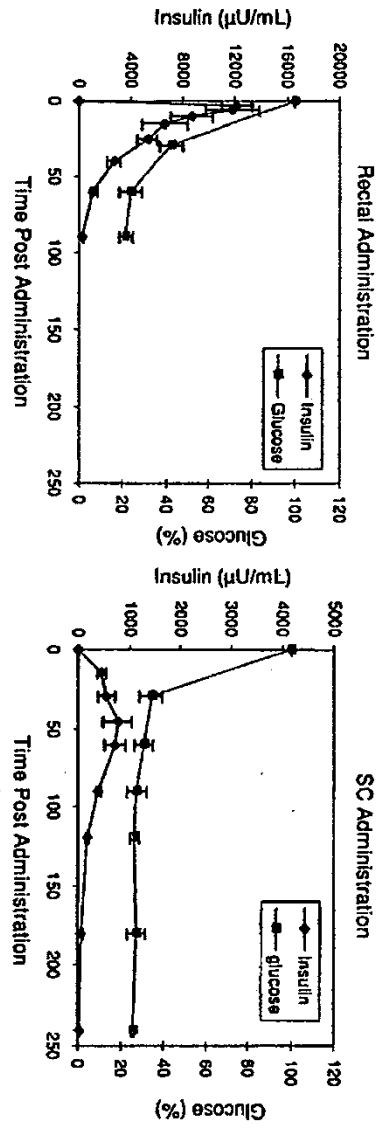


FIG. 4

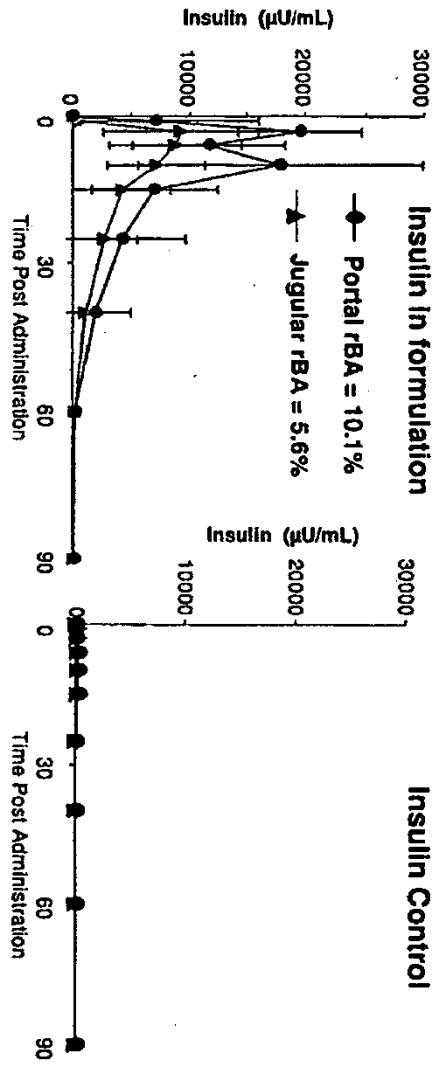


FIG. 5

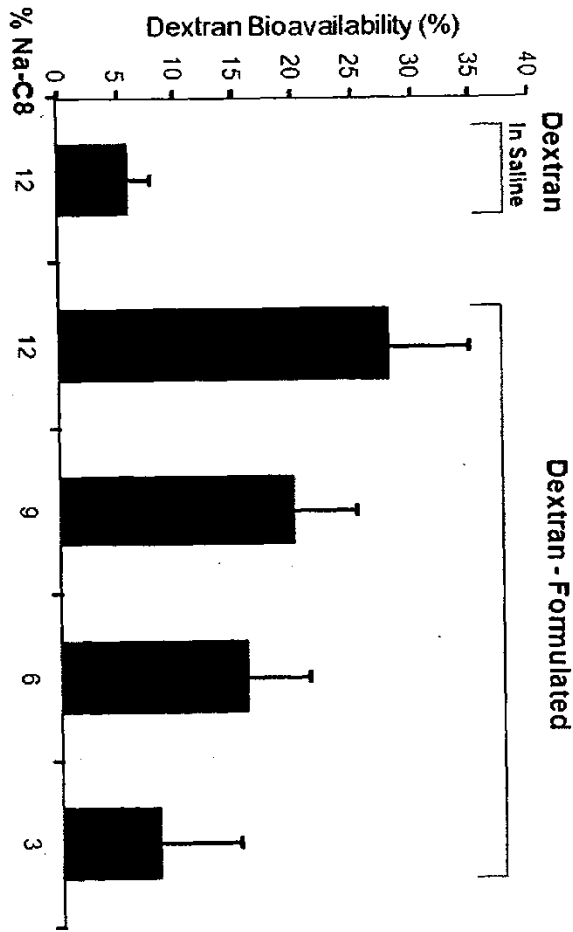


FIG. 6

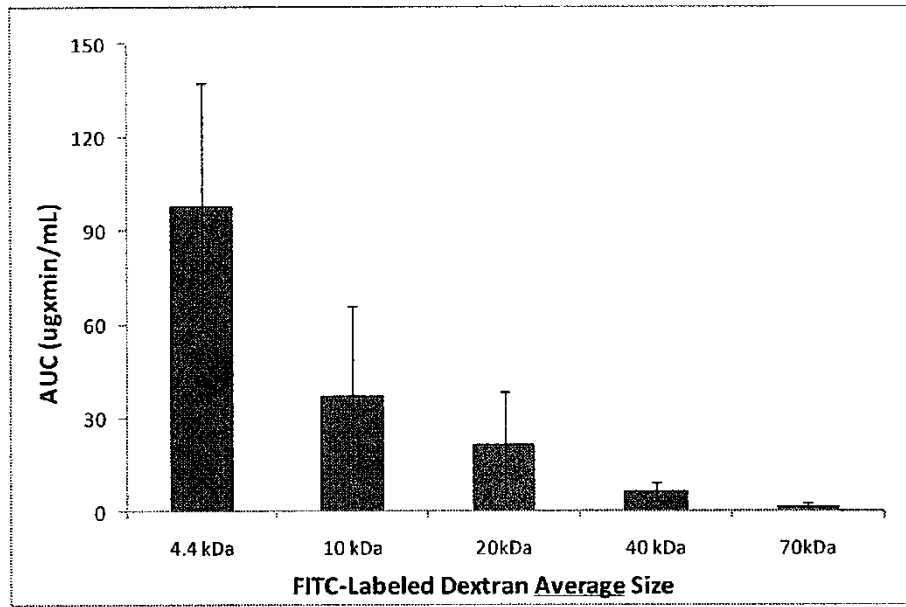
Figure 7

Figure 8

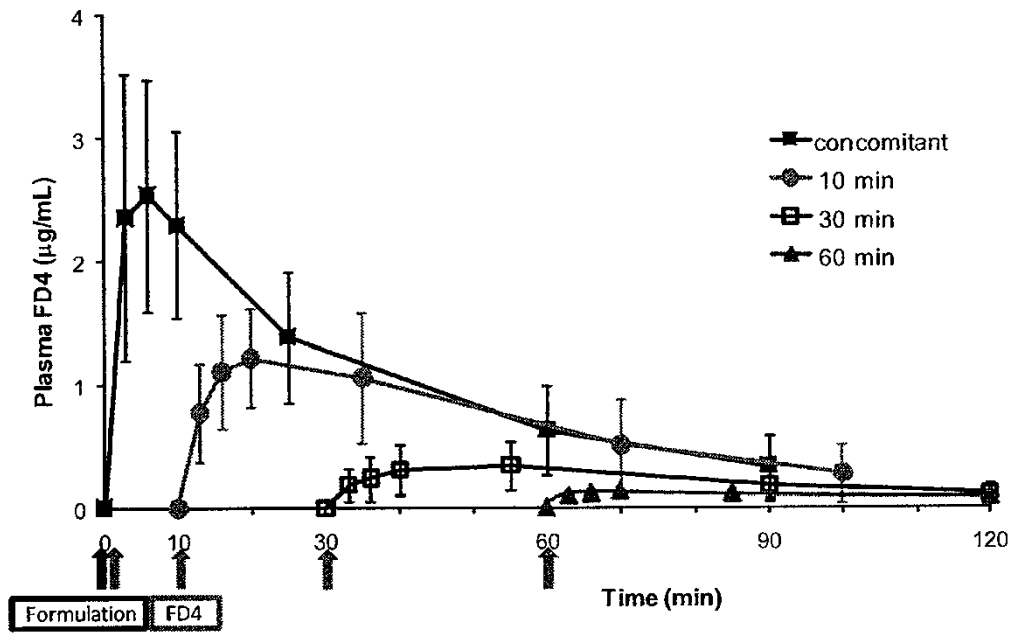


Figure 9

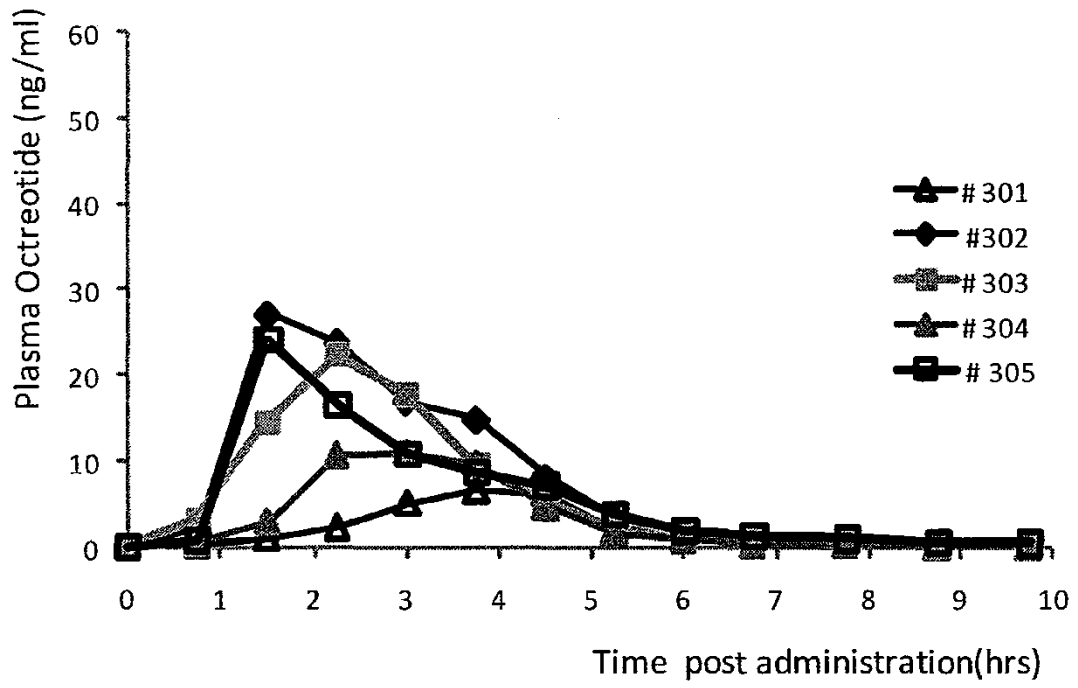


Figure 10

