

PRL024ESM

Titolo: **Sistema depot comprendente glatiramer acetato**

* * * * *

DESCRIZIONE

CAMPO DELL'INVENZIONE

5 **[0001]** La presente invenzione riguarda forme di dosaggio a lunga durata d'azione di glatiramer acetato e altri sali farmacologicamente accettabili di glatiramer. Sono particolarmente preferiti sistemi depot e altri sistemi impiantabili per un rilascio prolungato di glatiramer acetato.

STATO DELL'ARTE DELL'INVENZIONE

10 **Glatiramer acetato**

[0002] Copolimero-1, noto anche come glatiramer acetato e commercializzato con il nome commerciale Copaxone®, comprende i sali acetato di polipeptidi contenenti acido L-glutammico, L-alanina, L-tirosina e L-lisina. Le frazioni molari medie degli amminoacidi sono 0,141,
15 0,427, 0,095 e 0,338, rispettivamente, e il peso molecolare medio di copolimero-1 è tra 4700 e 11000 dalton. Chimicamente, glatiramer acetato è designato polimero di acido L-glutammico con L-alanina, L-lisina e L-tirosina, acetato (sale). La sua formula strutturale è:

(Glu, Ala, Lys, Tyr) \times CH₃COOH
20 (C₅H₉NO₄_C₃H₇NO₂_C₆H₁₄N₂O₂_C₉H₁₁NO₃) \times C₂H₄O₂ [CAS - 147245-92-9],
 appross. rapporto Glu₁₄Ala₄₃Tyr₁₀Lyz₃₄ \times (CH₃COOH)₂₀. Copaxone® è una soluzione chiara, da incolore a leggermente gialla, sterile, non pirogena per iniezione sottocutanea. Ogni millilitro contiene 20mg di glatiramer acetato e 40mg di mannitolo. L'intervallo di pH della soluzione va
25 approssimativamente da 5,5 a 7,0.

Stampa Man

PRL024ESM

Meccanismo di azione

[0003] Glatiramer acetato è un polimero casuale (massa molecolare media 6,4 kD) composto da quattro aminoacidi che si trovano nella proteina basica della mielina. Il meccanismo d'azione di glatiramer acetato è sconosciuto, sebbene siano emerse alcune proprietà immunologiche importanti di questo copolimero. Una somministrazione di copolimero-1 sposta la popolazione di cellule T da cellule Th1 pro-infiammatorie a cellule Th2 regolatorie che sopprimono la risposta infiammatoria (etichetta FDA Copaxone®). Data la sua somiglianza con la proteina basica della mielina, copolimero-1 può anche agire come diversivo, deviando una risposta autoimmune contro la mielina. L'integrità della barriera emato-encefalica, tuttavia, non è significativamente influenzata da copolimero-1, almeno non nelle prime fasi di un trattamento.

[0004] Copolimero-1 è un non auto-antigene che ha dimostrato di sopprimere un'encefalomielite allergica sperimentale (EAE) indotta da encefalitogeni vari inclusi omogenato di midollo spinale di topo (MSCH) che include tutti gli antigeni della mielina, come proteina basica della mielina (MBP) (Sela M et al., Bull Inst Pasteur (1990) 88 303-314), proteina proteolipidica (PLP) (Teitelbaum D et al., J Neuroimmunol (1996) 64 209-217) e glicoproteina oligodendrocitica della mielina (MOG) (Ben-Nun A et al., J Neurol (1996) 243 (Suppl 1) S14-S22) in una varietà di specie. EAE è un modello accettato per la sclerosi multipla.

[0005] È stato dimostrato che copolimero-1 è attivo quando iniettato per via sottocutanea, intraperitoneale, endovenosa o intramuscolare

Fulvio Montuori

PRLO24ESM

(Teitelbaum D et al., Eur J Immunol (1971) 1 242-248; Teitelbaum D et al., Eur J Immunol (1973) 3 273-279). In prove cliniche di fase III, si è scoperto che iniezioni sottocutanee quotidiane di copolimero-1 rallentano la progressione della disabilità e riducono il tasso di ricaduta nella sclerosi multipla recidivante-remittente (Johnson KP, Neurology (1995) 1
5 65-70; www.copaxone.com). Una terapia con copolimero-1 è attualmente limitata ad una somministrazione sottocutanea quotidiana. Un trattamento con copolimero-1 per ingestione o inalazione è divulgato in US 6,214,791, ma queste vie di somministrazione non hanno dimostrato
10 di raggiungere un'efficacia clinica in pazienti umani.

Efficacia

[0006] Prove a sostegno dell'efficacia di glatiramer acetato nel ridurre la frequenza di ricadute in pazienti con sclerosi multipla recidivante-remittente (RR MS) derivano da due prove controllate con placebo, che hanno utilizzato entrambe una dose di glatiramer acetato da
15 20 mg/giorno. Nessun'altra dose o regime di dosaggio è stato studiato in prove cliniche controllate con placebo di RR MS (www.copaxone.com). Una prova comparativa della dose approvata da 20 mg e della dose da 40 mg non ha mostrato una differenza significativa di efficacia tra queste
20 dosi (The 9006 trial; Cohen JA et al., Neurology (2007) 68 939-944). Sono in corso varie prove cliniche su glatiramer acetato. Queste includono studi con una dose più elevata di glatiramer acetato (40 mg - lo studio FORTE); studi su pazienti con Sindrome Clinicamente Isolata (lo studio PreCISe) nonché numerosi protocolli di combinazione e induzione, nei
25 quali glatiramer acetato viene dato insieme a, o in seguito a, un altro

Philip Morris

PRLO24ESM

prodotto attivo.

Effetti collaterali

[0007] Attualmente, tutti i trattamenti specificatamente approvati per la sclerosi multipla comportano un'auto-iniezione della sostanza attiva. Problemi frequentemente osservati nel sito di iniezione includono
5 irritazione, ipersensibilità, infiammazione, dolore e persino necrosi (nel caso di un trattamento con interferone 1 β) e un basso livello di adesione alla terapia da parte del paziente.

[0008] Effetti collaterali generalmente includono un nodulo nel sito
10 di iniezione (reazione del sito di iniezione), dolori, febbre e brividi. Questi effetti collaterali sono generalmente di natura lieve. Occasionalmente una reazione si verifica pochi minuti dopo un'iniezione nella quale vi è arrossamento, mancanza di respiro, ansia e battito cardiaco accelerato. Questi effetti collaterali passano entro trenta minuti. Nel tempo, si può
15 sviluppare un'ammaccatura visibile nel sito di iniezione a causa della distruzione locale di tessuto adiposo, nota come lipoatrofia. Pertanto, è auspicabile un metodo di somministrazione alternativo.

[0009] Effetti collaterali più gravi sono stati segnalati per glatiramer acetato, secondo l'etichetta di prescrizione della FDA; questi includono
20 effetti collaterali gravi per il sistema cardiovascolare, sistema digestivo (incluso il fegato), sistema ematico e linfatico, sistema muscolo-scheletrico, sistema nervoso, sistema respiratorio, sensi speciali (in particolare gli occhi), sistema urogenitale del corpo; sono stati anche riportati disturbi metabolici e nutrizionali; tuttavia un collegamento tra
25 glatiramer acetato e questi effetti avversi non è stato definitivamente

Philip M. Smith

PRLO24ESM

stabilito (etichetta FDA Copaxone®).

Sistemi depot

[0010] La via parenterale mediante iniezione endovenosa (IV), intramuscolare (IM) o sottocutanea (SC) è la forma più comune ed efficace di erogazione per farmaci di peso molecolare piccolo nonché grande. Tuttavia, il dolore, il disagio e l'inconveniente dovuto alle punture d'ago rende questa via di erogazione di farmaci la meno preferita dai pazienti. Pertanto, viene preferita qualsiasi tecnologia di erogazione di farmaci che possa ridurre al minimo il numero totale di iniezioni. Tali riduzioni di frequenza del dosaggio di farmaci, in pratica, possono essere ottenute attraverso l'utilizzo di formulazioni depot iniettabili che sono in grado di rilasciare farmaci in maniera lenta ma prevedibile e, di conseguenza, migliorare l'adesione alla terapia. Per la maggior parte dei farmaci, a seconda della dose, può essere possibile ridurre la frequenza di iniezione da quotidiana a una o due volte al mese o anche più a lungo (6 mesi). Oltre a migliorare il comfort del paziente, iniezioni meno frequenti di farmaci, sotto forma di formulazioni depot, appianano il profilo plasmatico concentrazione-tempo eliminando picchi e valli. Tale appianamento dei profili plasmatici ha il potenziale non solo di accrescere il beneficio terapeutico nella maggior parte dei casi, ma anche di ridurre qualsiasi evento indesiderato, come immunogenicità eccetera, spesso associato a farmaci di peso molecolare grande.

[0011] Microparticelle, impianti e gel sono le forme più comuni di dispositivi polimerici biodegradabili utilizzati nella pratica per prolungare il rilascio di farmaci nel corpo. Microparticelle sono sospese in un mezzo

Franco M...

PRLO24ESM

acquoso subito prima di un'iniezione e si possono caricare fino a 40% di solidi in sospensione. Formulazioni ad impianto/bastoncino vengono erogate al tessuto SC/IM con l'ausilio di aghi speciali allo stato secco senza la necessità di un mezzo acquoso. Questa caratteristica di bastoncini/impianti fa sì che vengano erogate masse più elevate di formulazione, nonché di contenuto di farmaci. Inoltre, nei bastoncini/impianti, i problemi iniziali di rilascio rapido sono ridotti al minimo a causa di un'area molto più piccola in impianti rispetto alle microparticelle. Oltre a sistemi biodegradabili, vi sono impianti e pompe per infusione non biodegradabili che possono essere portati all'esterno del corpo. Impianti non biodegradabili richiedono la visita di un medico non solo per impiantare il dispositivo nel tessuto SC/IM ma anche per rimuoverlo dopo il periodo di rilascio del farmaco.

[0012] Composizioni iniettabili contenenti preparazioni di microparticelle sono particolarmente suscettibili a problemi. Sospensioni di microparticelle possono contenere fino al 40% di solidi rispetto allo 0,5-5% di solidi in altri tipi di sospensioni iniettabili. Inoltre, le microparticelle utilizzate in prodotti depot iniettabili, variano in dimensioni fino a circa 250 μ m (media, 60-100 μ m), rispetto ad una dimensione delle particelle di meno di 5 μ m raccomandata per una somministrazione IM o SC. Le concentrazioni più elevate di solidi, nonché le dimensioni delle particelle solide maggiori richiedono dimensioni maggiori dell'ago (circa 18-21 gauge) per un'iniezione. Nel complesso, nonostante gli utilizzi poco frequenti di aghi più grandi e scomodi, i pazienti preferiscono ancora forme di dosaggio somministrate meno

Handwritten signature

PRLO24ESM

frequentemente rispetto ad iniezioni giornaliere di farmaci con un ago più piccolo.

[0013] Poliesteri biodegradabili di poli(acido lattico) (PLA) e copolimeri di lattide e glicolide indicati come poli (lattide-co-glicolide) (PLGA) sono i più comuni polimeri utilizzati in forme di dosaggio biodegradabili. PLA è una molecola idrofoba e PLGA si degrada più velocemente di PLA a causa della presenza di più gruppi glicolide idrofili. Questi polimeri biocompatibili subiscono un clivaggio casuale, non enzimatico, idrolitico dei collegamenti estere per formare acido lattico e acido glicolico, che sono composti metabolici normali nel corpo. Suture, clip e impianti riassorbibili sono le prime applicazioni di questi polimeri. Southern Research Institute ha sviluppato la prima sutura sintetica riassorbibile (Dexon®) nel 1970. Il primo brevetto che descrive l'utilizzo di polimeri PLGA in una forma di dosaggio a rilascio controllato apparve nel 1973 (US 3,773,919).

[0014] WO 2005/070332 A1 riguarda formulazioni di erogazione a lungo termine per un rilascio a lungo termine di farmaci a piccole molecole per disturbi del sistema nervoso.

[0015] WO 2005/041933 A1 riguarda composizioni farmaceutiche comprendenti una nanoparticella ed uno qualsiasi tra un peptide, un polisaccaride o una glicoproteina, attaccato elettrostaticamente ad essa per una somministrazione orale.

[0016] WO 2005/035088 A2 riguarda metodi di preparazione di particelle sferiche di un agente attivo mediante separazione di fase controllata.

PRLO24ESM

[0017] US 2005/0170005 A1 riguarda composizioni di particelle piccole microincapsulate di un agente attivo.

[0018] US 7,195,778 riguarda un dispositivo di erogazione di farmaci per somministrazione orale e rilascio controllato di farmaci.

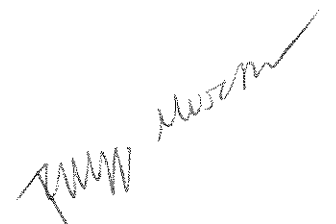
5 [0019] US2007/0081976 A1 riguarda bioconiugati comprendenti un polisaccaride solfato come alginato solfato e ialuronano solfato ed almeno un polipeptide bioattivo in grado di legare un gruppo solfato di detto polisaccaride solfato.

10 [0020] US 2004/0038887 A1 fornisce copolimeri casuali di tre- e quattro- amminoacidi aventi lunghezze di 14-, 35- e 50- residui amminoacidici (ma non Copaxone®) per il trattamento della sclerosi multipla.

[0021] WO 2007/059342 A2 riguarda copolimeri casuali (ma non Copaxone®) per il trattamento di SM.

15 [0022] Oggi, polimeri PLGA sono disponibili in commercio da fornitori multipli; Alkermes (Medisorb polymers), Absorbable Polymers International [in precedenza Birmingham Polymers (una divisione di Durect)], Purac and Boehringer Ingelheim. Oltre a PLGA e PLA, anche polimeri cellulosici naturali come amido, derivati dell'amido, destrano e
20 polimeri sintetici non PLGA vengono attualmente esaminati come polimeri biodegradabili in tali sistemi.

[0023] Al momento non sono disponibili forme di dosaggio a lunga durata d'azione di glatiramer acetato. Si tratta di un'enorme esigenza medica insoddisfatta, in quanto queste formulazioni sarebbero
25 estremamente vantaggiose per molti pazienti, in particolare per quelli con



PRL024ESM

sintomi neurologici o disabilità fisiche.

SOMMARIO DELL'INVENZIONE

[0024] L'invenzione riguarda le forme di realizzazione come descritte nelle rivendicazioni.

5 [0025] L'invenzione riguarda quanto segue:

Punto 1. Una composizione farmaceutica parenterale a lunga durata d'azione comprendente una quantità terapeuticamente efficace di glatiramer acetato e poli (D, L-lattide-co-glicolide) (PLGA) come veicolo biodegradabile farmaceuticamente accettabile, la composizione essendo in una forma depot a rilascio controllato adatta per uno schema di dosaggio da una volta a settimana ad una volta ogni 6 mesi in una dose che varia da 20 a 750mg di glatiramer acetato,

10

in cui la composizione comprende una fase acquosa interna comprendente una quantità terapeuticamente efficace di glatiramer acetato, una fase polimerica immiscibile in acqua comprendente PLGA e una fase acquosa esterna, e in cui la composizione è sotto forma di microparticelle preparate mediante un processo di emulsificazione doppia acqua-in olio-in acqua.

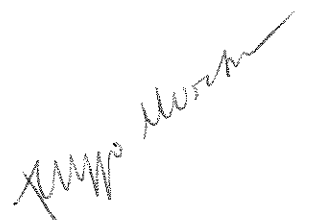
15

20

Punto 2. La composizione farmaceutica secondo il punto 1, che è in una forma depot adatta per un impianto in una posizione medicalmente accettabile in un soggetto che ne ha bisogno.

Punto 3. La composizione farmaceutica secondo il punto 1 o 2, che è adatta per uno schema di dosaggio da una volta ogni 2

25



PRLO24ESM

settimane ad una volta al mese.

- Punto 4. La composizione farmaceutica secondo il punto 1 o 2, in cui il glatiramer acetato comprende L-alanina, acido L-glutammico, L-lisina e L-tirosina in rapporti molari di 0,14 acido glutammico, 0,43 alanina, 0,10 tirosina e 0,33 lisina.
- Punto 5. La composizione farmaceutica secondo il punto 1 o 2, adatta per un impianto sottocutaneo o intramuscolare.
- Punto 6. La composizione farmaceutica secondo il punto 1, in cui la fase acquosa esterna comprende un tensioattivo selezionato tra alcol polivinilico (PVA), polisorbato, copolimeri a blocchi polietilene ossido-polipropilene ossido ed esteri di cellulosa.
- Punto 7. La composizione farmaceutica secondo il punto 1 o 2, in cui la composizione fornisce un'efficacia terapeutica pari o superiore alle forme di dosaggio iniettabili quotidiane disponibili in commercio di glatiramer acetato, con incidenza e/o gravità ridotte di effetti collaterali a livello locale e/o sistemico; e in cui la composizione fornisce inoltre un rilascio prolungato o un'azione prolungata di glatiramer in un soggetto rispetto ad una dose sostanzialmente simile di una formulazione a rilascio immediato di glatiramer acetato.
- Punto 8. Una composizione farmaceutica secondo il punto 1 da utilizzare nel trattamento della sclerosi multipla.
- Punto 9. La composizione farmaceutica da utilizzare nel trattamento

Handwritten signature: P. M. M. M. M.

PRLO24ESM

della sclerosi multipla secondo il punto 8, in cui il glatiramer acetato è somministrato in combinazione con almeno un altro agente attivo.

[0026] Nel presente documento vengono fornite composizioni farmaceutiche parenterali a lunga durata d'azione comprendenti una quantità terapeuticamente efficace di un sale farmaceuticamente accettabile di glatiramer, ad esempio glatiramer acetato. In particolare, viene fornita una composizione farmaceutica a lunga durata d'azione comprendente una quantità terapeuticamente efficace di un sale di glatiramer in una forma depot, adatta per una somministrazione parenterale in una posizione medicalmente accettabile in un soggetto che ne ha bisogno. La presente divulgazione fornisce inoltre un metodo per trattare la sclerosi multipla, comprendente la somministrazione parenterale o l'impianto di una composizione comprendente una quantità terapeuticamente efficace di un sale farmaceuticamente accettabile di glatiramer, preferibilmente glatiramer acetato.

[0027] Inaspettatamente è stato ora scoperto che le composizioni farmaceutiche a lunga durata d'azione secondo i principi della presente invenzione forniscono un'efficacia terapeutica pari o superiore alle forme di dosaggio iniettabili quotidiane disponibili in commercio, con incidenza e/o gravità ridotte di effetti collaterali a livello locale e/o a livelli sistemici.

[0028] Secondo alcune forme di realizzazione della divulgazione, il glatiramer acetato comprende il sale acetato di L-alanina, acido L-glutammico, L-lisina e L-tirosina nei rapporti molari di circa 0,14 acido glutammico, circa 0,43 alanina, circa 0,10 tirosina e circa 0,33 lisina.

Fulvio Meroni

PRLO24ESM

[0029] Secondo altre forme di realizzazione della divulgazione, il glatiramer acetato o altro sale farmaceuticamente accettabile di glatiramer comprende da circa 15 a circa 100 amminoacidi.

[0030] Secondo certe forme di realizzazione della divulgazione, il depot impiantabile è adatto per un impianto sottocutaneo o intramuscolare.

[0031] Secondo forme di realizzazione alternative della divulgazione, la composizione farmaceutica parenterale a lunga durata d'azione comprende un veicolo biodegradabile o non biodegradabile farmaceuticamente accettabile per sali di glatiramer come glatiramer acetato.

[0032] Secondo alcune forme di realizzazione della divulgazione, il veicolo è selezionato tra PLGA, PLA, PGA, policaprolattone, poliidrossibutirrato, poliortoesteri, polialcanoanidridi, gelatina, collagene, cellulosa ossidata e polifosfazene. Ogni possibilità rappresenta una forma di realizzazione separata dell'invenzione.

[0033] Secondo forme di realizzazione particolari della divulgazione, le composizioni farmaceutiche a lunga durata d'azione della presente invenzione sono sotto forma di microparticelle preparate mediante un processo di emulsificazione doppia acqua-in olio-in acqua. In forme di realizzazione attualmente preferite della divulgazione, le composizioni farmaceutiche a lunga durata d'azione della presente divulgazione comprendono una fase acquosa interna comprendente una quantità terapeuticamente efficace di un sale farmaceuticamente accettabile di glatiramer, una fase polimerica immiscibile in acqua comprendente un

PLM/Man

PRL024ESM

veicolo selezionato tra un polimero biodegradabile e uno non-biodegradabile, e una fase acquosa esterna. In altre forme di realizzazione attualmente preferite della divulgazione, la fase polimerica immiscibile in acqua comprende un polimero biodegradabile selezionato tra PLA e PLGA.

5 Ogni possibilità rappresenta una forma di realizzazione separata della divulgazione. In forme di realizzazione aggiuntive della divulgazione, la fase acquosa esterna comprende un tensioattivo selezionato tra alcol polivinilico (PVA), polisorbato, copolimeri a blocchi polietilene ossido-polipropilene ossido ed esteri di cellulosa. Ogni possibilità rappresenta
10 una forma di realizzazione separata della divulgazione.

[0034] La presente divulgazione racchiude l'utilizzo di glatiramer acetato o di qualsiasi altro sale farmaceuticamente accettabile di glatiramer in forma depot adatta per un impianto in un individuo che ne ha bisogno per il trattamento della sclerosi multipla.

15 **[0035]** La presente divulgazione racchiude inoltre l'utilizzo del depot impiantabile di glatiramer acetato adatto per fornire un rilascio prolungato o un'azione prolungata di glatiramer in un soggetto.

[0036] All'interno della portata della presente divulgazione vi è un sale farmaceuticamente accettabile di glatiramer in una forma depot
20 adatta per un utilizzo nel trattamento della sclerosi multipla o nel fornire un rilascio prolungato o un'azione prolungata di glatiramer in un soggetto.

[0037] La divulgazione racchiude anche la combinazione di un glatiramer acetato con almeno un farmaco aggiuntivo, preferibilmente un
25 immunosoppressore, in particolare fingolimod. Secondo alcune forme di

Falco

PRLO24ESM

realizzazione della divulgazione, la composizione farmaceutica a lunga durata d'azione è adatta per uno schema di dosaggio da una volta alla settimana ad una volta ogni 6 mesi.

[0038] Secondo forme di realizzazione particolari della divulgazione, la composizione è adatta per un dosaggio da una volta ogni 2 settimane ad una volta al mese.

[0039] Secondo alcune forme di realizzazione della divulgazione, le composizioni a lunga durata d'azione comprendono una dose tra 20-750mg di glatiramer acetato per iniezione.

[0040] Esempi specifici delle composizioni a lunga durata d'azione comprenderanno microsfele biodegradabili o non biodegradabili, impianti di qualsiasi forma geometrica adatta, bastoncini impiantabili, capsule impiantabili, anelli impiantabili, gel a rilascio prolungato e matrici erodibili. Ogni possibilità rappresenta una forma di realizzazione separata della divulgazione.

BREVE DESCRIZIONE DELLE FIGURE

[0041]

Figura 1. Rilascio di glatiramer acetato da formulazioni di microparticolato di PLGA MPG-02 - 07 in PBS a 37°C. I dati rappresentati sono normalizzati alla soluzione peptidica standard conservata nelle stesse condizioni.

Figura 2. Rilascio di glatiramer acetato da formulazioni di microparticolato di PLGA MPG-05R, 08-11 e tocoferil succinato sale di glatiramer (1:1), in PBS a 37°C. I dati rappresentati sono normalizzati alla soluzione peptidica standard immagazzinata nelle stesse condizioni.

PRL024ESM

Figura 3. Rilascio di glatiramer acetato da formulazioni di microparticolato di PLGA MPG-12 - 15 in PBS a 37°C. I dati presentati sono normalizzati alla soluzione standard peptidica conservata nelle stesse condizioni.

5 **Figura 4.** Rilascio di glatiramer acetato da formulazioni di microparticolato di PLGA MPG-14SU-1 e MPG-15SU-1 in vitro in PBS a 37°C, pH 7,4.

Figura 5. Rilascio di glatiramer acetato da formulazioni di microparticolato di PLGA MPG-14SU-2 e MPG-15SU-2 in vitro in PBS a
10 37°C, pH 7,4.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

[0042] La presente invenzione fornisce preparazioni farmaceutiche parenterali a lunga durata d'azione di glatiramer acetato che offrono un'efficacia terapeutica pari o superiore alle iniezioni quotidiane e che
15 quindi risultano in una adesione alla terapia aumentata da parte del paziente. Oltre a fornire la stessa efficacia terapeutica, le iniezioni o gli impianti a lunga durata d'azione riducono gli effetti collaterali di glatiramer (locali e/o sistemici), risultanti da iniezioni frequenti.

[0043] Nel presente documento viene fornita una composizione
20 farmaceutica parenterale a lunga durata d'azione comprendente una quantità terapeuticamente efficace di glatiramer acetato o qualsiasi altro sale farmaceuticamente accettabile di glatiramer. Il termine "parenterale" come utilizzato nel presente documento si riferisce a vie selezionate tra sottocutanea (SC), endovenosa (IV), intramuscolare (IM), intradermica
25 (ID), intraperitoneale (IP) e simili. Ogni possibilità rappresenta una forma

Handwritten signature

PRLO24ESM

di realizzazione separata. Il termine "quantità terapeuticamente efficace",
come utilizzato nel presente documento, è inteso a qualificare la quantità
di copolimero che raggiungerà l'obiettivo di alleviare i sintomi della
sclerosi multipla. Dosi adatte includono 20-750mg per ogni forma di
5 dosaggio. Tuttavia, resta inteso che la quantità somministrata del
copolimero sarà determinata da un medico, a seconda di parametri vari
inclusi la via di somministrazione scelta, l'età, il peso e la gravità dei
sintomi del paziente.

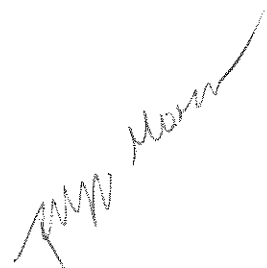
[0044] Secondo forme di realizzazione varie, la quantità
10 terapeuticamente efficace dell'almeno un copolimero varia da circa 1 mg
a circa 500 mg/giorno. In alternativa, tali quantità terapeuticamente
efficaci dell'almeno un copolimero vanno da circa 20 mg a circa 100
mg/giorno.

[0045] Inoltre viene fornita una composizione farmaceutica a lunga
15 durata d'azione comprendente una quantità terapeuticamente efficace di
glatiramer acetato o qualsiasi altro sale farmaceuticamente accettabile di
glatiramer in una forma depot adatta per una somministrazione in una
posizione medicalmente accettabile in un soggetto che ne ha bisogno. Il
termine "a lunga durata d'azione", come utilizzato nel presente
20 documento, si riferisce ad una composizione che fornisce un rilascio
prolungato, controllato o esteso del sale di glatiramer alla circolazione
sistemica generale di un soggetto o a siti locali di azione in un soggetto.
Questo termine può inoltre riferirsi ad una composizione che fornisce una
durata prolungata, controllata o estesa di azione (farmacocinetica) del
25 sale di glatiramer in un soggetto.

PRLO24ESM

[0046] In particolare, le composizioni farmaceutiche a lunga durata d'azione forniscono un regime di dosaggio che varia da una volta a settimana ad una volta ogni 6 mesi. Secondo forme di realizzazione attualmente più preferibili, il regime di dosaggio varia da una volta a settimana, due volte al mese (approssimativamente una volta ogni 2 settimane) ad una volta al mese. A seconda della durata di azione richiesta, ciascun dispositivo depot o impiantabile della presente invenzione conterrà tipicamente tra circa 20 e 750 mg del principio attivo, progettato per essere rilasciato per un periodo che varia da un paio di settimane ad un certo numero di mesi.

[0047] In alcune forme di realizzazione, le formulazioni depot fornite nel presente documento includono, ma non sono limitate a, sospensioni di glatiramer o suo sale farmaceuticamente accettabile in fase acquosa, oleosa o cerosa; complessi polielettrolitici scarsamente solubili di glatiramer o suo sale farmaceuticamente accettabile; matrici formanti gel "in-situ" basate sulla combinazione di un solvente miscibile in acqua con glatiramer o un suo sale farmaceuticamente accettabile; e microparticelle polimeriche biodegradabili con glatiramer o un suo sale farmaceuticamente accettabile incorporato. Ogni possibilità rappresenta una forma di realizzazione separata. In particolare, le composizioni fornite nel presente documento sono sotto forma di microparticelle iniettabili in cui il glatiramer o il suo sale farmaceuticamente accettabile viene intrappolato in un veicolo biodegradabile o non biodegradabile. Le composizioni di microparticolato fornite nel presente documento possono comprendere una emulsione doppia acqua-in olio-in acqua. Viene fornita



PRLO24ESM

una composizione di microparticolato comprendente una fase acquosa interna comprendente glatiramer o qualsiasi suo sale farmaceuticamente accettabile, una fase oleosa o una fase immiscibile in acqua comprendente un polimero biodegradabile o non biodegradabile ed una
5 fase acquosa esterna. La fase acquosa esterna può inoltre comprendere un tensioattivo, preferibilmente alcol polivinilico (PVA), polisorbato, copolimeri a blocchi polietilene ossido-polipropilene ossido o esteri di cellulosa. I termini "fase oleosa" e "fase immiscibile in acqua" possono essere utilizzati in modo intercambiabile nel presente documento.

10 **[0048]** Viene divulgato un metodo per trattare la sclerosi multipla mediante somministrazione parenterale di una composizione farmaceutica a lunga durata d'azione comprendente una quantità terapeuticamente efficace di glatiramer acetato o qualsiasi altro sale farmaceuticamente accettabile di glatiramer in un soggetto che ne ha
15 bisogno. Viene anche divulgato un metodo per trattare la sclerosi multipla, mediante somministrazione in un individuo che ne ha bisogno, di glatiramer acetato o qualsiasi altro sale farmaceuticamente accettabile di glatiramer in una forma depot. Il termine "trattare", come utilizzato nel presente documento, si riferisce alla soppressione o all'alleviamento di
20 sintomi dopo l'insorgenza della sclerosi multipla. Sintomi comuni dopo l'insorgenza della sclerosi multipla includono, ma non sono limitati a, riduzione o perdita della vista, andatura irregolare e malferma, difficoltà di parola, nonché frequenza e incontinenza urinaria. In aggiunta, la sclerosi multipla può causare cambiamenti dell'umore e depressione,
25 spasmi muscolari e paralisi grave. Il "soggetto" al quale viene

Handwritten signature

PRLO24ESM

somministrato il farmaco è un mammifero, preferibilmente, ma non limitato a, un essere umano. Il termine "sclerosi multipla", come utilizzato nel presente documento, si riferisce ad una malattia autoimmune del sistema nervoso centrale che è accompagnata da uno o più dei sintomi
5 sopra descritti.

[0049] Il termine "glatiramer acetato", come utilizzato nel presente documento, si riferisce ad un composto precedentemente noto come Copolimero 1 che viene venduto con il nome commerciale Copaxone® e che è costituito dai sali acetato di polipeptidi sintetici, contenenti quattro
10 amminoacidi presenti in natura: acido L-glutammico, L-alanina, L-tirosina e L-lisina con una frazione molare media di 0,141, 0,427, 0,095 e 0,338, rispettivamente. Il peso molecolare medio di glatiramer acetato in Copaxone® è di 4700-11000 dalton (etichetta FDA Copaxone®) e il
15 numero di amminoacidi varia da circa 15 a circa 100 aminoacidi. Il termine si riferisce anche a derivati e analoghi chimici del composto. Tipicamente il composto è preparato e caratterizzato come specificato in qualsiasi tra Brevetti US nn. 5,981,589; 6,054,430; 6,342,476; 6,362,161; 6,620,847; e 6,939,539.

[0050] In alcune forme di realizzazione, la composizione può
20 comprendere qualsiasi altro sale farmaceuticamente accettabile di glatiramer inclusi, ma non limitati a, solfato, piosolfato, bisolfato, solfito, bisolfito, fosfato, monoidrogenofosfato, diidrogenofosfato, metafosfato, pirofosfato, cloridrato, bromidrato, iodidrato, acetato, nitrato, propionato, decanoato, caprilato, acrilato, formiato, isobutirrato, caprato,
25 eptanoato, propiolato, ossalato, malonato, succinato, tocoferil succinato,

PRLO24ESM

suberato, sebacato, fumarato, maleato, butino-1,4-dioato, esino-1,6-dioato, benzoato, clorobenzoato, metilbenzoato, dinitrobenzoato, idrossibenzoato, metossibenzoato, ftalato, tereftalato, solfonato, xilenesolfonato, fenilacetato, fenilpropionato, fenilbutirrato, citrato, 5 lattato, β -idrossibutirrato, glicolato, tartrato, metansolfonato, propansolfonato, naftalene-2-solfonato, p-toluensolfonato, mandelato e sali simili. Ogni possibilità rappresenta una forma di realizzazione separata.

[0051] I copolimeri possono essere realizzati mediante qualsiasi 10 procedura disponibile per uno dei tecnici del ramo. Per esempio, i copolimeri possono essere realizzati in condizioni di condensazione utilizzando il rapporto molare desiderato di amminoacidi in soluzione, o mediante procedure sintetiche in fase solida. Condizioni di 15 condensazione includono le condizioni appropriate di temperatura, pH e solvente per condensare il gruppo carbossile di un amminoacido con il gruppo ammino di un altro amminoacido per formare un legame peptidico. Agenti condensanti, per esempio dicicloesilcarbodiimmide, possono essere utilizzati per facilitare la formazione del legame peptidico.

[0052] Gruppi bloccanti possono essere utilizzati per proteggere 20 gruppi funzionali, come le porzioni funzionali di catena laterale ed alcuni dei gruppi ammino o carbossile contro reazioni collaterali indesiderate. Il processo divulgato in Brevetto U.S. n. 3,849,550 può essere utilizzato per preparare i copolimeri dell'invenzione. Per esempio, le N-carbossianidridi di tirosina, alanina, γ -benzil glutammato e N, ϵ -trifluoroacetil-lisina sono 25 polimerizzate a temperature ambientali in diossano anidro con

John M. ...

PRLO24ESM

dietilammina come iniziatore. Il gruppo γ -carbossile dell'acido glutammico può essere sbloccato mediante idrogeno bromuro in acido acetico glaciale. I gruppi trifluoroacetile vengono rimossi dalla lisina mediante piperidina uno molare. Un tecnico del ramo capisce facilmente
5 che il processo può essere regolato per realizzare peptidi e polipeptidi contenenti gli aminoacidi desiderati, cioè tre dei quattro amminoacidi in Copolimero 1, eliminando selettivamente le reazioni che riguardano uno qualsiasi tra acido glutammico, alanina, tirosina o lisina. Brevetti U.S. nn. 6,620,847; 6,362,161; 6,342,476; 6,054,430; 6,048,898 e 5,981,589
10 divulgano metodi migliorati per la preparazione di glatiramer acetato (Cop-1). Nel presente documento, i termini "temperatura ambientale" e "temperatura ambiente" tipicamente indicano una temperatura che varia da circa 20°C a circa 26°C.

[0053] Il peso molecolare dei copolimeri può essere regolato durante
15 una sintesi di polipeptidi o dopo che i polimeri sono stati realizzati. Per regolare il peso molecolare durante una sintesi di polipeptidi, le condizioni sintetiche o le quantità di amminoacidi vengono regolate in modo che una sintesi si arresti quando il polipeptide raggiunge la lunghezza desiderata approssimativa. Dopo una sintesi, polipeptidi con
20 il peso molecolare desiderato possono essere ottenuti mediante qualsiasi procedura disponibile di selezione di dimensioni, come cromatografia dei polipeptidi su una colonna o gel di dimensionamento di peso molecolare, e raccolta degli intervalli desiderati di peso molecolare. I polipeptidi presenti possono anche essere parzialmente idrolizzati per rimuovere
25 specie a peso molecolare elevato, per esempio mediante idrolisi acida o

Handwritten signature

PRLO24ESM

enzimatica, e quindi purificati per rimuovere l'acido o gli enzimi.

[0054] In una forma di realizzazione, i copolimeri con un peso molecolare desiderato possono essere preparati mediante un processo che include la reazione di un polipeptide protetto con acido bromidrico per formare un trifluoroacetil-polipeptide avente il profilo di peso molecolare desiderato. La reazione viene eseguita per un tempo e ad una temperatura che sono predeterminati mediante una o più reazioni di test. Durante la reazione di test, il tempo e la temperatura vengono variati e viene determinato l'intervallo di peso molecolare di un determinato lotto di polipeptidi di test. Le condizioni di test che forniscono l'intervallo di peso molecolare ottimale per quel lotto di polipeptidi vengono utilizzate per il lotto. Pertanto, un trifluoroacetil-polipeptide avente il profilo di peso molecolare desiderato può essere prodotto mediante un processo che include la reazione del polipeptide protetto con acido bromidrico per un tempo e ad una temperatura predeterminati dalla reazione di test. Il trifluoroacetil-polipeptide con il profilo di peso molecolare desiderato viene quindi ulteriormente trattato con una soluzione acquosa di piperidina per formare un polipeptide deprotetto avente il peso molecolare desiderato.

[0055] In una forma di realizzazione preferita, un campione di test di polipeptide protetto da un dato lotto viene fatto reagire con acido bromidrico per circa 10-50 ore ad una temperatura di circa 20-28°C. Le condizioni migliori per quel lotto sono determinate eseguendo diverse reazioni di test. Per esempio, in una forma di realizzazione, il polipeptide protetto viene fatto reagire con acido bromidrico per circa 17 ore ad una

Handwritten signature

PRLO24ESM

temperatura di circa 26°C.

[0056] In certe forme di realizzazione, le forme di dosaggio includono, ma non sono limitate a, sistemi depot iniettabili biodegradabili come, sistemi depot iniettabili a base di PLGA; sistemi depot iniettabili non basati su PLGA, e gel o dispersioni biodegradabili iniettabili. Ogni possibilità rappresenta una forma di realizzazione separata.

[0057] Il termine "biodegradabile", come utilizzato nel presente documento, si riferisce ad un componente che si erode o si degrada sulla sua superficie nel tempo a causa, almeno in parte, di un contatto con sostanze presenti nei fluidi tissutali circostanti, o mediante azione cellulare. In particolare, il componente biodegradabile è un polimero come, ma non limitato a, polimeri a base di acido lattico come polilattidi, ad esempio poli(D,L-lattide), ossia PLA; polimeri a base di acido glicolico come poliglicolidi (PGA) ad esempio Lactel® di Durect; poli(D,L-lattide-co-glicolide) ossia PLGA, (Resomer® RG-504, Resomer® RG-502, Resomer® RG-504H, Resomer® RG-502H, Resomer® RG-504S, Resomer® RG-502S, da Boehringer, Lactel® di Durect); policaprolattone come Poli (ε-caprolattone) ossia PCL (Lactel® di Durect); polianidridi; poli(acido sebacico) SA; poli(acido ricenolico) RA; poli(acido fumarico), FA; poli(acido grasso dimero), FAD; poli(acido tereftalico), TA; poli(acido isoftalico), IPA; poli(p-{carbossifenossi}metano), CPM; poli(p-{carbossifenossi} propano), CPP; CPH poli(p-{carbossifenossi} esano); poliammine, poliuretani, poliesterammidi, poliortoesteri {CHDM: cis/trans cicloesil dimetanolo, HD: 1,6-esandiolo. DETOU: (3,9-dietilidene-2,4,8,10-tetraossaspiro undecano)}; polidiossanoni; poliidrossibutirati; polialchilene ossalati;

Filippo Aben

PRLO24ESM

poliammidi; poliesterammidi; poliuretani; poliacetali; polichetali;
policarbonati; poliortocarbonati; polisilossani; polifosfazeni; succinati;
acido ialuronico; poli(acido malico); poli(amminoacidi);
poliidrossivalerati; polialchilene succinati; polivinilpirrolidone;
5 polistirene; esteri di cellulosa sintetica; acidi poliacrilici; acido
polibutirrico; copolimeri triblocco (PLGA-PEG-PLGA), copolimeri
triblocco(PEG-PLGA-PEG), poli(N-isopropilacrilammide) (PNIPAAm),
poli(etilene ossido) - poli(propilene ossido) - poli(etilene ossido) copolimeri
triblocco(PEO-PPO-PEO), acido poli valerico; glicole polietilenico;
10 poliidrossialchilcellulosa; chitina; chitosano; poliortoesteri e copolimeri,
terpolimeri; lipidi come colesterolo, lecitina; poli(acido glutammico-co-
etil-glutammato) e simili, o loro miscele. In alcune forme di realizzazione,
le composizioni della presente divulgazione comprendono un polimero
biodegradabile selezionato tra, ma non limitato a, PLGA, PLA, PGA,
15 policaprolattone, poliidrossibutirrato, poliortoesteri, polialcanoanidridi,
gelatina, collagene, cellulosa ossidata, polifosfazene e simili. Ogni
possibilità rappresenta una forma di realizzazione separata.

[0058] Il polimero biodegradabile secondo l'invenzione è poli (D, L-
lattide-co-glicolide) ossia PLGA. Preferibilmente, il polimero
20 biodegradabile è presente in una quantità da circa il 10% a circa il 98%
p/p della composizione. Il polimero a base di acido lattico ha un rapporto
monomerico tra acido lattico e acido glicolico nell'intervallo da 100:0 a
circa 0:100, preferibilmente da 100:0 a circa 10:90 ed ha un peso
molecolare medio da circa 1000 a 200000 dalton. Tuttavia, resta inteso
25 che la quantità di polimero biodegradabile è determinata da parametri

PRLO24ESM

come la durata di utilizzo e simili.

[0059] Le composizioni fornite nel presente documento possono inoltre comprendere uno o più eccipienti farmaceuticamente accettabili selezionati tra, ma non limitati a, co-tensioattivi, solventi/co-solventi, solventi immiscibili in acqua, acqua, solventi miscibili in acqua, componenti oleosi, solventi idrofili, emulsionanti, conservanti, antiossidanti, agenti anti-schiumogeni, stabilizzanti, agenti tampone, agenti di regolazione del pH, agenti osmotici, agenti di formazione di canali, agenti di regolazione osmotica o qualsiasi altro eccipiente noto nell'arte. Co-tensioattivi adatti includono, ma non sono limitati a, polietilenglicoli, copolimeri a blocchi poliossietilene-poliossipropilene noti come "polossamero", esteri di acido grasso di poliglicerina come decagliceril monolaurato e decagliceril monomiristato, estere di acido grasso di sorbitano come sorbitano monostearato, estere di acido grasso di poliossietilene sorbitano come poliossietilene sorbitano monooleato (Tween), estere di acido grasso di polietilenglicole come poliossietilene monostearato, poliossietilene alchil etere come poliossietilene lauril etere, poliossietilene olio di ricino e olio di ricino indurito come poliossietilene olio di ricino indurito, e simili o loro miscele. Ogni possibilità rappresenta una forma di realizzazione separata. Solventi/co-solventi adatti includono, ma non sono limitati a, alcoli, triacetina, dimetil isosorbide, glicofurolo, propilene carbonato, acqua, dimetil acetammide, e simili o loro miscele. Ogni possibilità rappresenta una forma di realizzazione separata. Agenti anti-schiumogeni adatti includono, ma non sono limitati a, emulsioni di silicio o sorbitano sesquioleato. Stabilizzanti adatti per

Handwritten signature

PRL024ESM

impedire o ridurre il deterioramento dei componenti nelle composizioni della presente invenzione includono, ma non sono limitati a, antiossidanti come glicina, a-tocoferolo o ascorbato, BHA, BHT, e simili o loro miscele. Ogni possibilità rappresenta una forma di realizzazione
5 separata. Modificatori di tonicità adatti includono, ma non sono limitati a, mannitolo, sodio cloruro e glucosio. Ogni possibilità rappresenta una forma di realizzazione separata. Agenti tampone adatti includono, ma non sono limitati a, acetati, fosfati e citrati con cationi adatti. Ogni possibilità rappresenta una forma di realizzazione separata.

10 **[0060]** Le composizioni fornite nel presente documento possono essere preparate mediante qualsiasi maniera nota nell'arte. Attualmente è preferita l'incorporazione del copolimero di glatiramer o suo sale in un sistema di erogazione colloidale, ad esempio, microparticelle biodegradabili, consentendo così un ritardo nel rilascio mediante
15 diffusione attraverso pareti polimeriche della particella e mediante degradazione di polimero in un mezzo acquoso o fluidi biologici nel corpo. Le composizioni fornite nel presente documento possono essere preparate sotto forma di microparticelle iniettabili mediante un processo noto come "emulsificazione doppia". In breve, la soluzione concentrata del
20 copolimero solubile in acqua viene dispersa in una soluzione del polimero biodegradabile o non biodegradabile in un solvente organico volatile immiscibile in acqua (ad esempio cloruro di metilene, cloroformio e simili). L'emulsione "acqua-in-olio" (a/o) così ottenuta viene quindi dispersa in una fase acquosa continua esterna contenente un
25 tensioattivo (ad esempio alcol polivinilico - PVA, polisorbati, copolimeri a

PMP Mon

PRL024ESM

blocchi polietilene ossido-polipropilene ossido, esteri di cellulosa e simili) per formare gocce di "emulsione doppia acqua-in olio-in acqua (a/o/a)". Dopo evaporazione del solvente organico, le microparticelle si solidificano e vengono raccolte mediante filtrazione o centrifugazione. Le
5 microparticelle(MP)raccolte vengono lavate con acqua purificata per eliminare la maggior parte del tensioattivo e del peptide non legato e nuovamente centrifugate. Le MP lavate vengono raccolte e liofilizzate senza additivi o con l'aggiunta di un crioprotettore (mannitolo) per facilitare la loro successiva ricostituzione.

10 **[0061]** La dimensione delle particelle della "emulsione doppia acqua-in olio-in acqua (a/o/a)" può essere determinata mediante parametri vari inclusi, ma non limitati a, la quantità di forza applicata in questo passaggio, la velocità di miscelazione, tipo e concentrazione di tensioattivo, eccetera. Dimensioni delle particelle adatte variano da circa
15 1 a 100 μm .

I sistemi depot forniti nel presente documento racchiudono qualsiasi forma nota ad un tecnico del ramo. Forme adatte includono, ma non sono limitate a, microsferi biodegradabili o non biodegradabili, bastoncini impiantabili, capsule impiantabili ed anelli impiantabili. Ogni possibilità
20 rappresenta una forma di realizzazione separata.

[0062] Sono inoltre contemplati gel depot e matrici erodibili a rilascio prolungato. Ogni possibilità rappresenta una forma di realizzazione separata.

Per esempio, sistemi impiantabili adatti sono descritti in US
25 2008/0063687.

PRL024ESM

[0063] Bastoncini impiantabili possono essere preparati come è noto nell'arte, utilizzando micro-estrusori adatti come quelli descritti per esempio in <http://www.randcastle.com/prodinfo.html>.

[0064] Secondo i principi della presente invenzione, le composizioni
5 farmaceutiche a lunga durata d'azione della presente invenzione forniscono un'efficacia terapeutica pari o superiore alle forme di dosaggio iniettabili quotidiane disponibili in commercio, con incidenza ridotta di effetti collaterali e con gravità ridotta di effetti collaterali a livello locale e/o a livello sistemico. In alcune forme di realizzazione, le composizioni
10 della presente invenzione forniscono un rilascio prolungato o un'azione prolungata di glatiramer in un soggetto rispetto ad una dose sostanzialmente simile di una formulazione a rilascio immediato di glatiramer acetato.

Nel presente documento è racchiusa una terapia di combinazione di
15 glatiramer acetato o qualsiasi altro sale farmaceuticamente accettabile di glatiramer con almeno un altro agente attivo. Agenti attivi all'interno della portata della presente invenzione includono, ma non sono limitati a, interferoni, ad esempio interferoni α pegilati o non-pegilati, o interferoni β , ad esempio interferone β -1a o l'interferone β -1b, o interferoni τ ;
20 immunosoppressori facoltativamente con attività antiproliferativa/antineoplastica, ad esempio mitoxantrone, metotrexato, azatioprina, ciclofosfamide o steroidi, ad esempio metilprednisolone, prednisone o desametasone o agenti steroideo-secerntenti, ad esempio ACTH; inibitori dell'adenosina deaminasi, ad esempio cladribina;
25 immunoglobulina G IV(ad esempio, come divulgato in Neurology, 1998,

PRLO24ESM

maggio 50(5): 1273-81) anticorpi monoclonali contro vari marcatori di superficie di cellule T, ad esempio natalizumab (ANTEGREN®) o alemtuzumab; citochine che promuovono TH2, ad esempio IL-4, IL-10, o composti che inibiscono l'espressione di citochine che promuovono TH1, ad esempio, inibitori della fosfodiesterasi, ad esempio pentossifillina; 5 agenti antispastici inclusi baclofen, diazepam, piracetam, dantrolene, lamotrigina, rifluzolo, tizanidina, clonidina, beta-bloccanti, ciproeptadina, orfenadrina o cannabinoidi; antagonisti del recettore del glutammato AMPA, ad esempio 2,3-diidrossi-6-nitro-7-sulfamoilbenzo(f)chinossalina, [1,2,3,4, -tetraidro-7-morfolin-il-2,3-10 diosso-6- (trifluorometil) chinossalin-il] metilfosfonato, 1 - (4-amminofenil) -4-metil-7,8-metilene-diossi-5H-2,3-benzodiazepina o (-) 1 - (4-amminofenil) -4-metil-7,8-metilene-diossi-4,5-diidro-3-metilcarbamoil-2,3-benzodiazepina; inibitori dell'espressione di VCAM-1 15 o antagonisti del suo ligando, ad esempio, antagonisti della integrina $\alpha 4\beta 1$ VLA-4 e/o delle integrine $\alpha 4\beta 7$, ad esempio natalizumab (ANTEGREN®); fattore inibitorio della migrazione anti-macrofagi (Anti-MIF); xii) inibitori della catepsina S; xiii) inibitori mTor. Ogni possibilità rappresenta una forma di realizzazione separata. Attualmente preferito 20 un altro agente attivo è FTY720 (2-ammino-2-[2- (4-ottilfenil)etil]propano-1,3-diolo; fingolimod) appartenente alla classe degli immunosoppressori.

[0065] I seguenti esempi sono presentati allo scopo di illustrare più completamente certe forme di realizzazione dell'invenzione.

Esempi

25 **Esempio 1: Metodi generali di preparazione**

PRL024ESM

Particelle depot iniettabili a base di PLGA

[0066] Sono state preparate microparticelle mediante un metodo di estrazione/evaporazione con solvente (emulsione singola). Una soluzione 50:50, diclorometano/etanolo contenente 250mg di PLGA e 200 mg di
5 glatiramer acetato è stata versata lentamente in una soluzione acquosa (200ml) contenente PVA 2% ed emulsionata utilizzando un agitatore meccanico (300 rpm) a 25°C. Il solvente organico è stato fatto evaporare sotto agitazione (100 rpm) per 2 ore. Le microparticelle così formate sono state raccolte mediante centrifugazione e lavate con acqua distillata per
10 rimuovere un emulsionante eccessivo. La sospensione finale è stata quindi liofilizzata per ottenere una polvere fine.

Particelle depot iniettabili a base di policaprolattone

[0067] Sono state preparate microparticelle mediante un metodo di estrazione/evaporazione con solvente (emulsione singola). Una soluzione
15 70:30, diclorometano/acetone contenente 500mg di policaprolattone e 200 mg di glatiramer acetato è stata versata lentamente in una soluzione acquosa (200ml) contenente PVA 2%. Tween 80 1% ed emulsionata utilizzando un agitatore meccanico (500 rpm) a 25°C. Il solvente organico è stato fatto evaporare sotto agitazione (300 rpm) per 4 ore. Le
20 microparticelle formate sono state raccolte mediante centrifugazione e lavate con acqua distillata per rimuovere emulsionanti eccessivi. La sospensione finale è stata quindi liofilizzata per ottenere una polvere fine.

Bastoncini di impianto a base di PLGA

[0068] Sono stati preparati impianti biodegradabili a forma di
25 bastoncino a base di PLGA, 20mm in lunghezza e 2mm in diametro,

Filippo Mazzini

PRL024ESM

mediante un metodo di estrazione/evaporazione con solvente. Una soluzione 50:50, diclorometano/etanolo contenente 250mg di PLGA e 200 mg di glatiramer acetato è stata versata lentamente in uno stampo speciale a forma di bastoncino. Il solvente organico è stato fatto evaporare
5 in un forno sotto vuoto per 12 ore a temperatura ambiente. In alternativa l'impianto a forma di bastoncino è stato preparato mediante estrusione della miscela di 250 mg di PLGA e 200 mg di glatiramer a 85-90°C, utilizzando un estrusore a vite (Microtruder Rancastle RCP-0250 o simile), con diametro del punzone di 0,8 o 1,0 mm.

10 **Esempio 2: Metodo analitico - saggio di glatiramer acetato**

Attrezzatura

[0069]

Spettrofotometro

Bilancia analitica, in grado di pesare con precisione fino a 0,01 mg

15 Materiali e Reagenti

[0070]

Glatiramer acetato 83% come standard di riferimento

acido 2, 4, 6-trinitrobenzensolfonico (TNBS, acido picrilsolfonico,
170,5 mM) 5% in MeOH

20 tampone borato 0,1 M pH 9,3 (sodio tetraborato decaidrato MW 381,37)

acqua, purificata

pipette volumetriche per 0,5, 1,0, 2,0 e 7,0 mL

vetreria varia.

25 Preparazioni

PRLO24ESM

Preparazione di una soluzione madre di glatiramer 400 ug/mL

[0071] 4,8 mg di glatiramer acetato (potenza 83% come base per uno standard di riferimento) sono stati pesati in una beuta volumetrica da 10ml. Sono stati aggiunti approssimativamente 7ml di tampone borato 0,1M per consentire una dissoluzione del glatiramer acetato in un bagno ad ultrasuoni. La soluzione è stata ulteriormente diluita con tampone borato 0,1M per ottenere una soluzione madre di glatiramer 400 µg/ml (come base).

Preparazione di una soluzione di lavoro di TNBS 0,25%

[0072] Prima dell'utilizzo, la soluzione madre 5% di TNBS è stata diluita con acqua (20 volte, ad esempio 50 µl e 950 µl di acqua) per ottenere una soluzione di lavoro di TNBS 0,25%.

Preparazione di standard di curve di calibrazione

[0073] Otto soluzioni standard di calibrazione di glatiramer (cSTD, 4ml ciascuna) sono state preparate secondo la Tabella 1.

Tabella 1. Soluzioni standard di glatiramer acetato

| cSTD # | Concentrazione di glatiramer µg/ml (come base) | Volume di soluzione madre di glatiramer (ml) | Volume di glatiramer Std 3 (ml) | Volume di tampone borato 0,1M (ml) |
|--------|--|--|---------------------------------|------------------------------------|
| Std 0 | 0 | | - | 4 |
| Std 1 | 2 | | 0,4 | 3,6 |
| Std 2 | 10 | | 2 | 2 |
| Std 3 | 20 | 0,2 | | 3,8 |
| Std 4 | 50 | 0,5 | | 3,5 |
| Std 5 | 100 | 1 | | 3 |
| Std 6 | 200 | 2 | | 2 |
| Std 7 | 400 | 4 | | - |

M. Maschi

PRL024ESM

Misurazione della densità ottica

[0074] 1,0 ml di ciascuna soluzione standard di calibrazione di glatiramer, campioni (in duplicato) e bianco del reagente (tampone borato 0,1M) è stato trasferito in una provetta da centrifuga in polipropilene da
5 1,5 ml, a cui sono stati aggiunti 50 µl di soluzione di lavoro di TNBS 0,25%. La soluzione è stata accuratamente miscelata e mantenuta a temperatura ambiente per 30 minuti. Le densità ottiche di ciascuna delle soluzioni ottenute sono state lette a 420nm e 700nm e la differenza di queste densità è stata calcolata per evitare un errore dovuto alla
10 dispersione di luce in sistemi colloidali. È stata calcolata una curva di calibrazione per l'intervallo selezionato di concentrazioni.

Criteri di accettazione

[0075] La differenza tra risultati per preparazioni di campione duplicato era NMT 5%, calcolata mediante l'equazione seguente:

$$15 \quad D = \frac{(R_{spl1} - R_{spl2}) \times 2}{R_{spl1} + R_{spl2}} \times 100,$$

in cui R_{spl1} è il risultato ottenuto per il campione 1 e R_{spl2} è il risultato ottenuto per il campione 2.

Esempio 3: Preparazione di microparticelle di PLGA caricate con glatiramer acetato

20 **[0076]** Fase acquosa (continua) esterna: 30 ml di soluzione di NaCl 0,75% in acqua purificata, contenente inoltre alcol polivinilico (PVA) 0,5% parzialmente idrolizzato (87-89%) come tensioattivo, polisorbato-80 (Tween-80) 0,2% per MPG-10 e PVA 2% per una preparazione di MP di bianco.

Handwritten signature and initials:
M.M. M.S. (likely M. M. M. S. or similar)

PRL024ESM

[0077] Fase acquosa interna (per soluzione peptidica): 150-200 ml di acqua purificata per 25-30 mg di glatiramer acetato. Il glatiramer acetato è stato disciolto in acqua utilizzando un bagno ad ultrasuoni.

[0078] Soluzione polimerica organica (fase oleosa): 165-300 mg di PLGA in 2-5 mL di cloruro di metilene. Facoltativamente, un contro-ione è stato ulteriormente disciolto o disperso nella fase organica.

Procedimenti di preparazione

[0079] Preparazione di un'emulsione acqua in olio (a/o): una fase acquosa interna, contenente glatiramer acetato disciolto, è stata miscelata direttamente nella provetta di test con la fase oleosa contenente una soluzione di PLGA in CH_2Cl_2 . La miscela è stata accuratamente agitata con scuotimento e trattata con un indentatore ad ultrasuoni (punta in titanio, potenza massima 120 watt, potenza operativa 10-15%, 3-5 cicli di 5 secondi). Un raffreddamento è stato facoltativamente applicato utilizzando ghiaccio o acqua ghiacciata per evitare l'ebollizione del cloruro di metilene.

[0080] Preparazione di una emulsione doppia (a/o/a): l'emulsione a/o così ottenuta della soluzione di glatiramer acetato in soluzione organica polimerica di PLGA, è stata ulteriormente trattata con un miscelatore ad elevata azione di taglio (mixer piccolo, VDI-12, diametro dell'albero 10 mm e miscelatore più grande, OMNI-1100, diametro dell'albero 18 mm) a varie velocità per 30-120 secondi.

[0081] Eliminazione del solvente: un becher aperto con l'emulsione doppia così formata è stato posto sull'agitatore magnetico a piastra ed agitato per 3-4 ore a temperatura ambiente in una cappa aspirante fino

PLGA
Mosher

PRLO24ESM

a quando tutto il cloruro di metilene è evaporato e le microparticelle si sono solidificate.

[0082] Centrifugazione di microparticelle: la sospensione di microparticelle solidificate è stata centrifugata a 2000 - 5000g per 10 minuti, il surnatante è stato trasferito in un recipiente separato e analizzato per il contenuto di glatiramer acetato per stimare l'incorporazione e il legame del peptide.

[0083] Lavaggio di microparticelle: le microparticelle sedimentate dalla procedura sopra descritta sono state sospese in 10 ml di acqua purificata utilizzando un miscelatore vortex e un bagno ad ultrasuoni e agitate o sonicate per 2-3 minuti. La sospensione delle microparticelle è stata nuovamente centrifugata a 2000 - 5000g per 10 minuti, il surnatante è stato trasferito in un recipiente separato e analizzato per il contenuto di glatiramer acetato.

[0084] Liofilizzazione: il precipitato lavato di microparticelle è stato ri-sospeso in 3-5 ml di acqua purificata o mannitolo 5%, trasferito in fiale di vetro pre-pesate da 10 ml, congelato utilizzando un set di piastre di liofilizzatore a -37-43°C e liofilizzato (essiccamento principale per 16-48 ore a -20°C e sotto vuoto 0,05 bar, essiccamento finale per 12-16 ore a +20°C e 0,025 bar). Le fiale, dopo liofilizzazione, sono state pesate, chiuse con tappi di gomma bromobutilica e conservate in condizioni di conservazione di frigorifero fino al momento dell'utilizzo.

[0085] Stima della dimensione delle particelle: la dimensione delle particelle delle microparticelle è stata valutata utilizzando microscopia a campo chiaro e contrasto di fase (Leutz Orthoplan™, Germania) con

*Tutti
Aban*

PRLO24ESM

obiettivi 40x e 10x e micrometro per portaoggetti con intervallo di 1-1000 μm .

5 **[0086]** Tutte le formulazioni di microparticelle sono state preparate utilizzando una fase acquosa contenente cloruro di sodio 0,75% per aumentare la pressione osmotica esterna e migliorare l'incorporazione del farmaco carico solubile in acqua. Microparticelle di bianco (vuote) (primo esperimento) sono state ottenute con PVA 2% come tensioattivo, mentre per la preparazione di tutte le formulazioni caricate di peptide è stato utilizzato PVA 0,5%.

10 **[0087]** Composizioni e parametri del processo di preparazione sono presentati nelle Tabelle 2-5.

Tabella 2. Microparticelle di PLGA per rilascio controllato di glatiramer acetato (GA) (formulazioni 1-4)

Talpa Nishi

PRL024ESM

| | MP Bianco | MPG-01 | MPG-02 | MPG-03 | MPG-04 |
|---|---|--|--|--|--|
| Fase acquosa interna | | | | | |
| GA, mg | | 17 | 60,25 | 30 | 18,7 |
| GA base secca, mg | 0 | 14,11 | 50,0 | 24,9 | 15,5 |
| Acqua per GA, µl | | 100 | 400 | 200 | 100+50 µl di PVA 2% |
| Polimero nella fase oleosa | | | | | |
| PLGA RG 502H, mg | 315 | 270 | | | 165 |
| PLGA RG 502, mg | | | 500 | 220 | |
| Fase oleosa | | | | | |
| Tocoferil succinato | | 100 | 120 | 50 | 65 |
| Cloruro di metilene | 2ml (2,3g) | 4,5 g | 9g | 3,2 g | 3g |
| Fase acquosa esterna | | | | | |
| EVA (2% o 0,5%) | 23 ml 2% | 65 ml 0,5% | 60 ml 0,5% | 30 ml 0,5% | 30 ml 0,5% |
| NaCl | 0 | 0,5 g | 0,5 g | 0,25 g | 0,25 g |
| Descrizione del processo di preparazione (processore, set di velocità, durata di evaporazione) | | | | | |
| | IKA VDI-12 #5 30 sec, evap. per una notte RT agitatore magnetico | IKA VDI-12 #5 2 min, evap. per una notte RT agitatore magnetico | IKA VDI-12 #5 2 min, evap. per una notte RT agitatore magnetico | IKA VDI-12 #5 2 min, evap. 4 ore RT agitatore magnetico | IKA VDI-12 #5 2 min, evap. 4 ore RT agitatore magnetico |
| Descrizione delle microparticelle | | | | | |
| | MP sferiche 10-50 µm superficie liscia | MP sferiche 5-20 µm superficie porosa | MP aggregate 10-30 µm superficie porosa | MP sferiche 10-15 µm superficie leggermente porosa | MP sferiche 10-15 µm superficie leggermente porosa |
| Legame (associazione con MP) | | | | | |
| | | 86% | 34% | 61% | 70% |

[0088] Un miscelatore ad elevata azione di taglio VWR VDI-12 da IKA Germania con diametro piccolo dello statore (albero 12mm) e intervallo di velocità 8-30000 rpm è stato impostato in posizione #5 (circa 24000 rpm). È stato utilizzato un trattamento breve (30 sec) di una soluzione PLGA approssimativamente 10% in cloruro di metilene in una fase di PVA 2% per preparare un campione di MP di bianco, il che è risultato in microparticelle sferiche lisce con una distribuzione di dimensioni relativamente ampia (10-50 µm). A causa della formazione di schiuma, è stato effettuato un ulteriore processo a concentrazione più bassa di tensioattivo. Anche il tempo di omogeneizzazione è stato esteso (trattamento di 1 o 2 minuti) per ottenere una distribuzione di dimensioni

TMP Muzum

PRLO24ESM

più ristretta.

[0089] A causa della presenza di una fase acquosa interna nell'emulsione doppia, tutte le microparticelle preparate con il peptide di glatiramer presentavano inclusioni e segni di porosità visibili sulla
5 superficie di MP o all'interno della particella, quando osservati al microscopio ottico.

Tabella 3. Microparticelle di PLGA per rilascio controllato di glatiramer acetato (GA) (formulazioni 5-7)

PLGA *Alcova*

PRL024ESM

| | MPG-05 | MPG-06 | MPG-07 |
|--|--|--|---|
| Fase acquosa interna | | | |
| GA, mg | 30,8 | 20 | 20 |
| GA base secca, mg | 25,6 | 16,6 | 16,6 |
| Acqua per GA, µl | 100+50 PVA 2% | 166 | 175 |
| Polimero nella fase oleosa | | | |
| PLGA RG 502H, mg | 165 | | |
| PLGA RG 502, mg | | 200 | 250 |
| Fase oleosa | | | |
| Dicetilfosfato | | 75 | |
| Dimiristoilfosfatid il glicerolo sodico (DMPG Na) | | | 60 |
| Cloruro di metilene | 2,7 g | 2,5 g | 3,25 g |
| Fase acquosa esterna | | | |
| PVA (0,5%) | 30 ml | 30 ml | 30 ml |
| NaCl | 0,25 g | 0,25 g | 0,25 g |
| Osservazioni e commenti | | Fiocchi formati da DCP e GA | DMPG Na è scarsamente solubile in CH ₂ Cl ₂ |
| Descrizione del processo di preparazione (processore, set di velocità, durata di evaporazione) | IKA VDI-12 #5 2 min, evaporazione 4 ore RT agitatore magnetico | IKA VDI-12 #5 2 min, evaporazione 4 ore RT agitatore magnetico | IKA VDI-12 #5 2 min, evaporazione 4 ore RT agitatore magnetico |
| Descrizione delle microparticelle | MP sferiche 10-15 µm superficie leggermente porosa | particelle irregolari | MP sferiche 5-15 µm |
| Legame (associazione con MP) | 81% | 76% | 84% |

[0090] Le microparticelle caricate di glatiramer acetato formate sono state centrifugate; il pellet è stato ri-sospeso in acqua purificata, lavato e centrifugato ripetutamente. Il surnatante e in alcuni casi l'acqua di lavaggio sono stati analizzati per il contenuto di glatiramer acetato. Il precipitato centrifugato è stato ri-sospeso in acqua purificata o soluzione di mannitolo 5% e liofilizzato.

Tabella 4: Microparticelle di PLGA per rilascio controllato di glatiramer

Polym. Nazam

PRLO24ESM

acetato (GA) (formulazioni 05R, 08-011 e tocoferil succinato sale di
glatiramer)

| | MPG-08 | MPG-09 | MPG-10 | MPG-11 | MPG-05R | Tocoferil succinato sale 1:1 |
|--|---|---|---|---|---|--|
| Fase acquosa interna | | | | | | |
| GA, mg | 30,1 | 30,1 | 30,1 | 30,1 | 30,9 | 30,1 |
| GA base secca, mg | 25,0 | 25,0 | 25,0 | 25,0 | 25,6 | 25,0 |
| Acqua, ml | 150 | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 |
| Polimero | | | | | | |
| PIGA RS 5021, mg | 165 | 165 | | | 165 | |
| PIGA RS-503, mg | | | 165 | 165 | | 0 |
| Fase oleosa | | | | | | |
| Tocoferil succinato, mg | 20 | 50 | 20 | 50 | 0 | 50 |
| Cloruro di metilene | 2,7 g | 2,7 g | 2,7 g | 3,2 g | 3,7 g | 2 g |
| Fase acquosa esterna | | | | | | |
| Tensioattivo | 30 ml EVA 0,5% | 30 ml EVA 0,5% | 30 ml D, 23 Tw60 | 30 ml EVA 0,5% | 30 ml EVA 0,5% | 30mlH ₂ O |
| NaCl | 0,25 g | 0,25 g | 0,25 g | 0,25 g | 0,25g | - |
| Descrizione del processo di preparazione (processore, set di velocità, durata di evaporazione) | OMNI GLH #4 1 min, evap. 4 ore RT agitatore magnetico | OMNI GLH #4 1 min, evap. 4 ore RT agitatore magnetico | OMNI GLH #4 1 min, evap. 4 ore RT agitatore magnetico | OMNI GLH #4 1 min, evap. 4 ore RT agitatore magnetico | IKA VDI-12 #5 2 min, evap. 4 ore RT agitatore magnetico | 22 kHz indentatore al titanio sonicazione 13W 60 sec |
| Descrizione delle microparticelle | MP sferiche 2-3 µm lisce | MP sferiche 1-3 µm lisce | MP sferiche 3-5x20 µm lisce | MP sferiche MP 2-4 µm lisce | MP sferiche 1-10 µm con inclusioni | Agglomerato sferico 30-100 µm |
| Legame (associazione con MP) | 82% | 87% | 46% | 85% | 93% | 89% |

[0091] Una formulazione di un complesso equimolare (sale) di
5 tocoferil succinato (MW 530, un COOH eq. 265 Dalton) e glatiramer
acetato (MW 4700-11000, un NH₂ eq. ~693 Dalton) è stata preparata
sospendendo una soluzione acquosa di glatiramer in cloruro di metilene
con una quantità equimolare precedentemente dissolta di tocoferil
succinato con l'aiuto di un indentatore ultrasonico per 60 secondi (6x10
10 sec) con raffreddamento con ghiaccio. Dopo evaporazione del solvente
organico e dell'acqua, il prodotto insolubile in acqua così formato è stato
raccolto, lavato con acqua purificata e con etanolo secco e sottoposto ad
ulteriori indagini senza purificazione aggiuntiva.

Handwritten signature: TUMM M524

Tabella 5. Microparticelle di PLGA per rilascio controllato di glatiramer acetato (GA) (formulazioni MPG-12 - 15)

| | MPG-12 | MPG-13 | MPG-14 | MPG-15 |
|--|--|--|--|--|
| Fase acquosa interna | | | | |
| GA, mg | 31,8 | 31,8 | 31,5 | 31,7 |
| GA base secca, mg | 26,4 | 26,4 | 26,1 | 26,3 |
| Acqua, µl | 200 | 200 | 200 | 200 |
| Polimero nella fase oleosa | | | | |
| PLGA RS 502H, mg | 200 | 250 | 300 | 165 |
| Fase oleosa | | | | |
| Tocoferil succinato, mg | | | | 9 |
| Cloruro di metilene | 2,6 g | 2,7 g | 2,7 g | 2,6 g |
| Fase acquosa esterna | | | | |
| soluzione di PVA 0,5% | 30 ml | 30 ml | 30 ml | 30 ml |
| NaCl | 0,25 g | 0,25 g | 0,25 g | 0,25 g |
| Processo di preparazione | | | | |
| Descrizione del processo di preparazione (processore, set di velocità, durata di evaporazione) | IKA VDI-12 #5 (1 min), evaporazione 4 ore RT agitatore magnetico | IKA VDI-12 #5 (1 min), evaporazione 4 ore RT agitatore magnetico | IKA VDI-12 #5 (1 min), evaporazione 4 ore RT agitatore magnetico | IKA VDI-12 #6 20sec, #5 40sec, evaporazione 4 ore RT agitatore magnetico |
| Descrizione delle microparticelle | | | | |
| Descrizione delle microparticelle | particelle sferiche 10-15 µm con inclusioni | particelle sferiche 10-15 µm con inclusioni | particelle sferiche 10-15 µm con inclusioni | particelle sferiche 6-10 µm con inclusioni; aggregati |
| Legame (associazione con NP) | | | | |
| Legame (associazione con NP) | 85,4% | 94,9% | 96,4% | 70,9% |
| Rilascio rapido (rilascio a 1 ora) | | | | |
| Rilascio rapido (rilascio a 1 ora) | 18,9% | 8,5% | 9,5% | 13,6% |
| Quantità di GA, rilasciata tra il giorno 4 e il giorno 11 | | | | |
| Quantità di GA, rilasciata tra il giorno 4 e il giorno 11 | 25,6% | 21,0% | 32,7% | 19,6% |

Liofilizzazione

- 5 [0092] Formulazioni di microparticolato, dopo centrifugazione e lavaggio, sono state liofilizzate "così come sono", in seguito a ri-sospensione di sedimento in acqua purificata o, in alcuni casi, con l'aggiunta di crioprotettore (il sedimento è stato ri-sospeso in una

Handwritten signature: PRL024ESM

PRLO24ESM

soluzione di mannitolo 5%). Campioni sono stati congelati per 1 ora a -37--43°C utilizzando la piastra liofilizzante, e liofilizzati utilizzando un liofilizzatore "Alpha 2-4 LSC" (Christ, Germania) per 24-48 ore a pressione 0,050 mbar e -20°C, essiccamento finale a 0,025 mbar e +20°C per 10-16 ore. In entrambe le procedure di ri-sospensione, il prodotto liofilizzato poteva essere facilmente ricostituito. L'utilizzo di mannitolo porta ad un prodotto facilmente ricostituito rispetto a formulazioni senza il crioprotettore, ma tali composizioni contenevano una quantità significativa di materiale di zavorra e richiedevano calcoli più complessi per determinare la concentrazione reale del materiale attivo.

Esempio 4: Rilascio in vitro di glatiramer acetato da microparticelle di PLGA

Attrezzatura

[0093]

- 15 Fiale da 20 ml
- agitatore magnetico multi-punto
- Incubatore
- Pipettatori
- Spettrofotometro UV-Vis Shimadzu 1601
- 20 Reagenti e plastica/vetreteria

Articoli di test

[0094]

- Formulazioni MPG-02, 03, 04, 05, 05R, 06, 07, 12, 13, 14 e 15 - 50 mg di microparticelle liofilizzate secche.
- 25 Formulazioni MPG-08, 09, 10 e 11 - quantità corrispondente a 50

Luigi Nanni

PRL024ESM

mg di microparticelle secche, liofilizzate con mannitolo 5%.

Soluzione di glatiramer acetato di controllo 20-50 µg/mL (come base) in PBS con sodio azide 0,05%)

Temperatura: 37°C

5 **[0095]** Al fine di valutare il rilascio di glatiramer acetato incorporato da microparticelle biodegradabili di PLGA caricate con glatiramer acetato (formulazioni varie), è stato utilizzato il seguente processo.

10 **[0096]** Descrizione del processo: 20 ml di PBS (fosfato 0,01M, NaN₃ 0,05%) pH 7,4 sono stati aggiunti a ciascuna fiala. Le fiale sono state poste a 37°C ed agitate con un magnete piccolo. campioni da 600 µl sono stati centrifugati a 10000 g per 5 minuti. 500 µl di surnatante sono stati trasferiti in una micro-provetta da 1,5 ml cui segue l'aggiunta di 500µl di tampone borato 0,1M (diluizione 2 volte) e 50 µl di TNBS. La composizione risultante è stata tortuosamente miscelata ed è stata
15 tenuta sul banco per 30 minuti. È stata eseguita un'analisi utilizzando un metodo TNBS.

20 **[0097]** Le particelle precipitate restanti, ri-sospese con 500 µl di PBS fresco (con NaN₃), sono state riportate nella fiala. Un calcolo corretto della quantità rilasciata di glatiramer acetato è stato eseguito in un ulteriore processo di rilascio per 2,5% per ciascun punto temporale.

25 **[0098]** Il rilascio del glatiramer acetato incorporato è stato effettuato in fiale di vetro ben chiuse da 20ml, utilizzando un incubatore a 37°C, dotato di un agitatore magnetico multi-punto. Come mezzo di rilascio è stata utilizzata una soluzione salina tamponata con fosfato (PBS) con pH 7,4.

Handwritten signature: T. M. M. M. M. M.

PRLO24ESM

[0099] Il rilascio del glatiramer acetato è stato testato per un periodo di 10-32 giorni.

[0100] L'equazione per la curva di calibrazione nell'intervallo 1-200 µg/ml è stata calcolata (Shimadzu UV-1601) come:

5
$$OD=0.035+0.0132*C (r^2 = 0.9985)$$

Dove OD - densità ottica (differenza a 420 e 700 nm)

C - concentrazione di glatiramer acetato base, µg/ml

[0101] I risultati del rilascio di peptidi di formulazioni MPG01-MPG07 sono mostrati nella figura 1. Il rilascio più veloce del glatiramer acetato incorporato (40% per i giorni 1-10) è stato ottenuto in una
10 formulazione MPG-05, basata su polimero PLGA a basso peso molecolare con gruppi terminali acidi (Resomer RG 502H) e senza contro-ione idrofobo. Anche un polimero neutro RG 502 con una quantità relativamente piccola di tocoferil succinato come un contro-ione (MPG-
15 03) ha dimostrato un rilascio significativo (-30% per i giorni 2-12), ma con valori assoluti di rilascio inferiori. Formulazioni contenenti quantità più elevate di contro-ioni hanno mostrato una soppressione del rilascio del farmaco. Senza essere vincolati da alcuna teoria o meccanismo
20 d'azione, ciò potrebbe essere attribuito all'idrofobicità elevata del complesso formato. In aggiunta, la preparazione delle microparticelle con DCP o DMPG è stata associata alla formazione di aggregati e ad una distribuzione ampia delle dimensioni delle particelle.

[0102] L'utilizzo di un miscelatore ad elevata azione di taglio più grande e più potente OMNI GLH (diametro dell'albero 20 mm, 5000-
25 30000 rpm invece di VDI-12 (albero da 12 mm) porta ad una diminuzione

PRLO24ESM

significativa delle dimensioni delle microparticelle (formulazioni 8-11) e ad una levigatezza aumentata della superficie. Un aumento della quantità del solvente organico (MPG-02) ha causato una diminuzione dell'incorporazione di peptide nelle microparticelle. Senza essere vincolati da alcuna teoria o meccanismo d'azione, questo è probabilmente attribuito all'aumento della dimensione intermedia di gocce di emulsione doppia o/a/o. Allo stesso modo, l'utilizzo di polisorbato come tensioattivo non ionico ha anche influenzato negativamente il carico di farmaco (MPG-10 con Tween-80 0,2%). L'aggiunta di contro-ioni idrofobi (tocoferil succinato, dimiristoilfosfatidilglicerolo DMPG, dicetilfosfato DCP) ha ritardato significativamente un rilascio di peptide dalle microparticelle polimeriche rispetto a formulazioni senza contro-ione (MPG-05, MPG-05R). Senza essere vincolati da alcuna teoria o meccanismo d'azione, l'aggiunta dei contro-ioni idrofobi può fornire microparticelle con proprietà compromesse (MPG-06).

[0103] La struttura chimica del polimero utilizzato ha mostrato un impatto maggiore sulle proprietà di rilascio rispetto al peso molecolare del PLGA. Resomer RG 502H e RG 502 (MW circa 17000 Dalton) avevano coefficienti di diffusione molto simili, ma il fattore principale determinante il rilascio del peptide incluso dalla matrice polimerica era un'interazione ionica multi-punto tra porzioni funzionali Lys cariche positivamente di glatiramer acetato e gruppi terminali carbossilici in un polimero PLGA. Resomer® RG 502 neutro ha mostrato una bassa capacità di legame anche in presenza di un contro-ione (MPG-02, 03) mentre Resomer® RG 503 neutro con peso molecolare più elevato ha

Tempo Assum

PRL024ESM

dimostrato un legame migliore ma un rilascio molto lento (MPG-10, 11).

[0104] Esperimenti ripetuti di rilascio da formulazioni identiche preparate separatamente (MPG-05 e MPG-05R) hanno mostrato un comportamento ragionevolmente simile e una buona riproducibilità per
5 tali lotti su piccola scala. Formulazioni di glatiramer acetato con Resomer® RG 502H hanno dimostrato un effetto di rilascio rapido simile (~30%), un buon legame iniziale di peptide ed un rilascio veloce del farmaco (Figura 2).

[0105] Una formulazione di un complesso equimolare (sale) di
10 tocoferil succinato aveva un legame elevato ed una solubilità estremamente bassa in acqua (~ 5 µg/ml). Senza essere vincolati da alcuna teoria o meccanismo d'azione, ciò può essere causato da una reticolazione ionica del diacido (tocoferil succinato) e della molecola di poliammina del polimero. Un rilascio del polimero da questo sale in PBS
15 era estremamente lento. Per microparticelle polimeriche, quando tocoferil succinato è incorporato nella matrice PLGA, solo una parte di questo diacido può interagire con il polimero e per una soppressione completa del rilascio è necessaria una quantità più elevata di tocoferil succinato. Perciò il tasso di rilascio può essere regolato dal rapporto tra glatiramer
20 e PLGA. La quantità di solvente organico utilizzato può anche essere importante ma in misura minore.

[0106] Formulazioni 12-15, basate su Resomer® RG 502H con rapporti differenti tra il farmaco e il polimero, hanno dimostrato che il rapporto gioca un ruolo importante nel controllare l'effetto di rilascio
25 rapido iniziale, del livello di legame e del tasso di rilascio. La regolazione

MPG
Musim

PRLO24ESM

della quantità del PLGA e del peptide nonché l'aggiunta di un contro-ione idrofobico, come tocoferil succinato, consente la preparazione di formulazioni di microparticolato (MPG-12 - 15) con legame elevato, rilascio rapido iniziale basso e tassi di rilascio ragionevoli (Figura 3).

5 **Esempio 5: Upscaling**

Campioni liofilizzati di formulazioni di microparticolato di glatiramer acetato

10 **[0107]** MPG-14 SU-1 - formulazione di MPG-014, è stata prodotta utilizzando un recipiente di reazione più grande e un omogeneizzatore più grande (OMNI GLH) a velocità bassa.

[0108] Totale - 13 fiale; ciascuna fiala conteneva approssimativamente 235mg di formulazione liofilizzata con un contenuto totale di glatiramer acetato di ~18,2 mg per fiala, pari a ~75 µg/mg della formulazione liofilizzata.

15 **[0109]** MPG-15 SU-1 - formulazione di MPG-015, è stata prodotta utilizzando un recipiente di reazione più grande e un omogeneizzatore più grande (OMNI GLH) a velocità bassa.

20 **[0110]** Totale - 10 fiale; ciascuna fiala conteneva circa 145mg di formulazione liofilizzata con un contenuto totale di glatiramer acetato di ~14,9 mg per fiala, pari a ~100 µg/mg della formulazione liofilizzata.

[0111] MPG-14 SU-2 - formulazione di MPG-014, è stata prodotta utilizzando lo stesso recipiente di reazione, lo stesso omogeneizzatore (VDI 12) e gli stessi parametri, processo ripetuto più volte. Una composizione è stata lavata accuratamente per ridurre il rilascio rapido
25 iniziale.

PRLO24ESM

[0112] Totale - 12 fiale; ciascuna fiala conteneva approssimativamente 88mg di formulazione liofilizzata con un contenuto totale di glatiramer acetato di ~6,3 mg per fiala, pari a ~72 µg/mg della formulazione liofilizzata.

5 [0113] MPG-15 SU-2 - formulazione di MPG-015, è stata prodotta utilizzando lo stesso recipiente di reazione, lo stesso omogeneizzatore (VDI 12) e gli stessi parametri, processo ripetuto più volte. Una composizione è stata lavata accuratamente per ridurre il rilascio rapido iniziale.

10 [0114] Totale - 12 fiale; ciascuna fiala conteneva circa 55mg di formulazione liofilizzata con un contenuto totale di glatiramer acetato di ~5,6 mg per fiala, pari a ~100 µg/mg della formulazione liofilizzata.

[0115] Tutti i campioni liofilizzati sono stati conservati in un frigorifero a +4°C e sono stati ricostituiti prima dell'utilizzo.

15 [0116] Il rapporto tra la formulazione e il diluente (soluzione di glucosio) era almeno 1:5, preferibilmente 1:10 e superiore. Un'agitazione con scuotimento vigorosa è stata eseguita prima della somministrazione del campione ricostituito. I profili di rilascio di queste formulazioni sono mostrati nelle Figure 4 e 5.

20 [0117] Perciò, è stata dimostrata l'incorporazione del peptide altamente solubile in acqua di glatiramer acetato in microparticelle polimeriche biodegradabili. Le microparticelle hanno mostrato un buon legame del polimero, un carico ragionevole di farmaco ed un rilascio rapido di rilascio iniziale ridotto, il che può essere regolato impiegando
25 composizioni e processi di preparazione differenti. Microparticelle di

Luigi Nisam

PRLO24ESM

PLGA, fatte di Resomer® 502H e caricate con glatiramer acetato, forniscono un rilascio in vitro del peptide incorporato con un tasso di rilascio del 3-5% al giorno per 10-15 giorni in un mezzo acquoso agitato (soluzione salina tamponata con fosfato, pH 7,4) a 37°C.

5 **Esempio 6: Modello di encefalomielite autoimmune sperimentale (EAE)**

10 **[0118]** L'encefalomielite autoimmune sperimentale (EAE) è una malattia infiammatoria demielinizzante autoimmune che può essere indotta in animali da laboratorio mediante iniezione di proteina basica della mielina. Tale malattia è diventata il modello standard di laboratorio per lo studio di malattie autoimmuni cliniche e sperimentali. In effetti, numerosi articoli (ad esempio Abramsky et. al., J Neuroimmunol (1982) 2 1 e Bolton et al., J Neurol Sci. (1982) 56 147) notano che le somiglianze tra EAE recidivante cronica negli animali e sclerosi multipla nell'uomo
15 coinvolgono in particolare il valore di EAE per lo studio di malattie demielinizzanti autoimmuni come la sclerosi multipla. Come tale, il modello di test EAE viene impiegato per stabilire l'attività delle formulazioni della presente invenzione contro la sclerosi multipla. Tale test è condotto secondo la seguente procedura.

20 **[0119]** A ratti Lewis femmina vengono iniettati nei loro cuscinetti 12,5 µg di proteina basica della mielina (MBP) (preparata a partire da midollo spinale di cavia) in adiuvante completo di Freund. La formulazione della presente invenzione è data per iniezione ogni settimana/due settimane/una volta al mese a dosaggi vari agli animali
25 di test. Una formulazione di controllo viene data a certi altri animali di

PRL024ESM

test. Gli animali vengono quindi pesati e gli viene assegnato un punteggio quotidianamente per i sintomi di EAE in base ad una scala da 0 a 3 (0=nessun cambiamento, 1=coda flaccida, 2=disabilità degli arti posteriori e 3=paralisi del quarto posteriore/moribondo). Gli animali
5 vengono quindi sacrificati se viene raggiunto un punteggio di 3.

Esempio 7: Studi in vivo utilizzando il modello EAE

[0120] Per determinare l'effetto delle formulazioni della presente invenzione sul modello murino di SM, viene eseguita un'encefalomielite autoimmune sperimentale (EAE). Topi knockout per 25-idrossivitamina
10 D_3 -1 α -idrossilasi (1 α -OH KO) sono mantenuti su una dieta purificata contenente calcio 0,87% e 1,25-(OH) $_2D_3$ (Vit. D) 1 ng da due a tre settimane prima di un'immunizzazione EAE. EAE viene indotta in topi tra sei e dieci settimane di età, mediante immunizzazione sottocutanea di 200 μ g del peptide immunodominante per la glicoproteina
15 oligodendrocitica della mielina (MOG₃₅₋₅₅).

[0121] Il peptide viene sintetizzato utilizzando una chimica standard di 9-fluorenil-metossi-carbonile. Il peptide viene disciolto in adiuvante completo di Freund (CFA; Sigma) contenente 4 mg/ml di Mycobacterium tuberculosis H837a inattivato da calore.

20 **[0122]** I topi vengono esaminati quotidianamente per segni clinici di EAE utilizzando il seguente sistema di punteggio: 0, nessun segno; 1, coda floscia; 2, debolezza degli arti posteriori; 3, paralisi degli arti posteriori; 4, paralisi degli arti anteriori; 5, moribondo o morte.

[0123] Topi che sviluppano segni clinici di EAE con punteggi ≥ 2 sono
25 trattati con la formulazione della presente invenzione che viene

PRLO24ESM

somministrata per iniezione ogni settimana/due settimane/una volta al mese a dosaggi vari. Gruppi di controllo sono trattati con placebo o con regime Gold standard di glatiramer acetato [ad esempio PNAS, 2005, vol. 102, n. 52, 19045-19050]. I topi vengono quindi pesati e gli viene
5 assegnato un punteggio quotidianamente per i sintomi di EAE. Un'analisi statistica viene eseguita utilizzando il test di probabilità esatto di Fisher a due code sui tassi di incidenza e il test t di Student non appaiato su tutte le altre misurazioni. Valori di $P < 0,05$ sono considerati statisticamente significativi.

10

Felipe Alvarado

RIVENDICAZIONI

1. Composizione farmaceutica parenterale a lunga durata d'azione comprendente una quantità terapeuticamente efficace di glatiramer acetato e poli(D, L-lattide-co-glicolide) (PLGA) come veicolo
5 biodegradabile farmaceuticamente accettabile, la composizione essendo in una forma depot a rilascio controllato adatta per uno schema di dosaggio da una volta a settimana ad una volta ogni 6 mesi in una dose che va da 20 a 750mg di glatiramer acetato,

in cui la composizione comprende una fase acquosa interna
10 comprendente una quantità terapeuticamente efficace di glatiramer acetato, una fase polimerica immiscibile in acqua comprendente PLGA e una fase acquosa esterna, e

in cui la composizione è sotto forma di microparticelle preparate mediante un processo di emulsificazione doppia acqua-in olio-in acqua.

15 2. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 1, che è in forma depot adatta per un impianto in una posizione medicalmente accettabile in un soggetto che ne ha bisogno.

3. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 1 o 2, che è adatta per uno schema di dosaggio da una volta ogni 2 settimane
20 ad una volta al mese.

4. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui il glatiramer acetato comprende L-alanina, acido L-glutammico, L-lisina e L-tirosina in rapporti molarli di 0,14 acido glutammico, 0,43 alanina, 0,10 tirosina e 0,33 lisina.

25 5. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 1 o 2,

P. M. M. M.

PRL024ESM

adatta per un impianto sottocutaneo o intramuscolare.

5 **6.** Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 1,
in cui la fase acquosa esterna comprende un tensioattivo selezionato
tra alcol polivinilico (PVA), polisorbato, copolimeri a blocchi polietilene
ossido-polipropilene ossido ed esteri di cellulosa.

10 **7.** Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 1 o 2,
in cui la composizione fornisce un'efficacia terapeutica pari o superiore
alle forme di dosaggio iniettabili quotidiane disponibili in commercio di
glatiramer acetato, con incidenza e/o gravità ridotte di effetti collaterali a
livello locale e/o sistemico; e

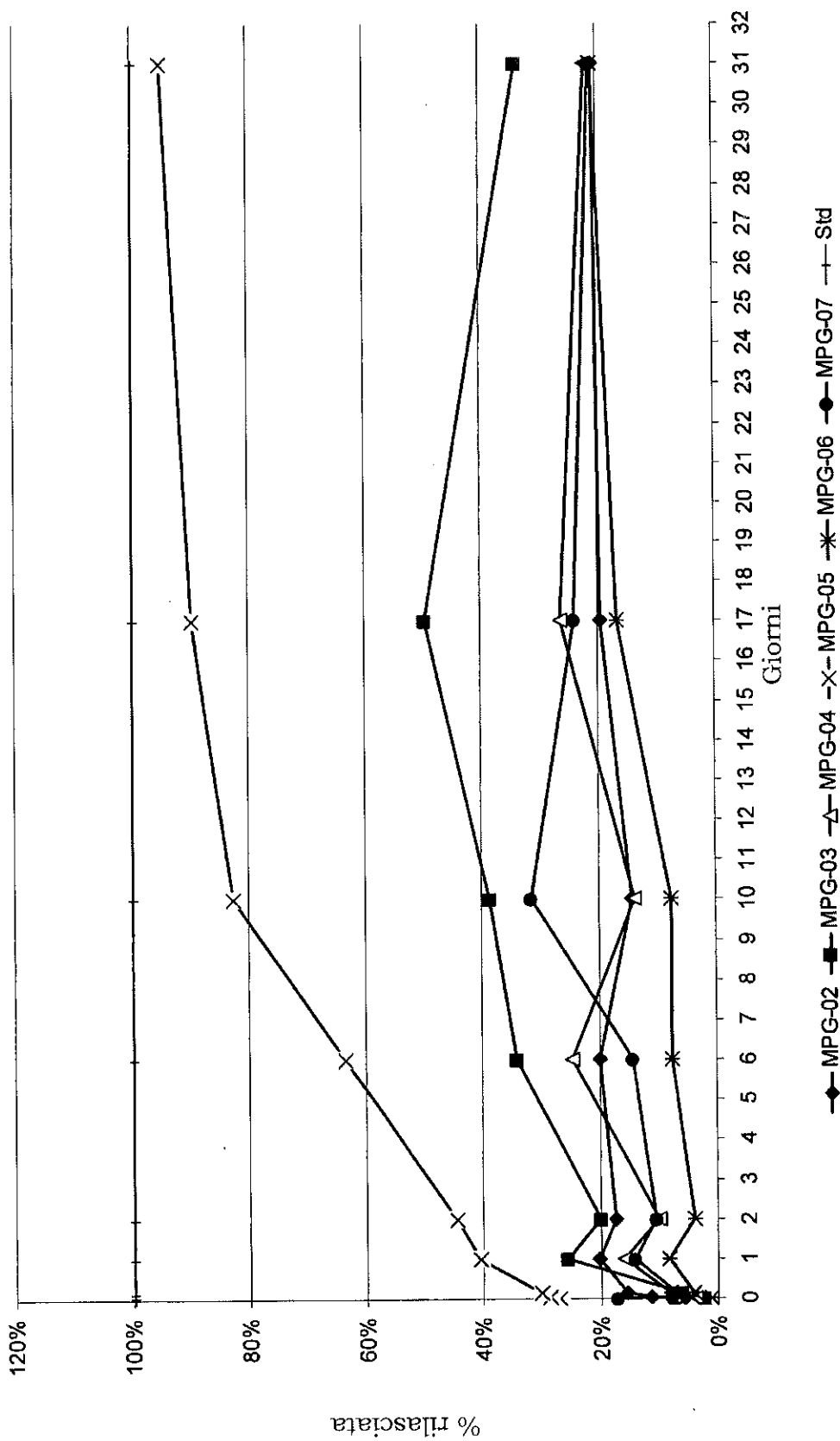
in cui la composizione fornisce inoltre un rilascio prolungato o
un'azione prolungata di glatiramer in un soggetto rispetto ad una dose
sostanzialmente simile di una formulazione a rilascio immediato di
glatiramer acetato.

15 **8.** Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 1 da
utilizzare nel trattamento della sclerosi multipla.

20 **9.** Composizione farmaceutica da utilizzare nel trattamento
della sclerosi multipla secondo la rivendicazione 8, in cui il glatiramer
acetato è somministrato in combinazione con almeno un altro agente
attivo.

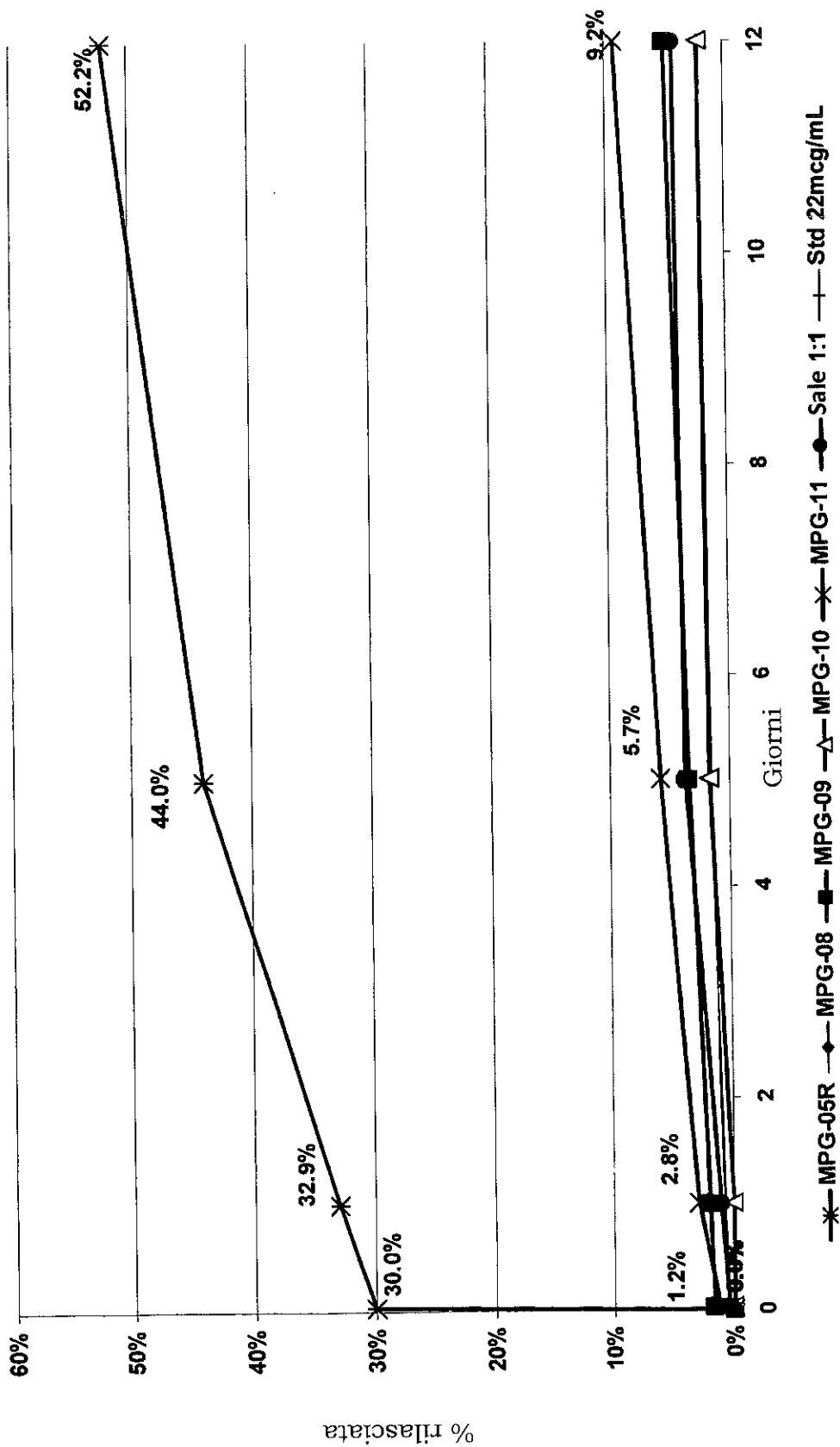
TRAMP. M. S. M.

Figura 1



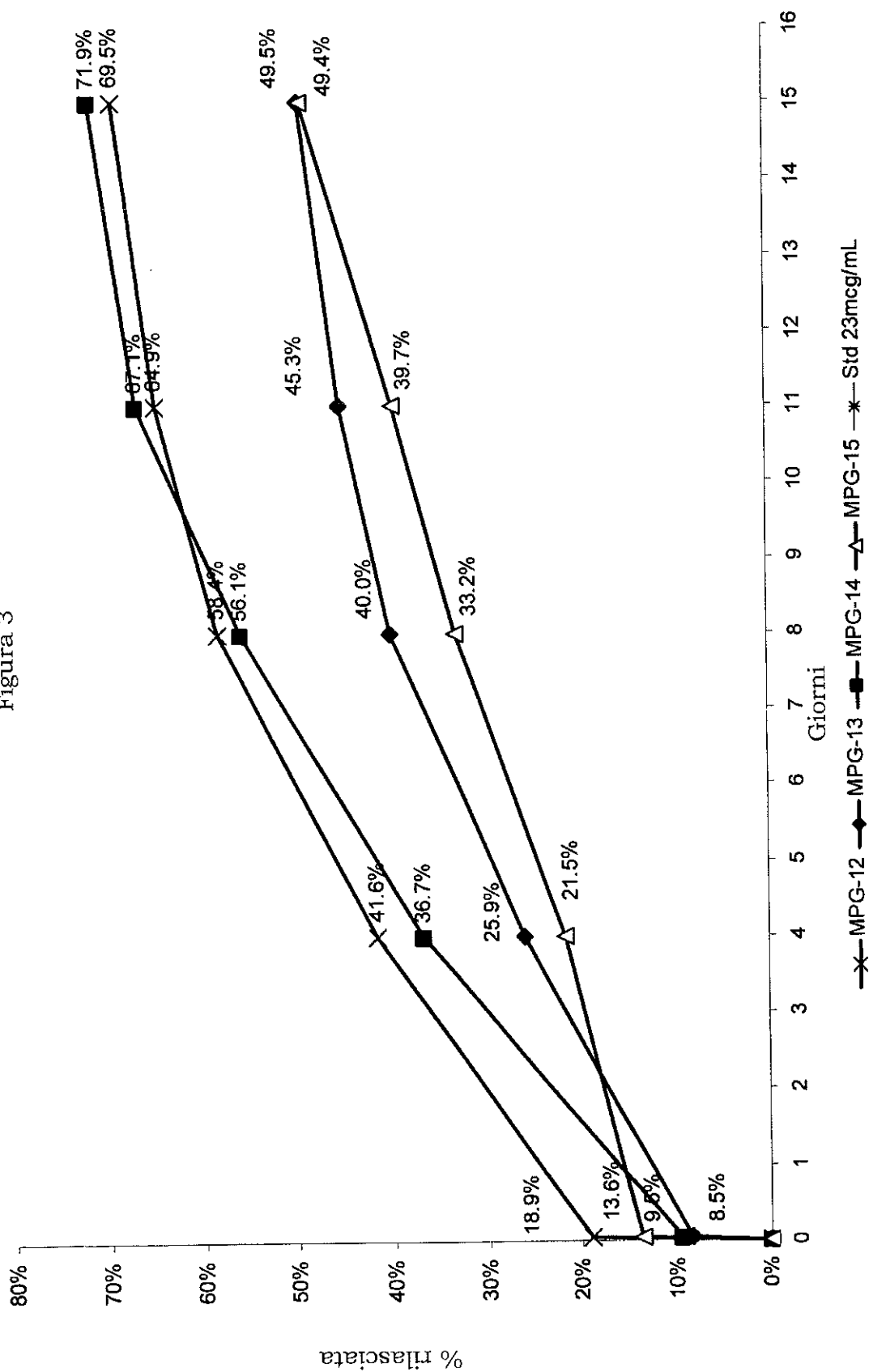
Fulvio Neri

Figura 2



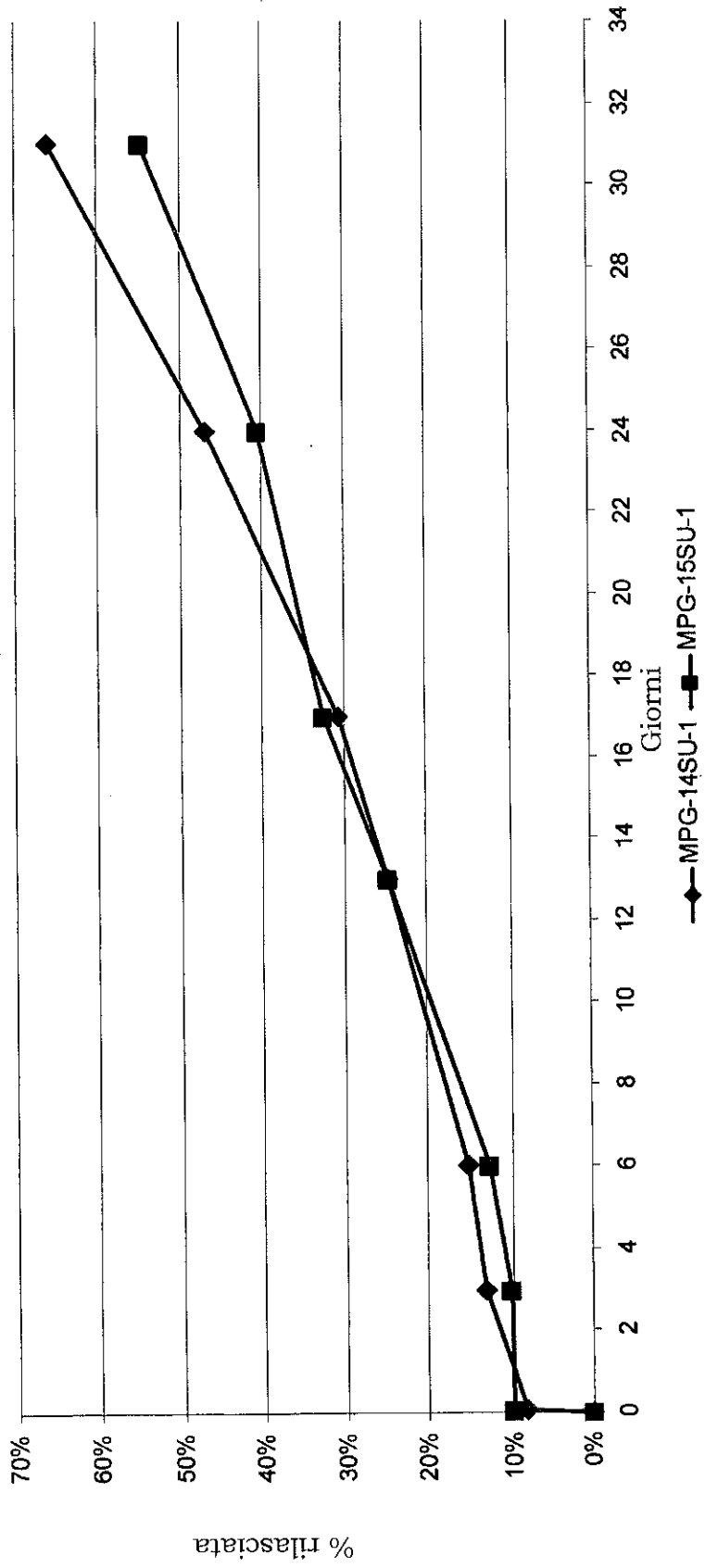
Handwritten signature

Figura 3



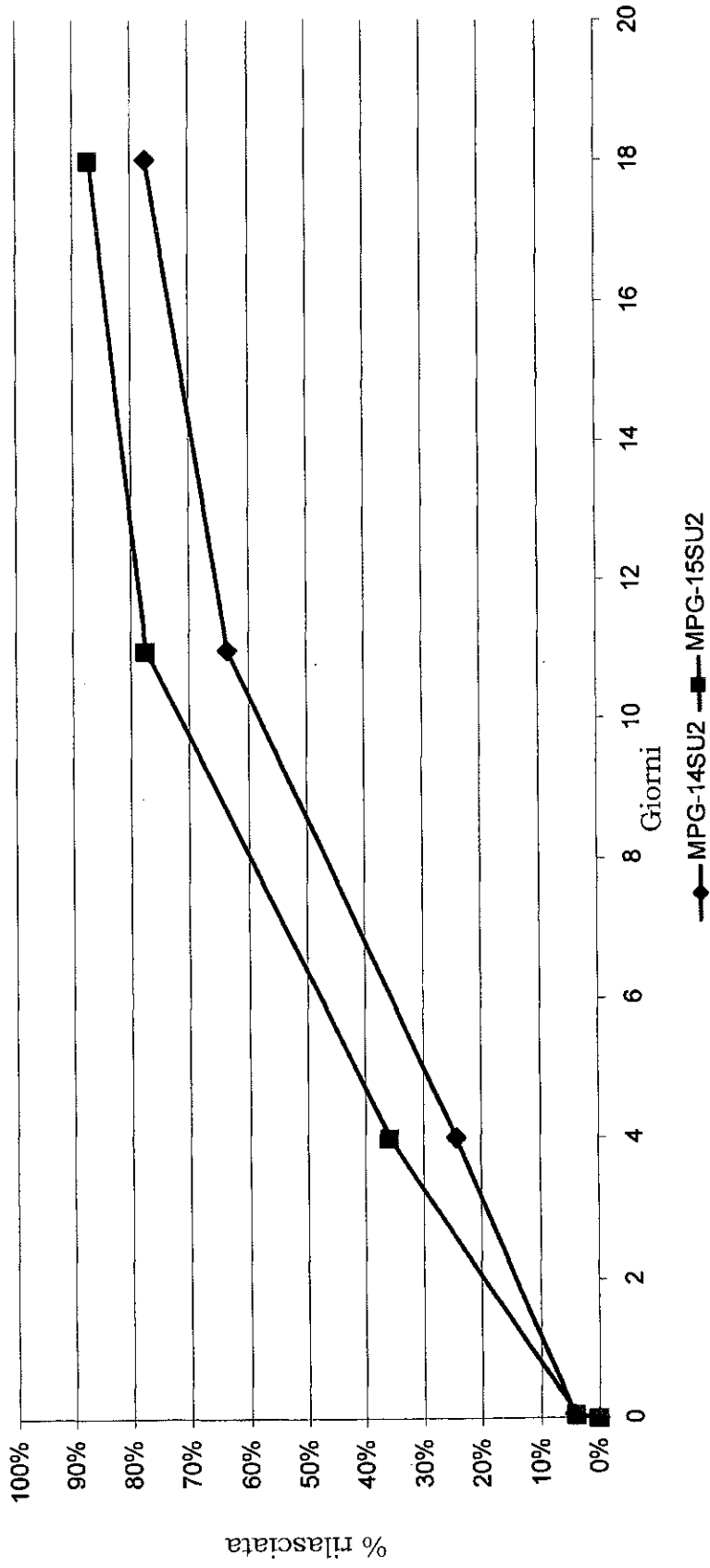
Handwritten signature

Figura 4



Handwritten signature

Figura 5



Felipe Norton