



FR

EXAMEN EUROPEEN DE QUALIFICATION 2016

Epreuve A(Ch)

Chimie

Cette épreuve contient :

- * Lettre du demandeur 2016/A(Ch)/FR/1-11
- * Document D1 2016/A(Ch)/FR/12-13
- * Document D2 2016/A(Ch)/FR/14-16



Lettre du demandeur

Nano BioTech&No.Logic
Burjassot Campus

Oficina de D. Arturo Barea. Patentes
Alcalá 42
Madrid

Cher Monsieur Barea,

[001] Nous sommes une petite entreprise spin-off universitaire dans le domaine biopharmaceutique. Nous travaillons sur des stratégies pour administrer de l'insuline pour le traitement du diabète par voie orale. Des nanoparticules biodégradables nouvelles et prometteuses basées sur nos recherches sont désormais prêtes à passer au stade des essais cliniques. Nous vous demandons de déposer en notre nom une demande de brevet européen pour tous les aspects de notre technologie.

[002] Comme nous cherchons actuellement à obtenir un financement pour développer nos nanoparticules, nous vous prions de rédiger la demande de sorte qu'un brevet soit délivré par l'OEB dans les meilleurs délais. Veuillez noter que, pour des raisons financières, nous ne sommes pas disposés à payer des taxes de revendication.

[003] Nous annexons à la présente lettre toutes les informations nécessaires à l'élaboration de la demande de brevet. Vous aurez probablement besoin de considérer le document D1 ci-joint pour rédiger la demande. Pour mieux vous faire comprendre le domaine de l'invention, nous joignons aussi un bref article (D2) paru dans le *Journal of Controlled Release* que nous avons publié il y a un an.



[004] La grande majorité des produits biopharmaceutiques peptidiques sont administrés par injection intraveineuse ou sous-cutanée. Ces modes d'administration sont souvent incommodes et douloureux, notamment lorsqu'il faut procéder quotidiennement à plusieurs injections.

[005] L'administration orale de produits biopharmaceutiques peptidiques remédierait à ces inconvénients.

[006] Par "produits biopharmaceutiques peptidiques", il faut entendre des peptides thérapeutiquement actifs comprenant 70 acides aminés ou moins.

[007] Par "administration orale", il faut entendre l'administration par ingestion. L'absorption des peptides thérapeutiquement actifs dans la circulation sanguine s'effectue habituellement par la muqueuse intestinale.

[008] L'administration orale de produits biopharmaceutiques peptidiques est compliquée puisque les peptides thérapeutiquement actifs sont sujets à une dégradation et/ou déstabilisation dans les conditions acides de l'estomac. Un autre obstacle est la perméabilité de la muqueuse intestinale aux peptides, celle-ci déterminant le degré d'absorption intestinale et l'efficacité de l'action thérapeutique.

[009] Des stratégies sophistiquées s'imposent donc pour protéger les peptides thérapeutiquement actifs dans l'estomac et pour augmenter l'absorption intestinale.

[010] Une approche bien connue est l'encapsulation dans des nanoparticules polymériques. Toutefois, cette stratégie peut ne pas convenir à l'administration orale de peptides thérapeutiquement actifs vu la difficulté d'encapsuler avec des charges médicamenteuses acceptables.

[011] Par "charge médicamenteuse", il faut entendre la quantité de peptide thérapeutiquement actif encapsulé ou piégé dans la nanoparticule polymérique.



[012] Notre objectif est de développer une technologie d'administration orale efficace de produits biopharmaceutiques peptidiques, en particulier de peptides métaboliques, dont l'administration doit actuellement se faire par injection.

[013] Le terme "peptide métabolique" désigne n'importe quelle hormone intervenant dans la régulation du métabolisme, telle que l'amyline, la calcitonine, le glucagon, l'insuline ou la sécrétine. Nous nous sommes concentrés spécifiquement sur l'insuline. Par "insuline", il faut entendre l'insuline ou ses analogues de synthèse.

[014] Notre technologie comprend: 1) des nanoparticules biodégradables basées sur le polycyanoacrylate d'alkyle (PACA) comprenant un peptide métabolique encapsulé ou enfermé à l'intérieur, 2) des méthodes pour produire les nanoparticules en PACA et 3) des formes posologiques pour l'administration orale comprenant les nanoparticules en PACA.

[015] Ci-après, le terme "polycyanoacrylate d'alkyle (PACA)" désigne des homopolymères biodégradables ayant comme monomère un 2-cyanoacrylate d'alkyle C₂-C₁₂, plus spécifiquement des homopolymères biodégradables ayant comme monomère un 2-cyanoacrylate d'alkyle C₂-C₈, y compris mais sans s'y limiter, le 2-cyanoacrylate d'éthyle, le 2-cyanoacrylate de n-butyle, le 2-cyanoacrylate d'isobutyle, le 2-cyanoacrylate de n-hexyle, le 2-cyanoacrylate d'isohexyle et le 2-cyanoacrylate de 2-octyle.

[016] Les nanoparticules biodégradables de PACA décrites ici ont un diamètre hydrodynamique compris entre 10 nm et 500 nm mesuré par diffusion dynamique de la lumière. Les nanoparticules absorbables par voie intestinale doivent avoir un diamètre hydrodynamique de 300 nm ou moins. On vise de préférence une population de nanoparticules biodégradables de PACA dont au moins 90% des nanoparticules ont un diamètre hydrodynamique compris entre 100 nm et 300 nm.



[017] Lors de l'administration par voie orale, l'intégrité des nanoparticules biodégradables en PACA est préservée pendant le transit de l'estomac jusqu'à l'intestin grêle. Dans l'intestin grêle, les nanoparticules de PACA sont absorbées et le polymère biodégradable se dégrade lentement en libérant de façon contrôlée le peptide thérapeutiquement actif.

[018] Le rythme auquel le polymère se dégrade et auquel le peptide thérapeutiquement actif se libère dépend en premier lieu de la longueur de la chaîne alkyle des monomères 2-cyanoacrylate d'alkyle. Les polymères de 2-cyanoacrylates d'alkyle à courte chaîne, comme les alkyles en C₆ ou inférieurs, se dégradent à des rythmes convenables et leur utilisation est avantageuse. À cet égard, les 2-cyanoacrylates d'alkyle préférés sont le 2-cyanoacrylate d'éthyle et le 2-cyanoacrylate de n-butyle.

[019] Dans notre technologie, un peptide thérapeutiquement actif, plus précisément un peptide métabolique tel que l'insuline, est encapsulé ou piégé dans les nanoparticules biodégradables de PACA lors de la polymérisation, c'est-à-dire que le peptide est dissous ou dispersé dans le milieu de polymérisation, puis la réaction de polymérisation a lieu.

[020] N'importe quelle méthode de polymérisation connue de l'état de la technique convient, par exemple la polymérisation interfaciale ou la polymérisation anionique.

[021] De préférence, les nanoparticules biodégradables de PACA sont préparées par polymérisation anionique comprenant les étapes suivantes :

- a) on dissout une quantité thérapeutiquement efficace d'un peptide dans une solution aqueuse acide;
- b) on mélange la solution aqueuse à une huile et un tensioactif non ionique, et on agite pour former une nanoémulsion eau dans huile;
- c) on dissout un monomère 2-cyanoacrylate d'alkyle C₂-C₁₂ dans un solvant organique;
- d) on ajoute lentement la solution organique du monomère de l'étape c) à la nanoémulsion de l'étape b) sous agitation continue pour amorcer spontanément la polymérisation;



- e) on laisse la polymérisation se poursuivre et le solvant organique s'évaporer pour produire des nanoparticules de PACA;
- f) on sépare les nanoparticules de la nanoémulsion et on les purifie.

[022] Le solvant organique est typiquement le chloroforme. Tout acide peut servir à générer la solution aqueuse acide de l'étape a). L'huile est typiquement de l'oléate d'éthyle. Le tensioactif non ionique est typiquement du monolaurate de sorbitane ou de l'alcool polyvinyle.

[023] Le monomère 2-cyanoacrylate d'alkyle C₂-C₁₂ et le peptide thérapeutiquement actif sont typiquement présents dans un rapport pondéral 2:1.

[024] Les nanoparticules de PACA ont une charge médicamenteuse de 10% à 30% en poids de peptide thérapeutiquement actif par rapport au poids total des nanoparticules, la préférence allant à une charge médicamenteuse de 15% à 30% en poids. Une charge médicamenteuse inférieure à 10% en poids de peptide thérapeutiquement actif par rapport au poids total des nanoparticules résulte en un encapslement inefficace et ne suffit pas à produire un effet pharmacologique significatif.

[025] Un stabilisant acceptable sur le plan pharmaceutique, comme le dextrane, le chitosane, le fucoïdane, la pectine, l'amylase ou l'amylopectine, peut aussi être incorporé dans les nanoparticules. Dans ce cas, le stabilisant est ajouté au peptide thérapeutiquement actif dans l'étape a), typiquement à raison de 0,5 à 1% par rapport au poids du peptide thérapeutiquement actif.

[026] Le pH de la solution aqueuse acide utilisée à l'étape a) est typiquement compris entre 1 et 6. Dans un mode de réalisation préféré, le pH de la solution aqueuse à l'étape a) est égal ou inférieur à 2.



[027] Nous avons développé cette méthode avec succès pour préparer des nanoparticules de PACA chargées d'insuline. Lors d'essais préliminaires décrits dans les exemples ci-joints, nous avons administré à des rats, par voie orale, des nanoparticules biodégradables de PACA chargées d'insuline. Nous avons observé que les nanoparticules de PACA libèrent des quantités thérapeutiquement actives d'insuline pendant une période prolongée après l'administration par voie orale. Ceci est démontré par la baisse significative des taux de glucose dans le sang (voir figure 1).

[028] En outre, nous avons été surpris de constater qu'à un pH égal ou inférieur à 2, l'insuline forme un complexe non covalent avec le PACA pendant la réaction de polymérisation. Ce complexe est ensuite piégé dans les nanoparticules biodégradables de PACA. Cependant, à un pH supérieur à 2, l'insuline ne forme pas de complexe mais s'incorpore aux nanoparticules de PACA sous forme d'insuline libre.

[029] Nous pensons que ce phénomène est dû aux propriétés physico-chimiques de l'insuline et au mécanisme de polymérisation anionique. L'insuline a un point isoélectrique égal à 5,3. À un pH inférieur à 5,3, elle est donc capable d'être chargée positivement. À un pH égal ou inférieur à 2, l'insuline a une forte charge nette positive, l'insuline peut ainsi former des complexes non covalents avec les chaînes chargées négativement du PACA pendant la réaction de polymérisation.

[030] Les nanoparticules de PACA encapsulant de l'insuline sous la forme d'un complexe non covalent ont l'avantage de libérer l'insuline pendant une période prolongée après l'administration par voie orale. Nous supposons par ailleurs que l'absorption intestinale de l'insuline sous forme d'un complexe non covalent est améliorée. Ceci se traduit par une concentration thérapeutiquement efficace d'insuline dans le sang pendant de plus longue durées, permettant de satisfaire les besoins physiologiques en insuline et de faire baisser les taux de glucose dans le sang (voir figure 1).



[031] Toutefois, nous avons également constaté qu'à un pH égal ou inférieur à 2, l'encapsulation de l'insuline pendant la réaction de polymérisation donne des nanoparticules de PACA ayant des surfaces irrégulières et instables comprenant du matériau cristallin. L'instabilité physique est associée à une encapsulation peu efficace et une charge d'insuline insuffisante.

[032] Pour parer à cet inconvénient, il est essentiel d'incorporer un stabilisant pharmaceutiquement acceptable dans les nanoparticules de PACA préparées à un pH égal ou inférieur à 2. À cet effet, on utilise le dextrane. Le dextrane apporte la stabilisation nécessaire pour former des nanoparticules de morphologie acceptable. Le chitosane et la pectine sont également utilisés à cette fin avec des résultats tout aussi satisfaisants. Néanmoins, la stabilisation efficace des nanoparticules dépend aussi de la longueur de la chaîne alkyle des monomères 2-cyanoacrylate d'alkyle formant le PACA.

[033] Les nanoparticules biodégradables de PACA décrites ici peuvent être incorporées à des formes posologiques orales comme les capsules ou les comprimés. On peut en outre appliquer un revêtement aux formes posologiques orales afin de les protéger lors de leur transit par l'estomac.

[034] Les nanoparticules biodégradables de PACA et les formes posologiques orales peuvent servir à traiter une vaste gamme de maladies métaboliques, comme les maladies associées à l'hyperglycémie. Les nanoparticules de PACA chargées d'insuline peuvent être utilisées pour fournir de l'insuline aux diabétiques, notamment ceux ayant un diabète de type 2.

[035] Notre technologie est illustrée plus en détail par les exemples suivants:

Exemple 1

[036] Des nanoparticules biodégradables de PACA comprenant de l'insuline sont préparées par polymérisation anionique. Comme monomères, on utilise le 2-cyanoacrylate d'éthyle (CAE), le 2-cyanoacrylate de n-butyle (CAB), le 2-cyanoacrylate de n-hexyle (CAH) et le 2-cyanoacrylate de 2-octyle (CAO).



[037] On dissout 0,25 g d'insuline dans 5 ml d'eau à un pH de 5. On mélange la solution aqueuse à de l'oléate d'éthyle et à du monolaurate de sorbitane dans un rapport pondéral 1:4:5. On obtient une nanoémulsion eau dans huile en agitant à 700 tr/min à 4°C. On dissout 0,5 g du monomère dans 2 ml de chloroforme et on ajoute lentement le tout à la nanoémulsion sous agitation continue. On agite le mélange pendant 3 heures, puis on le laisse reposer jusqu'au lendemain. Les nanoparticules sont séparées par centrifugation, lavées à l'éthanol absolu, et purifiées par filtration. La morphologie de surface des nanoparticules est observée au microscope électronique à balayage (MEB). Les nanoparticules sont sphériques, leur surface est lisse et elles sont exemptes de matériau cristallin. La taille des particules est estimée par diffusion dynamique de la lumière. 90% des nanoparticules ont un diamètre hydrodynamique compris entre 120 nm et 280 nm. La charge d'insuline est déterminée au moyen des méthodes connues de l'état de la technique.

Tableau 1

Composition	Monomère	Charge d'insuline (% pondéral)
A	CAE	22,1
B	CAB	22,7
C	CAH	21,8
D	CAO	21,5

[038] Les résultats montrent la formation de nanoparticules de PACA chargées d'insuline avec une charge d'insuline élevée. Le choix du monomère n'a pas d'incidence significative.

Exemple 2

[039] On prépare des nanoparticules chargées d'insuline en utilisant CAB au moyen de la méthode décrite à l'exemple 1. Pour stabiliser les nanoparticules, on y incorpore du Dextrane 10 ou du Dextrane 20 (poids moléculaire respectif 10 000 et 20 000). Le dextrane est ajouté à raison de 0,5% ou 1% (par rapport au poids de l'insuline) à la solution aqueuse d'insuline avant de mélanger avec l'huile et le tensioactif.



Tableau 2

Composition	Dextrane	Concentration (% pondéral)	Charge d'insuline (% pondéral)
E	Dextrane 10	0,5	22,6
F	Dextrane 10	1	23,1
G	Dextrane 20	0,5	23,2
H	Dextrane 20	1	22,8

[040] On n'observe aucune différence significative de la charge d'insuline en variant le poids moléculaire du dextrane ou sa concentration.

Exemple 3

[041] On prépare par la méthode décrite à l'exemple 1 des nanoparticules de PACA chargées d'insuline à partir de divers monomères, sauf que l'on ajuste la solution aqueuse d'insuline à un pH de 2 au moyen d'acide chlorhydrique, et on ajoute éventuellement du Dextrane 10 comme stabilisant. On analyse la charge d'insuline et la morphologie de surface des nanoparticules.

**Tableau 3**

Composition	Monomère	Dextrane 10 (% pondéral)	Morphologie de surface (par MEB)	Charge d'insuline (% pondéral)
I	CAE	-	irrégulière, cristaux	3,9*
J	CAE	0,5	lisse, pas de matériau cristallin	17,1
K	CAB	-	irrégulière, cristaux	4,2*
L	CAB	0,5	lisse, pas de matériau cristallin	18,9
M	CAH	-	irrégulière, cristaux	3,8*
N	CAH	0,5	lisse, pas de matériau cristallin	17,6
O	CAO	-	irrégulière, cristaux	5,6*
P	CAO	0,5	irrégulière, cristaux	5,4*

* Charge d'insuline difficilement mesurable en raison de l'instabilité des nanoparticules



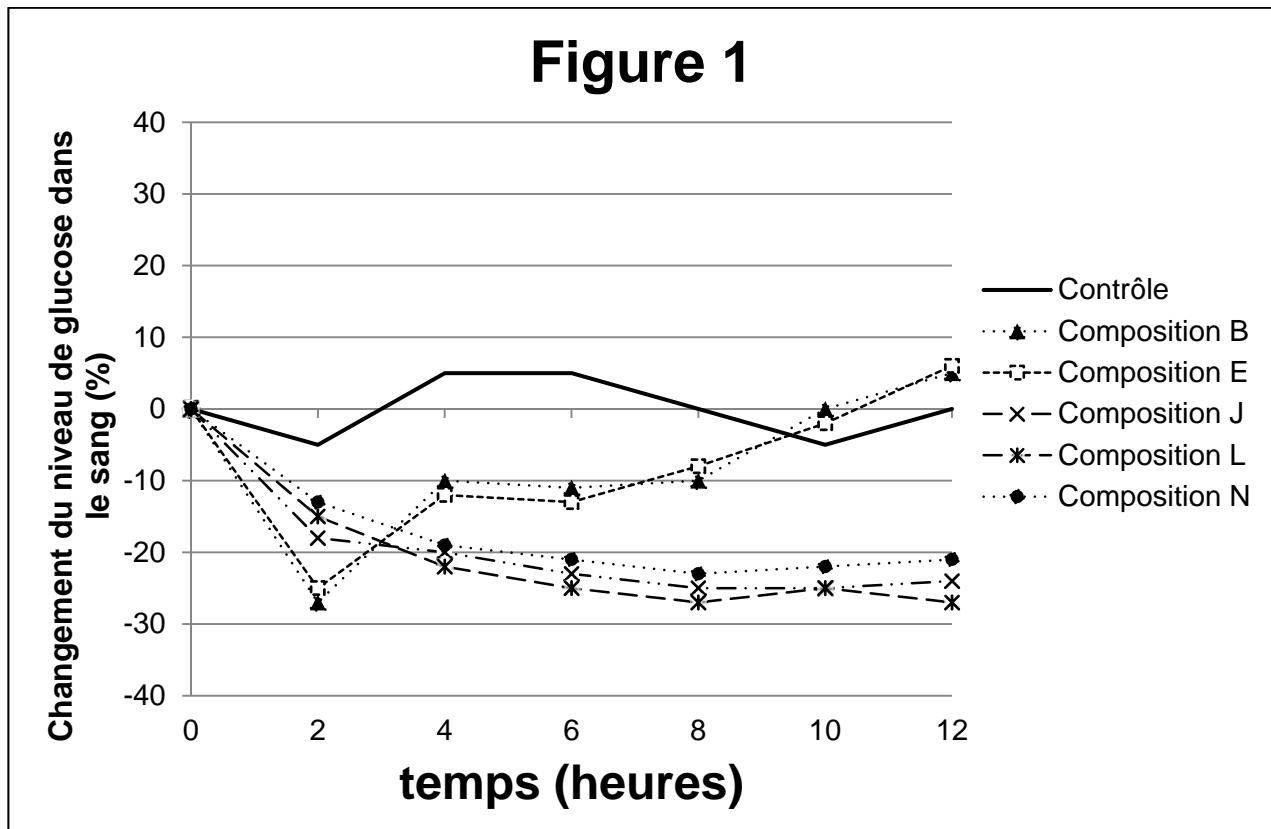
[042] Des nanoparticules ayant une stabilité, une morphologie et une charge d'insuline acceptables n'ont pas pu être obtenues avec le CAO, même en augmentant les concentrations de dextrane ou d'autres stabilisants.

Exemple 4

[043] Une étude *in vivo* a été effectuée au moyen de rats de la lignée Wistar. Des nanoparticules de PACA chargées d'insuline ont été mises en suspension dans une solution saline aqueuse. Les rats ont reçu une dose unique de nanoparticules de PACA (20 mg/kg de poids corporel) par voie orale. Le groupe de contrôle a uniquement reçu la solution saline. Des prises de sang ont été effectuées avant administration (référence) ainsi qu'à intervalles réguliers (2, 4, 6, 8, 10 et 12 heures) après administration et le taux en glucose a été déterminé au moyen de tests disponibles sur le marché. Les résultats sont exprimés dans la figure 1 sous forme de variation en pourcentage du taux en glucose (%) par rapport à la référence. Ces résultats démontrent qu'une réduction significative des taux de glucose dans le sang peut être maintenue pendant une période prolongée après administration par voie orale de nanoparticules de PACA chargées d'insuline.



Figure 1: Changement du taux de glucose dans le sang en pourcentage (%) en fonction du temps (heures) après administration orale



Document D1

WO 91/00XXX

**NANOPARTICULES POLYMÉRIQUES DESTINÉES À L'ADMINISTRATION
D'INSULINE PAR VOIE ORALE**

Domaine de la technique

[001] La présente invention porte sur des nanoparticules en polycyanoacrylate d'isobutyle comme véhicule pour l'administration orale d'insuline.

Généralités

[002] Depuis la découverte de l'insuline par Banting et Best en 1922, les tentatives se sont succédées pour trouver la voie d'administration idéale de l'insuline dans le traitement du diabète. L'administration orale d'insuline est souhaitée. La condition est de pouvoir protéger l'insuline de la dégradation à laquelle elle est sujette dans l'estomac.

[003] Le polycyanoacrylate d'isobutyle, utilisé à l'origine comme colle chirurgicale, peut convenir en tant que véhicule. Le taux de biodégradabilité des polycyanoacrylates d'alkyle (PACA) dépend de la longueur de la chaîne alkyle. Le polycyanoacrylate d'isobutyle a le grand avantage d'être à la fois biocompatible et d'avoir un excellent taux de biodégradabilité.

Divulgation de l'invention

[004] L'invention a pour objectif de fournir des nanoparticules polymériques à base de polycyanoacrylate d'isobutyle capables de piéger et de transporter de l'insuline en vue d'une absorption intestinale pour traiter des maladies métaboliques telles que le diabète, en particulier le diabète de type 2, par administration orale.



[005] On prépare les nanoparticules par polymérisation interfaciale en utilisant du 2-cyanoacrylate d'isobutyle. On ajoute de l'insuline à une phase lipophile contenant des triglycérides d'acides gras à longueur de chaîne moyenne et du 2-cyanoacrylate d'isobutyle dissous dans de l'éthanol absolu. La phase lipophile est ensuite ajoutée à une solution aqueuse à pH neutre ou légèrement acide contenant un tensioactif non ionique et les nanoparticules se forment immédiatement sous agitation mécanique. La suspension colloïdale ainsi obtenue peut être concentrée par évaporation et purifiée par filtration.

[006] Les nanoparticules de l'invention peuvent en outre comprendre, enfermé dans celles-ci une autre substance ou un additif, par exemple un stabilisant pharmaceutiquement acceptable comme le chitosane, le dextrane ou la pectine. Dans ce cas, le stabilisant est ajouté à la phase lipophile avec l'insuline.

[007] Le diamètre hydrodynamique des nanoparticules chargées d'insuline selon l'invention est mesuré par diffusion dynamique de la lumière. 95% des nanoparticules se situent entre 140 nm et 300 nm.

[008] La charge médicamenteuse moyenne des nanoparticules se monte à environ 25% en poids d'insuline par rapport au poids total des nanoparticules. La charge d'insuline élevée constitue un résultat très encourageant puisque les nanoparticules protègent l'insuline dans l'estomac et peuvent permettre une absorption thérapeutiquement efficace dans l'intestin grêle.

Revendications

1. Nanoparticules biodégradables à base de polycyanoacrylate d'isobutyle comprenant de l'insuline enfermée dans les nanoparticules.
2. Nanoparticules selon la revendication 1 pour leur utilisation dans une méthode de traitement d'une maladie métabolique comme le diabète, de préférence le diabète de type 2.



Document D2

Journal of Controlled Release, mars 2015

INTERACTIONS PEPTIDE-POLYMÈRE PENDANT LA POLYMÉRISATION DE

NANOPARTICULES EN POLYCYANOACRYLATE D'ALKYLE

Nano BioTech&No.Logic, Burjassot Campus

[001] Les nanoparticules biodégradables en polycyanoacrylate d'alkyle (PACA) peuvent être intéressantes comme véhicule pour la libération contrôlée de produits biopharmaceutiques peptidiques. On peut obtenir un encapsulation hautement efficace par polymérisation anionique de 2-cyanoacrylate d'alkyle. Cette méthode de polymérisation nécessite que le peptide bioactif soit présent dans le milieu de polymérisation. Le peptide peut donc perturber la réaction de polymérisation. Concrètement, des liaisons covalentes fortes peptide-polymère peuvent se former, divers groupes d'acides aminés du peptide pouvant se lier au 2-cyanoacrylate d'alkyle et bloquer ainsi l'achèvement de la polymérisation.

[002] Les liaisons covalentes peptide-polymère peuvent empêcher la libération d'une quantité importante du peptide enfermé dans les nanoparticules. Cet effet indésirable peut nuire à l'activité biologique et à l'efficacité thérapeutique des nanoparticules en PACA. La présente publication étudie l'occurrence d'interactions covalentes peptide-polymère pendant la formation de nanoparticules de polycyanoacrylate d'éthyle et de polycyanoacrylate de n-butyle avec les peptides bioactifs suivants: angiotensine II, insuline, facteur de croissance insulinique 1 (IGF-1) et sécrétine.



Expérimentation

[003] On prépare les nanoparticules de PACA par polymérisation anionique. On dissout 0,1 g de peptide dans 2,5 ml d'eau à un pH de 5. On obtient une nanoémulsion eau dans huile en mélangeant la phase aqueuse, de l'oléate d'éthyle et de l'alcool polyvinyle (rapport pondéral 1:3,5:5,5). Sous agitation continue, on ajoute lentement 0,2 g de 2-cyanoacrylate d'éthyle (CAE) ou de 2-cyanoacrylate de n-butyle (CAB) dissous dans 1 ml de chloroforme à la nanoémulsion. On laisse reposer jusqu'au lendemain pour que la polymérisation s'achève. Les nanoparticules sont séparées par centrifugation. Le diamètre hydrodynamique mesuré par diffusion dynamique de la lumière est tel que 90% des nanoparticules se situent dans la plage des 120 nm à 280 nm. La charge médicamenteuse moyenne (en poids de peptide bioactif par rapport au poids total des nanoparticules) se situe entre 21,7% et 22,5%. Les liaisons covalentes peptide-polymère sont caractérisées par spectrométrie de masse.

Résultats et discussion

[004] On constate que trois des quatre peptides bioactifs étudiés ont perturbé avec la polymérisation.

Peptide bioactif	Liaison covalente peptide-polymère		Site de formation des liaisons covalentes
	CAE	CAB	
Angiotensine II	oui	oui	Histidine
Insuline	non	non	-
IGF-1	oui	oui	Acide glutamique
Sécrétine	oui	oui	Histidine

[005] On a pu identifier des liaisons covalentes peptide-polymère pour l'angiotensine II, l'IGF-1 et la sécrétine. Les liaisons covalentes résultent des réactions de l'histidine et de l'acide glutamique des peptides avec le CAE et le CAB. Toutefois, l'insuline n'a pas perturbé la réaction de polymérisation à un pH de 5. Ceci s'explique par le repliement tridimensionnel de l'insuline dans les conditions de polymérisation, l'encombrement stérique mettant les groupes acides aminés réactifs à l'abri des interactions covalentes.



[006] Pour étudier l'incidence du pH sur l'occurrence d'interactions covalentes peptide-polymère, on répète la réaction de polymérisation à un pH de 1,9. L'abaissement du pH n'empêche pas la formation de liaisons covalentes de l'angiotensine II, de l'IGF-1 et de la sécrétine avec le CAE et le CAB. Pour ces peptides, la réactivité des groupes aminoacides semble indépendante du pH.

[007] Pour ce qui est de l'insuline à un pH de 1,9, en revanche, la production de nanoparticules de PACA distinctes et bien formées est compromise, tant avec le CAE que le CAB. Nous n'avons pu isoler que des nanoparticules instables ayant des formes irrégulières et une charge d'insuline inacceptablement basse d'environ 4%.

