



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

UIBM

DOMANDA NUMERO	101994900362658
Data Deposito	22/04/1994
Data Pubblicazione	22/10/1995

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Titolo

PROCEDIMENTO PER LA PREPARAZIONE DI COMPLESSI FRA FOSFOLIPIDI E PRINCIPI
ATTIVI UTILI PER LA PRODUZIONE DI LIPOSOMI E PRINCIPI ATTIVI E LIPOSOMI OTTENUTI
CON IL PROCEDIMENTO

ColoCant

CITERNESI UGO

MI 94 A 000778Descrizione

La presente invenzione concerne un procedimento per la produzione di complessi fra fosfolipidi e principi attivi che trovano impiego nella successiva preparazione di liposomi ad elevato potere incapsulante di principi attivi. Dai complessi, che possono presentarsi in forma gelificata, liquida o in polvere, il meccanismo di formazione dei liposomi è spontaneo ed avviene semplicemente tramite idratazione del complesso e successiva agitazione meccanica.

22 APR. 1994

I liposomi possiedono una struttura simile a quella delle membrane cellulari. Come è noto, i liposomi sono infatti degli aggregati sferici di doppi strati fosfolipidici ottenuti in mezzo acquoso a seguito di una riorganizzazione meccanica dei foglietti bimolecolari in cui i fosfolipidi si organizzano spontaneamente quando dispersi in soluzione acquosa. Le vescicole di liposomi possono essere costituite da un unico doppio strato (SUV-Small Unilamellar Vescicles) o da due o più strati (MLV-Multilayer Lipid Vescicles) di fosfolipidi di membrana con le loro teste polari rivolte verso l'esterno e verso gli strati acquosi interni della vescicola.

Dapprima utilizzati esclusivamente in campo farmaceutico, i liposomi trovano oggi un largo impiego anche nel settore cosmetico. L'interesse che essi suscitano in questi settori è dovuto alla loro proprietà di costituire dei sistemi altamente efficaci di veicolazione per un'ampia gamma di principi attivi idro- e liposolubili. Le sostanze idrosolubili possono essere contenute negli spazi acquosi interni dei liposomi e legate elettrostaticamente alla superficie del doppio strato lipidico. Le sostanze liposolubili sono invece trattenute all'interno del doppio strato lipidico o a volta restano imprigionate sottoforma di goccioline, all'interno dei compartimenti acquosi del liposoma. L'uso dei liposomi quali veicoli per principi attivi di impiego farmacologico e cosmetologico presenta notevoli vantaggi, quali una maggiore efficacia di



trattamento, una riduzione della quantità di sostanza da somministrare, una protezione contro il deterioramento del principio attivo ed un rilascio prolungato nel tempo dello stesso.

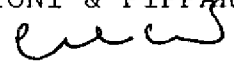
Attualmente esiste un largo numero di metodi per la produzione di liposomi. La maggior parte di essi presenta però, tra i principali inconvenienti, la difficoltà, se non addirittura l'impossibilità, di inserire nei liposomi principi attivi. La ricerca in questo settore ha quindi mirato in questi ultimi anni ad ottenere un metodo efficace per la produzione di liposomi contenenti principi attivi ad elevato potere incapsulante.

Per meglio illustrare la novità dell'invenzione qui descritta, sono di seguito riportate quattro tipologie di tecniche a tuttoggi impiegate per la produzione di liposomi carichi, vale a dire contenenti una o più sostanze attive.

Nella prima, nota come "intrappolamento passivo", le vescicole di liposomi vengono formate in seguito all'agitazione meccanica di una dispersione di fosfolipidi in una soluzione acquosa contenente la sostanza attiva. Il principio attivo viene quindi intrappolato nel liposoma al momento stesso della formazione dei liposomi. Tale procedimento presenta lo svantaggio di avere una capacità di incapsulazione ridotta (un'elevata percentuale dell'attivo resta nel mezzo acquoso e non viene intrappolata nei liposomi) e variabile a seconda della natura del mezzo di dispersione e della concentrazione della sostanza attiva e di altre eventualmente presenti.

La seconda metodologia prevede "l'evaporazione di un solvente" da un sistema di solvente a due fasi. Questa tecnica, oltre a non consentire l'ottenimento di liposomi ad elevato potere incapsulante, presenta l'ulteriore svantaggio di portare nella soluzione liposomiale la presenza di residui indesiderati di solventi organici, quali ad esempio idrocarburi clorurati, che ne rendono improponibile l'utilizzo in campo farmaceutico e cosmetico.

La terza procedura, partendo da un gel costituito da doppi strati di fosfolipidi di membrana, è basata su una "diluizione a due fasi". Nella prima fase, una soluzione concentrata del



principio attivo, in quantità insufficiente per determinare la formazione di liposomi, viene mescolata nel gel iniziale. La soluzione risultante viene poi ulteriormente diluita nella seconda fase tramite un eccesso di soluzione acquosa priva di principio attivo. Questa procedura, pur consentendo di ottenere un grado di intrappolamento di principio attivo più elevato rispetto alle metodiche precedenti, presenta comunque alcuni svantaggi. In primo luogo la capacità di incapsulazione non supera l'80% ed inoltre tale capacità non è costante, ma varia in funzione del principio attivo utilizzato. Per ottenere quindi liposomi a titolo noto di principio attivo - caratteristica questa indispensabile per applicazioni in campo farmaceutico - occorre una lunga e dispendiosa serie di verifiche sperimentali.

Un ulteriore svantaggio è dato dal fatto che la diluizione deve rispettare precisi valori per evitare un rilascio del principio attivo dall'interno del liposoma al mezzo disperdente acquoso circostante.

La quarta metodologia, recentemente proposta, è la cosiddetta "tecnica di intrappolamento transmembranico". Questa tecnica, descritta nella domanda PCT/EP 91/02377, prevede inizialmente la realizzazione di liposomi "vuoti", vale a dire contenenti unicamente il mezzo acquoso di dispersione. Successivamente il principio attivo viene immesso nel mezzo di dispersione e, tramite incubazione a determinati valori di temperatura e di osmolalità, se ne ottiene la migrazione all'interno dei liposomi preformati. Anche con questa tecnica, il grado di incapsulamento, pur raggiungendo valori soddisfacenti, risulta comunque variabile, in quanto funzione del principio attivo da inglobare nei liposomi.

Scopo della presente invenzione è quello di consentire l'ottenimento preliminare di complessi fra fosfolipidi e principi attivi e successivamente di liposomi "carichi" - vale a dire contenenti principi attivi - tramite una metodologia semplice e rapida che non presenti i limiti riscontrati nei sistemi sino ad ora ideati.

L'invenzione, qui di seguito descritta, consiste in un procedimento per la produzione di

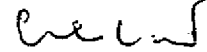
complessi e di liposomi contenenti principi attivi caratterizzato da una capacità incapsulante elevata e prossima al 100% e dalla possibilità di ottenere liposomi titolati sia in fosfolipidi, sia in principi attivi.

Il concetto principale su cui tale sistema è basato, consiste nella formazione preliminare di un complesso tra il principio attivo e i fosfolipidi e successiva disposizione in più doppi strati dei complessi così ottenuti. Si sfrutta l'anfipatia delle molecole di fosfolipidi, cioè il fatto che esse sono costituite da una parte idrofila e da una idrofoba, per creare dei complessi con principi attivi di natura sia idrofila che lipofila, che si legano gli uni alla testa polare, gli altri alla coda idrofoba del fosfolipide.

Il complesso fosfolipidi/principio attivo può essere presentato in forma gelificata, liquida o in polvere e consente di ottenere, tramite una semplice aggiunta di acqua seguita da una breve agitazione meccanica, dei liposomi in cui il principio attivo, così intrinsecamente unito alle molecole fosfolipidiche, si trova ad essere direttamente legato alla membrana del liposoma e non più semplicemente contenuto nella cavità liposomiale o sciolto nella fase acquosa, con un grado di incapsulazione prossimo al 100%.

I vantaggi che la presente invenzione presenta rispetto alle tecniche note sono numerosi e vengono qui di seguito illustrati.

1. Possibilità di creazione di complessi tra fosfolipidi e principi attivi con una relazione stabile tra i due componenti.
2. Capacità incapsulante del principio attivo complessato nei liposomi prossima al 100%, indipendentemente dalla natura del principio attivo. Ciò fa sì che si possano ottenere dispersioni di liposomi titolate sia in sostanza attiva, sia in fosfolipidi. La quantità di principio attivo non incapsulata nei liposomi e quindi inutilizzabile perchè incapace di attraversare la barriera epidermica si riduce cioè praticamente a zero.
3. Assenza di conservanti nel complesso fosfolipidi/principio attivo che consente pertanto la



produzione di liposomi senza il rischio di incapsulare e liposomizzare sistemi preservanti. I conservanti, qualora si intenda ottenere una soluzione liposomiale preservata, vanno uniti dopo che si è avuta la formazione di liposomi risultando così presenti solo nella dispersione acquosa e non nei liposomi.

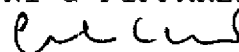
4. Possibilità di produrre soluzioni liposomiali sterili, senza aggiunta di conservanti, apirogene e di grado farmaceutico.

5. Stabilità dei liposomi ottenuti, in quanto non si ha la migrazione della sostanza attiva dall'interno all'esterno del liposoma con meccanismi dovuti ad equilibri osmotici.

6. Possibilità di produrre liposomi in maniera estemporanea al momento dell'uso eliminando eventuali problemi connessi alla conservazione ed alla sterilità dei liposomi.

Questo vantaggio si traduce praticamente nella possibilità di preparare composizioni composte da due confezioni da miscelare al momento dell'uso, e quindi in composizioni farmaceutiche molto stabili anche in assenza di conservanti e pertanto iniettabili o utilizzabili per somministrare la sostanza attiva a colture cellulari.

I principi attivi utilmente impiegabili nel procedimento dell'invenzione possono essere diversi in funzione della applicazione desiderata. Per applicazioni in campo cosmetico possono essere utilizzati principi attivi antirughe quali: acidi grassi poliinsaturi, estratto di Echinacea, estratto di Aloe vera, Fetuina, Vitamina A ed altri; principi attivi antiradicali liberi quali: Superossido Dismutasi, Perossidasi, Leucocianidine, Vitamina E; principi attivi anticellulite: Escina, Ruscogenine, Caffeina, estratto di Ippocastano, Carnitina ed altri; principi attivi rivitalizzanti quali: Citocromo-C, estratto di placenta, estratto di Ginseng ed altri. Per applicazioni in campo farmaceutico possono essere utilizzati principi attivi antimicotici quali: derivati tiazolici, Grisioufulvina ed altri; principi attivi antibiotici quali Penicillina, Vancomicina, Cefalosporina ed altri; principi attivi a base di ormoni quali Calcitonina. Per applicazioni in campo dietetico possono essere utilizzati principi attivi a base di vitamine ed altri integratori.



Per applicazioni in campo agronomico possono essere utilizzati principi attivi diserbanti quali: dinitroortocresolo, carbammati ed altri; principi attivi anticrittogamici quali: organofosfati, organocloruri, tiofosfati ed altri.

I fosfolipidi utilizzabili nel procedimento per la preparazione dei complessi secondo l'invenzione possono essere di origine vegetale, animale o sintetici. Fra i fosfolipidi di origine vegetale si può citare la Lecitina di Soja; fra quelli di origine animale sono utilizzabili la lecitina ex ovo e i cerebrosidi.

A-FORMA GELIFICATA

FASE 1: il principio attivo viene disciolto in un solvente appropriato.

FASE 2: preparazione del complesso tra la soluzione del principio attivo preparata nella precedente fase e fosfolipidi di purezza e natura differenti a seconda dell'uso finale del prodotto. Se il solvente utilizzato per disciogliere il principio attivo non può essere contenuto nel prodotto finale (ad es. esano), esso viene eliminato per evaporazione/distillazione sottovuoto.

FASE 3: ottenimento della struttura multilaminare del complesso di fosfolipidi e principio attivo mediante aggiunta di una soluzione a base di etanolo, sino ad ottenere un'impasto morbido.

FASE 4: completamento della formazione del gel mediante aggiunta di glicerolo.

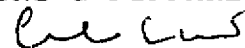
B - FORMA LIQUIDA

FASE 1 E 2: come indicato per A (Forma gelificata)

FASE 3: ottenimento della struttura multilaminare del complesso di fosfolipidi e principio attivo mediante aggiunta di una soluzione a base di etanolo in quantità tale da rendere il prodotto liquiforme.

C - POLVERE

FASE 1, 2 E 3: come indicato per A (Forma gelificata)



FASE 4: il complesso ottenuto viene sottoposto ad essiccamento sotto vuoto a temperatura stabilita secondo la natura del principio attivo.

Come già detto in precedenza, per ottenere i liposomi, è sufficiente aggiungere al complesso fosfolipidi/principio attivo una soluzione acquosa il cui volume è calcolato in funzione del titolo in principio attivo che si vuole ottenere nella soluzione liposomiale.

La scelta dei solventi del principio attivo dipende dalla natura del o dei principi attivi che si intendono complessare con il fosfolipide. Se possibile, si preferisce utilizzare solventi che non debbano essere successivamente eliminati e possono essere presenti nel prodotto finale. Nel caso cioè non sia possibile il solvente indesiderato viene allontanato dal mezzo in cui si trova il complesso, ad esempio per evaporazione o distillazione sotto vuoto.

Qui di seguito si riportano, a titolo di esempio, le procedure per la preparazione di due complessi, in forma gelificata, liquida o in polvere, di fosfolipidi con due principi attivi solubili in solventi differenti.

ESEMPIO 1

A - COMPLESSO DI FOSFOLIPIDI CON VITAMINA A IN FORMA GELIFICATA

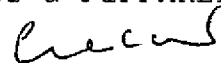
FASE 1: la vitamina A sottoforma di acetato, nell'esatta quantità calcolata (10% in concentrazione di 1.000.000UI/g), viene disciolta in esano (rapporto Vit. A acetato/esano: 1:1), mescolando sino ad ottenere una miscela omogenea.

FASE 2: alla miscela ottenuta nella fase 1 si aggiungono i fosfolipidi (60%) in polvere della purezza e della natura desiderate, avendo cura di ottenere un impasto omogeneo.

L'esano deve essere eliminato dal complesso tramite un aumento della temperatura operando sottovuoto.

FASE 3: quando l'esano è evaporato completamente si aggiunge l'etanolo (10%) e si mescola sino ad ottenere un impasto omogeneo.

FASE 4: da ultimo, si aggiunge glicerolo (20%) che facilita la formazione del complesso



gelificato.

B - COMPLESSO DI FOSFOLIPIDI CON VITAMINA A IN FORMA LIQUIDA

FASE 1 E 2: come indicato per A (Forma gelificata)

FASE 3: quando l'esano è evaporato completamente si aggiunge l'etanolo in quantità tale da rendere il prodotto liquiforme.

C - COMPLESSO DI FOSFOLIPIDI CON VITAMINA A IN POLVERE

FASE 1, 2 E 3: come indicato per A (Forma gelificata)

FASE 4: l'impasto ottenuto viene essiccato sotto vuoto e a temperatura ambiente.

ESEMPIO 2

A - COMPLESSO DI FOSFOLIPIDI CON SUPEROSSIDO DISMUTASI (SOD) IN FORMA GELIFICATA

FASE 1: una quantità di SOD desiderata (1.000.000UI/Kg) viene disciolta in una soluzione alcolica (acqua/etanolo in rapporto 1:3 quantità 20%), mescolando sino ad ottenere una miscela omogenea.

FASE 2: alla miscela ottenuta nella fase 1 si aggiungono i fosfolipidi (70%) in polvere della purezza e della natura desiderate, avendo cura di ottenere un impasto omogeneo.

FASE 3: in questo complesso, come in tutti quelli in cui il principio attivo è solubile in etanolo o in una soluzione acqua/etanolo, la fase 3 praticamente non esiste. L'etanolo necessario per la formazione dei doppi strati fosfolipidici è infatti quello che si utilizza per disciogliere il principio attivo.

FASE 4: da ultimo, si aggiunge glicerolo che facilita la formazione del complesso gelificato.

B - COMPLESSO DI FOSFOLIPIDI CON SUPEROSSIDO DISMUTASI (SOD) IN FORMA LIQUIDA

FASE 1 E 2: come indicato per A (Forma gelificata)

FASE 3: si aggiunge etanolo in quantità tale da rendere il prodotto liquiforme.

luc

C - COMPLESSO DI FOSFOLIPIDI CON SUPEROSSIDO DISMUTASI (SOD) IN POLVERE

FASE 1, 2 E 3: come indicato per A (Forma gelificata)

FASE 4: l'impasto ottenuto viene essiccato a temperatura ambiente.

RIVENDICAZIONI

1. Procedimento per la preparazione di un complesso fosfolipidi/principio attivo utile per la produzione di liposomi contenenti una o più sostanze attive, in cui la sostanza attiva, intrinsecamente legata alla molecole fosfolipidiche, si trova ad essere automaticamente inglobata nei liposomi non appena i doppi strati fosfolipidici si costituiscono in vescicole per semplice aggiunta di una soluzione acquosa, caratterizzato dal fatto di comprendere i seguenti stadi:

- dissoluzione in un solvente del o dei principi attivi,
- aggiunta del fosfolipide alla soluzione summenzionata,
- eventuale eliminazione del solvente qualora quest'ultimo sia indesiderato nel prodotto finale,
- aggiunta al complesso così ottenuto di un mezzo idrofilico per consentire la organizzazione delle molecole di tale complesso in una struttura multilaminare, organizzata in una pluralità di foglietti bimolecolari;
- trattamento del complesso per ottenerlo nella forma desiderata.

2. Procedimento secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che la formazione della struttura multilaminare del complesso avviene per aggiunta di una soluzione alcoolica.

3. Procedimento secondo le rivendicazioni 1 e 2, caratterizzato dal fatto che la preparazione della struttura multilaminare in forma gelificata avviene per aggiunta di soluzione di etanolo.

4. Procedimento secondo le rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto che la preparazione dei suddetti complessi avviene miscelando detta o dette sostanze attive con fosfolipidi di membrana in presenza di un solvente adeguato.

5. Procedimento secondo una o più delle rivendicazioni precedenti caratterizzato dal fatto che il trattamento finale del complesso consiste in una aggiunta di glicerolo per facilitare la formazione di un gel.



6. Procedimento secondo le rivendicazioni da 2 e 3, caratterizzato dal fatto che il trattamento finale del complesso consiste in un'aggiunta di soluzione alcoolica fino ad ottenere un prodotto liquiforme.
7. Procedimento come da rivendicazioni da 1 a 4, caratterizzato dal fatto che il trattamento finale del complesso consiste in un essiccamento a dare il complesso in forma di polvere.
8. Procedimento come da rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto che il solvente utilizzato per la formazione della struttura multilaminare del complesso e' lo stesso solvente utilizzato per la dissoluzione del principio attivo.
9. Complesso di fosfolipidi e uno o piu' principi attivi, preparati con il processo della presente invenzione caratterizzato dal fatto che i principi attivi sono scelti tra quelli attivi in campo cosmetico, farmaceutico, dietetico e agronomico.
10. Complesso di fosfolipidi e uno o piu' principi attivi, preparati con il processo della presente invenzione caratterizzato dal fatto che i principi attivi sono scelti tra vitamine, enzimi, antibiotici, e ormoni o loro miscele.
11. Complesso come da rivendicazione 9, caratterizzato dal fatto che il principio attivo e' la vitamina A.
12. Complesso come da rivendicazione 9, caratterizzato dal fatto che il principio attivo e la superossido dismutasi.
13. Complesso come da rivendicazione 9, caratterizzato dal fatto che i fosfolipidi sono di origine vegetale.
14. Composizioni per uso farmaceutico, cosmetico, dietetico e agronomico contenente i complessi di fosfolipidi e principi attivi secondo le rivendicazioni da 9 a 13.
15. Liposomi ottenuti dai complessi di cui alle rivendicazioni precedenti mediante aggiunta di soluzione acquosa.
16. Composizioni per uso farmaceutico, cosmetico, dietetico e agronomico terapeutiche e

Studio CIONI & PIPPARELLI

cosmetologiche contenenti i liposomi di cui alla rivendicazione precedente.

Studio CIONI & PIPPARELLI

Cecchi

