



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

UIBM

DOMANDA NUMERO	101994900382061
Data Deposito	25/07/1994
Data Pubblicazione	25/01/1996

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Titolo

PREPARATO OFTALMICO PER L'USO COME LACRIMA ARTIFICIALE
--

DESCRIZIONE

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

"Preparato oftalmico per l'uso come lacrima artificiale"

a nome: TECHNOPHARMA S.A.

Inventore: Amalio CANTORO

La presente invenzione concerne un preparato oftalmico per l'uso come lacrima artificiale. Più specificamente, l'invenzione riguarda una formulazione acquosa da applicare nel sacco congiuntivale per il trattamento di una patologia del film lacrimale nota come cherato-congiuntivite secca o sindrome dell'occhio secco e, in generale, da utilizzare in tutti quei casi in cui è indicato l'uso di lacrime artificiali, ad esempio contro irritazioni oculari dovute a condizioni ambientali o all'uso di lenti a contatto.

Come risulta dagli studi condotti sull'argomento, il film lacrimale è una complessa struttura a tre strati, comprendente:

- uno strato interno di mucina, costituita da una miscela di glicoproteine prodotta dalle cellule caliciformi congiuntivali (goblet cells), che si adsorbe sulla superficie corneale formando una superficie idrofila;
- uno strato intermedio acquoso che si distribuisce su detta superficie idrofila, composto essenzialmente da acqua, elettroliti, proteine, enzimi e mucina;
- un sottile strato esterno lipidico che ha prevalentemente la funzione di regolare il tasso di evaporazione dell'acqua dal film lacrimale.

Ing. Barrano & Cantoro
Roma s.p.a.

Questa struttura a tre strati costituisce un complesso sistema fisiologico, il cui perfetto equilibrio e continuo rinnovamento è garantito dall'intervento di diversi fattori. E' in conseguenza di anomalie dello strato interno di mucina o di quello intermedio acquoso che si manifesta la sindrome dell'occhio secco. Nei pazienti affetti da tale patologia, infatti, si verifica una iperevaporazione del liquido lacrimale ed un ridotto turn-over con conseguente iperosmoticità del film, la cui osmolarità raggiunge i 330-340 mOsm/l, contro un valore normale di circa 300 mOsm/l.

Un fluido lacrimale fortemente iperosmotico comporta uno squilibrio tra gli elettroliti e le glicoproteine ad elevato peso molecolare (muco) del fluido lacrimale con conseguente assenza o riduzione del fenomeno della felcizzazione del muco.

A tale proposito, è noto che una delle caratteristiche fisiche più interessanti del muco lacrimale è la sua capacità di cristallizzare sotto forma di felci quando, per evaporazione, viene fatto asciugare a temperatura ambiente. Il fenomeno della felcizzazione si evidenzia dopo qualche istante della raccolta del muco lacrimale dal fornice inferiore dell'occhio. Anche se non vi sono certezze sui processi biochimici coinvolti nella cristallizzazione del muco, sembra accettato che il fenomeno citato possa essere il risultato della interazione degli elettroliti con le glicoproteine ad alto peso molecolare del muco (mucine), e che i diversi aspetti della felcizzazione (Tipo I, felcizzazione uniforme; Tipo II, felcizzazione abbondante con felci di dimensioni ridotte e spazi vuoti; Tipo III, felcizzazione presente ma in

Ing. Barriani & Barriani
Roma s.p.a.

modo parziale; Tipo IV, felpizzazione assente) siano collegati allo stato normale o patologico del liquido lacrimale. Una fitta arborizzazione, ad esempio, è considerata espressione del perfetto equilibrio tra mucina ed elettroliti; la presenza parziale o l'assenza della felpizzazione della lacrima, che si rileva in occhi con cheratocongiuntivite secca, indica una mancanza quantitativa del muco lacrimale o un'alterazione qualitativa delle glicoproteine e del loro ambiente (pH, idratazione, equilibrio elettrolitico).

L'eccessiva iperosmolarità delle lacrime determina, inoltre, una degenerazione delle cellule congiuntivali con aumento della desquamazione, perdita delle micropliche della superficie cellulare, rottura della membrana delle cellule epiteliali e riduzione del numero di cellule caliciformi produttrici della mucina. Tale degenerazione cellulare, essendo responsabile della riduzione delle goblet cells e della carenza di mucina, è ritenuta l'origine della maggior parte dei sintomi clinici in corso di occhio secco (secchezza, irritazione, fotofobia e senso di corpo estraneo) e dell'instabilità del film lacrimale.

Infatti l'integrità dello strato interno di mucina rappresenta uno dei fattori essenziali nel mantenimento della stabilità del film lacrimale, sia perché migliora la bagnabilità della superficie corneale, sia perché aumenta la viscosità della fase fluida. Quando la mucina è assente o insufficiente la cornea diventa non bagnabile e si determina la rottura del film lacrimale con formazione di zone secche.

Da un punto di vista diagnostico, oltre che con la valutazione dei sintomi che le sono propri, la sindrome dell'occhio secco può

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

essere rilevata e monitorata attraverso procedure consolidate, quali la misura della produzione lacrimale (test di Schirmer), del tempo di rottura del film lacrimale dopo un ammiccamento, cioè una chiusura totale delle palpebre (break-up time, BUT) e la valutazione della colorazione della superficie oculare con il rosa bengala e la fluoresceina.

Ulteriori metodiche obiettive che permettono di valutare le caratteristiche terapeutiche di preparati per il trattamento dell'occhio secco sono la citologia ad impressione (o per impronta), il test della felpizzazione del muco lacrimale e la determinazione dell'osmolarità del liquido lacrimale. Il primo di detti tests è un metodo non invasivo e ripetibile, con cui è possibile seguire lo stato morfologico delle cellule della congiuntiva bulbare mettendo in evidenza cellularità, coesività concentrazione di goblet cells produttrici di muco, variazione nelle dimensioni delle cellule epiteliali con modifica del rapporto nucleo/citoplasma, variazione della stratificazione cellulare ed eventuale cheratinizzazione dell'epitelio. Quest'ultimo parametro è molto importante in quanto una delle conseguenze più negative, da un punto di vista citologico, della cheratocongiuntivite secca è proprio rappresentata dalla progressiva trasformazione di un epitelio secernente in cheratinizzato e non secernente.

Il test della felpizzazione del muco lacrimale rileva i diversi aspetti della cristallizzazione del muco lacrimale, classificandoli secondo i tipi I-IV precedentemente menzionati, mentre i valori di osmolarità del fluido lacrimale, espressi in mOsm/l, forniscono

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

un'indicazione quantitativa della concentrazione di sali nelle lacrime, il cui incremento, come già detto, deriva da un'aumentata evaporazione dell'acqua del film lacrimale. Il valore dell'osmolarità lacrimale può essere assunto come parametro obiettivo dello stato patologico in esame, essendo stato dimostrato che in condizioni patologiche tale valore aumenta mediamente di 30 - 40 mOsm/l.

La cheratocongiuntivite sicca viene normalmente trattata, oltre che con inserti oculari a lenta dissoluzione da inserire nel sacco congiuntivale, poco utilizzati perché scomodi da applicare e comunque fastidiosi per il paziente, con preparazioni liquide da instillare in gocce, note come lacrime artificiali. Queste ultime costituiscono un corretto approccio terapeutico per la sindrome dell'occhio secco, proprio perché possono sostituire le lacrime, lubrificare i tessuti e prevenire la formazione di aree secche nell'epitelio corneale.

Benché nelle formulazioni commerciali più semplici le lacrime artificiali siano delle vere e proprie soluzioni fisiologiche contenenti, oltre a conservanti e tamponi, il solo cloruro di sodio, è stato dimostrato, su cornee isolate di coniglio, che la presenza in un liquido di irrigazione corneale di ioni K^+ , Ca^{++} , Mg^{++} , HCO_3^- e $H_2PO_4^-$ (oltre agli ioni Na^+ e Cl^-) riduce il tasso di desquamazione delle cellule epiteliali rispetto al caso in cui si adotti il solo cloruro di sodio e la soluzione di Ringer (Bachman W.G. et al., Essential ions for maintenance of the corneal epithelial surface, Invest Ophthalmol Vis. Sci. 26, 1484-1488, 1985).

Concordemente, molti ritengono che le lacrime artificiali

Ing. Barrano & Baranolo
Roma s.p.a.

dovrebbero essere formulate in modo da riprodurre il più possibile la composizione quali-quantitativa delle lacrime, con particolare riguardo alla concentrazione di ioni potassio, magnesio, calcio, cloruro e bicarbonato (Rismondo V. et al., Electrolyte composition of lacrimal gland fluid and tears of normal and vitamin A-deficient rabbits, CLAO J. 15 (3), 222-229, 1989). In particolare, il potassio, presente in elevata concentrazione nel fluido lacrimale naturale, ha una funzione complementare a quella del sodio nel mantenimento della omeostasi intracellulare (Green K. et al., Tear potassium contributes to maintenance of corneal thickness, Ophthalmic Res. 24, 99-102, 1992), mentre il calcio e il magnesio esercitano un ruolo stabilizzante per l'adesione cellulare. Specificamente, il calcio interviene nel metabolismo del glicogeno, nei processi di endocitosi e nella motilità cellulare (Cheung W.Y., Calcium and cell function Vol. 1, Academic Press, New York, 1980) e il magnesio è implicato nella permeabilità della membrana cellulare (Iwata S., The precocular tear film and dry eye syndrome, in International Ophthalmology Clinics, a cura di Holly F.J e Lemp M.A., Little Brown, Boston, Mass., pp. 31-32, 1973) e nell'aggregazione cellulare (Aikawa J.K., The relationship of magnesium to disease in domestic animals and humans, Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, 1971).

Un esempio di formulazione di lacrima artificiale la cui combinazione tende a riprodurre la combinazione di elettroliti normalmente presente nel fluido lacrimale è descritto nel brevetto europeo No. 0 205 279. Benché simili formulazioni abbiano il pregio di

Ing. Baranovič-Romanov
Roma s.p.a.

fornire un'adeguata varietà di elementi nutritivi essenziali per il metabolismo cellulare, esse non sono esenti dall'inconveniente tipico delle soluzioni acquose contenenti sali a basso peso molecolare, la bassa viscosità.

A causa di questa caratteristica, il tempo di permanenza precorneale di tali soluzioni, una volta instillate nel sacco congiuntivale, è estremamente ridotto, ed è quindi necessario ripetere l'instillazione ogni 10-15 minuti, il che comporta la "non-compliance" dei pazienti, oltre che un effetto tossico sui tessuti oculari (congiuntiva e cornea) da parte dei conservanti normalmente presenti.

Per superare l'inconveniente citato sono state introdotte in terapia varie formulazioni di lacrime artificiali viscosizzate mediante l'aggiunta di agenti ad elevato peso molecolare, normalmente polimeri idrosolubili di origine sintetica o naturale. Il brevetto USA No. 4.409.205 descrive appunto una di tali formulazioni in cui l'agente viscosizzante è un polimero sintetico non ionico, scelto tra alcool polivinilico, glicol polietilenico e loro miscele.

È da notare, comunque, che la formulazione di lacrima artificiale proposta da detto brevetto si discosta dai criteri citati sopra riportati in merito alla necessità di un adeguato contenuto di elettroliti, dal momento che insegna che una soluzione oftalmica è molto più efficace nel riportare alla normalità un fluido lacrimale irregolarmente strutturato se la quantità di sali cationici, in particolare sali sodici, è mantenuta ad un livello minimo. Concordemente, nella soluzione ivi rivendicata il contenuto salino è mantenuto al di sotto dello 0,75%,

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

espresso come equivalenti di NaCl.

Al di là di quest'ultima considerazione, è stato sperimentalmente dimostrato che una lacrima artificiale, per avere un elevato tempo di permanenza precorneale ed essere allo stesso tempo tollerata dal paziente, deve essere viscosizzata da un agente che conferisca alla soluzione un comportamento reologico non-newtoniano, e i polimeri non ionici, come quelli proposti dal citato brevetto USA, non hanno tale caratteristica.

Come tutti i fluidi newtoniani, le soluzioni viscosizzate con agenti polimerici non ionici, infatti, mantengono costante la viscosità anche se sottoposte ad uno sforzo di taglio, situazione che si verifica nel film lacrimale durante un ammiccamento. Al contrario, le glicoproteine del fluido lacrimale naturale presentano, in soluzione acquosa, una elevata viscosità in condizioni di riposo, cioè tra due ammiccamenti consecutivi, ed una viscosità molto bassa nel corso di un ammiccamento, cioè quando sottoposte ad uno sforzo di taglio. Tale comportamento reologico, tipico dei fluidi non-newtoniani e in particolare di quelli pseudoplastici, si traduce da una parte in elevati tempi di permanenza precorneale e dall'altra in una buona tollerabilità oculare.

Secondo quanto sperimentalmente dimostrato, perché le formulazioni di lacrime artificiali presentino caratteristiche reologiche non-newtoniane è necessario che i prodotti polimerici ad esse aggiunti in qualità di viscosizzanti siano di tipo polianionico. Un esempio di formulazione che risponde a tale criterio è quella descritta nella

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

domanda di brevetto PCT No. 84/04681, in cui si propongono come agenti viscosizzanti polimeri carbossivinilici ad alto peso molecolare del tipo del Carbopol, da includere nella composizione in ragione dello 0,05-0,25% in peso. Detta formulazione, tuttavia, contiene agenti stabilizzanti, conservanti, neutralizzanti e preferenzialmente cloruro di sodio come regolatore dell'osmolarità, ma non contiene una combinazione di sostanze nutritive saline.

Il materiale polianionico più spesso proposto come agente viscosizzante in formulazioni per uso oftalmico è l'acido ialuronico (o i suoi sali), un polisaccaride presente in natura in molti tessuti e fluidi sia umani che animali che assume in soluzione acquosa un comportamento reologico non newtoniano del tutto simile, in adeguata concentrazione, a quello delle lacrime naturali. Nella domanda di brevetto europeo No. 0 323 522, ad esempio, il sodio ialuronato (di peso molecolare non specificato) viene proposto come agente viscosizzante in una composizione di lacrima artificiale, in concentrazione compresa tra lo 0,01 e l'1% in peso. Anche in questo caso, però, la composizione proposta contiene sostanzialmente ialuronato di sodio, cloruro di sodio, conservanti ed eventualmente tamponi ma non contiene gli ioni essenziali per un fisiologico metabolismo cellulare.

Soluzioni acquose contenenti sodio ialuronato assieme ad una notevole varietà di ioni sono descritte nella domanda di brevetto europeo No. 0 414 373. Tale documento, tuttavia, non riguarda preparati per lacrime artificiali, ma soluzioni viscoelastiche per l'uso in chirurgia oculare, come coadiuvanti negli interventi di microvisco-

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

chirurgia oculare a carico del segmento anteriore (cataratta, cheratoplastica, trabeculectomia, ecc.) e posteriore (distacco di retina, retinopatia) dell'occhio. In tale campo il sodio ialuronato ad alto peso molecolare è impiegato in concentrazione relativamente elevata per impartire ai prodotti risultanti proprietà viscoelastiche tali da garantire, nel corso degli interventi chirurgici, il mantenimento degli spazi anatomici oculari (ad esempio camera anteriore) evitandone il collasso, o la separazione di strutture o lembi oculari (ad esempio, sclera da congiuntiva) o la protezione dei tessuti oculari da eventuali danni chirurgici. Benché nel documento in esame si menzionino concentrazioni di sodio ialuronato che spaziano dallo 0,1 al 5% in peso (e preferibilmente dall'1 al 3% in peso) le soluzioni viscoelastiche presentano proprietà accettabili per l'uso a cui sono destinate solo a concentrazioni di sodio ialuronato superiori all'1% e con pesi molecolari di almeno 1 milione di dalton. Infatti, in tutti gli esempi di realizzazione descritti nella domanda di brevetto in questione si utilizza una concentrazione di sodio ialuronato del 3% in peso.

Tornando alle formulazioni per lacrime artificiali, il più recente brevetto USA No. 5.106.615 riporta che nelle soluzioni per irrigazione corneale, a bassa concentrazione di agente viscosizzante a comportamento non newtoniano, tale comportamento non viene mantenuto a causa della compresenza di sali nel preparato. Secondo l'insegnamento di tale documento, dunque, una formulazione per l'uso come lacrima artificiale, per poter mantenere le vantaggiose caratteristiche reologiche di fluido non newtoniano conferitele dagli

Ing. Barriano & Barriano
Roma s.p.a.

agenti viscosizzanti polianionici, deve avere un tenore in sali (a parte quelli che costituiscono l'agente viscosizzante) praticamente trascurabile, e comunque non superiore a 1,5 mmoli/l. Secondo il brevetto USA in parola, sia le formulazioni descritte nel brevetto USA No. 4.409.205 che quelle descritte nella domanda di brevetto PCT No. 84/04681 (precedentemente citati) perdono le caratteristiche reologiche non newtoniane a causa di un'eccessiva presenza di sali.

Dato che, contrariamente ad alcuni insegnamenti della tecnica anteriore, si ritiene che la presenza di un adeguato tenore di alcune specie ioniche sia determinante per un corretto trattamento delle patologie del film lacrimale, lo scopo della presente invenzione è quello di fornire una composizione viscosizzata adatta per l'uso come lacrima artificiale che mantenga la reologia non newtoniana anche in presenza di sali, e in modo specifico di cationi bivalenti come Ca^{++} e Mg^{++} .

A tale scopo, si propone una soluzione acquosa salina ipotonica, viscosizzata con sodio ialuronato e contenente non solo gli ioni Na^+ e Cl^- , ma anche almeno gli ioni K^+ , Ca^{++} , Mg^{++} e HPO_4^- , la cui formulazione è tale che la reologia non newtoniana conferitale dalla presenza del polimero non viene negativamente influenzata dalla presenza dei sali. Grazie alle sue caratteristiche reologiche, la soluzione proposta ha un elevato tempo di permanenza precorneale, e grazie anche alla presenza degli ioni citati essa stabilizza significativamente il film lacrimale migliorando, come sarà evidente nel seguito, tutti i parametri indicativi dello stato patologico causato dalla cheratocongiuntivite secca.

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

Forma pertanto oggetto specifico della presente invenzione un preparato oftalmico per l'uso come lacrima artificiale viscosizzato con ialuronato, contenente ialuronato in concentrazioni comprese tra lo 0,05 e il 2% in peso, nonché le seguenti quantità minime di specie ioniche: 40 mmoli/l di ione sodio, 12 mmoli/l di ione potassio, 0,4 mmoli/l di ione calcio, 0,4 mmoli/l di ione magnesio, 50 mmoli/l di ione cloruro e 7 mmoli/l di ione fosfato.

Preferibilmente, detto preparato contiene anche una sostanza chelante, in particolare un citrato, in ragione di almeno 0,7 mmoli/l, e secondo una forma di realizzazione preferita dell'invenzione esso ha la seguente formulazione di massima:

Na ⁺	40-95 mmoli/l	Cl ⁻	50-150 mmoli/l
K ⁺	12-28 mmoli/l	HPO ₄ ⁼	7-20 mmoli/l
Ca ⁺⁺	0,4-1,5 mmoli/l	citrato	0,7-2,5 mmoli/l
Mg ⁺⁺	0,4-1,0 mmoli/l	ialuronato	0,05-2% in peso.

Opzionalmente, la formulazione proposta può anche contenere gli ioni acetato e bicarbonato, ed EDTA come conservante, preferibilmente alle concentrazioni minime, rispettivamente, di 7 mmoli/l, 5 mmoli/l e 1 mmole/l.

Il sale dell'acido ialuronico incluso nella formulazione è preferibilmente ialuronato di sodio a peso molecolare compreso tra 500.000 e 4.000.000 di daltons, e il preparato risultante è vantaggiosamente ipotonico, con una osmolarità compresa tra 140 e 280 mOsm/l, ha un pH compreso tra 6,8 e 7,6 e una viscosità compresa tra 10.000 e 20.000 cps a 2 s⁻¹ e tra 10 e 5 cps a 1000 s⁻¹.

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

Come sarà evidente nel seguito, la formulazione proposta mantiene il comportamento reologico tipico delle soluzioni a base di ialuronato nonostante la presenza di varie specie ioniche in quantità relativamente elevate e, se instillata nel sacco congiuntivale, essa mantiene fisiologica l'osmolarità delle lacrime per più di 1h30min dopo l'instillazione, alleviando considerevolmente la sintomatologia connessa alla sindrome dell'occhio secco, migliorando il pattern di felcizzazione lacrimale e la morfologia delle cellule epiteliali, e aumentando la densità delle cellule goblet produttrici di mucina.

La presente invenzione viene descritta nel seguito, a titolo esemplificativo e non limitativo, con riferimento ad una sua forma di realizzazione specifica e alle figure dei disegni allegati, in cui:

la figura 1 mostra la curva di flusso, con la viscosità in funzione della velocità dello sforzo di taglio, di un preparato secondo l'invenzione, a confronto con un preparato viscosizzato della tecnica anteriore;

le figure 2 e 3 mostrano i risultati di prove cliniche relativi al bruciore oculare, ottenuti rispettivamente con il preparato dell'invenzione e con un prodotto della tecnica anteriore;

le figure 4 e 5 mostrano i risultati di prove cliniche relativi alla sensazione di corpo estraneo, ottenuti rispettivamente con il preparato dell'invenzione e con lo stesso prodotto della tecnica anteriore;

la figura 6 mostra i risultati dei tests sul tempo di rottura del film lacrimale (BUT) ottenuti con il preparato dell'invenzione e con lo stesso prodotto della tecnica anteriore;

Ing. Baranò & Baranò
Roma s.p.a.

la figura 7 mostra i risultati dei tests sulla secrezione lacrimale (Schirmer I) ottenuti con il preparato dell'invenzione e con lo stesso prodotto della tecnica anteriore;

la figura 8 mostra i risultati del test di colorazione con fluoresceina ottenuti con il preparato dell'invenzione e con lo stesso prodotto della tecnica anteriore;

la figura 9 mostra i risultati del test di colorazione con rosa bengala ottenuti con il preparato dell'invenzione e con lo stesso prodotto della tecnica anteriore;

le figure 10 e 11 mostrano i risultati delle misure di osmolarità lacrimale ottenuti con il preparato dell'invenzione e con lo stesso prodotto della tecnica anteriore, rispettivamente a 30 minuti e a 90 minuti dall'ultima instillazione;

le figure 12 e 13 mostrano la distribuzione della morfologia delle cellule epiteliali prima e dopo la terapia, rispettivamente con il preparato dell'invenzione e con lo stesso prodotto della tecnica anteriore;

le figure 14 e 15 mostrano la distribuzione della densità delle cellule goblet prima e dopo la terapia, rispettivamente con il preparato dell'invenzione e con lo stesso prodotto della tecnica anteriore;

le figure 16 e 17 mostrano i risultati dei tests di felcizzazione del muco lacrimale a 30 minuti dall'instillazione, ottenuti rispettivamente con il preparato dell'invenzione e con lo stesso prodotto della tecnica anteriore;

le figure 18 e 19 mostrano i risultati dei tests di felcizzazione

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

del muco lacrimale a 90 minuti dall'instillazione, ottenuti rispettivamente con il preparato dell'invenzione e con lo stesso prodotto della tecnica anteriore;

le figure 20 e 21 mostrano i risultati delle misure di osmolarità lacrimale ottenuti con il preparato dell'invenzione e con il prodotto della tecnica anteriore di cui alla figura 1, rispettivamente a 30 minuti e a 90 minuti dall'ultima instillazione;

le figure 22 e 23 mostrano la distribuzione della densità delle cellule goblet prima e dopo la terapia, rispettivamente con il preparato dell'invenzione e con lo stesso prodotto della tecnica anteriore; e

le figure 24 e 25 mostrano la distribuzione della morfologia delle cellule epiteliali prima e dopo la terapia, rispettivamente con il preparato dell'invenzione e con lo stesso prodotto della tecnica anteriore.

ESEMPIO 1

Valutazione delle caratteristiche reologiche dei preparati secondo
l'invenzione e confronto

Il preparato secondo l'invenzione su cui sono state effettuate le sperimentazioni riportate nel seguito, denominato SVS20, è formulato come segue:

	mg/100 ml	mmoli/l
sodio ialuronato	250	~ 6,2
NaCl	279,2	47,77
KCl	103,3	13,85
Na ₂ HPO ₄ ·12 H ₂ O	322,2	9,0

Ing. Barranò & Baranò
Roma s.p.a.

citrato Na_3	26,0	1,05
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	9,2	0,45
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	6,9	0,6

ed ha un pH pari a 7,32 e una osmolarità pari a 150 mOsm/l.

Allo scopo di valutarne il comportamento reologico in confronto ad un altro preparato per lacrima artificiale viscosizzato con acido ialuronico in cui però non siano presenti quantità apprezzabili di specie ioniche diverse da Na^+ e Cl^- è stata messa a punto una preparazione secondo la domanda di brevetto europeo No. 0 323 522, denominata nel seguito S09 e formulata come segue:

sodio ialuronato	250	mg/100 ml
NaCl	0,9	% in peso

Le rispettive curve di flusso, in cui la viscosità in $\text{mPa}\cdot\text{s}$ è riportata in funzione della velocità di taglio in s^{-1} , illustrate nella figura 1, sono state determinate alla temperatura della superficie oculare di 32 °C al fine di poter mimare le condizioni di impiego clinico dei preparati. Per le misure è stato utilizzato un viscosimetro Bohlin Rheometer System con:

- dispositivo di misura a cilindri coassiali C1BC-true
- barra di torsione 1,59 g·cm
- intervallo shear rate 2-1000 s^{-1}

Le curve così ottenute, riportate in figura 1, dimostrano chiaramente che, benché entrambe le formulazioni abbiano una viscosità dipendente dalla velocità dello sforzo di taglio, cioè un comportamento non newtoniano (mentre, ad esempio, una

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

formulazione viscosizzata con un polimero non ionico, avendo viscosità costante, darebbe un diagramma pressoché piatto), la formulazione dell'invenzione presenta in maniera più accentuata tale caratteristica.

Pertanto, la formulazione dell'invenzione, pur contenendo oltre a ioni Na^+ anche ioni K^+ e cationi bivalenti come Ca^{++} e Mg^{++} , non solo non perde le caratteristiche non newtoniane ma ha, sotto questo profilo, un comportamento migliore di quello di una formulazione contenente il solo cloruro di sodio come specie salina.

ESEMPIO 2

Sperimentazione clinica e confronto con soluzioni viscosizzate con idrossipropilmetilcellulosa

Una soluzione oftalmica sterile monodose secondo l'invenzione, formulata come riportato nell'esempio 1 (SVS20) è stata sottoposta a sperimentazione clinica e confrontata con un collirio commerciale multidose (indicato nel seguito come DC) viscosizzato con un agente non ionico, l'idrossipropilmetilcellulosa, e contenente in quantità apprezzabile il solo cloruro di sodio come specie salina.

La sperimentazione clinica è stata condotta su 220 pazienti ai quali era stata diagnosticata cheratocongiuntivite secca, 15 dei quali non hanno completato lo studio perché "drop-outs". I 205 pazienti che hanno completato lo studio, di cui 189 donne 16 uomini, sono stati trattati in maniera randomizzata con il preparato secondo l'invenzione (SVS20) o con quello della tecnica anteriore (DC) 6 volte al giorno per 60 giorni.

In tutti i pazienti sono stati valutati i sintomi oculari classici

Ing. Baranò G. Baranò
Roma s.p.a.

dell'occhio secco quali bruciore, fotofobia, sensazione di corpo estraneo e dolore, assegnando un punteggio variabile da 0 (assenza di sintomo) a 4 (presenza grave); le valutazioni sono state effettuate prima del trattamento e dopo 15, 30 e 60 giorni di terapia con i due preparati. I risultati di tali tests per quanto riguarda due di detti sintomi sono esposti nelle seguenti tabelle 1 e 2, e i valori corrispondenti sono anche riportati nelle figure 1-4 degli allegati disegni.

TABELLA 1

Tests sulla sintomatologia oculare
Bruciore (%)

Intensità sintomo	basale		15 giorni		30 giorni		60 giorni	
	SVS20	DC	SVS20	DC	SVS20	DC	SVS20	DC
4: molto int.	2	2	0	0	0	0	0	0
3: intenso	37	27	1	4	0	0	0	0
2: moder.	37	45	26	41	2	15	2	9
1: lieve	17	19	50	40	43	54	22	42
0: assente	7	7	23	15	55	31	76	49

TABELLA 2

Tests sulla sintomatologia oculare
Sensazione di corpo estraneo (%)

Intensità sintomo	basale		15 giorni		30 giorni		60 giorni	
	SVS20	DC	SVS20	DC	SVS20	DC	SVS20	DC
4: molto int.	6	3	0	0	0	0	0	0
3: intenso	20	17	1	4	0	2	0	3
2: moder.	28	42	13	35	2	15	0	6
1: lieve	35	30	49	35	30	49	16	37
0: assente	11	8	37	26	68	34	84	54

Dai dati che precedono risulta evidente che il preparato secondo l'invenzione permette un più rapido e significativo miglio-

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

ramento della sintomatologia soggettiva rispetto al preparato a base di cellulosa.

Negli stessi pazienti sono stati valutati, inoltre, i valori medi del tempo di rottura del film lacrimale (BUT) e i valori medi della secrezione lacrimale (Schirmer I), e sono stati effettuati i tests di colorazione della superficie corneo-congiuntivale con fluoresceina al 2% e con rosa bengala all'1%, assegnando alle colorazioni punteggi (scores) compresi tra 1 e 8. I rispettivi risultati di tali esami comparativi sono riportati numericamente nella tabella 3 che segue, e sono illustrati nei diagrammi di cui alle figure 6-9 allegate.

TABELLA 3

Tests di funzionalità e stabilità lacrimale e di integrità della superficie corneo-congiuntivale

Test, unità	basale		15 giorni		30 giorni		60 giorni	
	SVS20	DC	SVS20	DC	SVS20	DC	SVS20	DC
BUT, sec	3,12	3,51	5,87	4,91	7,15	5,74	8,64	6,4
Schirmer I, mm/5 min	3,87	3,74	7,3	4,88	9,55	6,16	10,68	6,87
fluoresc., punteggio	4,95	5,01	2,21	3,62	1,14	2,57	0,36	1,3
rosa beng., punteggio	4,92	5,06	2,29	3,69	1,21	2,42	0,38	1,45

Tutti i tests sopra riportati dimostrano un miglioramento più rapido e più accentuato della patologia in esame con il trattamento secondo l'invenzione rispetto al trattamento con il preparato DC della tecnica anteriore.

Oltre ad essere sottoposti tutti alle prove cliniche generali che

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

precedono, i pazienti erano stati divisi in due gruppi, nel primo dei quali, costituito da 113 persone, è stata anche valutata l'osmolarità lacrimale all'inizio dell'esperimento e dopo 15, 30 e 60 giorni di trattamento, effettuando le valutazioni a 30 minuti e a 90 minuti dall'instillazione dei colliri. I campioni di lacrime per la determinazione dell'osmolarità sono stati prelevati usando una pipetta con microcapillare, e impiegando una tecnica che evita l'induzione di lacrimazione riflessa. L'osmolarità è stata poi misurata mediante l'osmometro crioscopico Osmomat 30 della Gonotec di Berlino (Germania), opportunamente modificato.

I valori medi di osmolarità rilevati nei due gruppi di pazienti trattati con i due farmaci a confronto sono riportati nella seguente tabella 4, e nelle figure 10 e 11 allegate.

TABELLA 4

Valori medi della osmolarità lacrimale (mOsm/l)

Tempo dall'instill.	basale		15 giorni		30 giorni		60 giorni	
	SVS20	DC	SVS20	DC	SVS20	DC	SVS20	DC
30 minuti	353	350	301	338	303	340	304	340
90 minuti	354	350	306	346	311	347	312	347

Sul secondo gruppo di pazienti, costituito da 92 persone, sono stati condotti sia il test di citologia ad impressione che il test sul pattern di felcizzazione lacrimale. Il primo è stato effettuato all'inizio dello studio e dopo 60 giorni di trattamento, secondo la tecnica descritta da

Ing. Baranovič-Ranar
Roma s.p.a.

Nelson, D. J., in Cornea 7 (1), 71-81, (1988), mentre i pattern di felcizzazione lacrimale sono stati valutati all'inizio dell'esperimento e ancora dopo 15, 30 e 60 giorni di terapia, a 60 e a 90 minuti dall'ultima instillazione di collirio. Per quest'ultimo test si è adottata la tecnica descritta da Rolando, M. et al., Fortschr. Ophthalm. 83, 644-646, 1986.

I risultati delle prove condotte sul secondo gruppo di pazienti sono riassunti nelle tabelle 5 e 6 che seguono, ed illustrati nelle corrispondenti figure 12-15 e 16-19 allegate.

TABELLA 5
Citologia congiuntivale (%)

	basale		60 giorni	
	SVS20	DC	SVS20	DC
morfologia delle cellule epiteliali				
sup. cheratinizzate	17	11	8	9
sup. non cheratinizzate	26	20	11	33
cubiche	41	49	41	36
cilindriche	16	20	40	22
densità delle cellule goblet				
assenti	23	4	3	9
scarse	50	40	32	29
medie	27	36	52	47
numerosa	0	20	13	15

Ing. Barranò & Ranaldo
Roma s.p.a.

TABELLA 6

Tests di felcizzazione del muco lacrimale (%)

	basale		15 giorni		30 giorni		60 giorni	
	SVS20	DC	SVS20	DC	SVS20	DC	SVS20	DC
30 minuti								
tipo III + IV	100	100	30	71	26	42	9	36
tipo I + II	0	0	70	29	74	58	91	64
90 minuti								
tipo III + IV	100	100	44	67	26	36	23	23
tipo I + II	0	0	56	33	74	64	77	77

L'aumento delle cellule goblet, il miglioramento della morfologia delle cellule epiteliali e il miglioramento dei pattern di felcizzazione nei campioni trattati con il preparato dell'invenzione rispetto a quelli trattati con il preparato a base di cellulosa possono essere considerati anche una conseguenza della correzione della iperosmolarità patologica delle lacrime verso i valori fisiologici osservati nelle lacrime dei pazienti trattati con il collirio a base di acido ialuronico.

ESEMPIO 3

Sperimentazione clinica e confronto con le soluzioni viscosizzate con sodio ialuronato di cui all'esempio 1

Nel corso di un secondo studio clinico, condotto secondo un disegno sperimentale controllato in doppio cieco, della durata di 2 mesi, sono stati valutati su 24 pazienti affetti da cheratocongiuntivite secca gli effetti del collirio SVS20 secondo l'invenzione in confronto ad una soluzione estemporanea in monodose allo 0,25% di sodio ialuronato, isotonica rispetto al fluido lacrimale, contenente solo cloruro di sodio, corrispondente al preparato S09 di cui all'esempio 1.

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

Entrambi i colliri sono stati somministrati alla posologia di 1 goccia per occhio 6 volte al dì, e i risultati dello studio hanno confermato l'efficacia del preparato SVS20 nel riportare entro ambiti fisiologici l'osmolarità del film lacrimale fino a 90 minuti dall'instillazione, nello stabilizzare il film precorneale, con significativi incrementi dei valori di BUT e Schirmer I, e nel produrre un notevole miglioramento della morfologia delle cellule epiteliali e della densità delle cellule goblet. Nel gruppo di pazienti trattato con S09, al contrario, l'osmolarità è rimasta entro limiti patologici e l'esame citologico della superficie congiuntivale ha fatto registrare una situazione pressoché immodificata dopo 60 giorni di terapia, rispetto al controllo basale.

In particolare, i risultati delle misure di osmolarità lacrimale, condotte secondo le modalità descritte nell'esempio 2, sono riportati nella seguente tabella 7, e nelle figure 20 e 21 allegate.

TABELLA 7

Valori medi della osmolarità lacrimale (mOsm/l)

Tempo dall'instill.	basale		15 giorni		30 giorni		60 giorni	
	SVS20	S09	SVS20	S09	SVS20	S09	SVS20	S09
30 minuti	345	348	310	335	305	340	295	3335
90 minuti	345	348	320	340	315	340	300	345

Analogamente, i risulti dell'esame citologico, condotto come descritto nell'esempio 2, sono esposti nella tabella 8 seguente, nonché

Ing. Barzani & Zanardo
Roma spa

nelle figure 22-25 allegate.

TABELLA 8
Citologia congiuntivale (%)

	basale		60 giorni	
	SVS20	S09	SVS20	S09
densità delle cellule goblet				
assenti	50	58	17	42
scarse	34	17	33	42
medie	8	17	25	8
numerosa	8	8	25	8
morfologia delle cellule epiteliali				
sup. cheratinizzate	42	50	25	42
sup. non cheratinizzate	50	25	17	33
cubiche	4	17	33	17
cilindriche	4	8	25	8

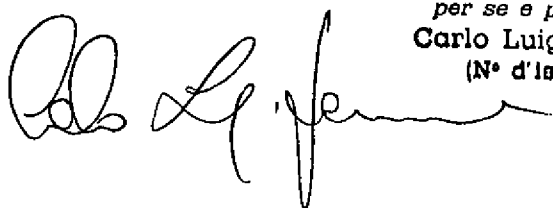
I risultati delle due sperimentazioni cliniche sopra riportate fanno propendere per la conclusione che il collirio SVS20, grazie alla formulazione del sodio ialuronato in un veicolo contenente gli ioni essenziali per un fisiologico metabolismo cellulare, stabilizzi significativamente il film lacrimale e produca un riequilibrio qualitativo e quantitativo dell'ambiente precorneale, consentendo così alle cellule epiteliali di non degenerare verso stadi morfologici e funzionali patologici e alle cellule goblet di raggiungere una densità più accentuata.

Dal confronto complessivo del prodotto dell'invenzione con il prodotto a base di acido ialuronico della tecnica anteriore si può dedurre che gli effetti vantaggiosi del primo rispetto al secondo siano dovuti all'apporto esogeno di ioni essenziali al metabolismo cellulare e

Ing. Barriani & Barriani
Roma s.p.a.

al ridotto stress osmotico a carico delle cellule epiteliali prodotto dalla somministrazione di una soluzione ipotonica. Inoltre, la presenza di un polimero a comportamento non newtoniano come il sodio ialuronato, oltre a stabilizzare le lacrime e a ritardarne l'evaporazione, affievolisce la trasmissione sulla superficie oculare delle forze di sfregamento prodotte dalle palpebre nel corso dell'ammiccamento, rendendolo molto ben tollerato.

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



UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Carlo Luigi Iannone
(N° d'iscr. 456)

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



RIVENDICAZIONI

1. Preparato oftalmico per l'uso come lacrima artificiale viscosizzato con ialuronato, contenente ialuronato in concentrazioni comprese tra lo 0,05 e il 2% in peso, nonché le seguenti quantità minime di specie ioniche: 40 mmoli/l di ione sodio, 12 mmoli/l di ione potassio, 0,4 mmoli/l di ione calcio, 0,4 mmoli/l di ione magnesio, 50 mmoli/l di ione cloruro e 7 mmoli/l di ione fosfato.

2. Preparato secondo la rivendicazione 1, contenente inoltre almeno 0,7 mmoli/l di una sostanza chelante.

3. Preparato secondo la rivendicazione 2 in cui detta sostanza chelante è un citrato.

4. Preparato secondo la rivendicazione 3 contenente le seguenti specie ioniche alle seguenti concentrazioni:

Na ⁺	40-95 mmoli/l	Cl ⁻	50-150 mmoli/l
K ⁺	12-28 mmoli/l	HPO ₄ ⁼	7-20 mmoli/l
Ca ⁺⁺	0,4-1,5 mmoli/l	citrato	0,7-2,5 mmoli/l
Mg ⁺⁺	0,4-1,0 mmoli/l	ialuronato	0,05-2% in peso.

5. Preparato secondo ognuna delle rivendicazioni precedenti, contenente, inoltre, almeno 7 mmoli/l di ione acetato.

6. Preparato secondo ognuna delle rivendicazioni precedenti, contenente, inoltre, almeno 5 mmoli/l di ione bicarbonato.

7. Preparato secondo ognuna delle rivendicazioni precedenti, contenente, inoltre, almeno 1 mmole/l di EDTA.

8. Preparato secondo ognuna delle rivendicazioni precedenti, in cui detto ialuronato è ialuronato di sodio ed ha peso molecolare

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

compreso tra 500.000 e 4.000.000 daltons.

9. Preparato secondo ognuna delle rivendicazioni precedenti ipotonico, avente osmolarità compresa tra 140 e 280 mOsm/l.

10. Preparato secondo ognuna delle rivendicazioni precedenti avente una viscosità compresa tra 10.000 e 20.000 cps a 2 sec^{-1} e tra 10 e 5 cps a 1000 sec^{-1} .

11. Preparato secondo ognuna delle rivendicazioni precedenti avente pH compreso tra 6,8 e 7,6.

12. Preparato secondo la rivendicazione 4 avente la seguente composizione:

	mg/100 ml	mmoli/l
sodio ialuronato	250	~ 6,2
NaCl	279,2	47,77
KCl	103,3	13,85
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$	322,2	9,0
citrato Na_3	26,0	1,05
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	9,2	0,45
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	6,9	0,6

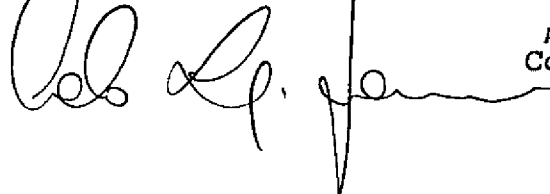
e avente un pH pari a 7,32 e una osmolarità pari a 150 mOsm/l.

13. Preparato secondo le rivendicazioni 1-12, sostanzialmente come in precedenza illustrato e descritto.

ROMA, 25 LUG. 1994

p.p. TECHNOPHARMA S.A.

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



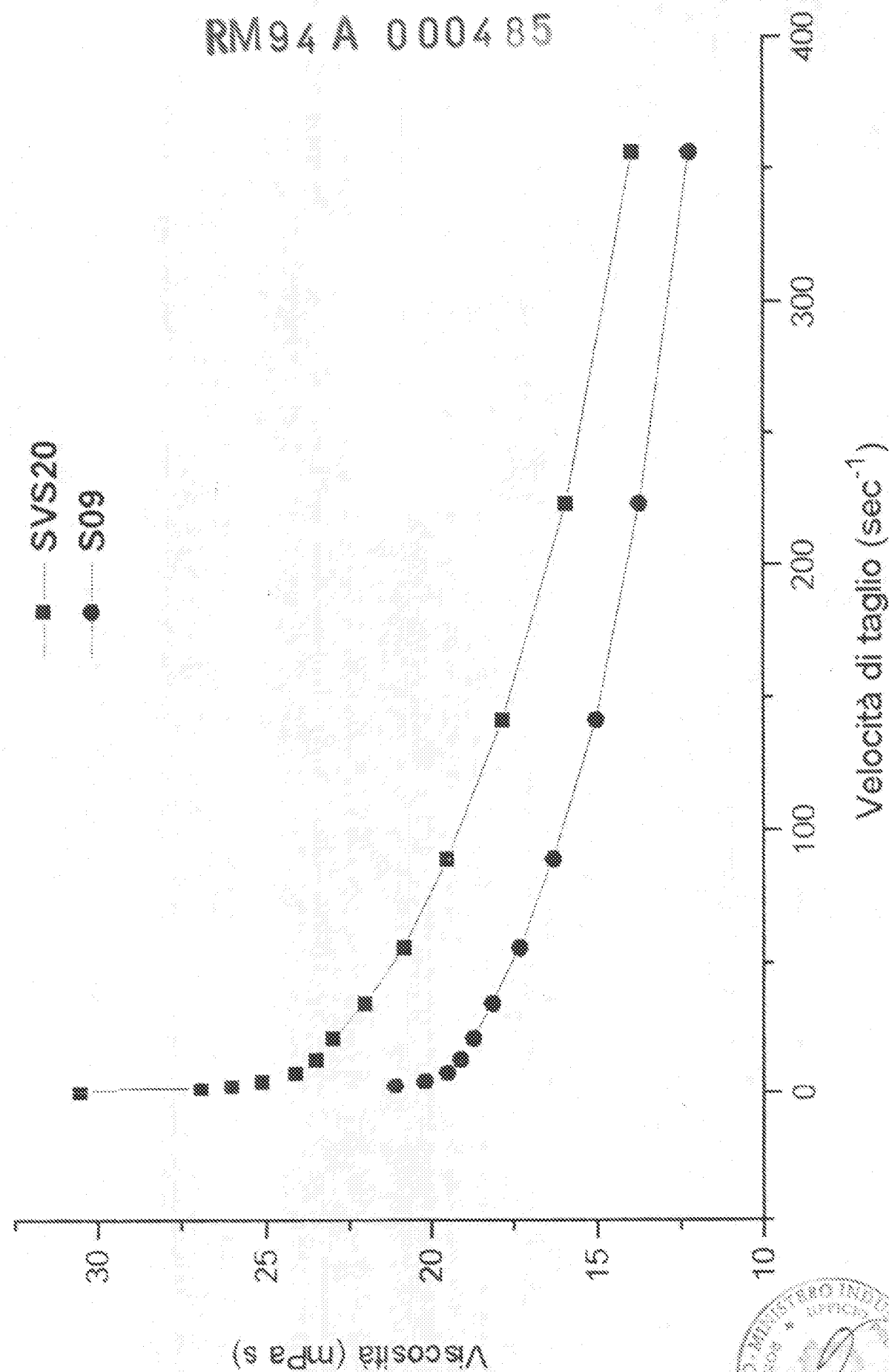
UN MANDATARIO
per se e per gli altri MB
Carlo Luigi Iannone
(N° d'iscr. 486)

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



RM94 A 000485

Fig. 1



P.D.: TECHNOPHARMA S.A.
 ING. BARZANI & ZANARDI ROMA S.p.A.

Handwritten signature

CAV. MANDATARIO
 per se e per gli altri
 Carlo Luigi Iannone
 (N° d'iscr. 486)

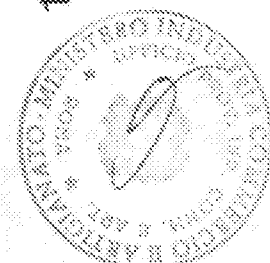


Fig.2 - SVS20

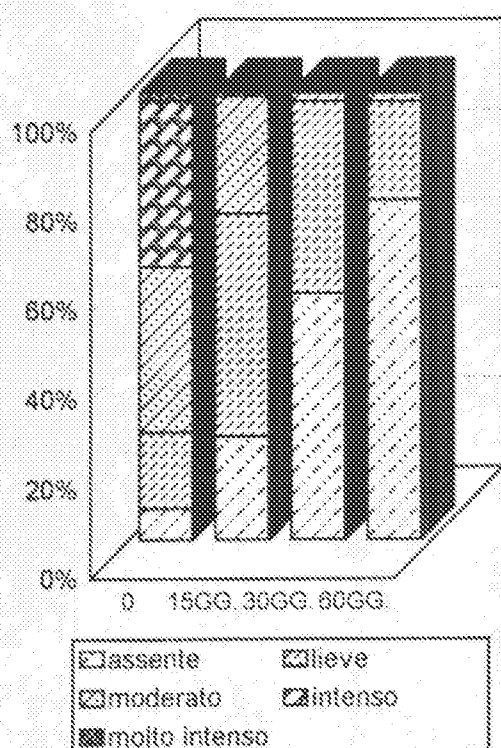


Fig.3 - DC

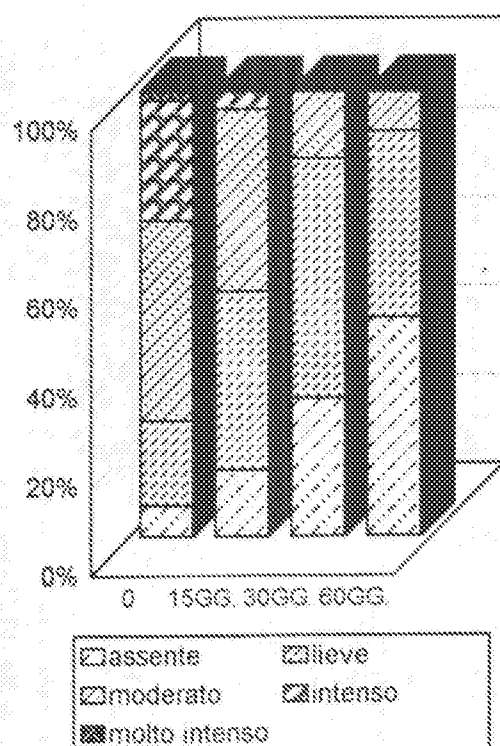


Fig.4 - SVS20

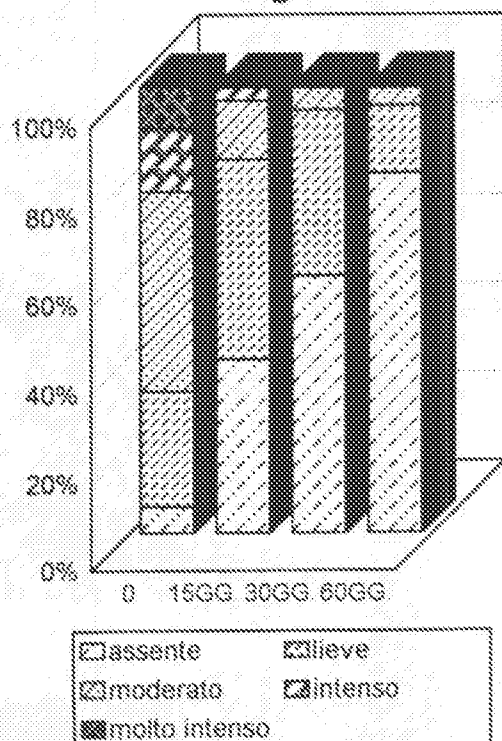
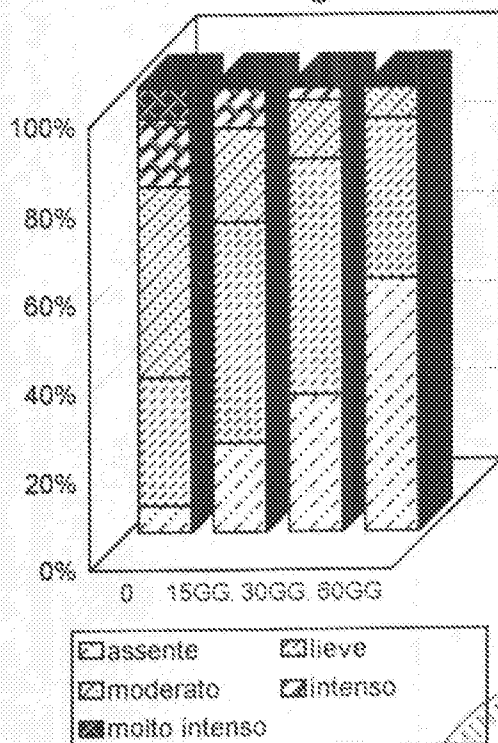


Fig.5 - DC



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

Carlo Luigi Iannone

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Carlo Luigi Iannone
(N° d'iscr. 456)

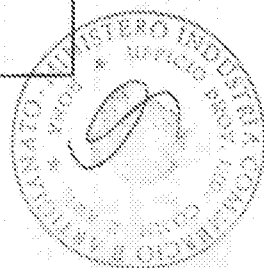


Fig.6

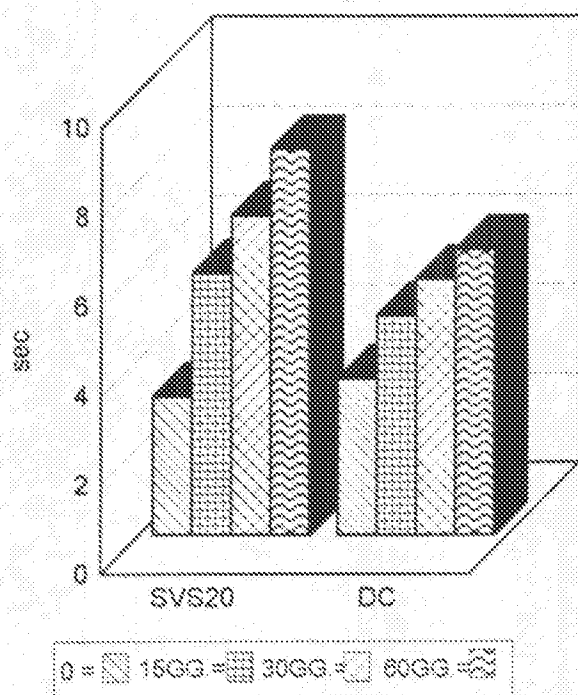


Fig.7

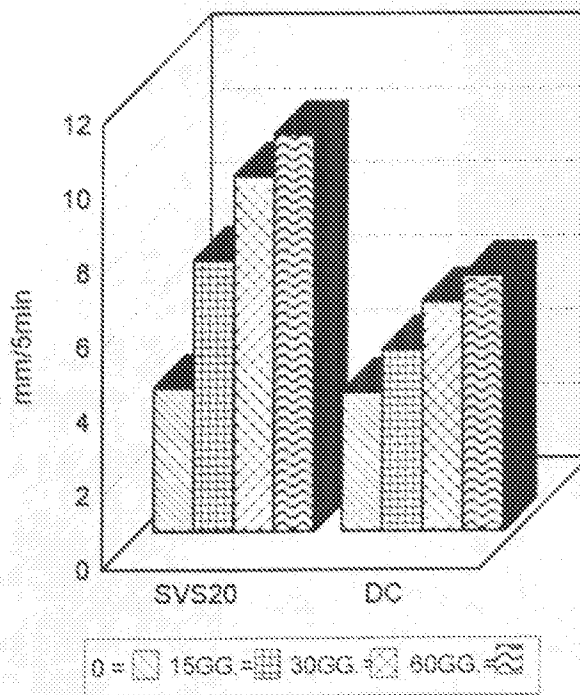


Fig.8

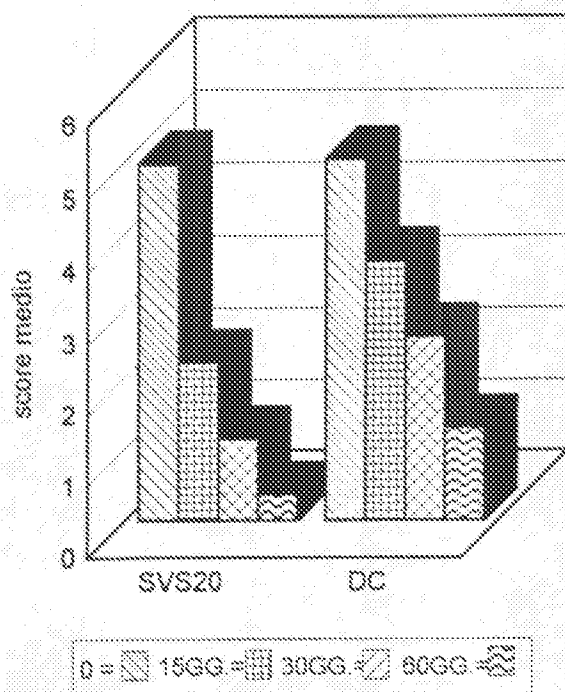
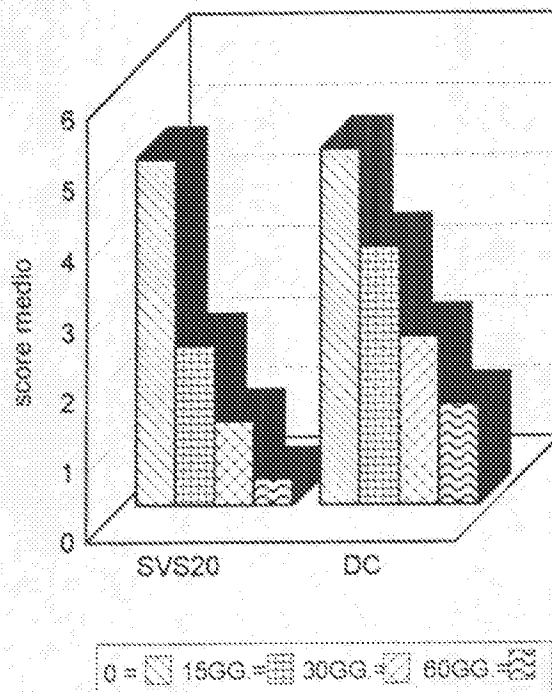


Fig.9



p.p.: TECHNOPHARMA S.A.
ING. BARZANO & ZANARDO ROMA S.p.A.

Carlo Luigi Iannone

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Carlo Luigi Iannone
(N° d'iscr. 486)

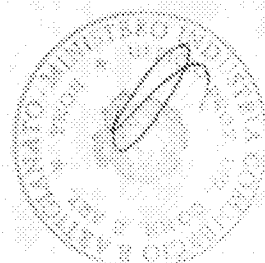
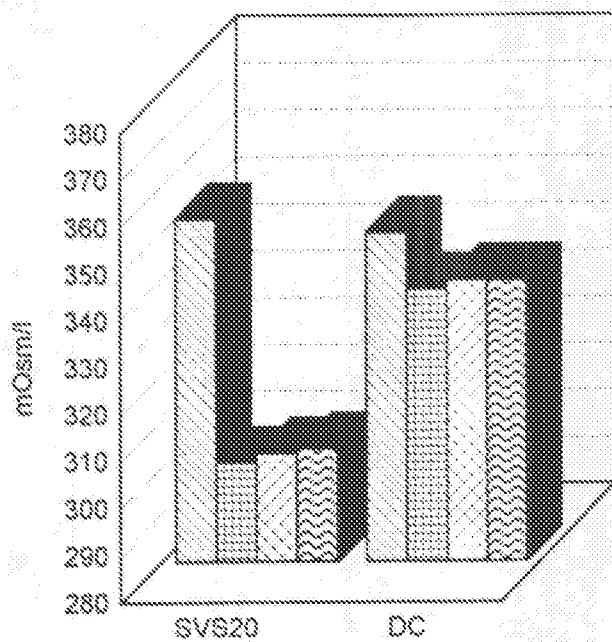
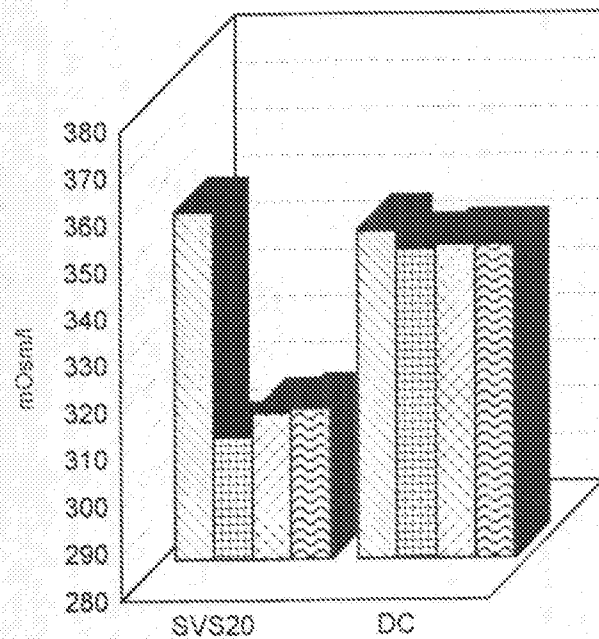


Fig.10



0 = 15GG = 30GG = 60GG =

Fig.11



0 = 15GG = 30GG = 60GG =

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

Carlo Luigi Iannone

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Carlo Luigi Iannone
(N° d'iscr. 456)

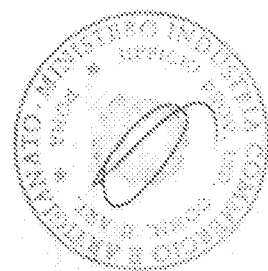


Fig.12 - SVS20

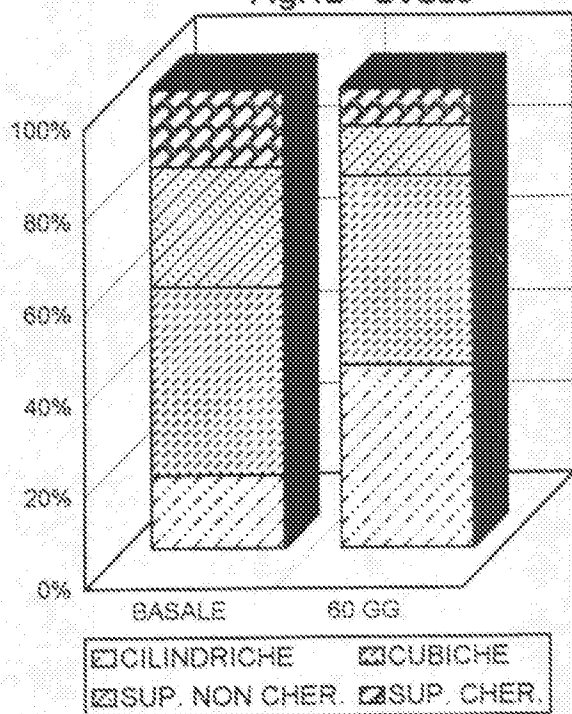


Fig.13 - DC

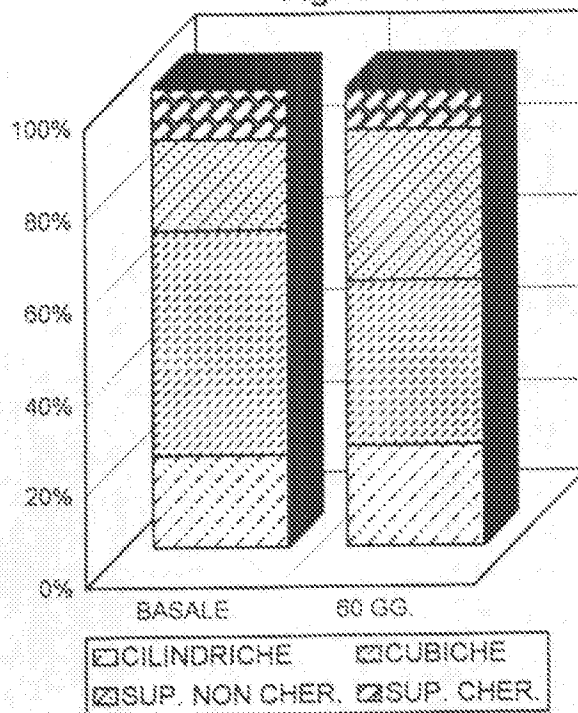


Fig.14 - SVS20

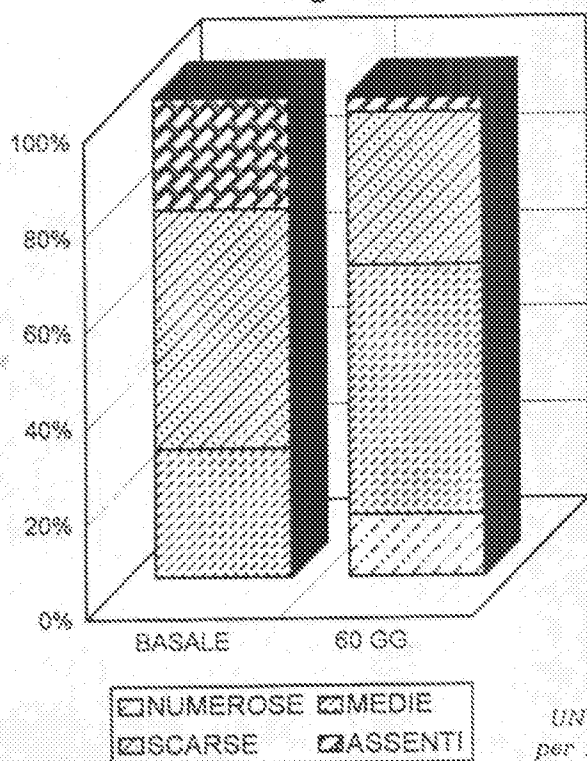


Fig.15 - DC

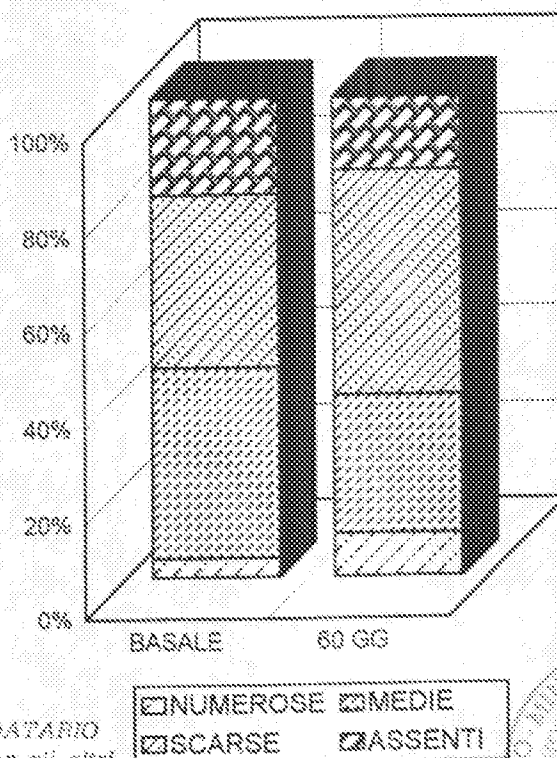


Fig.16 - SVS20

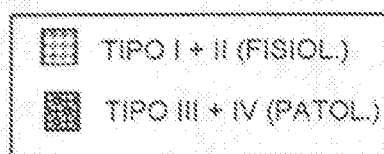
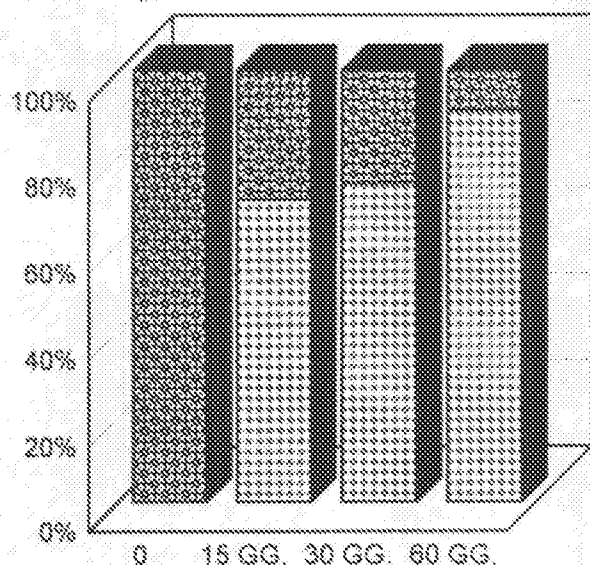


Fig.17 - DC

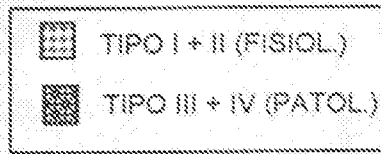
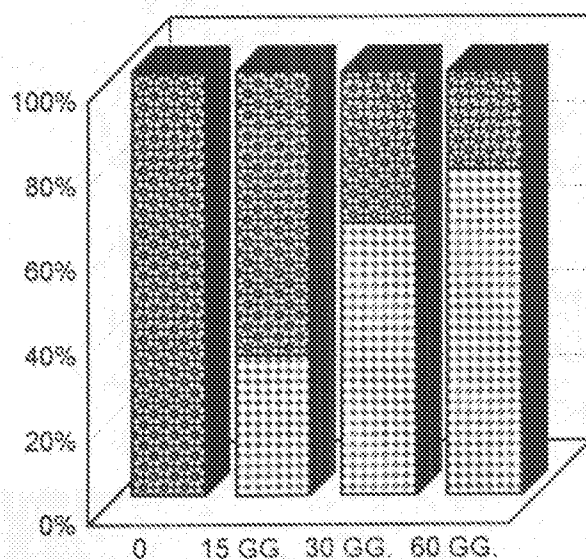


Fig.18 - SVS20

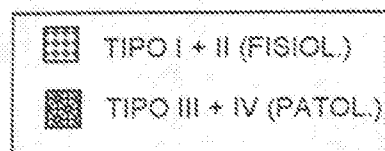
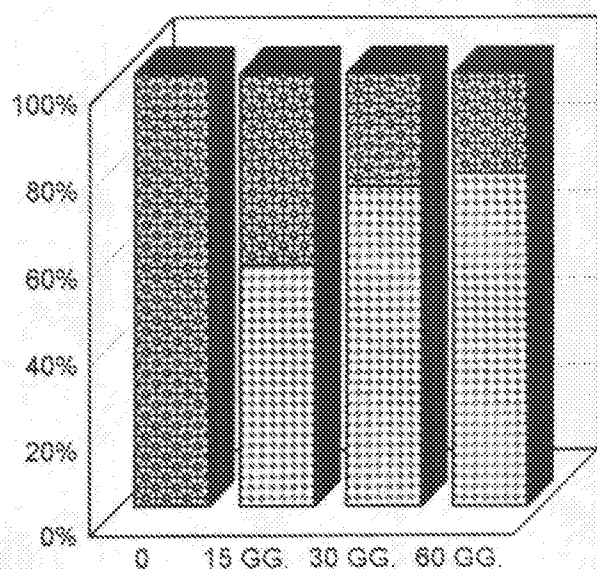


Fig.19 - DC

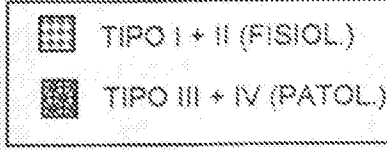
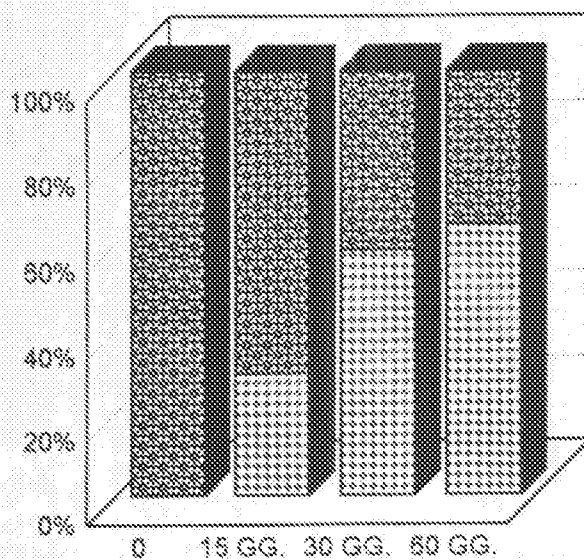


Fig.20

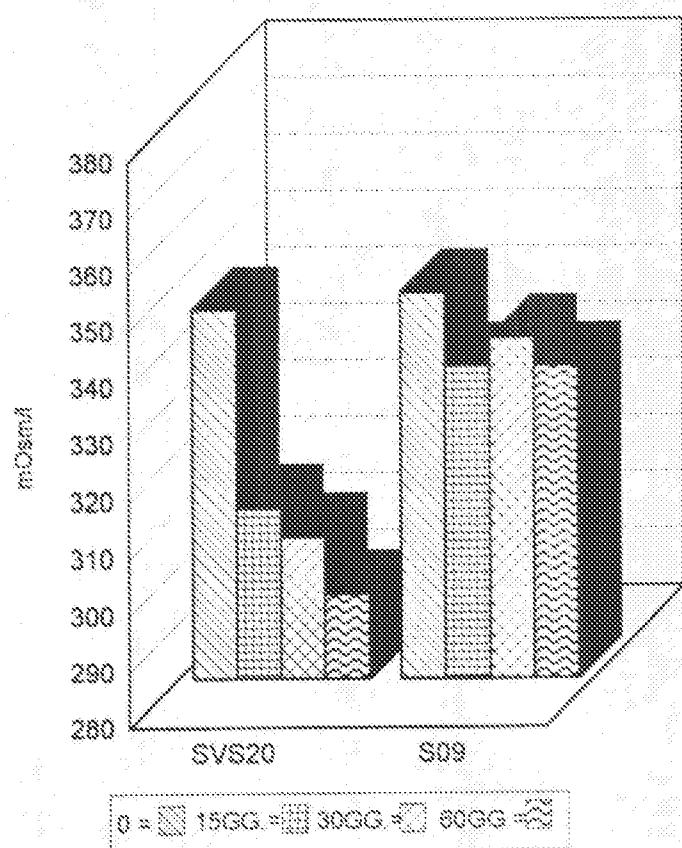
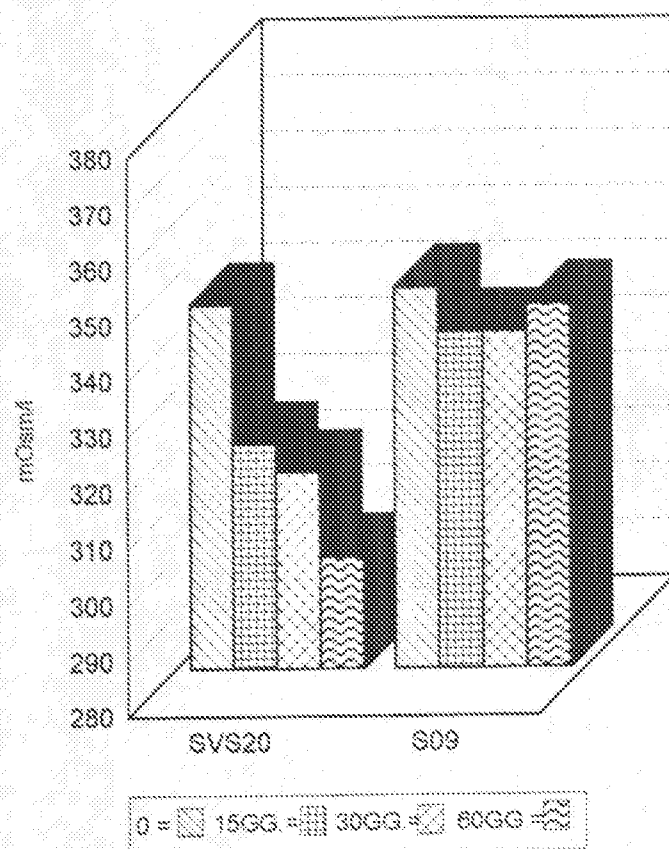


Fig.21



UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Carlo Luigi Iannone
(N° d'iscr. 486)

Carlo Luigi Iannone

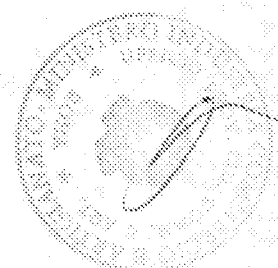


Fig.22 - SVS20

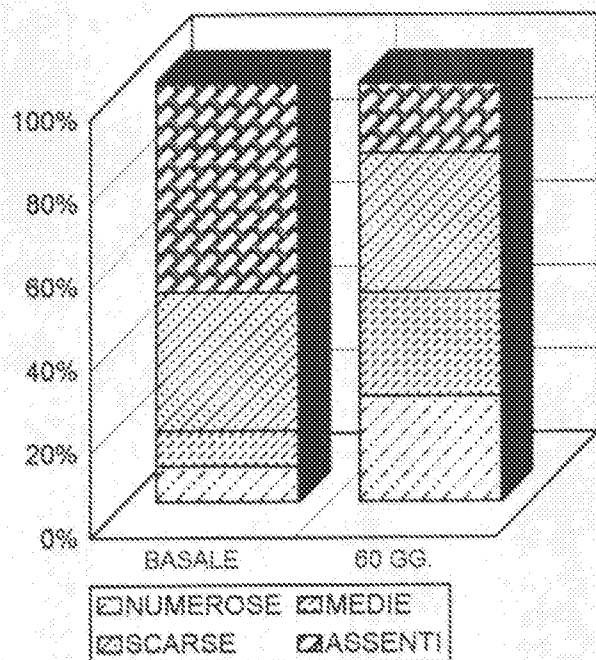


Fig.23 - S09

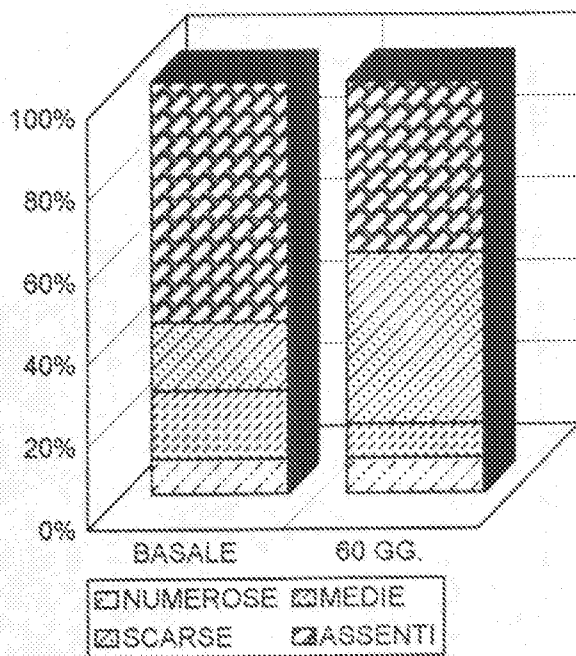


Fig.24 - SVS20

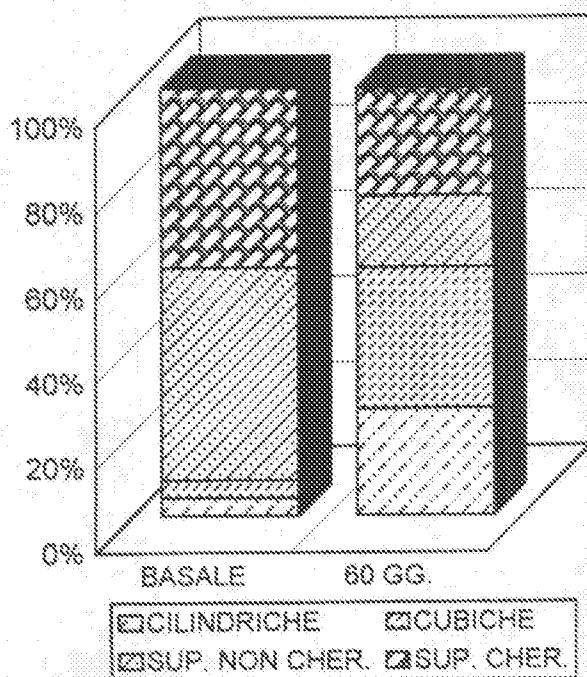
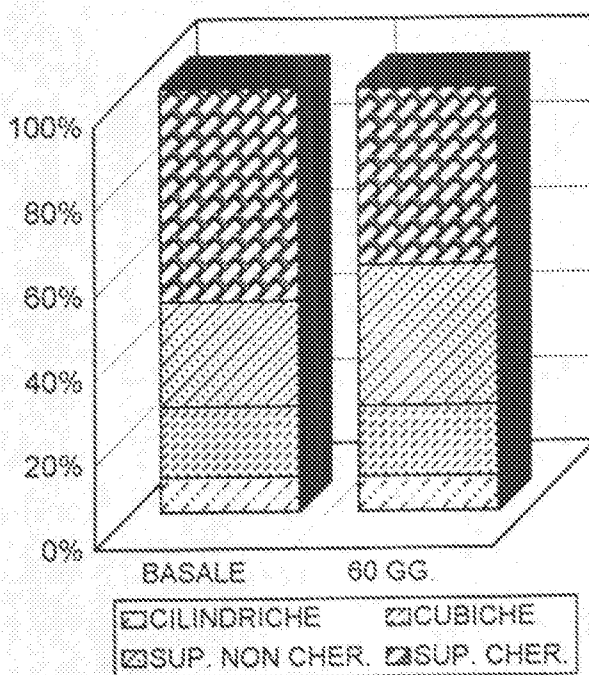


Fig.25 - S09



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

Handwritten signature

UN MANDATARIO
per me e per gli altri
Carlo Luigi Iannone
(N° d'lecc. 485)

