



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA NUMERO	102007901583516
Data Deposito	17/12/2007
Data Pubblicazione	17/06/2009

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Titolo

METODO PER LA RIGENERAZIONE CELLULARE DI ACIDO IALURONICO E RELATIVA
COMPOSIZIONE COSMETICA

8126 M Descrizione del brevetto per invenzione industriale avente per titolo:

PB/mc **“METODO PER LA RIGENERAZIONE CELLULARE DI ACIDO IALURONICO E RELATIVA COMPOSIZIONE COSMETICA”**

a nome : **MEDICHEM s.r.l.**

con sede in: Cernusco sul Naviglio (Milano)

* * *

La presente invenzione riguarda un metodo cosmetico per la rigenerazione dell'acido ialuronico all'interno delle cellule del tessuto connettivo, a partire dai costituenti acido D-glucuronico e N-acetil-D-glucosammina. Più precisamente l'invenzione fornisce una composizione cosmetica contenente liposomi che incorporano acido D-glucuronico e N-acetil-D-glucosammina insieme a opportuni veicoli fisiologicamente accettabili.

L'utilizzo di liposomi come veicoli per l'acido ialuronico è descritto in diversi brevetti. Per esempio, WO2006122638 descrive un agente di riempimento da utilizzare in dermocosmetica, contenente acido ialuronico o suoi derivati strutturati in liposomi fosfolipidici. WO03000190 e WO03000191 descrivono un metodo per la veicolazione intraarticolare di acido ialuronico incapsulato in liposomi per il trattamento dell'osteoartrite. WO9813024 descrive una formulazione farmaceutica contenente una miscela di acido ialuronico e liposomi.

Si è ora sorprendentemente trovato un metodo altamente efficace per rigenerare l'acido ialuronico all'interno delle cellule, attraverso la somministrazione di una preparazione liposomiale contenente, in forma separata (cioè non legati chimicamente), i precursori acido D-glucuronico e

N-acetil-D-glucosammina. La rigenerazione di acido ialuronico all'interno delle cellule permette il riempimento del tessuto connettivo danneggiato a seguito dei processi degenerativi legati all'invecchiamento. Tale efficacia rigenerativa è particolarmente utile in dermatologia, soprattutto per il trattamento delle rughe e dell'invecchiamento della pelle.

Secondo un primo aspetto, pertanto, l'invenzione riguarda una preparazione cosmetica contenente vescicole liposomiali disperse in un opportuno veicolo cosmeticamente compatibile, all'interno delle quali viene incorporato acido D-glucuronico e N-acetil-D-glucosammina. Le vescicole liposomiali utilizzate secondo l'invenzione possono essere di tipo uni o multi-lamellare (MLV=vescicole multilamellari; SUV=vescicole unilamellari), di varie dimensioni (small, medium, large, giant). Le vescicole possono essere costituite da fosfolipidi o sfingolipidi, preferibilmente da fosfatidilcolina, ma possono contenere anche altri ingredienti in grado di modularne le proprietà quali resistenza, viscosità, stabilità.

L'acido D-glucuronico e la N-acetil-D-glucosammina possono essere incorporati nei liposomi secondo metodi noti che comprendono l'aggiunta di fosfolipide ai componenti disciolti in un opportuno mezzo, sotto costante agitazione meccanica, seguita da omogenizzazione con turbina. Una volta terminato il processo, la preparazione liposomiale può essere miscelata con un'opportuna base per uso cosmetico, per esempio crema, emulsione, microemulsione, unguento, gel, lozione e olio.

In una forma di realizzazione preferita, la preparazione liposomiale viene dispersa in una base contenente acqua, EDTA, glicerina, sodio piroglutammato, sodio lattato e gomma xantana o agenti viscosizzanti

similari, sotto agitazione ed eventualmente riscaldando e poi raffreddando, in modo da ottenere un gel.

In un ulteriore aspetto l'invenzione riguarda l'uso delle composizioni qui descritte nella dermatologia estetica, in particolare nel trattamento di inestetismi quali rughe, pieghe della pelle, di esiti cicatriziali post-acneici o post-traumatici, esiti di rinoplastica o nel rimodellamento delle labbra e del contorno del viso (guance e mento).

Un ulteriore aspetto dell'invenzione riguarda un metodo per rigenerare acido ialuronico all'interno di cellule e tessuti umani che comprende l'applicazione su dette cellule o tessuti di una preparazione come sopra descritta.

Gli esempi che seguono illustrano l'invenzione in maggior dettaglio.

Esempio 1 - Preparazione di sistemi liposomiali a base di fosfatidilcolina per la veicolazione di AG e GlcNH₂ ed analisi del contenuto di attivo dei sistemi preparati

Materiali

Fosfatidilcoline utilizzate: PhosPho LCN-DS, lecitina di soia, purezza 62% minima, Fancor; Fosfatidilcolina di uovo, (PC), tipo XI-E, purezza 99%, Sigma.

D-glucuronic acid Sodium salt monohydrate, N-acetyl-L-glucosamina, Aldrich; Colesterolo, Carlo Erba.

I liposomi sono stati preparati con due diverse metodiche per cercare di aumentare la capacità di incapsulazione del AG e della GlcNH₂.

Le variabili che sono state introdotte sono state:

- Metodo di preparazione (idratazione diretta, idratazione dopo

formazione film lipidico)

- Quantità e tipo di fosfatidilcolina
- Utilizzo o meno di colesterolo
- Concentrazioni delle soluzioni di acido glucuronico e glucosammina

METODO A (idratazione diretta):

Per i lotti placebo e carichi, la procedura è stata la seguente:

- Pesare la fase lipofila e aggiungere la fase idrofila (volume finale da 200 µl a 1 ml)
- Passare nel vortex fino a completa dispersione del fosfolipide e successivamente in termomixer per 15 minuti a 25°C, 1400 rpm;
- In alcuni casi mantenere la dispersione 4°C per 24 ore;
- Centrifugare i campioni per 60 minuti a 4°C, 16400 rpm per eliminare l'attivo non incapsulato;
- Separare il surnatante dal pellet e conservare le due parti distinte in freezer a -20°C per i successivi dosaggi specifici degli attivi.

Con questo metodo sono stati prodotti i lotti costituiti da fosfatidilcolina PhosPho LCN-DS; la composizione dei lotti prodotti è riportata in Tabella 1. Quando non specificato il volume della fase idrofila era mantenuto 1 ml. I lotti che presentano * sono stati lasciati ad idratare 24 ore in frigorifero prima della centrifugazione.

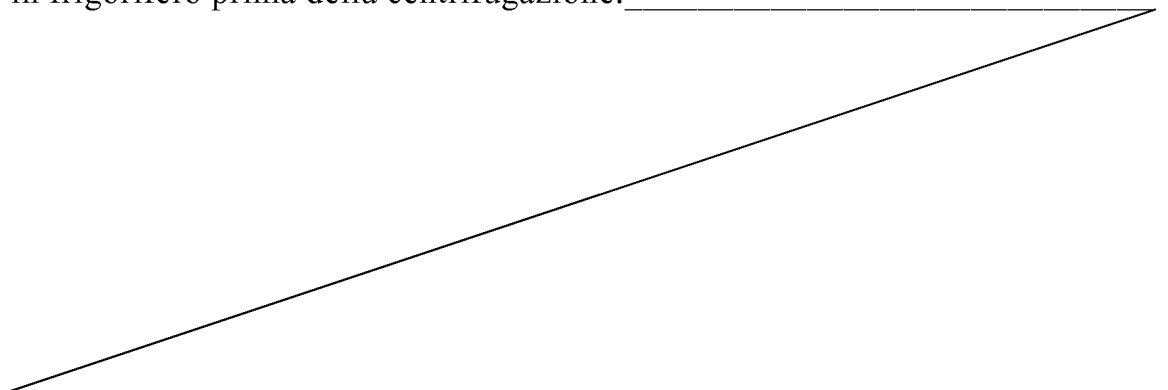


Tabella 1

Lotto	Quantità Fosfatidilcolina	Fase idrofila	Concentrazione di attivo ($\mu\text{mol/ml}$)
JALU 3,7	70 mg	Acqua	-
JALU 20-22	60 mg	Acqua	-
JALU 35	600 mg	Acqua (10 ml)	-
JALU 42	15 mg	Acqua (200 μl)	-
JALU 14-16	15 mg	Acqua	-
JALU 8-10	7 mg	Acqua	-
JALU 4-6	70 mg	AG 1,5 mg	6,4
JALU 23-25	60 mg	AG 0,3 mg	1,3
JALU 17-19	15 mg	AG 0,3 mg	1,3
JALU 11-13	7 mg	AG 0,3 mg	1,3
JALU 36-38	15 mg	AG 1 mg	4,3
JALU 39-41	15 mg	AG 1 mg (200 μl)	21,5
JALU 56-58	15 mg	AG 5 mg (200 μl)	105
JALU 63	75 mg	AG 25 mg	105
JALU 32-34	60 mg	GlcNH ₂ 0,3 mg	1,35
JALU 29-31	15 mg	GlcNH ₂ 0,3 mg	1,35
JALU 26-28	7 mg	GlcNH ₂ 0,3 mg	1,35
JALU 50-52	15 mg	GlcNH ₂ 5 mg	22,6
JALU 59-61	15 mg	GlcNH ₂ 5 mg (200 μl)	113
JALU 64-66*	15 mg	AG 5 mg (200 μl)	105
JALU 67-69*	30 mg	AG 5 mg (200 μl)	105
JALU 71-73*	15 mg	GlcNH ₂ 5 mg (200 μl)	113
JALU 74-76*	30 mg	GlcNH ₂ 5 mg (200 μl)	113
JALU 77-79*	15 mg	GlcNH ₂ 10 mg (400 μl)	226

METODO B: Con questo metodo sono stati prodotti lotti di liposomi utilizzando sia la fosfatidilcolina PhosPho LCN-DS che la PC. Anche in questo caso sono stati prodotti sia lotti placebo che carichi di AG con la seguente metodica:

- Pesare la fosfatidilcolina in un pallone di reazione a fondo tondo
- Aggiungere 500 μl di CHCl_3 contenente colesterolo in concentrazione 10mg/ml

- Tirare a secco il contenuto del pallone con evaporatore rotante a pressione ridotta a 40°C per 10 minuti
- Reidratare con 1 ml di fase idrofila
- Passare con vortex per 10 minuti, e centrifugare per 60 minuti, 4°C, 16400 rpm
- Separare surnatante e pellet e conservare in freezer a -20°C.

La Tabella 2 riporta i lotti di liposomi prodotti con la metodica B

Tabella 2

Lotti	Fosfatidilcolina (mg)	Fase idrofila	Concentrazione di attivo ($\mu\text{mol/ml}$)
JALU 43-45	PhosPho LCNDS (15 mg)	AG 1 mg	4,3
JALU 46-48	PC (10 mg)	AG 1 mg	4,3
JALU 49	PC (10 mg)	Acqua	-
JALU 62	PhosPho LCNDS (15 mg)	Acqua	-
JALU 53-55	Phospho LCNDS 15mg	AG 5 mg	21

Caratterizzazione dimensionale dei sistemi preparati

Per verificare l'identità fisica dei sistemi preparati è stata effettuata un'analisi dimensionale mediante un apparecchio a diffrazione di luce laser Mastersizer 2000 (Malvern), che opera in un intervallo dimensionale compreso tra i 20 nm e i 2 mm. Lo strumento è munito di un'unità di dispersione collegata ad una pompa che mantiene in agitazione il campione durante l'analisi. Ogni campione è stato analizzato in triplicato ed i risultati sono espressi come d_{10} , d_{50} e d_{90} ossia il diametro del 10%, del 50% e del 90% del campione analizzato.

Si riportano le analisi effettuate sui lotti placebo a concentrazioni diverse di fosfatidilcolina e preparati con le due metodiche (Tabella 3).

Tabella 3

Lotto	Quantità Fosfatidilcolina	D _{10%} (µm)	D _{50%} (µm)	D _{90%} (µm)
JALU 8-10	PhosPho LCNDS 7 mg	1,199	5,443	52,251
JALU 14-16	PhosPho LCNDS 15 mg	1,598	8,766	52,908
JALU 20-22	PhosPho LCNDS 60 mg	1,612	26,459	102,922
JALU 49**	PC (10 mg)	2,639	6,359	14,602
JALU 62**	PhosPho LCNDS (15 mg)	2,903	14,162	47,823

** Indicano i lotti preparati con la metodica B

I risultati evidenziano la formazione di vescicole con dimensioni micrometriche; per quanto riguarda la PhosPho LCNDS le dimensioni rimangono costanti utilizzando le due metodiche di preparazione a parità di quantità di fosfolipide utilizzato; i risultati del campione Jalu 49 evidenziano come le dimensioni dipendano dalla purezza del fosfolipide di partenza.

Esempio 2 - preparazione in forma di gel

Fase A (Formazione del Liposoma)

In un recipiente di acciaio inox provvisto di turbina a velocità variabile (0 - 3.000 giri/min.) e di un agitatore ad ancora si versano nell'ordine i seguenti componenti esattamente pesati:

- ACQUA DEMINERALIZZATA 56,400 %
- ACIDO GLUCURONICO 0,100 %
- ACETIL-GLUCOSAMINA 1,100 %

si mescola con il solo agitatore ad ancora fino a soluzione completa.

Si aggiunge lentamente e sotto turbina (2.500 giri/min.) la Fase A':

- LECITINA 1,500 %

si omogeneizza per circa 15 min.. Si ferma la turbina e con solo l'agitatore si continua a mescolare per altri 10 min.

Fase B

A parte in un contenitore di acciaio inox provvisto di riscaldamento, agitazione e turbina si prepara la seguente soluzione:

-	ACQUA DEMINERILIZZATA	30,000	%
-	EDTA BISODICO	0,500	%
-	GLICERINA	8,000	%
-	SODIO PIROGLUTAMMATO	1,000	%
-	SODIO LATTATO	1,000	%

si agita fino a soluzione omogenea e si riscalda la massa a 70°C.

Arrivata in temperatura si aggiunge lentamente e sotto turbina (1.500 giri/min) la Fase B':

-	GOMMA XANTANA	0,400	%
---	---------------	-------	---

si omogeneizza fino a dispersione completo della GOMMA XANTANA con formazione di un gel omogeneo e compatto.

Si raffredda fino a 25°C e sotto agitazione si versa dentro la Fase A.

Si continua l'agitazione per altri 20 min. fino ad ottenere una massa compatta ed omogenea.

Esempio 3 - messa a punto del sistema cellulare per la valutazione di efficacia "in vitro" dei sistemi preparati

Gli studi degli effetti cellulari sono stati condotti utilizzando cellule NHDF (Normal Human Dermal Fibroblasts), al 6° passaggio, in DMEM, 10% FBS, 1% PenStrept, 1% glutamina, in piastre multiwell 6 (area di crescita del singolo pozzetto= 9,6 cm²). Ciascun pozzetto contiene 300.000 cellule a confluenza.

L'inoculo dei campioni è avvenuto, secondo lo schema seguente, in

condizioni di sterilità sotto cappa a flusso laminare a 37°C con 2 ml di medium, inoculate nei singoli pozzetti e questi incubati a 37°C per 60 ore, 5% di CO₂, 97% di umidità.

Schema dei campioni inoculati su 8 piastre:

- A-B piastre controllo;
- C piastra trattata con liposomi placebo 15 mg/ml;
- D piastra trattata con liposomi placebo 60 mg/ml;
- E-F piastre trattate con liposomi carichi di AG eGlcNH₂ in concentrazioni rispettivamente di 0,5 e 10 mM;
- G-H piastre trattate con liposomi carichi di AG eGlcNH₂ concentrazioni rispettivamente di 5 e 50 Mm.

Al termine del periodo prestabilito le piastre vengono osservate in microscopia ottica a contrasto di fase, evidenziando la morte cellulare nelle piastre D, E, F, G, H. Nonostante questo il surnatante è stato recuperato, chiarificato per centrifugazione e sottoposto a determinazione del contenuto in acido ialuronico. Brevemente, 1 ml di terreno chiarificato è liofilizzato, ripreso in 300 ml di ammonio acetato pH 7.0 e precipitato con 4 volumi di etanolo freddo e lasciato a -20°C per 16-18 ore, centrifugato e il pellet recuperato; questo passaggio viene ripetuto una seconda volta. Al termine della seconda precipitazione il pellet viene lasciato totalmente asciugato e digerito con 100 mU/ml ialuronidasi SD a 37°C per 1 h e con 100 mU/ml Condroitinasi ABC a 37°C per 3 h. I campioni vengono quindi liofilizzati e derivatizzati con il 2-aminoacridone (AMAC).

Un volume di 40 µL di una soluzione 12.5 mM di AMAC in acido acetico/DMSO (3:17, v/v) viene aggiunta ad ogni campione, e lasciati

incubare per 10-15 min a temperatura ambiente; quindi viene aggiunto un volume di 40 μ L di soluzione fresca 1.25 M di NaBH_3CN in acqua e lasciato in incubazione 16-18 ore a 37°C. Al termine della derivatizzazione i campioni vengono sottoposti a separazione in PAGEFS.

I risultati mostrati in figura 1 evidenziano come la banda del disaccaride rappresentativo dell'avvenuta sintesi di acido ialuronico sia presente nei campioni contenenti liposomi ed in particolare risulti più spessa, indicativa di una maggior concentrazione di acido ialuronico formato, nei campioni contenenti una maggior concentrazione dei precursori AG e GlcNH₂.

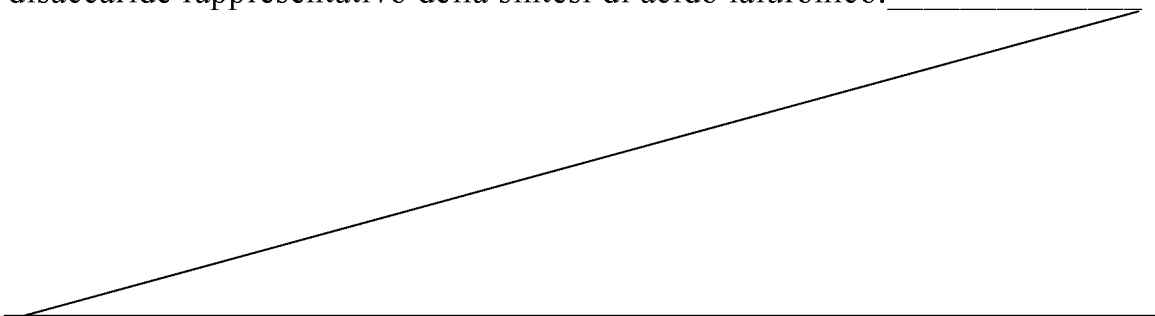
In figura 2 i risultati sono espressi come % di acido ialuronico (HA) prodotto rispetto al controllo, considerato 100%.

Conclusioni

Il tempo di incubazione considerato in questo primo esperimento (60 ore) è risultato troppo lungo per la sopravvivenza cellulare.

I risultati dell'elettroforesi evidenziano che i campioni trattati con concentrazioni di fosfolipidi pari a 15 e 60 mg/ml non presentano effetto inibitorio sulle vie biosintetiche dell'acido ialuronico.

L'inoculo di liposomi contenenti AG e GlcNH₂ in concentrazioni rispettivamente di 5 e 50 mM inducono un incremento nella banda del disaccaride rappresentativo della sintesi di acido ialuronico.

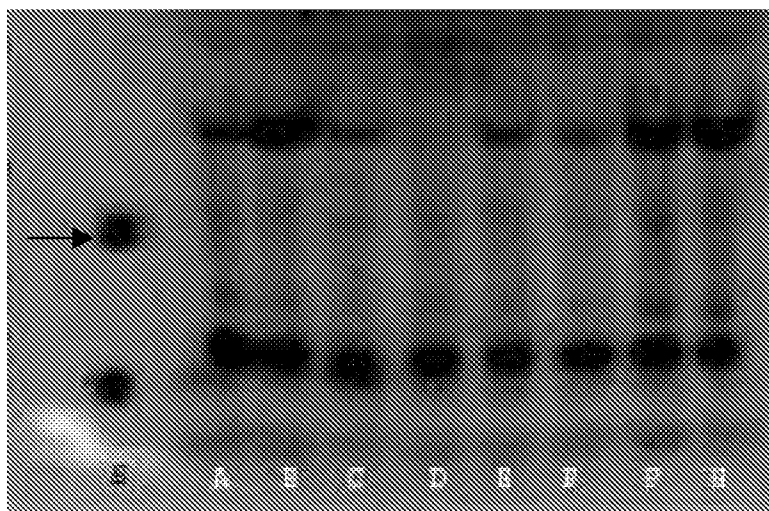


RIVENDICAZIONI

1. Preparazione cosmetica contenente vescicole liposomiali che incorporano acido D-glucuronico e N-acetil-D-glucosammina, disperse in una base idonea per uso cosmetico.
2. Preparazione secondo la rivendicazione 1, in cui le vescicole sono costituite da fosfatidilcolina.
3. Preparazione secondo la rivendicazione 1, in forma di crema, emulsione, microemulsione, unguento, gel, lozione e olio.
4. Preparazione secondo la rivendicazione 3, in forma di gel, in cui detta base è costituita da acqua, EDTA, glicerina, sodio piroglutammato, sodio lattato e un agente viscosizzante, in particolare gomma xantana.
5. Uso di liposomi contenenti acido D-glucuronico e N-acetil-D-glucosammina per la preparazione di una composizione cosmetica.
6. Uso di una preparazione secondo le rivendicazioni 1-4 per il trattamento di inestetismi quali rughe, pieghe della pelle, esiti cicatriziali post-acneici o post-traumatici, esiti di rinoplastica o per il rimodellamento delle labbra e del contorno del viso (guance e mento).
7. Metodo per rigenerare acido ialuronico all'interno di cellule e tessuti umani che comprende l'applicazione su dette cellule o tessuti di una preparazione secondo le rivendicazioni 1-4.

Milano, 17 dicembre 2007

Figura 1



Elettroforesi PAGEFS delle colture cellulari; la freccia indica la banda relativa al disaccaride rappresentativo dell'acido ialuronico

S: soluzione del disaccaride rappresentativo dell'acido ialuronico;

A-B piastre controllo;

C piastra trattata con liposomi placebo 15 mg/ml;

D piastra trattata con liposomi placebo 60 mg/ml;

E-F piastre trattate con liposomi carichi di AG eGlcNH₂ concentrazioni rispettivamente di 0,5 e 10 mM;

G-H piastre trattate con liposomi carichi di AG eGlcNH₂ concentrazioni rispettivamente di 5 e 50 mM.

Figura 2

