

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102012902072698A1

Publication Date

20140127

Applicant

ALTERGON, S.A.

Title

COMPLESSI DI CONDROITINA AD ASSORBIMENTO TRANSCUTANEO

9884 M Descrizione del brevetto per invenzione industriale avente per titolo:

FM/mc **“COMPLESSI DI CONDROITINA AD ASSORBIMENTO
TRANSCUTANEO”**

a nome : **ALTERGON S.A.**

con sede in: Lugano (Svizzera)

* * *

La presente invenzione ha per oggetto l'uso di condroitina come carrier transdermico e sistema a lento rilascio di principi attivi in composizioni farmaceutiche e cosmeceutiche.

Definizioni

Spesso con il termine condroitina si indica impropriamente anche la condroitina solfatata; pertanto, per chiarezza, i due termini condroitina e condroitina solfato sono mantenuti di seguito distinti. Con il termine condroitina si intende il polisaccaride non solfatato e i suoi sali, mentre con il termine condroitina solfato si intende il polisaccaride differentemente solfatato e i suoi sali.

Stato della tecnica

La condroitina, precursore metabolico della condroitina solfato, è un polisaccaride naturale lineare formato dall'alternanza di residui di N-acetil-D-galattosammina β 1:4 e D-glucuronato β 1:3. Nei vertebrati la condroitina è solfatata in maniera regio-selettiva a livello degli ossidrili 4 o 6 della N-acetil-D-galattosammina e in alcuni casi quelli 2 o 3 dell'acido glucuronico (Sugahara et al., J. Biol. Chem., 1996, 271:26745-54). Il peso molecolare della condroitina e l'entità e i siti della solfatazione dipendono dalla specie, dall'età e dalla tipologia del tessuto (Kuettner et al., Eds., in Articular

cartilage and osteoarthritis, NY, Raven Press, 1992; Volpi Ed., in Chondroitin sulfate: structure, role and pharmacological activity, S. Diego, California Academic Press - Elsevier Inc, 2006).

La condroitina, essendo nei vertebrati un intermedio metabolico (Sugumaran e Silbert, J. Biol. Chem. 1990, Oct 25, 265(30):18284-8), non è isolabile in quantità significative da fonti animali. Solo recentemente sono stati messi a punto processi per la produzione di condroitina da microrganismi o mediante sintesi enzimatica.

Di particolare interesse è la produzione di condroitina descritta in WO 2010136435, per mezzo di un ceppo ingegnerizzato di *E. coli* K4, che produce il polisaccaride K4, un derivato della condroitina che a livello del C3 dell'acido glucuronico presenta residui di β -fruttofuransio. Questi residui possono essere facilmente rimossi mediante idrolisi acida controllata, per la bassa stabilità del legame glicosidico con cui il fruttosio è legato alla catena della condroitina. Utilizzando questo microrganismo e una strategia integrata basata sull'ottimizzazione di un processo fermentativo trifasico (batch - fed batch - in regime di microfiltrazione) si ottengono rese in condroitina anche > 8g/L. Le alte rese produttive, la semplicità del downstream di purificazione, i bassi costi complessivi del processo, il suo ridotto impatto ambientale rendono il processo di WO 2010136435 superiore rispetto a tutte le strategie fermentative in precedenza descritte (Rodriguez et al., Eur. J. Biochem., 1988, 177:117-124; Manzoni et al., Biotechnology Letters, 1996, 18:383-386; WO 01/02597 A1; US 6,288,044; US 6,777,398; US 2005266460; WO 0180810; EP 1282684; EP 1832662; US 20030104601; US 20050164984; US 20070015249; US 20030109693; EP 1950308;

WO 2007145197; WO 2007069693; WO 2007058252; WO 2007058252; WO 2007023867; US 7,273,729; JP 2004024208; US 20060052335; US 20060057697; US 7,232,676; US 20070059805).

Più recentemente, US 2011244520A1 descrive una serie di microrganismi ingegnerizzati che producono condroitina in concentrazioni confrontabili con quelle di WO 2010136435.

Per quanto concerne la sintesi enzimatica della condroitina, US 2005266460, WO 0180810, EP 1282684, EP 1832662, US 20030104601 e US 20050164984 descrivono l'uso della condroitina sintetasi da *Pasteurella multocida*, un enzima che catalizza la sintesi di condroitina a partire dai corrispondenti UDP zuccheri. US 20070015249 e US 20030109693 descrivono la produzione di una condroitina sintetasi da *E. coli* K4 e il suo impiego per la produzione *in vitro* di condroitina.

EP 1950308, WO 2007145197, WO 2007069693, WO 2007058252, WO 2007058252 e WO 2007023867 descrivono metodi di sintesi *in vitro* di condroitina e derivati che utilizzano la condroitina sintetasi da *E. coli* K4 e suoi mutanti, che presentano una sola delle due attività trasferasiche.

US 7,273,729, JP 2004024208, US 20060052335, US 20060057697 e US 7,232,676 descrivono l'uso della condroitina sintetasi umana, un enzima che catalizza la sintesi di condroitina a partire dai corrispondenti UDP zuccheri. I documenti descrivono la struttura della condroitina sintetasi umana, un vettore di espressione che comprende la sequenza dell'enzima, l'espressione di tale vettore in cellule eucariotiche e un metodo per sintetizzare la catena polisaccaridica della condroitina.

US 20070059805 descrive la struttura della condroitina sintetasi umana,

un vettore di espressione che comprende la sequenza dell'enzima, l'espressione di tale vettore in cellule eucariote e un metodo per sintetizzare la catena polisaccaridica della condroitina.

Tutti i documenti in precedenza citati considerano la condroitina un intermedio per la sintesi di condroitina solfato, solo genericamente in alcuni di essi si cita la possibilità di un utilizzo della condroitina in composizioni non meglio definite come nel caso di US 20110244520 (claim 63) e di WO 0180810 (claim 73); in quest'ultimo documento va sottolineato che a pag 4-5, la condroitina è definita come un "polymer more inert, loosely speaking, than analogous HA molecule".

L'acido ialuronico è il solo glicosamminoglicano per il quale è stato proposto l'uso come veicolatore di principi attivi. Esiste in proposito un'ampia letteratura scientifica e brevettuale che documenta, in maniera non sempre concordante, la capacità dell'acido ialuronico di permeare la pelle e le pareti delle mucose, con alcune criticità in relazione al peso molecolare.

Il trasporto transcutaneo del diclofenac ad opera dell'acido ialuronico è stato ampiamente studiato *in vitro*, *in vivo* e in studi clinici (Brown et al. 2002, in Hyaluronan: Biomedical, Medical and Clinical Aspects, eds. J. Kennedy, G.O. Phillips, P. A. Williams, and V. Hascall, 249-256. Cambridge: Woodhead Publishers; Brown et al. 1995, in Hyaluronan in Drug Delivery, ed. D.A. Willoughby, 48-52. London: Royal Society of Medicine Press; Brown et al. 1995, in Hyaluronan in Drug Delivery, ed. D.A. Willoughby, 53-71, London: Royal Society of Medicine Press; Brown et al., 1995, Int. J. Tissue Reactions- Exp. Clin. Aspects 17:133-140; Brown and Moore, 1996, in Hyaluronan in Drug Delivery, ed. D. A. Willoughby,

121-131. London: Royal Society of Medicine Press; McEwan, and Smith, 1997, Aust. J. Derm. 38:187-189; Nazir et al., 2001, Pharm. Sci. 3(suppl.):1429).

Nel loro complesso questi studi hanno dimostrato che *in vitro* l'acido ialuronico migliora in modo significativo l'assorbimento nella pelle umana del diclofenac, che però rimane localizzato nell'epidermide (McEwan and Smith, 1997, Aust. J. Derm. 38:187-189; Wolf et al., 2001, Int. J. Dermatol. 40:709-713; Brown et al., 1995, In Hyaluronan in Drug Delivery, ed. D.A. Willoughby, 53-71, London: Royal Society of Medicine Press; Brown, et al., 1995, in Hyaluronan in Drug Delivery, ed. D.A. Willoughby, 48-52. London: Royal Society of Medicine Press; Lin and Maibach, 1996, In Hyaluronan in Drug Delivery, ed. D. Willoughby, 167-174. London: R.S. M. Press.; Brown, et al.; 1999, J. Invest. Dermatol. 113:740-746).

Un comportamento analogo dell'acido ialuronico, con localizzazione del farmaco a livello dell'epidermide è riportato per altri principi attivi come ibuprofene (Brown et al., in Hyaluronan: Biomedical, Medical and Clinical Aspects, eds. J. Kennedy, G.O. Phillips, P.A. Williams, and V. Hascall, 249-256. Cambridge: Woodhead Publishers; Brown and Martin, 2001, Int. J. Pharm. 225:113-121), clindamicina fosfato (Amr, 2000, Proc. Millen. Cong. Pharma. Sci. A80) e ciclosporina (Brown and Moore, 1996, in Hyaluronan in Drug Delivery, ed. D.A. Willoughby, 121-131. London: Royal Society of Medicine Press; Nazir et al., 2001, Pharm. Sci. 3(suppl.):1429).

Su questi razionali US 5639738 e US5792753 rivendicano l'associazione di acido ialuronico con peso molecolare compreso tra 150 e 750 KDa e NSAID per il trattamento di cheratosi attiniche e US 5852002

rivendica l'associazione di acido ialuronico con peso molecolare ancora compreso tra 150 e 750 KDa con antibiotici, antibatterici, antimicrobici e loro combinazioni per il trattamento di infezioni.

Studi comparativi basati sull'impiego della cella di Franz equipaggiata con pelle umana dimostrano che solo l'acido ialuronico e non altri glicosaminoglicani come la condroitina solfato e l'eparina (Brown et al., 2001, International J. of Pharmaceutics, 225, 113-121), presenta capacità di trasporto nella pelle di diclofenac e ibuprofene.

Il gel Solaraze®, a base di acido ialuronico e diclofenac, ha ottenuto negli USA, in Canada e in Europa l'approvazione regolatoria per il trattamento di cheratosi attiniche.

Descrizione dell'invenzione

Sorprendentemente è stato trovato che la condroitina con peso molecolare compreso tra 5 e 100 KDa, a differenza di quanto riportato per la condroitina solfato, quando applicata sulla pelle in formulazioni idonee, attraversa lo stato corneo, penetra nell'epidermide ed è trasportata nell'organismo dal flusso ematico.

L'invenzione riguarda pertanto l'uso di condroitina come carrier transdermico e sistema a lento rilascio di principi attivi in composizioni farmaceutiche e cosmeceutiche.

L'invenzione ha inoltre per oggetto complessi non covalenti di condroitina non solfatata con principi attivi che sono assorbiti attraverso la pelle e le mucose. Detti complessi si comportano come sistemi a lento rilascio del principio attivo.

Esempi di principi attivi utilizzabili secondo l'invenzione sono

anti-infiammatori non steroidei o steroidei, anti-tumoral, anti-virali, antimicrobici, diuretici, contraccettivi, analgesici, broncodilatatori, anticorpi monoclonali, immunosoppressori, vasocostrittori o vasodilatatori, antiossidanti, lenitivi, idratanti, drenanti, biostimolanti, radical scavengers, antirughe, composti per la crescita dei capelli, peptidi bioattivi, impiegati singolarmente o in combinazioni tra di loro.

In generale i complessi non covalenti della condroitina con principi attivi sono preparati aggiungendo l'attivo a soluzioni acquose o acquoso-organiche di condroitina. Per ottenere il complesso in forma solida il solvente è allontanato per evaporazione sotto vuoto o per liofilizzazione. I rapporti molari fra attivo e unità monomerica della condroitina possono variare entro limiti molto ampi, ad esempio da 0.05 a 1 mole di principio attivo per unità monometrica a seconda dei dosaggi previsti per gli attivi considerati.

I complessi così ottenuti sono quindi formulati utilizzando tecniche ed eccipienti convenzionali, in adatte composizioni, in particolare per la somministrazione topica, nasale, rettale o vaginale. Tali composizioni, che costituiscono un ulteriore oggetto dell'invenzione, possono eventualmente contenere anche altri ingredienti. Le composizioni dell'invenzione possono essere in forma di soluzioni, emulsioni, gel, creme, spray, supposte, colliri, maschere, patch, medicazioni o cerotti.

Le formulazioni dell'invenzione possono anche essere ottenute direttamente dalla soluzione del complesso per aggiunta di emulsionanti, stabilizzanti, tensioattivi, conservanti, profumanti, in funzione della tipologia di prodotto che si vuole ottenere (creme, gel, emulsioni W/O o O/W, latti,

maschere, etc).

L'assorbimento transcutaneo della condroitina è stato valutato impiegando condroitina marcata con trizio ottenuta per via biosintetica e topi nudi Charles River. La sperimentazione dimostra che la condroitina somministrata per via topica, indipendentemente dal suo peso molecolare, è assorbita attraverso la cute in maniera efficace, per poi essere distribuita dal flusso ematico nell'intero organismo. Dopo 1 h dall'applicazione circa il 50% della dose applicata si localizza nella pelle e solo in minima parte si distribuisce nell'organismo. A tempi più lunghi l'assorbimento a livello cutaneo cresce ulteriormente, così come il processo di distribuzione sistemico mediato dal flusso ematico. A 20 h l'escrezione urinaria della radioattività interessa circa il 25% della radioattività somministrata.

Si è inoltre trovato che la condroitina si comporta come un sistema a lento rilascio di principi attivi. Infatti, le sue caratteristiche strutturali rendono possibile l'interazione con molecole a basso peso molecolare per mezzo di forze attrattive di natura diversa, che possono agire singolarmente o in sinergia tra di loro, quali interazioni ioniche complementari, interazioni idrofobiche e idrofile, legami a ponti di idrogeno. Queste interazioni si rompono in soluzioni acquose, ma si riformano continuamente a causa della presenza a distanza utile di nuove possibilità di interazione con differenti siti della stessa catena polimerica. Un tale comportamento di fatto riduce la mobilità del composto legato, che rimane a lungo intrappolato in una gabbia di forze attrattive generate dalla catena polimerica. Ovviamente il complesso non covalente gradualmente si risolve nel tempo, in un sistema aperto, con una cinetica che dipende dallo stato di diluizione e dalla presenza di altre

specie chimiche.

Uno studio di equilibrio di dialisi, in cui la soluzione del complesso è racchiusa all'interno di un tubo da dialisi con cut off 2KDa, mentre all'esterno vi è un volume di acqua 20 volte maggiore, dimostra che in questo sistema sperimentale complessi diclofenac-condroitina di differente stechiometria si comportano come sistemi a rilascio controllato del principio attivo, con il raggiungimento dell'equilibrio di dialisi in tempi superiori alle 10 h, che si allungano con il diminuire del rapporto diclofenac-condroitina nel complesso. Nel sistema in cui è presente solo diclofenac l'equilibrio di dialisi è già raggiunto a 2 h.

La contestuale capacità della condroitina di attraversare lo strato corneo della pelle e la superficie delle mucose, coniugata con la capacità di formare complessi non covalenti, rendono pertanto questo polisaccaride un ottimo carrier per veicolare nell'uomo principi attivi di differente natura.

Studi *in vitro* su pelle umana in cella di Franz dimostrano l'effetto carrier e il meccanismo di rilascio della condroitina quando forma complessi non covalenti con differenti principi attivi come il diclofenac e il ketorolac. Le stesse evidenze si ottengono con sperimentazioni con applicazioni topiche di questi complessi su topi nudi.

Di seguito, si riportano esempi che meglio descrivono l'invenzione.

ESEMPIO 1 - Preparazione di [³H]condroitina a differente peso molecolare

La [³H]condroitina è ottenuta per via biosintetica utilizzando, come descritto in WO 2010136435, un ceppo ingegnerizzato di *E. coli* K4 che produce il polisaccaride K4, un derivato della condroitina che a livello del C3

dell'acido glucuronico presenta residui di β -fruttofuranosio eliminato quantitativamente con una idrolisi blanda con acido acetico. Per radio-marcare la condroitina si addiziona [^3H]galattosio al terreno di coltura. La [^3H]condroitina, purificata come descritto in WO 2010136435, ha un peso molecolare di 62 KDa. Per essere utilizzata nella successiva sperimentazione è diluita con condroitina non marcata dello stesso peso molecolare per avere un prodotto con una radioattività specifica di $1,5 \times 10^7$ dpm/mg. Per ottenere condroitina di peso molecolare 35 e 10 KDa, la [^3H]condroitina MW 62 KDa, con una radioattività specifica di $1,5 \times 10^7$ dpm/mg è sottoposta a idrolisi acida controllata in fase eterogenea. In una procedura standard 100 mg di [^3H]condroitina sono sospesi in 1 mL di etanolo (93% v/v) contenente 33 μL di HCl, si incuba sotto agitazione in un Vortemp a 55°C e 900 rpm. L'idrolisi dura rispettivamente 40' per ottenere un MW di 35 KDa e 90' per ottenere un MW di 10 KDa. Raggiunto il MW desiderato, la reazione è bloccata in ghiaccio, neutralizzando con 21 μL di NaOH 50% p/v, si lascia poi ad agitare ancora per 30' e si centrifuga a 5.000 g per 15'. Si rimuove il surnatante e si lava con 1 mL di etanolo (93% v/v). L'operazione di lavaggio è ripetuta una seconda volta utilizzando etanolo anidro. Dopo centrifugazione il pellet è essiccato per 16 h in stufa a 40°C sotto vuoto. L'analisi del peso molecolare della condroitina è realizzata con un sistema cromatografico a esclusione molecolare equipaggiato con un multy detector, costituito da un viscosimetro a quattro ponti, un rifrattometro, un right angle light scattering detector (RALS) e un low angle light scattering detector (LALS), brevettato dal gruppo americano Viscotek (www.viscotek.com). Il segnale misurato col LALS è proporzionale al peso molecolare e alla concentrazione, quello

misurato col rivelatore viscosimetrico è proporzionale alla concentrazione del campione e alla viscosità intrinseca, mentre il rifrattometro consente la misura della concentrazione. L'apparecchiatura Viscotek non solo consente di determinare il peso molecolare, ma anche di valutare il grado di eterogeneità del peso molecolare nella popolazione di molecole presenti, descritto dall'indice di polidispersione M_w/M_n , automaticamente calcolato dall'apparecchiatura Viscotek, e definito come rapporto tra peso molecolare medio ($M_w = \sum_i m_i M_i / \sum_i m_i$ dove m_i è la massa di polimero con peso molecolare M_i e $\sum_i m_i$ è la massa totale del polimero, espressione che, posto $m_i = n_i M_i$ si può anche presentare come $M_w = \sum_i n_i M_i^2 / \sum_i n_i M_i$) e peso molecolare ponderale ($M_n = \sum_i n_i M_i / \sum_i n_i$ dove $n_i M_i$ è la massa di polimero con peso molecolare M_i e $\sum_i n_i$ è il numero totale di moli di polimero presenti). Il valore della polidispersione nei campioni di [^3H]condroitina a differente peso molecolare (62, 35 e 10) non supera 1,2.

Per verificare la specificità del sito di marcatura un campione di [^3H]condroitina è sottoposto a idrolisi acida spinta in soluzione acquosa a 100°C per causare la totale rottura dei legami glicosidici. Un campione della miscela di idrolisi è analizzato mediante HPLC. Per la quantificazione di GlcA e GalNAc e GalNH è stata utilizzata una colonna analitica Carbowac PA1 4x250 mm munita di precolonna Carbowac PA1 4 x 50 mm (Dionex Srl, San Donato Milanese, Italia) operanti ad un flusso di 1 mL/min. Sia gli standard che i campioni sono stati analizzati secondo un metodo di separazione in gradiente con i seguenti eluenti: Eluente A NaOH 150 mM, Eluente B NaOH 150 mM + Na Acetato 1M. Il gradiente utilizzato è (Tempo in min, % eluente A, % eluente B): T0, A90, B10; T20, A80, B20; T30, A50,

B50; T35, A90, B10; T40, A100, B0). La rivelazione è stata ottenuta mediante Detector ad amperometria pulsata (elettrodo di riferimento AgCl) con Waveform Carbohydrates. La miscela di idrolisi si risolve in tre picchi, corrispondenti rispettivamente ai tempi di ritenzione dell'acido glucuronico, della galattosammina e in tracce della N-acetil-D-galattosammina. Gli eluati in corrispondenza dei picchi sono raccolti e letti per radioattività in liquido di scintillazione. La radioattività per il 75% si ritrova associata ai picchi della galattosammina e della N-acetil-D-galattosammina.

Per la successiva sperimentazione sul modello animale si preparano tre gel di [³H]condroitina che contengono ciascuno per grammo 100 mg di glicole polietilenico, 1 mg di alcol benzilico 879 mg di acqua e 20 mg di [³H]condroitina (3x10⁸ dpm) rispettivamente di MW 62, 35 e 10 KDa.

ESEMPIO 2 - Assorbimento topico di condroitina a differente peso molecolare

Come modello sperimentale per valutare l'assorbimento transcutaneo della condroitina si utilizzano 60 topi nudi Charles River di entrambe i sessi di 5 mesi di età. Gli animali in maniera casuale sono divisi in 12 gruppi di 5 che, come riportato nel disegno sperimentale di tabella 1, sono trattati con 50 mg di gel di [³H]condroitina con differente MW, preparata come descritto nell'esempio 1. Durante la sperimentazione gli animali sono mantenuti in gabbie singole, con libero accesso al cibo e all'acqua.

Dopo 1, 5, 10 e 20 h dall'applicazione, come riportato nel disegno sperimentale di tabella 1, gli animali sono sacrificati. Immediatamente dopo il sacrificio si procede a un accurato lavaggio della zona di applicazione del gel, fino a non ritrovare tracce apprezzabili di radioattività nelle acque di

lavaggio, per potere discriminare tra radioattività applicata e radioattività assorbita a livello cutaneo. Dagli animali sacrificati si procede al recupero della zona di pelle trattata, del fegato e del sangue, immediatamente dopo il prelevamento i campioni sono pesati e congelati. Dalle gabbie si recuperano le urine degli animali mediante lavaggio.

animali	trattamento	tempo del sacrificio (h)
1-5	$[^3\text{H}]$ condroitina MW 62 KDa	1
6-10		5
11-15		10
16-20		20
21-25	$[^3\text{H}]$ condroitina MW 35 KDa	1
26-30		5
31-35		10
36-40		20
41-45	$[^3\text{H}]$ condroitina MW 10 KDa	1
46-50		5
51-55		10
56-60		20

Tabella 1 - Disegno sperimentale, 60 topi nudi Charles River di entrambi i sessi di 5 mesi di età sono divisi in maniera casuale in 12 gruppi di 5 animali. Sul dorso di ciascun animale viene contrassegnata un'area di circa 5-6 cm², localizzata in una zona in cui risulta difficile agli animali leccarsi o grattarsi. Su questa area si applicano con una spatola 50 mg di gel di $[^3\text{H}]$ condroitina, per gli animali da 1 a 20 di MW 62 KDa, per gli animali da 21 a 40 di MW 35 KDa e per gli animali da 41 a 60 di MW 10 KDa.

Campioni (150-200 mg) di pelle, fegato e sangue sono solubilizzati in Soluene per 24 h a temperatura ambiente. Sui campioni solubilizzati e sulle urine è misurata la radioattività mediante scintillazione in fase liquida. Nelle

tabelle 2-4 sono riportati i dati sperimentali.

Campione	1h	5h	10h	20h
	% della dose applicata			
pelle	52±10	73±14	50±12	5±2
fegato	0,1±0,04	2,2±0,5	3,1±0,3	1,1±0,2
sangue	0,5±0,1	8,2±1,3	6,9±2,1	3,1±1,6
urine	-	2,3±1,2	5,9±4,3	24,8±10,2

Tabella 2 - Distribuzione della radioattività in topi nudi trattati per via topica con un gel di [³H]condroitina (3x10⁸ dpm) MW 62 KDa. Ciascun dato rappresenta la media di 5 animali.

Campione	1h	5h	10h	20h
	% della dose applicata			
pelle	49±8	74±10	53±13	8±3
fegato	0,1±0,02	2,0±0,7	3,4±0,5	1,3 ±0,4
sangue	0,7±0,2	8,8 ±1,9	6,6±2,4	3,8±1,5
urine	-	2,6±1,3	7,1±4,0	26,3±11,4

Tabella 3 - Distribuzione della radioattività in topi nudi trattati per via topica con un gel di [³H]condroitina (3x10⁸ dpm) MW 35 KDa. Ciascun dato rappresenta la media di 5 animali.

Campione	1h	5h	10h	20h
	% della dose applicata			
Pelle	58±0,9	78±15	51±9	6,2±1,9
Fegato	0,1±0,04	2,2±0,6	3,8±0,5	1,4±0,3
Sangue	0,9±0,2	8,2±1,4	6,9±3,4	3,3±1,3
Urine	-	2,5±1,9	6,1±3,3	24,9±13,2

Tabella 4 - Distribuzione della radioattività in topi nudi trattati per via topica con un gel di [³H]condroitina (3x10⁸ dpm) MW 10 KDa. Ciascun dato rappresenta la media di 5 animali.

I dati ottenuti dimostrano che la condroitina per via topica è assorbita attraverso la cute in maniera efficace, per poi essere distribuita dal flusso ematico nell'intero organismo, indipendentemente dal suo peso molecolare. Dopo 1 h dall'applicazione circa il 50% della dose applicata si localizza nella pelle e solo in minima parte si distribuisce nell'organismo. A tempi più lunghi l'assorbimento a livello cutaneo cresce ulteriormente, così come il processo di distribuzione sistemico mediato dal flusso ematico. A 20 h l'escrezione urinaria della radioattività interessa circa il 25% della radioattività somministrata.

ESEMPIO 3 - Preparazione di complessi non covalenti diclofenac-condroitina con differente composizione stechiometrica

Preparazione del complesso della condroitina con l'acido 2-(2-[2,6-diclorofenilammino] fenil) etanoico, detto anche diclofenac.

Si preparano complessi diclofenac-condroitina con rapporti molare diclofenac unità monomerica della condroitina di 0,630, 0,315 e 0,063.

Preparazione del complesso diclofenac-condroitina con un rapporto molare di 0,630. 5 g di diclofenac sodico sono sciolti a 50°C sotto energica agitazione in 100mL di una soluzione acquosa di condroitina sodica al 10% p/v MW 62 KDa.

Preparazione del complesso diclofenac-condroitina con un rapporto molare di 0,315. 2,5 g diclofenac sodico sono sciolti a 50°C sotto energica agitazione in 100mL di una soluzione acquosa di condroitina sodica al 10% p/v MW 35 KDa.

Preparazione del complesso diclofenac-condroitina con un rapporto molare di 0,063. 0,5 g diclofenac sodico sono sciolti a 50°C sotto energica

agitazione in 100mL di una soluzione acquosa di condroitina sodica al 10% p/v MW 10 KDa.

Le forme solide di questi complessi sono ottenute per allontanamento del solvente sotto vuoto a 50°C o in alternativa per liofilizzazione delle soluzioni. I complessi solidi si solubilizzano rapidamente in acqua.

ESEMPIO 4 - Studi *in vitro* di rilascio graduale di diclofenac da complessi non covalenti diclofenac-condroitina di differente stechiometria

Per valutare in maniera differenziale il meccanismo di rilascio del diclofenac da complessi non covalenti con la condroitina di differente stechiometria si è messo a punto uno studio di equilibrio di dialisi, in cui la soluzione del complesso è racchiusa all'interno di un tubo da dialisi con cut off 2 KDa, mentre all'esterno vi è un volume di acqua 20 volte maggiore. Il sistema è mantenuto sotto continua agitazione a 25°C e nel tempo si legge l'assorbimento a 275 nm a cui il diclofenac presenta il massimo di assorbimento. In questo modo poiché solo il diclofenac può attraversare la membrana dialitica, considerato la notevole differenza di volume tra soluzione dializzata e mezzo di dialisi, l'aumento di assorbimento a 275 nm può essere ricondotto alla quantità di diclofenac che si allontana dal complesso con la condroitina. In tabella 5 sono riportati i dati della sperimentazione.

Stechiometria del complesso (moli Diclofenac/moli condroitina)	% OD ₂₇₅ * presente a differenti tempi (h) nel mezzo di dialisi				
	1	2	4	8	16
0,630	30	48	71	82	95
0,315	21	33	56	68	91
0,063	13	20	45	59	79
Solo diclofenac**	85	94	96	95	96

*Date uguali a 100 le OD₂₇₅ presenti nel complesso

diclofenac-condroitina nel tubo di dialisi si riporta la percentuale di OD₂₇₅ complessivamente recuperate nella soluzione di dialisi ai differenti tempi;
**Nel tubo da dialisi sono introdotti 100 mL di soluzione acquosa contenente 5% p/v di diclofenac sale sodico.

Tabella 5 - Studio di equilibrio di dialisi, in cui 100 mL di soluzione acquosa del complesso sono presenti all'interno di un tubo da dialisi con cut off 2 KDa, mentre all'esterno vi è un volume di acqua di 2L. Il sistema è mantenuto sotto continua agitazione a 25°C e nel tempo si legge l'assorbimento a 275 nm a cui il diclofenac presenta il massimo di assorbimento.

Lo studio dimostra che in questo sistema sperimentale i complessi diclofenac-condroitina di differente stechiometria si comportano come sistemi a rilascio controllato del principio attivo, con il raggiungimento dell'equilibrio di dialisi in tempi superiori alle 10 h, che si allungano con il diminuire del rapporto diclofenac-condroitina nel complesso. Nel sistema in cui è presente solo diclofenac l'equilibrio di dialisi è già raggiunto a 2 h.

ESEMPIO 5 - Studi *in vitro* di assorbimento transcutaneo di complessi non covalenti diclofenac-condroitina

Lo studio è condotto utilizzando la cella di Franz equipaggiata con un campione di pelle umana proveniente da un intervento di chirurgia plastica per riduzione del seno di una donna di 45 anni sana. La pelle appena prelevata è immediatamente congelata a -20°C fino al momento dell'uso. Prima della collocazione nelle celle di Franz la pelle ancora congelata è ripulita del grasso sottocutaneo, in modo da utilizzare solo lo strato corneo, l'epidermide e il derma, e tagliata alle dimensioni idonee per la collocazione nella cella di Franz, con lo strato corneo rivolto verso l'alto. Prima di partire con la

sperimentazione la cella è mantenuta per 10 h a 30°C con una continua agitazione della soluzione ricevente costituita da 10 mL di HBSS (Hank's Buffered Saline Solutions). La superficie su cui si depone il formulato è di circa 3 cm². Prima di partire con l'applicazione del gel nelle celle si sostituisce la soluzione ricevente, avendo cura di eliminare ogni bolla d'aria tra pelle e soluzione. Sulla superficie della pelle si applicano 10 mg dei seguenti gel: a) diclofenac gel (per grammo di gel 100 mg di glicole polietilenico, 1 mg di alcol benzilico, 200 mg di diclofenac sodico e acqua a 1 g, si scioglie a 50°C sotto energica agitazione); b) diclofenac-condroitina gel (0,630 moli diclofenac/moli unità disaccaridiche condroitina; per grammo di gel 100 mg di glicole polietilenico, 1 mg di alcol benzilico, 200 mg di condroitina MW 35 KDa, 100 mg di diclofenac sodico e acqua a 1 g, si scioglie a 50°C sotto energica agitazione); c) diclofenac-condroitina solfato gel (0,630 moli diclofenac/moli unità disaccaridiche condroitina solfato; per grammo di gel 100 mg di glicole polietilenico, 1 mg di alcol benzilico, 279,6 mg di condroitina solfato MW 35,4 KDa, 100 mg di diclofenac sodico e acqua a 1 g, si scioglie a 50°C sotto energica agitazione).

Ai tempi indicati si recupera la fase ricevente e si lava accuratamente la superficie della pelle in modo da allontanare tutto il gel rimasto non assorbito. Si recupera la pelle, si omogeneizza e si fa digerire per 10 h sotto agitazione a 30°C con collagenasi (5.200 IU/g di pelle) in tampone fosfato 10 mM pH 7,4. Al termine dell'incubazione si aggiungono 0,4 volumi di etanolo e si centrifuga a 10.000 rpm per 20'. In queste condizioni la quasi totalità del diclofenac presente nel tessuto è estratto nella soluzione. La quantità di diclofenac presente nella soluzione di lavaggio della pelle (parte non

assorbita), nel digerito enzimatico del tessuto (parte assorbita a livello cutaneo) e nel fluido recettore (parte che ha attraversato la struttura cutanea) sono determinati in maniera quantitativa mediante HPLC. Le analisi sono eseguite su un HPLC Waters modello 746 (USA), equipaggiato con una colonna μ -bondapack C18 (150 x 4,6 millimetri). Come fase mobile si utilizza una soluzione acetonitrile, acqua deionizzata, acido ortofosforico (45:54.5:0.5 in vol.) con pH finale di 3,5, operando con un flusso di 1 mL/min. L'eluato è monitorato a 276 nm. La quantificazione è ottenuta mediante misurazione dei rapporti tra l'area del picco del diclofenac e quella dello standard interno costituito da una soluzione di naprossene a titolo noto.

In tabella 6 sono riportati i risultati dello studio.

Campione di gel contenente	tempo (h)	% della dose di diclofenac applicata		
		sulla pelle*	nella pelle	nel fluido recettore
Diclofenac	1	96	2	0
	5	91	3,5	0,9
	10	89	3,1	1,8
Diclofenac- Condroitina	1	82	11,4	3,8
	5	75	18,2	7,5
	10	69	16,5	11,9
Diclofenac - Condroitina solfato	1	98	nd	Nd
	5	95	2,7	1,1
	10	91	2,9	1,6

*quantità di diclofenac presente alla fine della sperimentazione nella soluzione di lavaggio della superficie della pelle montata nella cella di Franz.

Tabella 6 - Studio sull'assorbimento del diclofenac su pelle umana utilizzando la cella di Franz.

Come si rileva dall'analisi dei dati di tabella 6 l'assorbimento del diclofenac in presenza di condroitina aumenta significativamente rispetto a quanto si osserva in assenza del polisaccaride o in presenza di condroitina solfato.

ESEMPIO 6 - Studi *in vivo* di assorbimento transcutaneo di complessi condroitina-diclofenac

Come modello sperimentale per valutare l'assorbimento transcutaneo del complesso diclofenac-condroitina si utilizzano 45 topi nudi Charles River di entrambe i sessi di 5 mesi di età. Gli animali in maniera casuale sono divisi in 9 gruppi di 5 che, come riportato nel disegno sperimentale di tabella 7 sono trattati con 50 mg dei tre gel a) diclofenac gel, b) diclofenac-condroitina gel, c) diclofenac condroitina solfato gel, preparati come riportato nell'esempio 5. Durante la sperimentazione gli animali sono mantenuti in gabbie singole, con libero accesso al cibo e all'acqua.

animali	Trattamento	tempo del sacrificio (h)
1-5	Diclofenac gel	1
6-10		5
11-15		10
16-20	Diclofenac-condroitina gel	1
21-25		5
26-30		10
31-35	Diclofenac-condroitina solfato gel	1
36-40		5
41-55		10

Tabella 7 - Disegno sperimentale, 45 topi nudi Charles River di entrambe i sessi di 5 mesi di età sono divisi in maniera casuale in 9 gruppi di 5 animali. Sul dorso di ciascun animale viene contrassegnata un'area di circa 5-6 cm², localizzata in una zona in cui risulta difficile agli animali leccarsi o grattarsi. Su questa area si applicano con una spatola 50 mg di diclofenac gel, per gli animali da 1 a 15, di diclofenac-condroitina gel per gli animali da 16 a 30 e di diclofenac condroitina solfato gel per gli animali da 31 a 45.

Dopo 1, 5, 10 h dall'applicazione, come riportato nel disegno

sperimentale di tabella 7, gli animali sono sacrificati. Immediatamente dopo il sacrificio si procede a un accurato lavaggio della zona di applicazione del gel per potere discriminare tra radioattività applicata e radioattività assorbita a livello cutaneo. Dagli animali sacrificati si procede al recupero della zona di pelle trattata, del fegato e del sangue; immediatamente dopo il prelevamento i campioni sono pesati e congelati. Dalle gabbie si recuperano le urine degli animali mediante lavaggio. I campioni di pelle e di fegato sono solubilizzati per trattamento enzimatico con collagenasi e la quantità di diclofenac presente è determinata mediante HPLC come riportato nell'esempio 5. Il contenuto di diclofenac nel siero e nelle urine è determinato analogamente mediante HPLC.

Nelle tabelle 8-10 sono riportati i dati sperimentali.

Campione	Tempo del sacrificio (h)		
	1	5	10
	% della dose applicata		
pelle	0,8±0,3	1,2±0,5	3±0,4
fegato	Nd	nd	0,1±0,03
siero	Nd	nd	0,5±0,12
urine	Nd	nd	0,9±0,3

Tabella 8 - Distribuzione della radioattività in topi nudi trattati per via topica con diclofenac gel. Ciascun dato rappresenta la media di 5 animali.

Campione	Tempo del sacrificio (h)		
	1	5	10
	% della dose applicata		
pelle	49±13	69±15	45±10
fegato	Nd	1,2±0,3	3,1±0,7
siero	0,9±0,3	6,1±1,4	3,1±1,1
urine	Nd	1,9±1,5	7,9±5,1

Tabella 9 - Distribuzione della radioattività in topi nudi trattati per via

topica con diclofenac-condroitina gel. Ciascun dato rappresenta la media di 5 animali.

Campione	Tempo del sacrificio (h)		
	1	5	10
	% della dose applicata		
pelle	2±1	3±1,5	7±2,3
fegato	nd	nd	1,1±0,4
siero	nd	1,0±0,3	0,9±0,3
urine	nd	0,3±0,1	2,1±1,3

Tabella 10 - Distribuzione della radioattività in topi nudi trattati per via topica con diclofenac-condroitina solfato gel. Ciascun dato rappresenta la media di 5 animali.

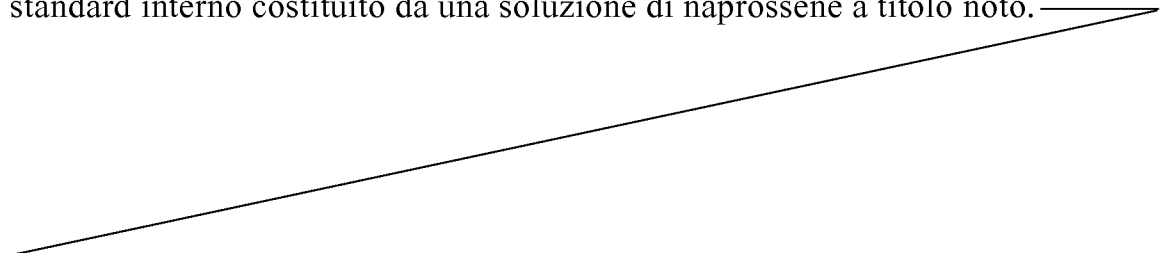
I dati delle tabelle 8-10 dimostrano che la condroitina e non la condroitina solfato funziona da efficiente carrier transdermico del diclofenac che si ritrova non solo localizzato nella pelle ma anche distribuito a livello sistemico. Il diclofenac da solo ha un assorbimento transcutaneo decisamente inferiore a quello che si riscontra nel caso del complesso non covalente con condroitina.

ESEMPIO 7 - Studi *in vitro* di assorbimento transcutaneo di complessi non covalenti ketorolac-condroitina

L'acido (±)-5-benzoil-2,3-diidro-1H-pirrolizin-1-carbossilico o ketorolac sale di trometamina, meglio conosciuto con il nome commerciale di toradol è un FANS di largo impiego come antiinfiammatorio, nonostante gli importanti effetti collaterali connessi con un suo uso prolungato. Lo studio sull'assorbimento topico di questo principio attivo, come complesso non covalente con la condroitina, è condotto secondo le modalità descritte nell'esempio 5 utilizzando la cella di Franz equipaggiata con un campione di

pele umana proveniente da un intervento di chirurgia plastica per riduzione del seno di una donna di 33 anni sana. Sulla superficie della pelle si applicano 10 mg dei seguenti gel: a) ketorolac sale di trometamina gel (per grammo di gel 100 mg di glicole polietilenico, 1 mg di alcol benzilico, 200 mg di ketorolac sale di trometamina e acqua a 1 g, si scioglie a 50°C sotto energica agitazione); b) ketorolac sale di trometamina-condroitina gel (0,535 moli ketorolac sale di trometamina /moli unità disaccaridiche condroitina; per grammo di gel 100 mg di glicole polietilenico, 1 mg di alcol benzilico, 200 mg di condroitina MW 62 KDa, 100 mg di ketorolac sale di trometamina e acqua a 1 g, si scioglie a 50°C sotto energica agitazione).

Le procedure di trattamento dei campioni sono quelle riportate nell'esempio 5. La quantità di ketorolac presente nella soluzione di lavaggio della pelle (parte non assorbita), nel digerito enzimatico del tessuto (parte assorbita a livello cutaneo) e nel fluido recettore (parte che ha attraversato la struttura cutanea) sono determinati in maniera quantitativa mediante HPLC. Le analisi sono eseguite su un HPLC Waters modello 746 (USA), equipaggiato con una colonna μ -bondapack C18 (150 x 4,6 millimetri). Come fase mobile si utilizza una soluzione acetonitrile, acqua deionizzata, acido ortofosforico (45:54.5:0.5 in vol.) con pH finale di 3,5, operando con un flusso di 1 mL/min. L'eluato è monitorato a 280 nm. La quantificazione è ottenuta mediante misurazione dei rapporti tra l'area del picco del ketorolac e quella dello standard interno costituito da una soluzione di naprossene a titolo noto.



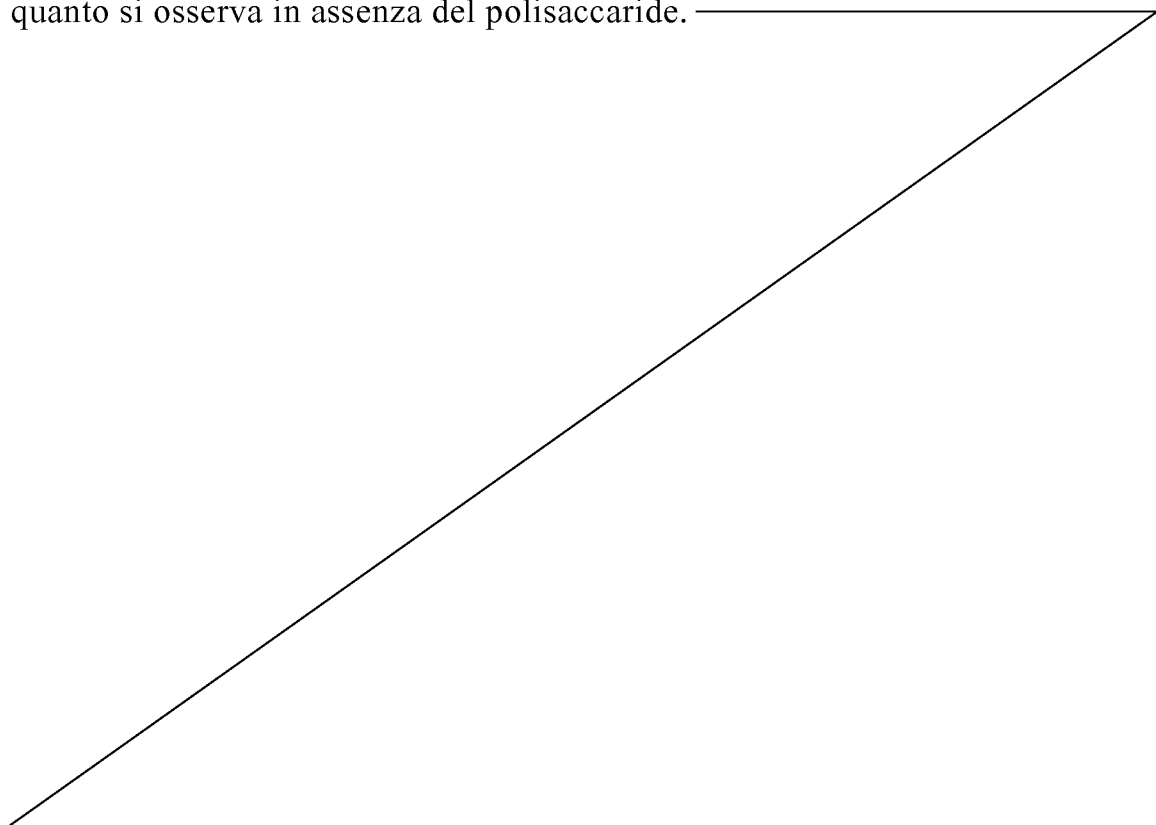
In tabella 11 sono riportati i risultati dello studio.

Campione di gel contenente	tempo (h)	% della dose di diclofenac applicata		
		sulla pelle*	nella pelle	nel fluido recettore
Ketorolac	1	98	1	nd
	5	93	2,6	0,7
	10	87	4,2	2,8
Ketorolac- Condroitina	1	85	9,4	4,8
	5	79	11,6	8,2
	10	70	14,2	10,8

*quantità di ketorolac presente alla fine della sperimentazione nella soluzione di lavaggio della superficie della pelle montata nella cella di Franz.

Tabella 11 - Studio sull'assorbimento del ketorolac su pelle umana utilizzando la cella di Franz.

Come si rileva dall'analisi dei dati di tabella 11 l'assorbimento del ketorolac in presenza di condroitina aumenta significativamente rispetto a quanto si osserva in assenza del polisaccaride.



RIVENDICAZIONI

1. Composizioni farmaceutiche e cosmeceutiche contenenti complessi non covalenti tra condroitina non solfatata e principi attivi.
2. Composizioni secondo la rivendicazione 1 per la somministrazione topica, nasale, rettale e vaginale.
3. Composizioni secondo le rivendicazioni da 1 a 2 comprendenti inoltre altri ingredienti.
4. Composizioni secondo le rivendicazioni da 1 a 3 in forma di soluzioni, emulsioni, gel, creme, spray, supposte, colliri, maschere, patch, medicazioni e cerotti.
5. Complessi non covalenti di condroitina non solfatata e principi attivi che sono assorbiti attraverso la pelle e le mucose e si comportano come carrier transdermico e sistemi a lento rilascio di principio attivo.
6. Complessi non covalenti secondo la rivendicazione 5, in cui il principio attivo è un anti-infiammatorio non steroideo o steroideo, un anti-tumorale, un anti-virale, un antimicrobico, un diuretico, un contraccettivo, un analgesico, un broncodilatatore, un anticorpo monoclonale, un immunosoppressore, un vaso costrittore o un vasodilatatore, un antiossidante, un lenitivo, un idratante, un drenante, un biostimolante, un radical scavenger, un antirughe, un composto per la crescita dei capelli, un peptide bioattivo, impiegati singolarmente o in combinazioni tra di loro.
7. Condroitina non solfatata come carrier transdermico e sistema a lento rilascio di principi attivi.

Milano, 27 luglio 2012

CLAIMS

1. Pharmaceutical and cosmeceutical compositions containing non-covalent complexes between non-sulfated chondroitin and active ingredients.
2. Compositions according to claim 1 for the topical, nasal, rectal and vaginal administrations.
3. Compositions according to claims 1 - 2 further comprising other ingredients.
4. Compositions according to claims 1 to 3 in the form of solutions, emulsions, gel, creams, spray, suppositories, eye drops, masks, patches, dressings and plasters.
5. Non-covalent complexes of non-sulfated chondroitin and active ingredients which are absorbed through the skin and the mucous membranes and behave as transdermal carrier and slow release systems for active ingredients.
6. Non-covalent complexes according to claim 5, wherein the active ingredient is a non-steroidal or steroidal anti-inflammatory, an anti-tumoral, an anti-viral, an antimicrobial, a diuretic, a contraceptive, an analgesic, a bronchodilator, a monoclonal antibody, an immunosuppressants, an vasoconstrictor or a vasodilator, an antioxidant, a lenitive, a moisturizer, a draining agent, a biostimulant, a radical scavenger, an anti-wrinkle, a compound for the growth of hair, a bioactive peptide, either used singularly or in combinations thereof.
7. Non-sulfated chondroitin as transdermal carrier and slow release system for active ingredients.