



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

DOMANDA NUMERO	102007901506581
Data Deposito	22/03/2007
Data Pubblicazione	22/09/2008

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Titolo

COMPOSIZIONI CONTENENTI N-ACETILGLUCOSAMINA PER L'IMPIEGO IN DERMOCOSMESI
E MEDICINA ESTETICA

DESCRIZIONE dell'invenzione industriale dal titolo:
"Composizioni contenenti N-acetilglucosamina per
l'impiego in dermocosmesi e medicina estetica"
Di: ROTTAPHARM S.p.A., nazionalità italiana, Galle-
ria Unione, 5, 20122 MILANO
Inventori designati: Paolo SENIN, Antonino SANTORO,
Angelo Luigi ROVATI
Depositata il: 22 Marzo 2007

DESCRIZIONE

Introduzione

Struttura della pelle

Differentemente da quanto può sembrare, la pelle presenta una struttura piuttosto complessa ed assimilabile schematicamente alla sovrapposizione di tre strati tissutali e cioè epidermide, derma e tessuto cutaneo, ognuno caratterizzato da funzioni precise e ben differenziate.

Lo strato superiore, chiamato epidermide, è piuttosto resistente ed appare sottile al microscopio. Si logora progressivamente e viene costantemente rinnovato. È traslucido e permette alla luce di attraversarlo solo parzialmente, come nel caso di un vetro smerigliato. L'epidermide non contiene vasi sanguigni, riceve ossigeno e sostanze nu-

PR/cp

trienti dagli strati più profondi del tessuto cutaneo, impedisce la perdita eccessiva di umidità dal corpo e conferisce un aspetto attraente alla pelle sana.

Tutte le cellule dell'epidermide provengono da un singolo strato denominato strato basale. Il tipo cellulare dominante nell'epidermide è il cheratinocita che prende il nome dalla sua capacità di sintetizzare la cheratina. Le cheratine sono proteine naturali, non idrosolubili, con elevata resistenza alla temperatura ed al pH; sono divise in cheratine dure e molli: le cheratine dure formano i capelli, i peli e le unghie, mentre quelle molli costituiscono le componenti principali delle cellule cornificate degli strati più esterni dell'epidermide e si trovano anche, come sostanza di collegamento, nello spazio extracellulare degli altri strati dell'epidermide.

Oltre ai cheratinociti, nell'epidermide si trovano anche i melanociti che sono localizzati nello strato basale e che producono il pigmento cutaneo, detto melanina, che, in base alla sua quantità, determina il colorito della pelle e dei capelli; i melanociti, inoltre, aumentano l'espressione di melanina per effetto delle radiazioni solari come re-

azione di difesa ai potenziali danni provocati dall'impatto dei raggi ultravioletti sul tessuto cutaneo.

Il già menzionato strato basale, che separa il derma dall'epidermide, è costituito appunto da cellule melanocitiche e da cheratinociti cilindrici, preposti alla mitosi cellulare, che garantiscono la continua rigenerazione dell'epidermide e la cui divisione cellulare dipende, a sua volta, dalla funzione svolta da altre sostanze quali i diversi fattori di crescita, ormoni e vitamine varie.

Tra lo strato basale dell'epidermide ed il derma si trova la membrana basale (anch'essa priva di vasi), detta anche giunzione dermo-ipodermica che, oltre a separare i due strati cutanei, serve anche ad ancorare le cellule basali al derma ed a mediare varie funzioni nutritive e metaboliche.

Il secondo strato e cioè il derma contiene vasi sanguigni, nervi, le radici dei capelli, ghiandole sudoripare e tutte quelle strutture che conferiscono resistenza ed elasticità alla pelle.

Il derma è composto in gran parte da fasci orizzontali di collagene che lo attraversano e sono immersi in una sostanza gelatinosa chiamata sostanza fondamentale che fa parte, a sua volta, del-

la matrice extra cellulare. Il collagene costituisce fino al 75% del peso del derma ed è responsabile della tonicità ed elasticità della pelle. I fasci di collagene sono tenuti insieme da fibre elastiche di una proteina chiamata elastina che rappresenta meno del 5% del peso del derma e che, malgrado il nome, non è direttamente responsabile dell'elasticità naturale della pelle.

Sia il collagene che le fibre di elastina sono prodotti da cellule chiamate fibroblasti che si trovano nel derma. I fibroblasti non solo producono ed organizzano la matrice extracellulare del derma, ma comunicano anche fra di loro e con altri tipi di cellule, espletando funzioni molto importanti nella fisiologia della pelle quali, per esempio, il rilascio di fattori di crescita/citochine che svolgono, a loro volta, un ruolo significativo nella rimarginazione di una ferita modulando l'attività dei cheratinociti (Sorrell M. e Caplan AI 2004).

L'acido ialuronico (AI) è un'altra componente fondamentale della matrice extra cellulare elasto-viscosa nella quale sono immerse le fibre collagene, le fibre di elastina ed altre strutture cellulari. Esso ha la capacità di richiamare acqua in quantità pari a centinaia di volte il suo peso e

rappresenta perciò una sostanza idratante naturale, responsabile della tonicità della pelle e della sua riserva di umidità. AI, inoltre, rende possibile il trasporto delle sostanze nutrienti essenziali dal sangue alle cellule della pelle. AI è un polisaccaride naturale, lineare e composto da unità strutturali disaccaridiche costituite dai monosaccaridi acido D-glucuronico e N-acetil-glucosamina (NA) ed è presente in tutti gli organismi viventi. Diversamente dal collagene, l'acido ialuronico non esibisce alcuna specificità di tessuto o di specie e non è né allergizzante né irritante.

Un'altra classe di sostanze, presente nella matrice extra cellulare e strettamente connessa, strutturalmente e funzionalmente all'AI, è rappresentata dai glucosamino glicani(GAGs). Essi sono costituiti da lunghe catene di unità disaccaridiche in cui i monomeri sono rappresentati da glucosamina o galattosamina ed acidi uronici. I GAGs portano cariche negative, per la presenza di gruppi solfonici e dei citati acidi uronici (e questa struttura spiega la loro potente capacità di attirare ioni negativi ed enormi quantità di H_2O), e vanno ad agganciarsi a catene proteiche (core proteins) a formare i proteoglicani. I proteoglicani sono il mag-

gior componente della matrice extra cellulare ed, assieme all'AI, a cui si legano covalentemente (tramite le link proteins), ed alle fibre collagene costituiscono la struttura extra cellulare del tessuto connettivo e quindi della pelle, conferendo a tali tessuti gran parte delle caratteristiche meccanico/funzionali che li caratterizzano.

La porzione più interna della cute è rappresentata infine dall'ipoderma o strato sottocutaneo, costituito da vasi sanguigni, nervi ed ammassi di adipociti. Da un punto di vista strutturale, la separazione con il soprastante derma non è ben definita mentre, in profondità, l'ipoderma è legato alla fascia muscolare sottostante ed il tessuto adiposo, che in esso si deposita in quantità variabili, esercita una ben precisa funzione isolante e modellante.

Caratteristiche funzionali della pelle e fattori condizionanti

Diversi studi sono stati eseguiti allo scopo di determinare l'effetto dell'acido ialuronico e di altre sostanze sull'attività delle cellule della pelle.

- L'acido ialuronico esogeno può influenzare la proliferazione dei fibroblasti cutanei e questo ef-

fetto varia a seconda della densità delle cellule e della concentrazione dell'acido ialuronico stesso. A questo proposito, e come osservato da Yoneda M. et al. (1988), l'aggiunta di AI a colture primarie di fibroblasti cutanei di pelle di topo, provoca una sintesi transitoria di DNA con conseguente back-up positivo costituito dall'aumento dei fibroblasti cutanei stessi e quindi dell'espressione di AI endogeno.

- L'importanza dell'AI esogeno è ulteriormente confermata dal fatto che, secondo Isnard N et al. (2001), in colture di fibroblasti e cheratinociti umani, l'aggiunta di AI (1mg/ml) provoca un chiaro aumento nell'espressione delle metalloproteasi della matrice extracellulare note per svolgere un ruolo importante nel rimodellamento tissutale in una varietà di processi fisiologici e patologici.

Con l'avanzare dell'età, elasticità e tono della pelle diminuiscono visibilmente con conseguente comparsa di rughe più o meno profonde e perdita del turgore caratteristico di una cute giovane ed esteticamente gradevole. Tale invecchiamento è essenzialmente legato al rallentamento del turn over sia dell'AI, con conseguente diminuita capacità di assorbire/trattenere l'acqua tissutale, che del col-

lagene con la compromissione delle altre caratteristiche funzionali della pelle quali resistenza alle sollecitazioni esterne ed elasticità.

La ricerca di sostanze da utilizzare in dermocosmesi e medicina estetica per uso topico o come filler cutanei per la correzione delle rughe facciali della pelle e per l'accrescimento dei tessuti molli facciali è stata oggetto di uno sforzo continuo per molti anni. Diversi biomateriali sono attualmente disponibili, ma tutti hanno evidenziato delle pesanti limitazioni: o vengono riassorbiti troppo in fretta e non sono, quindi, praticamente utilizzabili o possono dare luogo a reazioni allergiche (come per esempio nel caso del collagene), o migrano addirittura dal sito d'iniezione.

Una sostanza sicura ed efficace, per la destinazione d'uso sopra menzionata, deve essere biocompatibile, apirogena, non deve essere allergizzante o tossica, non deve causare infiammazione, deve essere facile da usare, stabile e non migrare dopo l'iniezione, deve durare il più a lungo possibile ma deve essere nel contempo riassorbibile e deve fornire alla pelle un aspetto naturale: l'acido ialuronico, per tutte le sue caratteristiche chimico fisiche e meccanico/strutturali, ha dimostrato ap-

punto di poter soddisfare contemporaneamente tutte queste esigenze funzionali. Esso è stato sviluppato per la prima volta come filler cutaneo nel 1989 da E. Balazs, che ne ha evidenziato la biocompatibilità e l'assenza di immuninogenicità (Balazs E.A. e Leshchiner E.A. 1989).

L'acido ialuronico esogeno è velocemente riassorbito dal derma e metabolizzato nel fegato con formazione di anidride carbonica e acqua. Il processo di riassorbimento di AI è rapido e completo e dipende dal legame recettoriale e dalla degradazione intracellulare. L'emivita nella pelle è molto breve e cioè meno di 24 ore.

Per ovviare a tale inconveniente l'acido ialuronico, da usare come filler ad effetto prolungato può venire reticolato chimicamente. Il processo di reticolazione, pur lasciandone invariata la biocompatibilità, modifica la solubilità e le proprietà reologiche di questo polisaccaride, che diventa più viscoso ed assume la consistenza di un gel. I geli di acido ialuronico, usati come filler cutanei, sono "idrogeli", poiché sono rigonfiati d'acqua per il 95% del loro peso e rimangono stabili nel tessuto, venendo riassorbiti solo dopo alcuni mesi, rendendone pertanto vantaggioso l'impiego in dermo-

cosmesi e medicina estetica.

Un ulteriore vantaggio è rappresentato dal fatto che, diversamente da altri filler temporanei, come il collagene, i gel a base di acido ialuronico vengono eliminati dal tessuto mediante degradazione isovolemica e cioè man mano che le molecole di acido ialuronico vengono degradate ed eliminate, quelle restanti possono legare più acqua, con il vantaggio che l'intero volume iniettato rimane invariato.

Per completare il quadro sull'utilizzo dell'acido ialuronico in dermocosmesi, va sottolineato che, nella sua forma non reticolata, esso può essere utilizzato vantaggiosamente, sia da solo che in associazione con altri principi attivi, in soluzioni, geli, creme o altre forme per applicazione topica, con evidente effetto benefico sul tono e turgore della pelle, favorendone l'idratazione e quindi l'aspetto estetico.

In letteratura, i risultati dei vari studi clinici pubblicati su diversi gel di acido ialuronico sono generalmente concordanti: si sono osservati, infatti, dei miglioramenti molto soddisfacenti dei difetti della pelle, sia da parte del medico che del paziente ed il grado di correzione è stato va-

lutato tra 60 e 90%, 6-9 mesi dopo la prima iniezione (Duranti F. ed al 1998; Olenius M. 1998; Carruthers J. et al, 2005; S. di Bosniak et al, 2004; Narins R. S. et al 2003; Lindqvist C et al, 2005; Carruthers J. & Carruthers A., 2003).

Come già precedentemente menzionato, fra i componenti fondamentali della matrice extra cellulare del tessuto connettivo e quindi della pelle, troviamo i Glucosamino glicani(GAGs) e l'acido Ialuronico e di quest'ultimo, caratteristiche, proprietà e funzioni sono già state ampiamente descritte e specificate.

Dal punto di vista strutturale si tratta, in entrambi i casi, di polimeri glucosidici, non ramificati, in cui l'unità ripetitiva è costituita da disaccaridi i cui monomeri sono rappresentati da acidi uronici quali il glucuronico, il galatturonico o l'iduronico e da amminozuccheri quali N-acetilglucosamina o N-acetil galattosamina variamente sostituiti.

Da quanto esposto, è facile evincere che, accanto all'AI, vi sono altre sostanze che possono risultare estremamente importanti nel conservare e/o migliorare funzionalità ed aspetto estetico della pelle. Una di queste è la NAG.

Esistono studi, reperibili in letteratura e test, descritti più avanti nella parte sperimentale della presente domanda di brevetto, che dimostrano come la NAG eserciti, su caratteristiche e funzionalità cutanee, un'azione inconfutabilmente positiva e tale da giustificarne e consigliarne un uso vantaggioso in dermocosmesi e medicina estetica. Così, per esempio:

- La NAG stimola l'attività dell'enzima ialuronato sintetasi nelle frazioni di membrana plasmatica di fibroblasti di pelle umana (Mian 1986), supportando e sinergizzando quindi l'impiego di AI esogeno nel difendere la pelle dalle sollecitazioni esterne e dai processi naturali e/o patologici di invecchiamento con conseguente perdita di tono, turgore, luminosità e comparsa di rughe più o meno profonde.

- In un modello "in vitro", che riproduce i vari strati della pelle e cioè MatTek Human Skin Epi-DemFT skin model (MatTek Corp., Ashland, MA USA), l'aggiunta di NAG ha provocato un elevato e significativo aumento, dose dipendente, della sintesi di AI e Procollagene 1 (Osborne R et al. 2006).

- A completare la documentazione scientifica esi-

stente e da quanto riportato nella parte sperimentale più avanti dettagliata, emerge che la NAG esercita, su colture "in vitro" di fibroblasti e cheratinociti di origine umana, un chiaro effetto, dose dipendente, nell'espressione di AI (testato solo sui fibroblasti), collagene, elastina ed altre proteine normalmente prodotte nel derma a giustificare e supportarne ulteriormente l'impiego in dermocosmesi, secondo le modalità descritte, esemplificate e rivendicate nella presente domanda di brevetto.

Sommario dell'invenzione

Da quanto descritto nella parte introduttiva, emerge molto chiaramente che sia l'impiego dell'AI esogeno che della NAG risulta sicuramente efficace e consigliabile in preparazioni da utilizzarsi per uso topico (dermocosmesi) ed intradermico (medicina estetica).

La presente invenzione si basa sul riconoscimento del fatto che l'attività di NAG è potenziata grazie all'associazione con NAG di un solfato di metallo alcalino in un ambito definito di rapporti ponderali. Costituisce così oggetto dell'invenzione una composizione sinergica come definita nelle rivendicazioni che seguono.

Secondo l'invenzione è stata realizzata e studiata una composizione molecolare fra NAG ed un solfato di metalli alcalini (d'ora in poi sarà utilizzato il sodio solfato anidro (SSA) come riferimento ponderale), in cui il rapporto dei pesi equivalenti fra NAG e SSA può variare da 1:0,5 a 1:3, utilizzando poi praticamente, per i motivi che saranno dettagliati nella parte sperimentale, il rapporto più vantaggioso e cioè 1:1 (pari in termini ponderali al 75,7% di NAG e 24,3% di SSA. A tale proposito va evidenziato che, per evitare confusioni, d'ora in poi la combinazione molecolare corrispondente al rapporto sperimentalmente più vantaggioso e cioè 1:1 sarà denominata Condramina (CA) mentre tutte le altre combinazioni, all'interno del range 1:0,5 - 1:3 (escluso ovviamente 1:1), saranno identificate con l'abbreviazione COMBI. Dopo una fase sperimentale preliminare, dalla quale è emerso il vantaggioso impiego della CA rispetto a tutte le altre COMBI (comunque convenienti rispetto all'impiego di NAG a dosi corrispondenti), le attività della CA, nello stimolare l'espressione di AI, collagene, elastina ed altre proteine, su colture "in vitro" di fibroblasti e cheratinociti, sono state testate e confrontate con quelle di NAG e sodio

solfato, presi individualmente ed in dosi/concentrazioni corrispondenti a quelle presenti nella CA, usate negli stessi test.

- Come atteso e come dettagliato nella parte sperimentale, la NAG ha dato degli ottimi risultati sia su colture di fibroblasti che di cheratinociti mentre, in maniera altrettanto prevedibile, il sodio solfato si è dimostrato del tutto inattivo e con risultati, quindi, non significativamente distinguibili da quelli delle colture di controllo.

- In maniera del tutto inattesa ed imprevedibile, la CA ha dato luogo (salvo nel caso dello stimolo dell'espressione di elastina in colture di fibroblasti in cui non vi è differenza significativa con la NAG) invariabilmente a risultati migliori di quelli espressi dalla NAG alle dosi/concentrazioni corrispondenti. Tali effetti si sono dimostrati costantemente dose dipendenti e statisticamente significativi, portando alla conclusione, del tutto imprevedibile a priori, dell'esistenza innegabile di un sinergismo d'azione fra NAG e SSA nell'esercitare un'utile azione di stimolo nella produzione di sostanze utili al trofismo cutaneo da parte di cellule caratteristiche del tessuto cutaneo stesso quali fibroblasti e cheratinociti.

- Poiché, inoltre, le concentrazioni/dosi, utilizzate nei test, sono del tutto compatibili con potenziali applicazioni pratiche e test paralleli, sulla possibile citotossicità della CA, si sono dimostrati del tutto rassicuranti, risulta evidente la possibilità pratica di utilizzare vantaggiosamente la CA, al posto della NAG, sia per uso orale che, per uso topico ed intradermico, preferibilmente in associazione con l'AI, in dermocosmesi e medicina estetica come dettagliato negli esempi più avanti descritti nella presente domanda di brevetto.

Informazioni sui principi attivi impiegati nelle composizioni descritte e rivendicate nella presente domanda di brevetto

Acido ialuronico (AI) usato come tale o come sale sodico:

- Numero CAS (acido): 9004-61-9
- Numero CAS (sale sodico): 9067-32-7
- Origine: biofermentativa
- Peso molecolare: compreso tra 0,5 e 3×10^6 Dalton
- Livello di reticolazione (laddove utilizzato) : compreso tra 0,5 e 5%

Le concentrazioni di AI, descritte e rivendicate nella presente domanda di brevetto non superano il 4% e sono preferibilmente comprese nel range 1-3%.

Combinazione NAG-SSA (COMBI):

COMBI è composta da NAG e SSA in rapporto di peso equivalente variabile fra 1:0,5 e 1:3 (escludendo il rapporto 1:1 già identificato come Condramina (CA)), corrispondente a rapporti ponderali oscillanti fra 86,17% e 50,93% per la NAG e fra 13,83% e 49,07% per il SSA:

Condramina (CA):

La CA è composta da NAG e SSA in rapporto di pesi equivalenti pari a 1:1, corrispondente in termini ponderali al 75,7% di CA ed al 24,3% DI SSA

Sia COMBI che CA sono costituite da:

a. NAG:

- Denominazione: N-Acetil-2-amino-2 deossiglucosio
- Numero CAS: 7512-17-6
- Peso molecolare: 221,19
- Formula bruta: $C_8H_{15}NO_6$

b. SSA:

- Numero CAS: 7757-82-6

- Peso molecolare: 142,05

- Formula bruta: $\text{Na}_2\text{O}_4\text{S}$

Le concentrazioni/dosi di CA, utilizzate nell'ambito dell'invenzione, sono preferibilmente comprese tra 0,05% e 2,5% in peso e più preferibilmente tra 0,1 e 0,5% per quanto riguarda le forme topiche ed intradermiche mentre, se utilizzata per somministrazione orale, la CA può essere assunta a dosi giornaliere, espresse in termini di glucosamina base, comprese fra 100 e 1000 e preferibilmente 250-750 mg, in una o più somministrazioni dipendentemente dal dosaggio e dalla forma farmaceutica utilizzati.

Parte sperimentale

L'effetto sinergico conseguito dalla composizione secondo l'invenzione è stato verificato su una serie di test "in vitro", valutando e confrontando i risultati sperimentali relativi alla Condamina (CA) con quelli dei suoi componenti e cioè N-Acetil glucosamina (NAG) e sodio solfato anidro (SSA) presi individualmente, a concentrazioni congruenti con il rapporto fra i loro pesi equivalenti all'interno della CA, dimostratosi il più conveniente e cioè 1:1. Tale rapporto è stato scel-

to in base ai risultati di un test preliminare in cui la valutazione è stata focalizzata sull'effetto sperimentale della variazione del rapporto reciproco di NAG e SSA all'interno di COMBI.

Metodi

I test prescelti sono stati:

1. Valutazione in vitro della stimolazione della sintesi di Acido Ialuronico (AI) da CA, NAG e SSA in colture di fibroblasti umani (vedi anche: Sayo et al. 2004)

Il test è stato condotto in due fasi e cioè:

- fase A: nella quale lo stimolo dell'espressione di AI da parte di COMBI è stato valutato mantenendone costante la concentrazione e variando le quantità reciproche dei suoi componenti. La concentrazione utilizzata è stata scelta in modo da rendere possibile il confronto con i risultati derivanti dalla fase B;

- fase B: nella quale è stato valutato l'effetto della CA sull'espressione di AI al variare della sua concentrazione ed in confronto a dosi congruenti dei suoi componenti.

Razionale del test

- Poiché il contenuto di AI nella pelle decresce

con il passare degli anni dando luogo all'invecchiamento cutaneo, con conseguente comparsa di rughe e perdita di elasticità, lo scopo del test è stato la valutazione ed il confronto della potenziale stimolazione, esercitata dalle sostanze in esame, sull'espressione di AI da parte di colture "in vitro" di cellule di derivazione cutanea quali i fibroblasti. Il test in oggetto, anche se condotto "in vitro", può essere considerato predittivo sugli effetti dell'impiego delle stesse sostanze anche "in vivo".

Modello cellulare

Sono stati impiegati fibroblasti umani, Detroit 551 ATCC CCL III provenienti da LGC Promochem (Milano - Italia).

Sostanze e concentrazioni testate

Le sostanze testate per il loro effetto sull'espressione di AI nelle colture di fibroblasti umani sono state:

Fase A:

- COMBI: alla concentrazione costante di 1,98 mg/ml con rapporti fra NAG e SSA, in termini di peso equivalente, pari a 1:0,4 ; 1:0,5 ; 1:3 e 1:3,5

- CA: alla concentrazione di 1,98 mg/ml con rapporto di peso equivalente, fra NAG e SSA, pari a 1:1

Fase B:

- CA: in cui il rapporto fra componenti, in termini di peso equivalente, è stato mantenuto costante e pari a 1:1 e le concentrazioni testate sono 0,66; 1,32; 1,98; 2,64 e 3,3 mg/ml
- NAG alle concentrazioni di 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 e 2,5, corrispondenti al contenuto di NAG nella CA alle concentrazioni e nel rapporto di pesi equivalenti (1:1) impiegati nello stesso test
- SSA alle concentrazioni di 0,16, 0,32, 0,48, 0,64 e 0,80 mg/m corrispondenti al contenuto di SSA nella CA alle concentrazioni e nel rapporto di pesi equivalenti (1:1) impiegati nello stesso test.

Preparazione delle colture cellulari

I fibroblasti di origine umana sono stati coltivati in opportuno terreno di crescita (Eagle's minimal essential medium) supplementato con 10% siero fetale bovino (Fetal Calf Serum, FCS), sodio piruvato 1 mM, glutamina 2 mM, aminoacidi non essenziali e 50 µg/ml di glutamicina. A confluenza le

cellule sono state piastrate in piastrine da 24 pozzetti, 5×10^4 cellule/pozzetto, nello stesso mezzo. A confluenza le cellule sono state pre-esposte al mezzo contenente 5% di siero prima dell'aggiunta delle sostanze da testare alle concentrazioni desiderate. Dopo 48 ore il surnatante è stato prelevato e su di esso sono stati determinati i parametri di interesse. Il test è stato condotto in doppio e colture di cellule non trattate sono state utilizzate come controllo.

Dosaggio dell'AI

L'AI è stato dosato con un test immunoenzimatico utilizzando un kit disponibile commercialmente (EIA, Corgenix). La neo-sintesi di AI è stata valutata nel terreno di coltura dopo trattamento con le sostanze in esame, secondo il protocollo fornito assieme al test, e contro la curva di taratura ottenuta utilizzando lo standard di AI contenuto nel kit.

Valutazione dei risultati

Fase A:

- la valutazione dell'effetto di COMBI e CA sulle colture di fibroblasti, al variare del rapporto reciproco dei loro componenti, all'interno di una

concentrazione mantenuta costante, è stata espressa come incremento o decremento assoluto e percentuale dell'espressione di AI rispetto alle corrispondenti colture di controllo dopo 48 ore di incubazione e per confronto con gli effetti esercitati dalla NAG alle concentrazioni corrispondenti esattamente o approssimativamente a quelle presenti nella CA ed in COMBI, al variare del rapporto reciproco fra i suoi componenti NAG e SSA.

Fase B:

- la valutazione dell'effetto delle sostanze testate, alle varie concentrazioni, sulle colture di fibroblasti è stata espressa come incremento o decremento assoluto e percentuale dell'espressione di AI, rispetto alle corrispondenti colture di controllo, dopo 48 ore di incubazione.

Sono state poi calcolate le differenze percentuali di incremento o decremento degli effetti esercitati da CA e NAG, a concentrazioni corrispondenti, con valutazione della loro potenziale significatività tramite il test "t" di Student.

2. Valutazione "in vitro" della stimolazione della sintesi di collagene ed elastina da CA, NAG e SSA in colture di fibroblasti umani (vedi anche: Booth

et al. 1980; Fenwick et al. 2001)

Razionale del test

Lo scopo del test è stato la valutazione ed il confronto della potenziale stimolazione, esercitata dalle sostanze testate, sull'espressione di collagene ed elastina da parte di colture "in vitro" di cellule di derivazione cutanea quali i fibroblasti. Il test in oggetto, anche se condotto "in vitro", può essere considerato predittivo sugli effetti dell'impiego delle stesse sostanze anche "in vivo".

Modello cellulare

Sono stati impiegati fibroblasti umani, Detroit 551 ATCC CCL III provenienti da LGC Promochem (Milano - Italia).

Sostanze e concentrazioni testate

Sostanze e concentrazioni testate sono state le stesse già descritte per la Fase B del test sulla stimolazione dell'espressione di AI e cioè:

- CA: 0,66, 1,32, 1,98, 2,64 e 3,3 mg/ml
- NAG: 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 e 2,5 mg/ml
- SSA: 0,16, 0,32, 0,48, 0,64 e 0,80 mg/ml

Preparazione delle colture cellulari

Le cellule sono state piastrate in piastre da

96 pozzetti, 2500 cellule/pozzetto per 24 ore in terreno di crescita per cellule (Dulbecco's Minimum Essential Medium, DMEM) + 10% siero fetale bovino (Fetal Calf Serum, FCS). E' stato quindi aggiunto terreno di coltura fresco arricchito con solo 5% di FCS e contenente le sostanze da testare in modo da raggiungere le concentrazioni finali desiderate. I campioni sono stati disciolti direttamente nel terreno di coltura. Ogni campione è stato testato in doppio e gli esperimenti sono stati ripetuti 2 volte. Dopo 24 ore sono stati determinati i parametri di interesse su piastre separate. Colture di cellule non trattate sono state utilizzate come controllo.

Dosaggio del collagene

Per il dosaggio del collagene è stato impiegato un kit disponibile commercialmente (Sircol™, bio-dye science) che utilizza la capacità del colorante Sirius Red di interagire con i gruppi basici laterali degli aminoacidi presenti nel collagene stesso. La neosintesi di collagene è stata valutata nel terreno di coltura dopo trattamento con le sostanze in esame, seguendo il protocollo fornito assieme al kit, e contro la curva di taratura ottenuta utiliz-

zando lo standard di collagene contenuto a sua volta nel kit.

Dosaggio dell'elastina

L'elastina è stata dosata utilizzando un test disponibile commercialmente (Fastin™, biodye science). Il dosaggio si basa sull'interazione della 5,10,15,20-tetrafenil-21,23-porfirina con le molecole di elastina.

La neosintesi di elastina è stata valutata nel terreno di coltura, dopo trattamento con le sostanze in esame, seguendo il protocollo fornito assieme al test e contro la curva di taratura ottenuta utilizzando lo standard di elastina contenuto nel kit stesso.

Valutazione dei risultati

La valutazione dell'effetto delle sostanze testate, alle varie concentrazioni, sulle colture di fibroblasti è stata espressa come incremento o decremento assoluto e percentuale dell'espressione di collagene ed elastina, rispetto alle corrispondenti colture di controllo, dopo 24 ore di incubazione.

Sono state poi calcolate le differenze percentuali di incremento o decremento degli effetti esercitati da CA e NAG, a concentrazioni corrispon-

denti, con conseguente valutazione della loro potenziale significatività statistica tramite il test "t" di Student.

3. Valutazione "in vitro" della stimolazione della sintesi proteica da CA e NAG in colture di fibroblasti e cheratinociti umani: (vedi anche: Lowry et al. 1951; Creighton et al. 1984; Sengupta et al. 1993)

Informazioni preliminari

Fibroblasti e cheratinociti, presenti nel derma e nell'epidermide, oltre che nella sintesi di collagene, elastina ed AI, sono coinvolti nell'espressione di svariati tipi di proteine fra cui, per esempio, la cheratina da parte dei cheratinociti e le cosiddette core e link-proteins, su cui vanno ad agganciarsi vari tipi di GAGs a formare i proteoglicani, a loro volta, componenti fondamentali della matrice extracellulare.

Il livello di salute ed efficienza di tali cellule, in presenza o meno di agenti di cui si vuole appunto verificare una potenziale azione benefica sulla pelle, si può valutare e desumere dalla loro capacità di sintesi proteica.

Modelli cellulari

Sono stati impiegati:

- Fibroblasti umani, Detroit 551 ATCC CCL III provenienti da LGC Promochem (Milano -Italia);
- Colture primarie di cheratinociti umani: HEKA, Cascade Biologics, cat-005-5C.

Sostanze e concentrazioni testate

Sostanze e concentrazioni testate sono qui di seguito riportate (sia sui fibroblasti che sui cheratinociti):

- CA: 0,13, 0,66, 1,32 e 2,64 mg/ml
- NAG: 0,1, 0,5, 1,0 e 2,0 mg/ml

Razionale del test

In base a quanto messo in evidenza precedentemente sugli indici di efficienza delle cellule presenti nella cute, lo scopo del test è stata la valutazione ed il confronto della potenziale stimolazione, esercitata dalle sostanze in esame, sull'espressione proteica da parte di colture in vitro di fibroblasti e cheratinociti.

Il test in oggetto, anche se condotto "in vitro" può essere considerato predittivo sugli effetti dell'impiego delle stesse sostanze anche "in vivo".

Preparazione delle colture cellulari

Il metodo è identico a quello già descritto per collagene ed elastina con la differenza che, dopo l'aggiunta delle sostanze da testare nel terreno di coltura, il terreno è stato rimpiazzato quotidianamente per tre giorni. Ogni campione è stato testato in doppio e gli esperimenti sono stati ripetuti due volte. Il parametro di interesse e cioè la sintesi proteica, è stato valutato alle 24, 48 e 72 ore su piastre separate. Colture di cellule non trattate sono state usate come controllo.

Dosaggio delle proteine

Per il dosaggio delle proteine è stato usato il metodo di Lowry [Lowry et al. 1951] consistente in una reazione di riduzione che prevede l'impiego del reagente di Folin-Ciocalteu come cromoforo, con viraggio dal giallo al blu e lettura spettrofotometrica a 750 nm [Creighton et al. 1984; Sengupta et al. 1993].

Il contenuto proteico delle colture in esame è stato ricavato dal confronto delle loro densità ottiche con quella di una curva di titolazione effettuata utilizzando albumina come indice proteico.

Valutazione dei risultati

La valutazione dell'effetto delle sostanze testate, alle varie concentrazioni ed ai vari tempi, sia sulle colture di fibroblasti che cheratinociti è stata espressa sia in termini assoluti (produzione di proteine espressa in mg/ml) che come incremento o decremento percentuale rispetto alle colture di controllo.

Sono state poi calcolate le differenze percentuali di incremento o decremento degli effetti esercitati da CA e NAG, ai vari giorni ed a concentrazioni corrispondenti, con valutazione della loro potenziale significatività statistica tramite il test "t" di Student.

4. Valutazione "in vitro" del potenziale citotossico di sostanze per uso cosmetico topico e intradermico: (vedi anche: Mossman, 1993)

Razionale del test

La caratteristica peculiare di sostanze da utilizzare in cosmetica, per uso topico o intradermico, deve essere un'assoluta assenza di effetti citotossici nel range di dosaggi/concentrazioni destinato ad una loro applicazione pratica.

Esistono opportuni test "in vitro", condotti su cellule derivate dal tessuto cutaneo quali fibro-

blasti e cheratinociti, la cui predittività sulla potenziale citotossicità delle sostanze in esame è trasferibile anche "in vivo".

A tale scopo è stato scelto il test sulla vitalità cellulare che utilizza l'MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) [Mossmann 1993] come reattivo colorimetrico con cui è possibile distinguere tra cellule vive, danneggiate o morte e che è predittivo della sicurezza di impiego delle sostanze in esame anche "in vivo".

Modelli cellulari

Sono stati impiegati:

- fibroblasti umani, Detroit 551 ATCC CCL III provenienti da LGC Promochem (Milano -Italia);
- coltura primaria di cheratinociti umani HEKA, Cascade Biologics, cat. - 005-5c.

Sostanze e concentrazioni testate

Poiché, nella composizione oggetto della presente invenzione, NAG e SSA non vengono mai rivendicati per un loro impiego individuale ma sempre associati nella composizione della CA, l'unica sostanza testata per un suo potenziale effetto citotossico è stata appunto la CA a concentrazioni tali

da essere predittive e riferibili a quelle impiegate nei test di attività "in vitro" sulle colture di fibroblasti e cheratinociti precedentemente descritti.

Nello studio in oggetto, la CA è stata previamente sciolta e posta in contatto con le colture cellulari prescelte in modo da raggiungere direttamente le concentrazioni volute, e cioè:

0,026, 0,053, 0,106, 0,211, 0,409, 0,818, 1,65 e 3,30 mg/ml.

Campioni analoghi di fibroblasti e/o cheratinociti umani non trattati sono stati utilizzati come controlli negativi.

Campioni analoghi di fibroblasti o cheratinociti umani sono stati trattati con un tensioattivo di tossicità nota (SDS), disciolto nel terreno di coltura a concentrazioni comprese tra 0,05 e $1,6 \times 10^{-3}$ mg/ml e utilizzati come controllo positivo.

L'esposizione è stata protratta per 24 ore, al termine delle quali è stato eseguito il test di citotossicità.

Descrizione del test di citotossicità con MTT

Il reagente chiave, come già specificato, è l'MTT, sostanza di colore giallo in soluzione ac-

quosa che, per reazione con la deidrogenasi mitocondriale presente nelle cellule vitali, si trasforma in forma di cristalli viola, insolubili in acqua ma solubili in isopropanolo acidificato. L'assorbanza a 540 nm della risultante soluzione viola, viene utilizzata appunto come indice del grado di citotossicità delle sostanze in esame.

In termini operativi, il reagente chiave viene preparato aggiungendo 15 mg di MTT a 30 ml di terreno di coltura. A parte, dopo 24 ore di contatto con la sostanza da testare e/o l'SDS, i fibroblasti o i cheratinociti vengono lavati con 400 μ l di soluzione di lavaggio (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, DPBS) e, dopo la rimozione della soluzione, vengono aggiunti 200 μ l del terreno MTT ed i campioni cellulari vengono incubati per 4 ore a 37°C. Alla fine del periodo di incubazione, il terreno MTT viene rimosso e vengono aggiunti 400 μ l di soluzione MTT solubilizzante (10% Tritan x-100 + HCl 0,1 N in isopropanolo anidro). Le piastre vengono agitate per 20-30 minuti fino a formazione di una soluzione omogenea di cui viene letta l'assorbanza a 540 nm con lettura del fondo a 670 nm.

Il risultato è espresso come:

$$\% \text{ inibizione e vitalità cellulare} = \left[1 - \frac{OD \text{ cellule trattate}}{OD \text{ cellule non trattate}} \right] \times 100$$

Valutazione dei risultati

I dati di citotossicità, ottenuti con il test MTT, vengono messi in grafico contro la concentrazione del prodotto testato creando una curva dose-risposta che permette di determinare:

- la curva teorica di regressione;
- il valore teorico di IC₅₀, ovvero la concentrazione che induce una riduzione della vitalità cellulare del 50% rispetto a quella delle cellule non trattate.

Il potenziale irritante di un composto viene collegato all'IC₅₀ secondo il seguente criterio di valutazione:

- IC₅₀ < 0,5: forte effetto citotossico/irritante
- IC₅₀ tra 0,5 e 1,5: moderato effetto citotossico/irritante
- IC₅₀ > 1,5: assenza di qualsiasi effetto citotossico e/o irritante

Risultati

1. Stimolazione della sintesi di AI da CA, NAG e SSA in colture di fibroblasti umani

Fase A:

Dai risultati riportati nella Tabella 3, Fase A, emerge chiaramente che esiste un evidente sinergismo fra NAG e SSA secondo rapporti, in termini di peso equivalente, che variano fra 1:0,5 e 1:3 con la punta più favorevole verificabile per un rapporto 1:1. Per combinazioni al di fuori di detto range favorevole, non è riscontrabile alcun sinergismo, poiché l'effetto della combinazione fra NAG e SSA in queste condizioni risulta addirittura inferiore a quello della NAG, presa da sola ed alla concentrazione corrispondente a quella presente nella combinazione stessa.

Si può notare, infatti, come per un rapporto NAG/SSA pari a 1:0,4 (il più favorevole a NAG), l'incremento dell'espressione di AI è circa 65%, nettamente inferiore a quello della NAG, alla stessa concentrazione, sicuramente superiore al 75%. Analogamente, per un rapporto NAG/SSA pari a 1:3,5 (il più favorevole a SSA), l'incremento risulta essere circa il 50% contro quello dalla NAG, presa da sola, che alla stessa concentrazione rasenta il 60%.

Fase B:

Dai risultati riportati nelle tabelle da 1 a 3, Fase B, si possono trarre le seguenti conclusioni:

- SSA preso da solo, in dosi crescenti e corrispondenti a quelle presenti nella CA, testata nello stesso esperimento, non esercita alcun tipo di stimolo né di inibizione ed in effetti, a tutte le concentrazioni testate, le differenze rispetto all'espressione di AI della coltura basale sono irrilevanti sia in valore assoluto che percentuale. A riprova di quanto verificato qualitativamente, dall'esame dei dati sperimentali non è possibile individuare alcuna correlazione fra concentrazione di SSA ed espressione di AI poiché il coefficiente di correlazione, associato alla corrispondente regressione, calcolata con il metodo dei minimi quadrati, risulta statisticamente non significativo ($r=0,345$ con GdL=4).

- Differentemente da quanto trovato da Sayo T et al., 2004 per la NAG, sia la CA che la NAG, alle concentrazioni testate e del tutto congrue poiché espressione dello stesso dosaggio di NAG, esercitano un chiaro effetto di stimolo della secrezione di AI in colture di fibroblasti derivanti da cute umana. Tale effetto risulta, in entrambi i casi, molto

marcato con la differenza che compare già a 0,66 mg/ml per la CA (corrispondente a 0,5 mg/ml di NAG) mentre risulta ritardata a 1 mg/ml nel caso della NAG. Va inoltre rilevato che, in entrambi i casi, l'intensità dell'effetto è dose dipendente ($r=0,973$ per la NAG e $0,939$ per la CA entrambi statisticamente significativi per i gradi di libertà delle correlazioni corrispondenti) e che l'espressione di AI appare, a tutte le concentrazioni, più marcata nel caso dello stimolo da CA con un incremento pari al 99% circa a 1,98 mg/ml (corrispondenti a 1,5 mg/ml di NAG), incremento raggiunto invece da NAG, come tale, solo alla più alta dose testata e cioè 2,5 mg/ml.

- Facendo riferimento alla tabella 4, per valutare la differenza nella stimolazione dell'espressione di AI da parte di CA e NAG, si è calcolata la differenza fra gli incrementi percentuali, a dosi corrispondenti, delle due sostanze in esame, e si è confermato che, a tutte le concentrazioni, la CA esercita uno stimolo percentuale superiore a quello della NAG. Applicando poi il test del "t" di Student alle differenze fra gli incrementi percentuali sopramenzionati, emerge che il valore trovato per "t" è altamente significativo portando alla conclu-

sione, del tutto imprevedibile e sorprendente, che fra SSA e NAG esiste un chiaro effetto sinergico poiché SSA che, come già visto, da solo non esplica alcun effetto sull'espressione di AI da parte dei fibroblasti, esercita, al contrario, una chiara azione di stimolo se associato alla NAG nella composizione della CA, rendendone chiaramente ed inaspettatamente vantaggioso l'impiego funzionale e formulativo al posto della NAG se utilizzata da sola.

2. Stimolazione della sintesi di collagene ed elastina da CA, NAG e SSA in colture di fibroblasti umani

A. Collagene

Dai risultati riportati nelle tabelle 5 - 7 si possono trarre le seguenti conclusioni:

- Anche in questo caso SSA, preso individualmente nel range di concentrazioni congruenti con quelle utilizzate per le altre 2 sostanze in esame e cioè CA e NAG, non esercita alcun tipo di stimolo né di inibizione sull'espressione di collagene in colture di fibroblasti originati da cute umana. Anche in questo caso, non è possibile individuare per l'SSA alcun tipo di relazione concentrazione/effetto poi-

ché il coefficiente di correlazione della regressione fra la sua concentrazione e l'espressione di collagene ($r=0,298$) risulta statisticamente non significativo.

- Sia la CA che la NAG, alle concentrazioni testate e del tutto congrue poiché espressione dello stesso dosaggio di NAG, esercitano un chiaro effetto di stimolo della secrezione di collagene in colture di fibroblasti derivanti da cute umana. L'intensità di tale effetto risulta in entrambi i casi molto marcato e dose dipendente tanto che per entrambi è possibile calcolare una regressione concentrazione/effetto caratterizzata da un elevato e statisticamente significativo coefficiente di correlazione ($r=0,927$ per lo stimolo da NAG e $0,929$ per lo stimolo da CA).

- Dai dati della tabella 11, in cui vengono riportati gli incrementi percentuali rispetto al controllo basale, nell'espressione di collagene stimolata da CA e NAG, sempre a livelli confrontabili, emerge che l'effetto di stimolo percentuale della CA è superiore a quello della NAG a tutte le concentrazioni testate. Applicando poi il test del "t" di Student alle differenze fra gli incrementi per-

centuali sopramenzionati, risulta che il valore determinato per "t" è altamente significativo, evidenziando quindi, anche in questo caso, l'effetto sinergico ed imprevedibile a priori esistente, fra SSA e NAG nella CA, confermando quindi il vantaggioso impiego funzionale e formulativo di quest'ultima al posto della NAG da sola.

B. Elastina

Dai risultati riportati nelle tabelle 8 - 10 si possono trarre le seguenti conclusioni:

- Come già verificato nel caso dei test sull'espressione di AI e collagene, SSA, a concentrazioni congruenti con quelle delle altre due sostanze in esame, e cioè CA e NAG, non è in grado di esercitare alcun effetto sia esso di stimolo o di limitazione sull'espressione di elastina da parte di fibroblasti originati da cute umana.

Al contrario sia CA che NAG, alle concentrazioni testate e congruenti fra di loro, esercitano un marcatissimo effetto di stimolo che, in entrambi i casi, compare già alla più bassa concentrazione testata e cioè 0,5 mg/ml per NAG e 0,66 mg/ml per CA (corrispondenti a 0,5 mg/ml di NAG) per aumentare in modo dose-dipendente fino a superare il 300% ri-

spetto al controllo basale, alla massima concentrazione cioè 2,5 mg/ml di NAG e 2,64 mg/ml di CA (corrispondenti a 2,5 mg/ml di NAG).

- Dai dati presentati in tabella 12, in cui i risultati del test sono espressi come incremento percentuale rispetto al controllo basale, e contrariamente a quanto emerso per i test relativi all'espressione di AI e collagene, non è possibile, in questo caso, riscontrare alcuna differenza nell'azione stimolante esercitata da CA e NAG. Tale evidenza sperimentale è confermata dal fatto che il "t" di Student, applicato alle differenze fra gli incrementi percentuali relativi ai due principi attivi in esame, risulta statisticamente non significativo. Questa tendenza che non conferma quella già manifestatasi nel caso degli effetti sull'espressione di AI e collagene, dove lo stimolo esercitato da CA è sempre superiore, è probabilmente da attribuirsi all'elevata intensità dello stimolo stesso che provoca un aumento dell'espressione dell'elastina pari a circa il 200% già alla concentrazione più bassa, corrispondente cioè a 0,5 mg/ml di NAG.

3. Stimolazione della sintesi proteica da CA e NAG in colture di fibroblasti e cheratinociti umani

A. Cheratinociti

Dai risultati riportati in tabella 13 si possono trarre le seguenti conclusioni:

- Sia per NAG che per CA lo stimolo dell'espressione proteica si manifesta, alle concentrazioni più alte, e cioè 1 e 2 mg/ml, già dopo 24 ore con incrementi percentuali anche ragguardevoli e cioè oltre il 50% per la NAG, alla dose più alta e quasi 70% alla la concentrazione corrispondente per la CA.
- Il culmine dell'azione di stimolo da parte di entrambe le sostanze in esame si osserva, tuttavia, dopo 48 ore quando, a differenza di quanto osservato alle 24 ore, già alle concentrazioni più basse e cioè 0,1 e 0,5 mg/ml di NAG e 0,66 di CA, l'incremento dell'espressione proteica da parte dei cheratinociti, assume un valore positivo attestandosi intorno al 20% per la NAG e raggiungendo addirittura il 30-40% nel caso della CA. Si evidenzia pertanto un quadro finale in cui entrambe le sostanze in esame esercitano sui cheratinociti un chiaro effetto di stimolo dell'espressione proteica, a tutte le concentrazioni testate ed in modo dose dipendente come dimostrato dalla significatività statistica

dei coefficienti di correlazione, associati alla regressione concentrazione/effetto, pari a 0,726 per NAG e 0,909 per CA.

- Dopo 72 ore esiste ancora un residuo di azione stimolante alle due concentrazioni più alte ma appare evidente che tale effetto è solo una coda di quello massimo raggiunto alle 48 ore e come tale non significativo.

- Per quanto riguarda il confronto di attività fra CA e NAG, le differenze fra gli incrementi dello stimolo percentuale, esercitato dalle due sostanze in esame, sono state valutate con il test "t" di Student come già effettuato per i risultati sperimentali degli altri test precedentemente esaminati (vedi stimolo sull'espressione di AI, collagene ed elastina).

In particolar modo, esaminando e confrontando le azioni esercitate dalle due sostanze alle 48 ore e cioè al massimo del loro effetto stimolante (tale confronto a 24 e 72 ore ha scarso significato perché temporalmente o prematuro o tardivo) emerge chiaramente che la CA esercita sui cheratinociti un'azione stimolante l'espressione proteica nettamente superiore a quella dalla NAG a dosi corri-

spondenti. Tale risultato sperimentale viene ulteriormente confermato dal valore del "t" di Student, applicato alle differenze di stimolo percentuale delle due sostanze in esame, che risulta altamente significativo.

Ancora una volta, pertanto, viene comprovato l'inaspettato ed imprevedibile effetto sinergico fra SSA e NAG rendendo l'impiego funzionale e formulativo della CA sicuramente preferibile e vantaggioso rispetto a quello della NAG a concentrazioni e/o dosaggi equivalenti.

Fibroblasti

Dai risultati riportati in tabella 14 si possono trarre le seguenti conclusioni:

- Anche sulle colture di fibroblasti, derivanti da cute umana, è possibile evidenziare un chiaro effetto di stimolo della secrezione proteica sia da parte di NAG che di CA. Tale stimolazione raggiunge il suo massimo dopo 24 ore per rimanere poi non distinguibile da quella espressa naturalmente dalle cellule non trattate alle 48 e 72 ore.

La comparsa dell'effetto stimolante si manifesta già a 0.5 mg/ml per la NAG ed a 0,66 mg/ml per la CA aumentando poi in modo dose dipendente (coef-

ficienti di correlazione per la regressione concentrazione/effetto significativi in entrambi i casi e cioè $r=0,844$ per la NAG e $0,845$ per la CA) fino alle massime concentrazioni testate e cioè 2 mg/ml per NAG e 2,64 mg/ml per CA.

Come già messo in evidenza precedentemente, lo stimolo esercitato da entrambe le sostanze in esame risulta molto marcato raggiungendo e superando, alle massime concentrazioni testate, un incremento del 50% rispetto all'espressione proteica delle colture controllo e confermando, quindi, l'effetto altamente positivo, esercitato da entrambi i principi attivi, sulle funzioni specifiche di cellule di origine cutanea quali fibroblasti e cheratinociti.

- Per quanto riguarda il confronto fra CA e NAG, anche in questo caso è stata valutata una potenziale differenza di attività tramite il test del "t" di Student, applicato alle differenze fra gli incrementi di stimolazione percentuale, esercitata dalle due sostanze in esame, a concentrazioni corrispondenti. Tale valutazione è stata effettuata sui valori rilevati alle 24 ore perché altamente significativi, ottenendo conferma statistica di

quanto già precedentemente emerso per il confronto relativo all'espressione di elastina, collagene e AI da parte di cellule di derivazione cutanea, e cioè che CA, grazie all'imprevedibile sinergismo fra SSA e NAG, di cui è composta, si dimostra più attiva della NAG stessa ed in modo statisticamente significativo rendendone più vantaggioso l'impiego funzionale e formulativo.

4. Valutazione "in vitro" del potenziale effetto citotossico della CA con il test dell'MTT

A. Su fibroblasti derivati da cute umana

Come già illustrato nella parte descrittiva, l'inibizione della vitalità cellulare è stata calcolata su una serie di colture di fibroblasti, in presenza del set di concentrazioni stabilite per la CA, ed applicando la formula (i) in cui "OD₅₄₀ cellule trattate" rappresenta l'assorbanza a 540 nm delle colture contenenti la CA e "OD₅₄₀ cellule non trattate" quella del controllo negativo (bianco). L'efficienza del test viene valutata su una coltura, contenente un tensioattivo altamente citotossico, e cioè il sodio-dodecilsolfato(SDS), ad una concentrazione (0,05 mg/ml) alla quale l'assorbanza a 540 nm dovrebbe risultare praticamente nulla es-

sendo la crescita batterica completamente inibita.:

$$\text{inibizione vitalità cellulare (\%)} = \left[1 - \frac{OD_{540} \text{ cellule trattate}}{OD_{540} \text{ cellule non trattate}} \right] \times 100 \quad (i)$$

I risultati ottenuti sono riportati nella seguente tabella:

Test dell'MTT su fibroblasti in presenza di CA - Risultati

Conc. CA (mg/ml)	Inibizione vit. Cellulare (%) Media $\pm$ d.s.
Bianco	0,00
0,026	0,19
0,053	0,24
0,106	1,66
0,211	4,02
0,409	4,36
0,818	5,86
1,650	12,78
3,300	18,44

Dai dati tabulati si possono trarre le seguenti conclusioni:

- L'efficienza del test è confermata dal fatto che, dopo esposizione dei fibroblasti umani a SDS

0,5 mg/ml, si è registrata una mortalità cellulare di circa il 100% (96,05%).

- Come precedentemente enunciato, il parametro che consente di valutare il potenziale irritante di una sostanza, da utilizzare per uso topico o come filler intradermico, si basa sulla determinazione della IC_{50} , calcolabile dalla correlazione fra concentrazioni e corrispondenti valori di inibizione della vitalità cellulare, ed assumendo il seguente criterio di valutazione:

- o $IC_{50} < 0,5$ mg/ml: forte effetto citotossico/irritante
- o IC_{50} fra 0,5 e 1,5 mg/ml: moderato effetto citotossico/irritante
- o $IC_{50} > 1,5$ mg/ml: assenza di qualsiasi effetto citotossico/irritante

Nel caso della CA, poiché alla massima concentrazione testata e cioè 3,30 mg/ml, l'inibizione percentuale della vitalità cellulare non raggiunge neppure il 20% (18,44%), emerge chiaramente che la IC_{50} è molto minore di 1,5 mg/ml e pertanto la CA, secondo i dati ricavati dal modello predittivo "in vitro", si può ritenere priva di potenziale citotossico sui fibroblasti, derivanti da cute umana, e

come tale liberamente utilizzabile sia per uso topico che come filler intradermico.

B. Su cheratinociti:

Nel caso di cheratinociti, per i quali sono stati utilizzati lo stesso test dell'MTT e gli stessi criteri di valutazione deducibili dal valore dell'IC₅₀, i risultati ottenuti sono riportati nella seguente tabella:

Test dell'MTT su condrociti in presenza di CA - Risultati

Conc. CA (mg/ml)	Inibizione vit. Cellulare (%) Media $\pm$ d.s.
Bianco	0,00
0,026	0,00
0,053	0,028
0,106	0,056
0,211	0,089
0,409	1,166
0,818	6,280
1,650	11,330
3,300	17,690

Dai dati tabulati si possono trarre le seguenti conclusioni:

- Anche in questo caso l'efficienza del test è confermata dal fatto che la mortalità della coltura di

cheratinociti, esposta a SDS 0,5 mg/ml, è praticamente 100% (94,28%).

• Per quanto riguarda le colture di cheratinociti, poiché, anche in questo caso, alla massima concentrazione testata di CA (3,30 mg/ml), l'inibizione % della vitalità cellulare non raggiunge il 20% e quindi la IC₅₀ è molto minore di 1,5 mg/ml, la CA si può ritenere del tutto priva di effetto citotossico anche sui cheratinociti umani.

Conclusioni

Dai risultati sperimentali soprarassunti, emergono almeno due considerazioni fondamentali e cioè, in primo luogo, l'effetto sorprendente, legato alla combinazione fra NAG e SSA (sia come CA che come COMBI), imprevedibilmente ed inaspettatamente vantaggiosa rispetto alla NAG a dosi congruenti ma senza il supporto sinergico di SSA (SSA da solo non esplica alcun effetto), ed in seconda istanza l'effetto sinergico fra i componenti che raggiunge il suo massimo, nel caso della CA, per un rapporto, espresso in termini di peso equivalente, pari a 1:1, per scemare progressivamente allontanandosi poi da questo valore centrale.

Se a quanto detto si aggiunge la totale assenza

di potenziali effetti citotossici della composizione secondo l'invenzione (essendo ben nota l'atossicità dei suoi componenti se somministrati per via orale), si può concludere che il suo impiego eventualmente in associazione con altri principi attivi, quali per esempio AI, preferibilmente alle dosi/concentrazioni e nelle formulazioni descritte e rivendicate nella presente domanda di brevetto, si presta ad un vantaggioso e sicuro impiego sia per somministrazione orale, ad esempio nelle formulazioni di integratori alimentari, sia a livello di applicazione topica o come filler intradermico nel ridonare tono e vigore alla pelle.

Tabelle

Tabella 1: Espressione di AI da colture di fibroblasti in presenza di SSA

Conc.SSA(*) (mg/ml)	AI (ng/well) (Media ⁺ /dev.st.)	AI (ng/well) (Diff.da basale)	AI (%) (Diff.da basale)	r (coeff.corr.) (Conc.SSA vs AI) -0,345 [NS(**)]
0,00 (basale)	576 +/- 52	0	0,00	
0,16	611 +/- 44	35	+6,07	
0,32	622 +/- 91	46	+7,99	
0,48	630 +/- 37	54	+9,38	
0,64	427 +/- 24	-149	-25,87	
0,80	587 +/- 56	11	+1,91	

(*): La concentrazione di SSA corrisponde alla porzione dello stesso componente presente nella CA u-

tilizzata nello stesso test (vedi Tabella 3 - Fase B)

(**) : NS = Non statisticamente significativo

Tabella 2: Espressione di AI da colture di fibroblasti in presenza di NAG

Conc.NAG(*) (mg/ml)	AI (ng/well) (Media $\pm$ dev.st.)	AI (ng/well) (Diff.da basale)	AI (%) (Diff.da basale)	r (coeff.corr.) (Conc.NAG vs AI) 0,973 [SS ^(***)]
0,00 (basale)	490 $\pm$ 20	0	0,00	
0,50	544 $\pm$ 132	+54	+14,02	
1,00	779 $\pm$ 94	+289	+58,98	
1,50	863 $\pm$ 25	+373	+76,12	
2,00	876 $\pm$ 70	+386	+78,78	
2,50	964 $\pm$ 192	+474	+96,73	

(*): La concentrazione di NAG corrisponde alla porzione dello stesso componente presente nella CA utilizzata nello stesso test (vedi Tabella 3 - Fase B)

(***) : SS = Statisticamente significativo

Tabella 3 - Fase A: Espressione di AI da colture di fibroblasti in presenza di combinazioni NAG/SSA a concentrazione costante e rapporti variabili fra NAG e SSA

Conc. CA/SSA (mg/ml)	Rapporto(*) NAG/SSA	AI (ng/well) da NAG/SSA (Media ⁺ /dev.st.,	AI(%) da NA/SSA (diff.da ba- sale)	AI(%) da NAG(**) (dosi con- gruenti)	Sinerg.(***) NAG/SSA
0,00 (basale)	-	511 +/- 18,4	0	0	-
1,98 (1,75 NAG+0,23 SSA)	1 : 0,4 ⁽¹⁾	843 +/- 26,9	+ 64,97	+76,12 - +78,8	NO
1,98 (1,71 NAG+0,27 SSA)	1 : 0,5 ⁽²⁾	942 +/- 50,2	+84,25	+76,12 - +78,8	SI (*)
1,98 (1,50 NAG+0,48 SSA)	1 : 1 ⁽³⁾	997 +/- 15,6	+95,11	+76,12	SI (**)
1,98 (1,00 NAG+0,98 SSA)	1 : 3 ⁽²⁾	873 +/- 19,8	+70,84	+58,98	SI (*)
1,98 (0,93 NAG+1,05 SSA)	1 : 3,5 ⁽¹⁾	769 +/- 25,5	+50,49	≈59	NO

(*) : Espresso in termini di peso equivalente

(**) : vedi Tabella 2

(***) : NO=nessun sinergismo ; SI(+)=marcato sinergismo ; SI(++)=massimo sinergismo

(1) : Rapporto fra NAG e SSA al di fuori del range di COMBI

(2) : Rapporto fra NAG e SSA incluso nel range di COMBI

(3) : Rapporto fra NAG e SSA corrispondente a CA

Tabella 3 - Fase B: Espressione di AI da colture di fibroblasti in presenza di concentrazioni variabili di CA

Conc. CA (*) (mg/ml)	AI (ng/well) (Media +/- dev. st.)	AI (ng/well) (Diff. da basale)	AI (%) (Diff. da basale)	R (coeff. corr.) (Conc. CA vs AI) 0,939 [SS****]
0,00 (basale)	523 +/- 31	0	0,00	
0,66 (0,5 NAG+0,16 SSA)	770 +/- 98	+247	+47,22	
1,32 (1,0 NAG+0,32 SSA)	884 +/- 151	+361	+69,02	
1,98 (1,5 NAG+0,48 SSA)	1009 +/- 86	+486	+92,93	
2,64 (2,0 NAG+0,64 SSA)	1029 +/- 3	+506	+96,75	
3,30 (2,5 NAG+0,80 SSA)	1070 +/- 14	+547	+104,59	

(*): La concentrazione di CA corrisponde alla somma di quelle corrispondenti di NAG e SO_4^{-2} delle tabelle 1 e 2

(**): SS = Statisticamente significativo

Tabella 4: Espressione di AI da colture di fibroblasti: differenza % fra gli stimoli di CA e NAG

Conc. ag. stimol. (NAG/CA - mg/ml) (*) (1)	Espr. di AI da CA (Incr.% su basale) (2)	Espr. di AI da NAG (Incr.% su basale) (3)	Diff. CA-NAG (Diff. fra incr.%) (2) - (3)	Student's "t" (4GdL**) = 3,637 p = 2,2% [(SS***)]
0,5/0,66	+47,22	+11,02	+36,20	
1,0/1,32	+69,02	+58,98	+10,04	
1,5/1,98	+92,93	+76,12	+16,81	
2,0/2,64	+96,75	+78,78	+17,97	
2,5/3,3	+104,59	+96,73	+7,86	

(*): Le proporzioni fra NAG e CA sono congruenti;
p.es. 0,5 mg/ml di NAG corrispondono al contenuto di NAG in 0,66 mg/ml di CA.

(**): GdL =Gradi di libertà

(***): SS = Statisticamente significativo

Tabella 5: Espressione di Collagene da colture di fibroblasti in presenza di SSA

Conc.SSA(*) (mg/ml)	Collagene (µg/ml) (Media $\pm$ dev.st.)	Collagene (µg/ml) (Diff.da basale)	Collagene (%) (Diff.da basale)	r (coeff.corr.) (Conc.SSA vs Collagene) -0,298 [NS(***)]
0,00 (basale)	5,09 $\pm$ 0,45	0,00	0,00	
0,16	4,66 $\pm$ 0,50	-0,43	-8,45	
0,32	5,29 $\pm$ 0,51	+0,20	+3,93	
0,48	5,18 $\pm$ 0,41	+0,09	+1,77	
0,64	5,55 $\pm$ 0,49	+0,46	+9,03	
0,80	4,92 $\pm$ 0,56	-0,17	-3,34	

(*): La concentrazione di SSA corrisponde alla porzione dello stesso componente presente nella CA utilizzata nello stesso test (vedi Tabella 7)

(**): NS = Non statisticamente significativo

Tabella 6: Espressione di Collagene da colture di fibroblasti in presenza di NAG

Conc.NAG(*) (mg/ml)	Collagene (µg/ml) (Media $\pm$ dev.st.)	Collagene (µg/ml) (Diff.da basale)	Collagene (%) (Diff.da basale)	r (coeff.corr.) (Conc.NAG vs Collagene) 0,927 [SS(****)]
0,00 (basale)	4,26 $\pm$ 0,18	0,00	0,00	
0,50	4,33 $\pm$ 0,13	+0,07	+1,64	
1,00	5,55 $\pm$ 0,28	+1,29	+30,28	
1,50	5,80 $\pm$ 0,28	+1,54	+36,15	
2,00	5,66 $\pm$ 0,16	+1,33	+32,86	
2,50	6,29 $\pm$ 0,28	+2,03	+47,65	

(*): La concentrazione di NAG corrisponde alla por-

zione dello stesso componente presente nella CA utilizzata nello stesso test (vedi Tabella 7)

(***): SS = Statisticamente significativo

Tabella 7: Espressione di Collagene da colture di fibroblasti in presenza di concentrazioni variabili di CA

Conc.CA(*) (mg/ml)	Collagene (µg/ml) (Media*/. dev.st.)	Collagene (µg/ml) (Diff.da basale)	Collagene (%) (Diff.da basale)	r (coeff.corr.) (Conc.CA vs Collag.) 0,929 [SS(****)]
0,00 (basale)	4,67 +/- 0,22	0,00	0,00	
0,66 (0,5 NAG+0,16 SSA)	4,96 +/- 0,19	+0,29	+6,22	
1,32 (1,0 NAG+0,32 SSA)	6,46 +/- 0,23	+1,045	+38,48	
1,98 (1,5 NAG+0,48 SSA)	6,57 +/- 0,24	+1,905	+40,84	
2,64 (2,0 NAG+0,64 SSA)	6,89 +/- 0,25	+2,225	+47,70	
3,30 (2,5 NAG+0,80 SSA)	7,03 +/- 0,27	+2,365	+50,70	

(*): La concentrazione di CA corrisponde alla somma di quelle corrispondenti di NAG e SO_4^{-2} delle tabelle 5 e 6

(***): SS = Statisticamente significativo

Tabella 8: Espressione di Elastina da colture di fibroblasti in presenza di SSA

Conc.SSA(*) (mg/ml)	Elastina (µg/ml) (Media*/. dev.st.)	Elastina (µg/ml) (Diff.da basale)	Elastina (%) (Diff.da basale)	r (coeff.corr.) (Conc.SSA vs Elastina) 0,230 [NS(**)]
0,00 (basale)	4,72 +/- 0,38	0,00	0,00	

0,16	4,61 $\pm$ 0,41	-0,11	-2,33	
0,32	4,79 $\pm$ 0,44	+0,07	+1,98	
0,48	5,18 $\pm$ 0,36	+0,46	+9,75	
0,64	4,54 $\pm$ 0,47	-0,18	-3,81	
0,80	4,83 $\pm$ 0,30	+0,16	-3,39	

(*): La concentrazione di SSA corrisponde alla porzione dello stesso componente presente nella CA utilizzata nello stesso test (vedi Tabella 10)

(**): NS = Non statisticamente significativo

Tabella 9: Espressione di Elastina da colture di fibroblasti in presenza di NAG

Conc.NAG(*) (mg/ml)	Elastina(μ g/ml) (Media $\pm$ dev.st.)	Elastina(μ g/ml) (Diff.da basale)	Elastina (%) (Diff.da basale)	r (coeff.corr.) (Conc.NAG vs Elastina) 0,859 [SS ^(***)]
0,00 (basale)	5,08 $\pm$ 0,32	0,00	0,00	
0,50	16,29 $\pm$ 0,83	+11,21	+220,67	
1,00	19,25 $\pm$ 0,99	+14,17	+278,94	
1,50	21,35 $\pm$ 1,01	+16,27	+320,28	
2,00	22,62 $\pm$ 1,03	+17,54	+345,27	
2,50	22,30 $\pm$ 1,04	+17,22	+339,00	

(*): La concentrazione di NAG corrisponde alla porzione dello stesso componente presente nella CA utilizzata nello stesso test (vedi Tabella 10)

(***): SS = Statisticamente significativo

Tabella 10: Espressione di Elastina da colture di fibroblasti in presenza di concentrazioni variabili di CA

Conc. CA (*) (mg/ml)	Elastina (µg/ml) (Media ± dev. st.)	Elastina (µg/ml) (Diff. da basale)	Elastina (%) (Diff. da basale)	R (coeff. corr.) (Conc. CA vs E- lastina) 0,874 [SS(***)]
0,00 (basale)	5,17 ± 0,12	0,00	0,00	
0,66 (0,5 NAG+0,16 SSA)	14,85 ± 0,27	+9,69	+187,51	
1,32 (1,0 NAG+0,32 SSA)	20,13 ± 0,38	+14,96	+289,64	
1,98 (1,5 NAG+0,48 SSA)	20,19 ± 0,68	+15,03	+290,96	
2,64 (2,0 NAG+0,64 SSA)	21,36 ± 0,35	+16,19	+313,46	
3,30 (2,5 NAG+0,80 SSA)	22,72 ± 0,42	+17,66	+339,88	

(*): La concentrazione di CA corrisponde alla somma di quelle corrispondenti di NAG e SO_4^{-2} delle tabelle 8 e 9

(**): SS = Statisticamente significativo

Tabella 11: Espressione di Collagene da colture di fibroblasti: differenza % fra gli stimoli di CA e NAG

Conc. ag.stimol. (NAG/CA - mg/ml) (*) (1)	Espr. di Collag. da CA (Incr.% su basale) (2)	Espr. Di Collag. da NAG (Incr.% su basale) (3)	Diff. CA-NAG (Diff. fra incr.%) (2) - (3)	Student's "t" (4GdL**) = 3,34 p = 2,9% [(SS***)]
0,5/0,66	+6,22	+1,64	+4,58	
1,0/1,32	+38,48	+30,28	+8,20	
1,5/1,98	+40,84	+36,15	+4,69	
2,0/2,64	+47,70	+32,86	+14,84	
2,5/3,3	+50,70	+47,65	+3,05	

(*): Le proporzioni fra NAG e CA sono congruenti;

p.es. 0,5 mg/ml di NAG corrispondono al contenuto di NAG in 0,66 mg/ml di CA

(**): GdL =Gradi di libertà

(***): SS = Statisticamente significativo

Tabella 12: Espressione di Elastina da colture di fibroblasti: differenza % fra gli stimoli di CA e NAG

Conc. ag.stimol. (NAG/CA - mg/ml) (*) (1)	Espr. di Elast. da CA (Incr.% su basale) (2)	Espr. Di Elast. da NAG (Incr.% su basale) (3)	Diff.CA-NAG (Diff.fra incr.%) (2) - (3)	Student's "t" (4GdL**) =1,78 p=14,9 [(NS***)]
0,5/0,66	+187,51	+220,67	-33,16	
1,0/1,32	+289,64	+278,94	+10,70	
1,5/1,98	+290,96	+320,28	-29,42	
2,0/2,64	+313,46	+345,27	-31,81	
2,5/3,3	+339,88	+339,00	+0,88	

(*): Le proporzioni fra NAG e CA sono congruenti ;

p.es. 0,5 mg/ml di NAG corrispondono al contenuto di NAG in 0,66 mg/ml di CA

(**): GdL =Gradi di libertà

(***): NS = Statisticamente non significativo

Tabella 13: Espressione proteica da colture di cheratinociti in presenza di NAG e CA e differenza dello stimolo % fra le due sostanze.

Espressione Proteica dopo 24 ore						
Conc. ag.stimol. (NAG/CA - mg/ml) (*) (1)	Espr.pro- teica da NAG (mg/ml) - Me- dia +/- dev.st. (2)	Espr.pro- teica da NAG Incr.% su basale (3)	Espr.pro- teica da CA (mg/ml) - Me- dia +/- dev.st. (4)	Espr.pro- teica da CA Incr.% su basale (5)	Diff.CA-NAG (Diff.fra incr.%) (5) - (3)	Student's "t" (3GdL**) = 0,70 p=53,5% [(NS***)]
0,00(basale)	0,245 ⁺ /0,039	0,00	0,245 ⁺ /0,039	0,00	0,00	
0,10/0,132	0,16 ⁺ /0,037	-34,7	0,22 ⁺ /0,053	-10,2	+24,5	
0,50/0,66	0,22 ⁺ /0,039	-10,2	0,255 ⁺ / 0,044	+4,1	+14,3	
1,00/1,32	0,36 ⁺ /0,047	+44,9	0,30 ⁺ /0,120	+22,4	-22,4	
2,00/2,64	0,38 ⁺ /0,050	+55,1	0,41 ⁺ /0,060	+67,3	+12,2	
Espressione Proteica dopo 48 ore						
0,00(basale)	0,340 ⁺ /0,11	0,00	0,340 ⁺ /0,11	0,00	0,00	Student's "t" (3GdL**) = 5,74 p=1,05% [(SS****)]
0,10/0,132	0,42 ⁺ /0,15	+23,5	0,45 ⁺ /0,10	+32,4	+8,8	
0,50/0,66	0,40 ⁺ /0,12	+17,6	0,47 ⁺ /0,060	+38,2	+20,6	
1,00/1,32	0,48 ⁺ /0,11	+41,2	0,53 ⁺ /0,08	+55,9	+14,7	
2,00/2,64	0,47 ⁺ /0,12	+38,2	0,54 ⁺ /0,08	+58,8	+20,6	
Espressione proteica dopo 72 ore						
0,00(basale)	0,58 ⁺ /0,10	0,00	0,58 ⁺ /0,10	0,00	0,00	Student's "t" (3GdL**) = 0,58 p=60,4% [(NS***)]
0,10/0,132	0,67 ⁺ /0,09	+15,5	0,65 ⁺ /0,08	+12,1	-3,4	
0,50/0,66	0,64 ⁺ /0,12	+10,3	0,63 ⁺ /0,09	+8,6	-1,7	
1,00/1,32	0,70 ⁺ /0,08	+20,7	0,69 ⁺ /0,09	+19,0	-1,7	
2,00/2,64	0,83 ⁺ /0,070	+43,1	0,85 ⁺ /0,11	+46,6	+3,4	

(*) : Le proporzioni fra NAG e CA sono congruenti;

p.es. 0,5 mg/ml di NAG corrispondono al contenuto
di NAG in 0,66mg/ml di CA

(**) : GdL =Gradi di libertà

(***) : NS = Statisticamente non significativo

(****) : SS = Statisticamente significativo

Tabella 14: Espressione proteica da colture di fibroblasti in presenza di NAG e CA e differenza dello stimolo % fra le due sostanze.

Espressione Proteica dopo 24 ore						
Conc. ag.stimol. (NAG/CA - mg/ml) (*) (1)	Espr.pro- teica da NAG (mg/ml) - Me- dia +/- dev.st. (2)	Espr.pro- teica da NAG Incr.% su basale (3)	Espr.pro- teica da CA (mg/ml) - Me- dia +/- dev.st. (4)	Espr.protei- ca da CA Incr.% su basale (5)	Diff.CA-NAG (Diff.fra incr.%) (5) - (3)	Student's "t" (3GdL**) = 3,79 p=3,2% [(SS****)]
0,00 (basale)	0,82 ⁺ /0,15	0,00	0,82 ⁺ /0,12	0,00	0,00	
0,10/0,132	0,70 ⁺ /0,11	-14,6	0,84 ⁺ /0,17	+2,40	+17,1	
0,50/0,66	1,08 ⁺ /0,29	+31,7	1,14 ⁺ /0,21	+39,0	+7,3	
1,00/1,32	1,11 ⁺ /0,22	+35,4	1,20 ⁺ /0,120	+46,3	+11,0	
2,00/2,64	1,24 ⁺ /0,17	+51,2	1,28 ⁺ /0,30	+56,1	+4,9	
Espressione Proteica dopo 48 ore						
0,00 (basale)	1,03 ⁺ /0,25	0,00	1,03 ⁺ /0,25	0,00	0,00	Student's "t" (3GdL**) = 1,68 p=19,3% [(NS***)]
0,10/0,132	0,95 ⁺ /0,08	-7,8	1,06 ⁺ /0,17	+2,9	+10,7	
0,50/0,66	0,93 ⁺ /0,08	-9,7	1,01 ⁺ /0,22	-1,9	+7,8	
1,00/1,32	0,81 ⁺ /0,11	-21,4	0,88 ⁺ /0,17	-14,6	+6,8	
2,00/2,64	1,10 ⁺ /0,20	+6,8	1,06 ⁺ /0,20	+2,9	-3,9	
Espressione proteica dopo 72 ore						
0,00 (basale)	1,10 ⁺ /0,18	0,00	1,10 ⁺ /0,18	0,00	0,00	Student's "t" (3GdL**) = 0,25 p=82,1% [(NS***)]
0,10/0,132	1,03 ⁺ /0,18	-6,4	0,96 ⁺ /0,21	-12,7	-6,4	
0,50/0,66	1,14 ⁺ /0,16	+3,6	1,13 ⁺ /0,20	+2,7	-0,9	
1,00/1,32	1,04 ⁺ /0,20	-5,5	1,20 ⁺ /0,20	+9,1	+14,5	
2,00/2,64	1,11 ⁺ /0,19	+0,91	1,08 ⁺ /0,27	-1,8	-2,7	

(*) : Le proporzioni fra NAG e CA sono congruenti;

p.es. 0,5 mg/ml di NAG corrispondono al cont

(**) : GdL =Gradi di libertà

(***): NS = Statisticamente non significativo

(****): SS = Statisticamente significativo

Esempi

A. Soluzioni e/o lipogeli contenenti CA e AI non reticolato da utilizzare per applicazione topica

Le formulazioni qui di seguito riportate, assieme alla descrizione delle procedure operative impiegate negli esempi 1 e 2, illustrano possibili applicazioni pratiche della presente invenzione ed essendo puramente esemplificative non devono essere ritenute in alcun modo limitative dell'invenzione stessa.

Si fa particolare riferimento agli eccipienti, che possono essere utilizzati in alternativa a quelli esplicitamente menzionati nella presente invenzione, dipendentemente dalle esigenze formulativi-tecnologiche e che, comunque, possono essere scelti fra una larghissima gamma di prodotti, presenti sul mercato, ben noti agli esperti di tecnica farmaceutica e, pertanto, di nessuna originalità inventiva.

Per quanto riguarda il dosaggio dei principi attivi, negli esempi descritti si riportano quantità puramente indicative la cui eventuale variazione non apporta alcuna modifica sostanziale ai

metodi di preparazione illustrati.

Più precisamente l'AI, espresso come sale sodico, può essere vantaggiosamente impiegato a concentrazioni non superiori al 4% (preferibilmente 1-3%), mentre la CA può variare fra lo 0,05 ed il 2,5% (preferibilmente 0,1-0,5%) in accordo con le concentrazioni utilizzate nei test "in vitro", descritti nella parte sperimentale e con quanto contenuto nelle rivendicazioni della presente domanda di brevetto.

Esempio 1: Soluzione monodose per applicazione topica

La formulazione, riportata in Tabella 1, concerne principi attivi ed eccipienti (con descrizione della corrispondente funzione tecnologica) che possono essere impiegati nella preparazione di una soluzione per applicazione topica, da ripartire automaticamente in contenitori monouso del volume stabilito.

Il materiale dei contenitori, per esempio polietilene, deve essere compatibile con i componenti la formulazione e con le norme vigenti per i materiali da impiegare in campo cosmetico o per un dispositivo medico.

Un esempio di preparazione della formulazione in oggetto da ripartire appunto in contenitori monodose in polietilene, viene qui di seguito esemplificativamente riportato:

- pesare separatamente i componenti la formulazione secondo quanto indicato nelle istruzioni di produzione;
- in un dissolutore, munito di opportuno sistema di agitazione, aggiungere una quantità di acqua bidistillata corrispondente a circa la metà del peso finale della soluzione. Attivare l'agitazione in modo da ottenere un vortice ed aggiungere nell'ordine: sodio para-idrossi-benzoato di metile (Me-paraben-Na), CA, EDTA disodico, 2-fenossietanolo e sodio para-idrossi-benzoato di propile (Pr-paraben-Na) assicurandosi che, ogni componente sia passato completamente in soluzione prima dell'aggiunta di quello successivo;
- verificare il pH della soluzione risultante ed, eventualmente, correggerlo con acido solforico diluito fino ad ottenere un valore di pH pari a $7,2 \pm 0,4$;
- aggiungere, sotto forte agitazione e molto lentamente, la quantità pesata di AI sodico e lasciare in vigorosa agitazione fino a completamento della

solubilizzazione;

- raggiungere il peso finale per aggiunta della restante quantità di acqua bidistillata;
- continuare l'agitazione per il tempo necessario ad ottenere la viscosità desiderata (compresa tra 2500 e 4500 Pa x sec⁻¹ misurata con sforzo di taglio pari a 5sec⁻¹), verificare nuovamente il pH e, se necessario, correggerlo con acido solforico o sodio idrossido diluiti;
- la risultante soluzione finale, viene ripartita in contenitori di politene del volume e della forma desiderati in una linea automatica appositamente predisposta.

Tabella 1: Soluzione monodose per applicazione topica - composizione

Ingrediente	Contenuto (%)	Funzione tecnologica
Sodio ialuronato ⁽¹⁾⁽²⁾	1,000	Ingrediente funzionale
Condramina ⁽³⁾	1,321	Ingrediente funzionale
Me-paraben-Na	0,150	Conservante
Pr-paraben-Na	0,035	Conservante
2-fenossietanolo	0,300	Conservante
EDTA sodico	0,100	Coadiuvante dei conservanti
Acido solforico diluito	q.b.a pH 7,2	Correttore di pH
Acqua bidistillata	q.b.a 100	Solvente/veicolante

(1): Peso molecolare compreso tra 0,5 e 3x10⁶ Dalton

(2): La quantità pesata di sodio ialuronato può es-

sere aggiustata a scopo riporto a titolo

(3): Composta da NAG 75,7% e sodio solfato anidro 24,3% e cioè secondo il rapporto ponderale corrispondente ai rispettivi pesi equivalenti.

Esempio 2: Lipogel idratante per applicazione topica

La formulazione, riportata in Tabella 2, concerne principi attivi ed eccipienti (con descrizione della corrispondente funzione tecnologica) che possono essere impiegati nella preparazione di un lipogel idratante per applicazione topica, da ripartire, per esempio, in contenitori multidose. Il materiale del contenitore, per esempio politene, deve essere compatibile con i componenti la formulazione e con le norme vigenti per i materiali da impiegare in dermocosmesi o per un dispositivo medico.

Un esempio di preparazione della formulazione in oggetto da ripartire, appunto, in contenitori multidose viene qui di seguito esemplificato:

- pesare separatamente i componenti la formulazione secondo quanto indicato nelle istruzioni di produzione;
- fase 1 (preparazione della soluzione di CA): in un opportuno turbo-emulsore introdurre le quantità

fissate di acqua depurata e CA; agitare con le sole pale per 30 minuti fino a completa dissoluzione;

- fase 2 (fase acquosa): introdurre nel turbo-emulsore, contenente la soluzione di CA, la glicerina, il polietilene dimeticonolo polimero, il 2-fenossietanolo e l'EDTA sodico; agitare con le sole pale per 30 minuti fino a completa omogeneizzazione dei componenti;

- fase 3 (fase oleosa): in un fusore, munito di opportuno sistema di agitazione e collegato con sistema di trasferimento sotto vuoto al turbo-emulsore contenente la fase acquosa, introdurre il PEG-6 caprilico/capricogliceridi, il Me-paraben, il Pr-paraben ed agitare per 20 minuti; aggiungere successivamente il carbonato di caprile ed agitare per altri 10 minuti;

- fase 4 (formazione dell'emulsione): attivare il sistema di collegamento sotto vuoto fusore-turbo emulsore, trasferire la fase 3 nella fase 2 ed utilizzare il turbo emulsore fino ad ottenimento di un'emulsione omogenea;

- fase 5 (aggiunta addensante): stabilizzare la risultante emulsione per aggiunta di poliacrilamide C13-14 isoparaffina/lauriletere-7 ed agitare per 20 minuti;

- fase 6 (fase siliconica): aggiungere alla risultante fase 5 e nell'ordine dimeticone/dimeticone crospolimero ed acido ialuronico/etil-esil-palmitato, mantenere in agitazione per 20 minuti e cioè fino a completa omogeneizzazione del gel finale; prima del confezionamento primario controllare il pH che deve essere compreso tra 5,0 e 6,0 e la viscosità fra 22000 e 32000 cPs;
- fase 7 (confezionamento primario): il gel risultante dalla fase 6, può essere trasferito e ripartito automaticamente su una linea per il riempimento automatico in tubi multiuso, preferibilmente provvisti di applicatore di precisione; come già evidenziato precedentemente, il materiale prescelto per i tubi, per esempio polietilene, dovrà essere compatibile con i componenti la formulazione e con le norme vigenti per i materiali da impiegare in dermocosmesi o per un dispositivo medico.

Tabella 2: Lipo-gel idratante per applicazione topica - composizione

Ingrediente	Contenuto(%)	Funzione tecnologica
Condramina ⁽¹⁾	0,66	Ingrediente funzionale
AI/etil-esil-palmitato ^{(2) (3)}	1,00	Ingrediente funzionale
Glicerina	4,00	Umettante/solvente
2-fenossietanolo	0,30	Conservante
EDTA disodico	0,10	Chelante/additivo reologico

Dimeticone/dimeticone Crospolimero	20,00	Additivo reologico
Poliacrilamide/C13-14 Isoparaffina/lauriletere-7	5,00	Additivo reologico
PEG-6 caprilico/caprico Gliceridi	2,00	Emolliente
Carbonato di caprilile	5,00	Emolliente
Me-paraben	0,15	Conservante
Pr-paraben	0,10	Conservante
Polietilene dimeticonolo Copolimero ⁽⁴⁾	3,00	Soft-focus-filler
Acqua demineralizzata	q.b.a 100	Solvente/veicolante

(1): Composta da NAG 75,7% e sodio solfato anidro 24,3% e cioè secondo il rapporto ponderale corrispondente ai rispettivi pesi equivalenti

(2): Particolare composizione di AI in biosfere (vedi Tabella 3) che, in seguito ad applicazione sulla superficie della pelle del viso, penetrano nelle rughe sottili, ne catturano l'acqua di evaporazione gonfiandosi con conseguente riattivazione naturale della superficie cutanea. La risultante - attività levigante è dovuta altresì al riempimento esterno delle rughe stesse da parte delle biosfere rimaste in superficie

(3): L'impiego delle biosfere è un plus migliorativo del tutto facoltativo. In alternativa esse possono essere sostituite da quantità di AI, tali

da ottenere gli stessi risultati estetici. L'AI/etil-esil-palmitato è normalmente reperibile sul mercato

(4): Componente costituito da particolari elastomeri siliconici, sotto forma di piccole particelle sferiche, in grado di riflettere uniformemente la luce incidente. Le particelle si fissano all'interno del solco delle rughe con conseguente effetto levigante superficiale di evidente impatto estetico.

Tabella 3: Composizione dell'AI/etil-esil-palmitato

Ingrediente	Contenuto (%)	Funzione tecnologica
Sodio ialuronato B.P.M. (*)	0,145	Ingrediente funzionale
Sodio ialuronato A.P.M. (**)	0,055	Ingrediente funzionale
Etil-esil-palmitato	95,300	Condizionante cutaneo/filmogeno
Silica dimetil silicato	2,500	Addensante
Butilene glicole	1,000	Conservante
Caprilil glicole	1,000	Conservante

(*): Basso peso molecolare

(**): Alto peso molecolare

B. Soluzioni visco-elastiche contenenti CA e AI non reticolato, da utilizzare come rivitalizzante della pelle

Il complesso delle operazioni, descritto nell'esempio 3, deve essere considerato unicamente come uno degli esempi esplicativi della presente in-

venzione e poiché, le procedure illustrate non rivestono alcuna originalità inventiva e non rappresentano alcuna novità tecnologica per operatori esperti del settore, non devono essere ritenute in alcun modo limitative dell'invenzione stessa.

Per quanto concerne concentrazioni e caratteristiche chimico-fisiche dei due principi attivi, rimane confermato quanto già specificato per gli Esempi 1 e 2.

Esempio 3: Soluzioni viscoelastiche da usare come rivitalizzanti per uso intradermico

La formulazione, riportata in tabella 4, concerne principi attivi ed eccipienti (con descrizione della corrispondente funzione tecnologica) che possono essere impiegati nella preparazione di soluzioni visco-elastiche, da utilizzare come dispositivo medico per uso intradermico in dermocosmesi e medicina estetica.

Analogamente i materiali di confezionamento, utilizzati, devono essere compatibili con i componenti la formulazione e con le norme vigenti che ne regolano l'impiego nella produzione di un dispositivo medico.

Un esempio di preparazione della classe di formulazioni in oggetto, da ripartire in siringhe mo-

nodose del volume voluto, viene qui di seguito riportato:

- pesare separatamente i componenti la formulazione secondo quanto indicato nelle istruzioni di produzione

- Fase 1 (soluzione salina isotonica): in un dissolutore munito di opportuno sistema di agitazione, preparare la soluzione salina isotonica, tamponata a pH 7,2, introducendo i componenti, sotto elencati, nelle percentuali descritte in Tabella 4 ed agitare fino ad ottenimento di una soluzione limpida:

- o Sodio cloruro (NaCl)

- o Sodio diidrogenofosfato biidrato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

- o Di-sodio monoidrogenofosfato decaidrato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)

- o Acqua per preparazioni iniettabili.

Controllare ed eventualmente correggere il pH a 7,2 con HCl 1N o NaOH 1N;

- Fase 2 (idratazione): in un apposito dissolutore, munito di sistema di agitazione, camicia riscaldante e di apparato per l'applicazione/controllo del vuoto, introdurre la quantità fissata di soluzione salina isotonica (fase 1) e la CA in quan-

tità tale da ottenere la concentrazione prestabilita. Mantenere in agitazione per 10 minuti, aggiungere alla soluzione risultante la quantità stabilita di AI e lasciare la miscela a riposo per un giorno, a temperatura compresa tra 2°C e 6°C, e cioè fino a completa idratazione dell'AI;

- fase 3 (omogeneizzazione): completato il processo di idratazione, applicare al dissolutore un vuoto di 0,2 bar per evitare l'incorporazione di bolle d'aria e lasciare la massa, ottenuta come descritto al paragrafo precedente, in lenta agitazione fino a completa omogeneizzazione;

- prima della ripartizione, controllare il valore di osmolarità della risultante massa omogenea che deve essere compreso tra 260 e 360 mOsm/l;

- la soluzione visco-elastica finale, da somministrare con aghi di piccole dimensioni (27 e 30 G), può essere ripartita in siringhe monouso, del volume voluto, sotto flusso laminare ed in un ambiente a contaminazione debitamente controllata;

- la confezione finale viene successivamente sottoposta ad un processo di sterilizzazione, compatibile con la formulazione ed i materiali da cui è composta.

Tabella 4: Soluzione visco-elastica contenente CA e

AI non croslinkato - composizione

Ingrediente	Contenuto (%)	Funzione tecnologica
Acido ialuronico ⁽¹⁾⁽²⁾	1,40	Ingrediente funzionale
Condramina ⁽³⁾	0,25	Ingrediente funzionale
Sodio cloruro	0,70	Agente isotonizzante
Sodio di idrogeno fosfato • 2H ₂ O	0,0056	Agente tamponante
Di-sodio idrogeno fosfato • 10 H ₂ O	0,07	Agente tamponante
Acqua per iniettabili	q.b.a 100	Solvente/veicolante

(1): Peso molecolare compreso tra 0,5 e 3 x 10⁶

Dalton

(2): La quantità pesata di sodio ialuronato può essere aggiustata a scopo riporto a titolo

(3): Composta da NAG 75,7% e sodio solfato anidro 24,3% e cioè secondo il rapporto ponderale corrispondente ai rispettivi pesi equivalenti.

C. Idrogeli contenenti CA e AI reticolato da utilizzare come filler a livello intradermico

Negli Esempi 4 e 5 vengono descritte due procedure nelle quali CA e AI reticolato vengono incorporati in un'unica formulazione, dando luogo a idrogeli da impiegare per somministrazione intradermica.

In entrambi i casi esiste una fase preliminare e cioè la reticolazione dell'AI che non fa parte delle rivendicazioni, contenute nella presente invenzione, ma che va ugualmente descritta, almeno

sinteticamente, per rendere comprensibili ed omogenee le procedure riportate negli esempi in oggetto.

Il processo di reticolazione descritto non riveste alcuna novità per tecnologi del settore e quindi va messo in evidenza che ad esso non è attribuibile alcuna originalità inventiva rivendicabile, al contrario, per gli idrogeli finali, contenenti contemporaneamente AI reticolato e CA, mai precedentemente descritti e rivendicati in funzione dell'assoluta novità rappresentata dalle formulazioni che li includono.

Il processo di reticolazione, sopra citato, consiste essenzialmente nella formazione di ponti molecolari che collegano tra di loro le singole unità di AI attraverso la formazione di legami covalenti con le molecole bifunzionali dell'agente reticolante. Si formano, in questo modo, strutture tridimensionali, di consistenza variabile, che in acqua o in liquidi fisiologici hanno la capacità di rigonfiarsi fino ad uno stato di equilibrio che è in diretta relazione con il loro grado di reticolazione.

Sull'AI sono presenti due centri di reazione, adatti alla formazione di ponti tramite interazione con gli agenti bifunzionali, e cioè:

- il gruppo carbossilico dell'acido glucuronico con formazione di ponti esterei;
- il gruppo ossidrilico nella posizione 6 della molecola di N-Acetilglucosamina, con formazione di ponti eterei.

Esiste un grandissimo numero di agenti reticolanti ben noti, ampiamente utilizzati e facilmente reperibili sul mercato e fra questi possiamo citare esemplificativamente:

1,4-butandiol-digliciletere (BDDE), polietilenglicol-di-glicidil-etere, di-vinilsolfone (DVS), epichloridrina, 1,2,3,4 di-epossibutano, 1,2,7,8 di-e-possibutano ed altri.

Fra gli agenti reticolanti sopra citati, il BDDE risulta essere quello preferibile per la sua bassissima tossicità e, per questa ragione, viene utilizzato nelle formulazioni descritte e rivendicate nella presente domanda di brevetto e di conseguenza nel dettaglio degli esempi 4, 5.

Per ogni agente reticolante esistono precise modalità di utilizzo pratico e, nel caso del BDDE, il processo si realizza tramite la formazione di legami eterei con i gruppi ossidrilici della NAG nelle condizioni di impiego qui di seguito specificate:

- o Rapporto BDDE/AI (w/w) : 1/1-1/50
- o Concentrazione BDDE nella miscela di reazione:
0,5-20% (w/v)
- o Concentrazione di AI nella miscela di reazione:
10-20%
- o Peso molecolare dell'AI: $0,5-3 \times 10^6$ Dalton
- o Temperatura di reazione: 30-60°C
- o pH dell'ambiente di reazione: >11
- o tempo di reazione: 2-4 ore

Per quanto riguarda il dosaggio dei principi attivi, negli esempi descritti si riportano quantità puramente indicative e la cui eventuale variazione non apporta alcuna modifica ai metodi di preparazione illustrati. Tali quantità, inoltre, rispettano le condizioni richieste dall'impiego del BDDE come agente reticolante e rientrano negli intervalli già specificati negli esempi 1, 2 e 3. Per maggiore chiarezza la formulazione relativa agli esempi 4 e 5 viene riassunta quantitativamente nella tabella 5.

Esempio 4: Idrogel di AI al 2% contenente CA allo 0,1% (incorporazione della CA mediante reidratazione dell'AI reticolato)

Il processo viene dettagliato mediante i passaggi e le fasi qui di seguito descritti:

a. Preparazione dell'idrogel al 2% di AI reticolato

- fase 1 (dissoluzione dell'AI): in un apposito reattore, munito di agitatore, camicia riscaldante ed apparato di controllo del vuoto, introdurre quantità di NaOH 0,25 N e AI (come sale sodico) ottenuto da biofermentazione (peso molecolare compreso tra 0,5 e 3×10^6 Dalton), in quantità tali da ottenere una concentrazione finale di AI pari al 12% (w/v); lasciar idratare l'AI per un'ora a 2-6°C, applicare un vuoto di 0,2 bar, per evitare l'inglobamento di bolle d'aria nella massa, ed innestare un'agitazione moderata fino ad ottenimento di una completa omogeneizzazione;

- fase 2 (reazione di reticolazione): nel reattore, contenente la fase 1, ripristinare la pressione ambiente, aggiungere una quantità di BDDE tale da ottenere un rapporto 1:16 (w/w) rispetto al contenuto di AI e mantenere in agitazione per altri dieci minuti in modo da disperdere uniformemente il BDDE nella massa di reazione; interrompere a questo punto l'agitazione e lasciare in reazione per 2-4 ore a 50°C fino a completamento del processo di reticolazione; frantumare il gel risultante, in un apposito apparato, fino ad ottenimento di particelle di dimensioni pari a circa 1 cm³;

- fase 3 (purificazione/Idratazione): trasferire il prodotto, derivante dalla fase 2 in un contenitore munito di agitatore, preparare a parte una soluzione salina isotonica, tamponata a pH 7,2 secondo la composizione riportata in tabella 6, ed aggiungerne all'AI reticolato una quantità tale da raggiungere un rapporto 5:1 (w/w) rispetto al gel proveniente dalla fase 2; innestare una lenta agitazione, portare a pH 7 con HCl 1M e lasciare in agitazione per 24 ore. Ripetere l'operazione per almeno tre volte e cioè fino a raggiungere l'equilibrio di rigonfiamento con ottenimento dell'idrogel di AI avente la concentrazione desiderata.

Nel corso delle operazioni sopradescritte, controllare ripetutamente il pH della soluzione isotonica esterna e l'osmolarità dell'idrogel finale che deve corrispondere a quella relativa alla concentrazione prestabilita di AI (osmolarità compresa tra 260 e 360 mOsm/l e pH compreso tra 6,8 e 7,6)

b. Preparazione della soluzione isotonica, tamponata a pH 7,2, contenente la concentrazione prefissata di CA (0,1%)

- in un apposito recipiente, munito di agitatore, caricare la quantità prestabilita di soluzione salina tamponata a pH 7,2, ottenuta secondo quanto

descritto alla fase 3 del passaggio a., controllare il pH ed eventualmente correggerlo con HCl 1N o NaOH 1N.

- Aggiungere la quantità prefissata di CA e lasciare in agitazione fino a completa solubilizzazione. Trasferire e conservare la soluzione così ottenuta in contenitore chiuso e lontano da sorgenti di calore.

c. Preparazione dell'idrogel al 2% di AI reticolato e CA (0,1%)

- fase 1 (precipitazione ed essiccamento dell'AI reticolato): in un apposito apparato per dialisi, equipaggiato con una membrana adatta allo scopo (ad es. tipo spectra 4 MWCO:12-14000), introdurre la quantità fissata di idrogel di AI reticolato, ottenuto secondo quanto descritto nella fase 3 del passaggio a., trasferire il dializzatore in un contenitore di opportuno volume ed introdurre una quantità di acqua tale da consentire una dialisi esaustiva con completa eliminazione del sale (se necessario sostituire il medium di dialisi); trasferire il gel, risultante, in un adatto contenitore munito di agitazione, aggiungere un forte eccesso di etanolo ed innescare una vigorosa agitazione fino a completa precipitazione dell'AI reticolato;

separare il solido per filtrazione ed essiccarlo, sotto vuoto, ad una temperatura non superiore a 40°C; dopo essiccamento e per utilità d'uso, ridurre il risultante AI reticolato in particelle di dimensioni comprese tra 20 e 50 µm in un opportuno sistema di macinazione/micronizzazione;

- fase 2 (incorporazione della CA mediante reidratazione): in un apposito recipiente, munito di agitatore, trasferire la quantità richiesta di AI reticolato, ottenuto secondo quanto descritto nella fase 1, aggiungere una quantità di soluzione isotonica di CA tamponata a pH 7,2 (vedi passaggio b.), tale da ottenere le concentrazioni prestabilite dei principi attivi e condurre la reidratazione, sotto lentissima agitazione, fino a formazione dell'idrogel desiderato;

- fase 3 (ripartizione in siringhe): il risultante idrogel finale si presta ad una ripartizione in siringhe monodose che può venir condotta con un'apposita macchina riempitrice, in un ambiente dedicato e sotto flusso laminare; la confezione finale viene successivamente sottoposta ad un processo di sterilizzazione compatibile con la formulazione ed i materiali di cui è composta.

Esempio 5: Idrogel al 2% di AI contenente CA allo

0,1% (incorporazione della CA mediante diffusione nell'idrogel di AI)

Il processo viene dettagliato mediante i passaggi e le fasi qui di seguito descritti:

- fase 1 (preparazione dell'idrogel di AI reticolato): preparato secondo le modalità operative descritte nell'esempio 4 - passaggio a.- fase 2;
- fase 2 (preparazione della soluzione isotonica tamponata a pH 7,2 contenente la concentrazione prefissata di CA (0,1%)): preparata secondo quanto descritto nell'esempio 4 - passaggio b.
- fase 3 (preparazione dell'idrogel al 2% di AI reticolato e CA (0,1%)): in un apposito contenitore, munito di opportuno sistema di agitazione, introdurre la quantità prestabilita di idrogel di AI, ottenuto secondo la modalità operativa della fase 1, avviare il processo di diffusione per aggiunta della quantità calcolata della soluzione isotonica di CA (vedi fase 2) e lasciare sotto lenta agitazione per 24 ore; scartare la soluzione isotonica residua, controllare che i parametri dell'idrogel risultante corrispondano a quelli stabiliti e cioè:
 - o il valore di osmolarità deve essere compreso tra 260 e 360 mOsm/ml

o il valore del pH deve essere compreso tra 6,8 e 7,6;

ripetere l'operazione per il numero di volte necessario e sufficiente ad ottenere la formulazione finale contenente l'AI reticolato e la CA alle concentrazioni stabilite;

- fase 4 (ripartizione in siringhe): il prodotto risultante dalla fase 3, viene omogeneizzato e ridotto in particelle di dimensioni comprese fra 100 e 300 μm tali cioè da poter essere ripartite in siringhe monodose, con un'apposita macchina riempitrice in un ambiente dedicato e provvisto di flusso laminare.

La confezione finale viene successivamente sottoposta ad un processo di sterilizzazione compatibile con la formulazione ed i materiali di cui è composta.

Tabella 5: Formulazione relativa agli Esempi 4 e 5

Ingrediente	Contenuto (%)	Funzione tecnologica
Acido ialuronico reticolato ⁽¹⁾⁽²⁾	2,0	Ingrediente funzionale
Condramina ⁽³⁾	0,1	Ingrediente funzionale
Sodio cloruro	0,7	Agente isotonzante
Sodio diidrogenofosfato • 2H ₂ O	0,0056	Agente tamponante
Di-sodio idrogenofosfato • 10 H ₂ O	0,07	Agente tamponante
Acqua per iniettabili	q.b.a 100	Solvente/veicolante

(1): sotto forma di sale sodico. Peso molecolare compreso tra 0,5 e 3×10^6 Dalton

(2): la quantità pesata di sodio ialuronato può essere aggiustata a scopo riporto a titolo

(3): composta da NAG 75,7% e sodio solfato anidro 24,3% e cioè secondo il rapporto ponderale corrispondente ai rispettivi pesi equivalenti.

Tabella 6: Soluzione tampone isotonica a pH 7,2 -
Composizione

Ingrediente	Contenuto (%)	Funzione tecnologica
Sodio cloruro	0,7	Agente isotonizzante
Sodio diidrogenofosfato • 2H ₂ O	0,0056	Agente tamponante
Di-sodio idrogenofosfato • 10 H ₂ O	0,07	Agente tamponante
Acido cloridrico 1N ^(*)	q.b.	Correttore di pH
Sodio idrossido 1N ^(*)	q.b.	Correttore di pH
Acqua per iniettabili	q.b.a 100	Solvente/veicolante

(*) : Da impiegare solo se necessario

C. Forme orali

Le formulazioni qui di seguito riportate illustrano possibili applicazioni pratiche della presente invenzione e come tali non devono essere ritenute, in alcun modo, limitative dell'invenzione stessa.

Si fa particolare riferimento agli eccipienti delle varie forme considerate, che possono essere utilizzati in alternativa a quelli esplicitamente

menzionati negli esempi qui di seguito illustrati, dipendentemente dalle esigenze formulativi-tecnologiche e che, comunque, possono essere scelti fra una larghissima serie di prodotti presenti sul mercato e ben noti agli esperti di tecnica farmaceutica e pertanto di nessuna originalità inventiva.

Anche nel caso delle forme orali il dosaggio della CA, esplicitato negli esempi, è puramente indicativo e comunque all'interno del range di dosaggi rivendicato nella presente descrizione inventiva e cioè variabile fra 100-1000 e preferibilmente 250-750 mg giornalieri, espressi in termini di glucosamina base.

Lo stesso discorso vale, in termini di rapporto fra NAG e SSA, all'interno della CA, che può liberamente variare, come precedentemente specificato, in termini di peso equivalente, fra 1:0,5 e 1:3 e che, negli esempi descritti, è stato mantenuto costante e pari a 1:1 perché il più vantaggioso secondo quanto evidenziato nella parte sperimentale.

Va inoltre precisato che, eventuali variazioni di dosaggio della CA e dei suoi contenuti relativi di NAG e SSA non apportano alcuna modifica sostanziale ai metodi di preparazione illustrati.

Esempio 6: Compresse per uso orale

La formulazione riportata in tabella 7, oltre al principio attivo, comprende eccipienti (con descrizione della corrispondente funzione tecnologica), che possono essere impiegati nella preparazione di compresse da utilizzarsi per la somministrazione orale dell'oggetto della presente invenzione da solo o associato ad altri principi attivi. La tecnica di veicolazione della dose prescelta di CA, da sola o associata ad altri principi attivi, in una compressa, richiede solo operazioni che sono tecnologicamente ben note e del tutto normali, per un qualsiasi tecnico del settore e cioè:

- pesata dei singoli componenti la formulazione
- granulazione a umido, mediante soluzione acquosa di polivinilpirrolidone K-25, di NAG e cellulosa microcristallina (granulato A) in un opportuno granulatore
- essiccamento del granulato A in stufa a circolazione d'aria a temperatura non superiore a 50°C e fino a peso costante (è utilizzabile qualsiasi altro tipo di essiccamento purché previamente validato)
- setacciatura del granulato A con gli altri componenti la formulazione;
- preparazione della miscela di compressione per

omogeneizzazione del granulato A con gli altri componenti la formulazione in un opportuno miscelatore;

- compressione della risultante miscela in un'opportuna comprimitrice automatica con ottenimento finale di compresse aventi forma e dimensioni opportune.

Tabella 7: Esempio di formulazione in compresse

Ingredienti	mg/compressa	Funzione tecnologica
Principio att.		
Condramina ⁽¹⁾⁽²⁾	815,6	Ingrediente funzionale
(corrisp. a glucosamina)	(500)	
Eccipienti		
Cellulosa microcrist. ⁽²⁾	61,2	Diluente/disintegrante
Polivinilpirrolidone K-25 ⁽²⁾	10,6	Legante
Carbossimetil cellulosa sodica cross-linkata ⁽³⁾	q.b.	Disaggregante
Talco ⁽³⁾	q.b.	Lubrif./antiaderente
Mg stearato ⁽³⁾	q.b.	Lubrif./antiaderente
Acqua ⁽⁴⁾	q.b.	Supporto formulativi

(1): la quantità di CA è formulata e calcolata in modo che il rapporto fra NAG e SSA, in termini di peso equivalente sia 1:1 (ponderalmente 75,7% di NAG e 24,3% di SSA) e tale da corrispondere ad un contenuto, espresso in glucosamina base, pari a 500 mg (PM di NAG = 221,2; PM di glucosamina base = 179,2: in termini ponderali 221,2 mg di NAG corri-

spondono pertanto a 179,17 mg di glucosamina base)

(2): utilizzati nella preparazione del granulato di CA

(3): le quantità assolute e relative di questi eccipienti dipendono dalle dimensioni e forma del punzone di compressione, dal tipo di comprimitrice e dal sistema di caricamento delle polveri nella camera di compressione in essa installato

(4): l'acqua viene impiegata nella preparazione del granulato A e la sua quantità relativa ai componenti del granulato stesso dipende dal tipo e dalle dimensioni del granulatore impiegato. Essa viene completamente eliminata in fase di essiccamento

Esempio 7: Capsule per uso orale

La formulazione riportata in tabella 8, oltre al principio attivo, comprende eccipienti (con descrizione della corrispondente funzione tecnologica), che possono essere impiegati nella preparazione di capsule di gelatina dura da utilizzarsi per la somministrazione orale dell'oggetto della presente invenzione da solo o eventualmente associato ad altri principi attivi.

La tecnica di veicolazione della dose prescelta di CA, da sola o associata ad altri principi attivi, in una capsula di gelatina dura, richiede solo

operazioni che sono tecnologicamente ben note e del tutto normali, per un qualsiasi tecnico del settore e cioè:

- pesata dei singoli componenti la formulazione
- preparazione della miscela da incapsulare per omogeneizzazione a secco in un opportuno miscelatore
- ripartizione finale in un'opercolatrice automatica in capsule di gelatina dura di dimensione opportuna e del colore desiderato

Tabella 8: Esempio di formulazione in capsule

Ingredienti	mg/capsula	Funzione tecnologica
Principio att.		
Condramina ⁽¹⁾	407,8	Ingrediente funzionale
(corrisp. a glucosamina)	(250)	
Eccipienti		
Cellulosa microcristallina ⁽²⁾	q.b.	Diluente/disintegrante
Talco ⁽²⁾	q.b.	Lubrificante/antiaderente
Mg stearato ⁽²⁾	q.b.	Lubrificante/antiaderente

(1): vedi quanto già specificato nella nota (1) della tabella 7 per il calcolo del dosaggio di CA e dei rapporti ponderali fra NAG e SSA.

(2): le quantità assolute e relative degli eccipienti dipendono dalla dimensione delle capsule utilizzate come veicolo di somministrazione e dal tipo/sistema di dosaggio installato sull'opercola-

trice impiegata nella ripartizione della formulazione in capsule di gelatina dura.

Esempio 8: Bustine termosaldate contenenti polvere per la preparazione estemporanea di soluzioni/sospensioni bevibili

La formulazione, riportata in tabella 9, oltre al principio attivo, comprende eccipienti (con descrizione della corrispondente funzione tecnologica), che possono essere impiegati nell'utilizzo dell'oggetto della presente invenzione, da solo o eventualmente associato ad altri principi attivi, nella formulazione di una polvere per la preparazione di soluzioni/sospensioni estemporanee da assumere per via orale.

A questo scopo la formulazione in oggetto può essere opportunamente veicolata in una bustina termosaldata e costituita da uno strato esterno di carta, un'interfaccia di alluminio ed uno strato interno di polietilene, utilizzando operazioni di preparazione ben note ed utilizzabili da qualsiasi staff tecnico del settore e cioè:

- pesata e setacciatura dei singoli componenti la formulazione;
- preparazione della miscela dei componenti per omogeneizzazione a secco in un opportuno miscela-

tore;

- termoformatura delle bustine in un'opportuna linea automatica
- riempimento e sigillatura, sulla stessa linea automatica, di bustine, aventi la forma e le dimensioni desiderate e contenenti la polvere da utilizzare per la preparazione di soluzioni/sospensioni da assumere estemporaneamente per via orale.

Tabella 9: Esempio di formulazione in polvere per la preparazione di soluzioni/sospensioni da assumere estemporaneamente per via orale

Ingredienti	mg/bustina	Funzione tecnologica
Principio att.		
Condramina ⁽¹⁾	815.6	Ingrediente funzionale
(corrisp. a glucosamina)	(500)	
Eccipienti		
Sorbitolo ⁽²⁾	q.b.	Diluente/dolcificante
Acido citrico ⁽²⁾	q.b.	Esaltazione sapore
Polietilenglicole 4000 ⁽²⁾	q.b.	Lubrificante/plastificante
Altri ⁽³⁾	q.b.	Dolcificanti/aromatizzanti

(1): vedi quanto già specificato nella nota (1) della tabella 7 per il calcolo del dosaggio di CA e dei rapporti ponderali fra NAG e SSA.

(2): le quantità assolute e relative di questi eccipienti dipendono dal tipo di imbustinatrice impiegata e dalle dimensioni delle bustine.

(3): agenti aromatizzanti e dolcificanti possono essere aggiunti liberamente, dipendentemente dalle preferenze organolettiche.

RIVENDICAZIONI

1. Composizione utile per il trattamento cosmetico ed estetico della cute, contenente N-acetilglucosamina e solfato di metallo alcalino in rapporto di pesi equivalenti da 1:0,5 a 1:3.
2. Composizione secondo la rivendicazione 1, in cui la N-acetilglucosamina ed il solfato di metallo alcalino sono in rapporto di equivalenti 1:1.
3. Composizione secondo le rivendicazioni 1 o 2, ove detto solfato di metallo alcalino è solfato di sodio anidro.
4. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 3, comprendente inoltre acido ialuronico o un suo sale.
5. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 4, comprendente inoltre acido ialuronico o un suo sale in concentrazione fino a 4% in peso, riferito al peso totale della composizione.
6. Composizione secondo la rivendicazione 5, comprendente acido ialuronico o un suo sale in concentrazione da 1% a 3% in peso.
7. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 6, in forma idonea per uso topico o intradermico, comprendente N-acetilglucosamina e solfato di sodio anidro in quantità totale compresa

tra 0,05% e 2,5% in peso riferita al peso totale della composizione.

8. Composizione secondo la rivendicazione 7, comprendente N-acetilglucosamina e sodio solfato anidro in quantità totale da 0,1% a 0,5% in peso.

9. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, comprendente veicoli, eccipienti e/o conservanti per uso cosmetico.

10. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in forma di soluzione, lipogelo o idrogelo per applicazione topica sulla cute.

11. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 6, in forma di unità di dosaggio per somministrazione orale.

12. Composizione secondo la rivendicazione 11, comprendente N-acetilglucosamina e solfato di sodio anidro in rapporto di pesi equivalenti di 1:1 e contenente una quantità di N-acetilglucosamina compresa tra 100 e 1000 mg espresso in termini di glucosamina base.

13. Impiego di una composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 12 per il trattamento cosmetico della cute.

14. Impiego di una composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 10 per la prepara-

zione di un prodotto cosmetico per uso topico e/o intradermico.

15. Impiego di una composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 10 per la preparazione di un filler intradermico utile per ridonare tono e vigore alla pelle.

16. Impiego di una composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 6 per la preparazione di un integratore alimentare per il trofismo cutaneo.