



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

UIBM

DOMANDA NUMERO	101996900546479
Data Deposito	03/10/1996
Data Pubblicazione	03/04/1998

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		
Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	08	B		

Titolo

COMPOSIZIONI FARMACEUTICHE PER USO VAGINALE E RETTALE COMPRENDENTI ACIDO IALURONICO O SUOI DERIVATI DA SOLI O IN ASSOCIAZIONE CON AGENTI SPERMICIDI COME IL NONOXINOLO-9

Descrizione di una domanda di brevetto per invenzione industriale dal titolo "Composizioni farmaceutiche per uso vaginale e rettale comprendenti acido ialuronico o suoi derivati da soli o in associazione con agenti spermicidi come il nonoxinolo-9", della Fidia Advanced Biopolymers S.r.l. con sede in Via De' Carpenteri 3, 72100 - Brindisi, Italia, nella persona del suo Presidente e Legale Rappresentante, Dr. Lanfranco Callegaro.

Inventori: Lanfranco CALLEGARO

PD 96A0 00238

Depositata il con N.

**** *

OGGETTO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione descrive la preparazione di formulazioni farmaceutiche ad uso vaginale e rettale comprendenti acido ialuronico o un suo derivato, da solo e in associazione con agenti spermicidi come il nonoxinolo-9, nella prevenzione dell'HIV e per il trattamento e la cura di malattie trasmesse per via sessuale (Sexual Transmitted Disease), in cui l'acido ialuronico o il suo derivato, aventi proprietà mucoadesive, hanno un effetto riepitelizzante e umidificante sull'epitelio vaginale.



CAMPO DELL'INVENZIONE

Fra i polimeri naturali maggiormente impiegati per la preparazione di formulazioni farmaceutiche, i polisaccaridi acidi rappresentano una categoria di grande interesse: fra questi, l'acido ialuronico, un

polisaccaride che si trova ampiamente distribuito all'interno degli organismi animali, è costituito da unità di acido D-glucuronico e da N-acetil-D-glucosamina che si susseguono alternativamente. E' un polimero lineare con un ampio intervallo di peso molecolare che è funzione della fonte da cui viene estratto e del metodo di purificazione seguito. In natura è presente, fra l'altro, nei gel pericellulari, nella sostanza fondamentale dei tessuti connettivi degli organismi dei vertebrati, di cui è uno dei principali componenti, nel liquido sinoviale articolare, nell'umor vitreo, nel tessuto del cordone ombelicale umano e nelle creste di gallo.

Sono note frazioni specifiche di acido ialuronico che possono avere diversi campi di applicazione, in relazione al rispettivo peso molecolare, come viene descritto nei brevetti EP 0138572 e EP 0535200 della Fidia S.p.A. In particolare, la frazione denominata Hyalectin, avente un peso molecolare compreso tra 500.000 e 730.000, non presenta attività infiammatoria e quindi è utilizzabile per sostituire liquidi endobulbari e per la terapia di patologie articolari mediante iniezioni intraarticolari, la frazione denominata Hyaloftil, avente un peso molecolare compreso tra 750.000 e 1.230.000, viene utilizzata nel settore oftalmico, mentre la frazione denominata Hyalastine, avente un peso molecolare compreso tra 50.000 e 100.000, è idonea nella preparazione di formulazioni farmaceutiche da impiegarsi nella stimolazione della riparazione tissutale.



during the inflammatory response and wound healing" J. Theor. Biol., 119 : 219 (1986).

Inoltre, è noto che l'acido ialuronico ha effetto nella cicatrizzazione delle ferite epiteliali, nelle quali il primo evento è la migrazione delle cellule dell'epitelio verso le aree denudate.

Studi *in vitro* hanno dimostrato che l'acido ialuronico stimola la migrazione dell'epitelio corneale (Miyauchi S. et al., Journal of Ocular Pharmacology 6 (1990) 91-99).

Studi *in vivo* hanno poi dimostrato che l'acido ialuronico può accelerare la cicatrizzazione dell'epitelio corneale dopo la rimozione chirurgica e chimica, in modelli animali (Sugiyama T. et al., Journal of Ocular Pharmacology 7 (1991) 53-64) e si è visto anche che l'elevata capacità dell'acido ialuronico di incorporare acqua lo rende adatto a idratare i tessuti. Infatti, nello ialuronato di sodio il numero medio di legami con molecole di acqua per unità disaccaridica è 9 (Davies A. et al., Int J Biol Macromol 4 (1982) 436-438); tali molecole vengono rilasciate lentamente dallo ialuronato mantenendo il tessuto idratato. Infatti lo 0,1 % (p/v) di acido ialuronico ha dimostrato di agire come agente idratante epiteliale (Wysenbeek Y.S. et al., Investigative Ophthalmology and Visual Science 29 (1988) 194-199) e cutaneo (Hoshizaki S. and Nakabata H., J Soc Cosmet Chem Jap 17 (1983) 19-26) e lo 0.1-0.2 % (p/v) di acido ialuronico è stato usato nel trattamento della secchezza degli occhi (Mengher L.S. et al., British Journal of



Sono noti anche gli esteri dell'acido ialuronico in cui i gruppi carbossilici sono esterificati tutti o in parte con alcoli della serie alifatica e/o aromatica, e il loro impiego nel settore farmaceutico, cosmetico e nel settore dei materiali plastici biodegradabili (brevetti US 4,851,521 e 4,965,353). Inoltre, nella domanda di brevetto n° EP 0341745 sono descritti gli esteri inter-e intra-molecolari dell'acido ialuronico (ACP), in cui parte o tutti i gruppi carbossilici sono esterificati con gruppi idrossilici della stessa e/o di diverse molecole del polisaccaride acido, ed è noto il loro impiego nel settore farmaceutico, cosmetico e nel settore dei materiali plastici biodegradabili.

E' altresì noto che l'acido ialuronico svolge un ruolo fondamentale nei processi di riparazione tissutale, soprattutto nelle prime fasi del processo di formazione del tessuto di granulazione, stabilizzando la matrice del coagulo e controllandone la degradazione, favorendo il richiamo di cellule infiammatorie, quali i polimorfonucleati e monociti, di cellule mesenchimali, quali i fibroblasti e le cellule endoteliali, ed orientando la successiva migrazione delle cellule epiteliali.

E' evidente, quindi, che l'apporto di soluzioni di acido ialuronico è in grado di accelerare la guarigione di pazienti con piaghe da decubito, ferite ed ustioni. Il ruolo dell'acido ialuronico nelle varie fasi che costituiscono il processo di riparazione tissutale è stato descritto, attraverso la costruzione di un modello teorico, da Weigel P.H. et al.: "A model for the role of hyaluronic acid and fibrin in the early events



Ophthalmology 70 (1986) 442-447).

L'acido ialuronico ha dimostrato, quindi, di essere un ottimo bioadesivo/mucoadesivo utilizzato come veicolo oftalmico in soluzioni, gel, matrici, (con proprietà simili, se non migliori rispetto al Carbopol, un bioadesivo disponibile in commercio) (Saettone et al., International Journal of Pharmaceutics, 51 (1989) 203-212).

Il termine bioadesione implica che il sistema che veicola il principio attivo, aderisca ad una specifica superficie biologica, ad esempio un tessuto epiteliale, o alla mucosa che riveste la superficie di un tessuto e, in quest'ultimo caso, si parla di mucoadesione.

Il nonoxinolo-9 è un agente spermicida utilizzato in numerosi prodotti contraccettivi. E' un detergente non-ionico che esprime la sua attività spermicida immobilizzando lo sperma attraverso la distruzione della membrana cellulare degli spermatozoi (North B. Journal of Reproductive Medicine. 33 (1988) 307-311). Studi in laboratorio e sull'uomo hanno dimostrato l'uso profilattico di nonoxinolo-9 contro virus, batteri, parassiti e patologie a trasmissione sessuale (Howe J.E. et al. AIDS 8 (1994) 861-871).

Di interesse particolare è il potenziale uso di nonoxinolo-9 nella prevenzione della trasmissione di HIV. L'inattivazione del virus HIV da parte di nonoxinolo-9 è stata dimostrata in vitro (Polsky B., The Lancet (1988) 1456). Nello stesso modo, in modelli animali infettati artificialmente, nonoxinolo-9 ha dimostrato la protezione dalla



trasmissione di HIV e SIV (Moench T.R. et al., AIDS, 7 (1993) 797-802; Miller C.J. et al., Fertility and Sterility, 57 (1992) 1126-1128). Tuttavia ci sono alcune pubblicazioni contraddittorie riguardo la sua efficacia nell'uomo. In un recente studio, Kreiss J. et al. (JAMA, 268 (1992) 477-482) riportano che l'uso frequente (14 volte alla settimana) ed un'alta dose (1000 mg) di nonoxinolo-9 somministrato in spugne, può aumentare il rischio della trasmissione di HIV. Contrariamente, Zekeng L. et al. (AIDS, 7 (1993) 725-731) hanno dimostrato che un uso meno frequente (3 volte alla settimana) ed una dose più bassa (100 mg) di nonoxinolo-9 in formulazioni vaginali, possono ridurre l'incidenza dell'infezione da HIV. Il risultato di Kreiss J. et al. (JAMA, 268 (1992) 477-482), riguardante il possibile aumento di rischio della trasmissione di HIV con alte dosi di nonoxinolo-9, può essere causato dal danno epiteliale indotto dal nonoxinolo-9 stesso, riscontrato come effetto avverso negli animali da esperimento (Chvapil M. et al., Fertility and Sterility, 33 (1980) 445-450) e nell'uomo (Niruthisard S. et al., Sexually Transmitted Diseases, 18 (1991) 176-179). Il danno epiteliale è stato dimostrato dallo studio di Niruthisard S. et al., (Sexually Transmitted Diseases 18 (1991) 176-179) somministrando formulazioni vaginali da 150 mg di nonoxinolo-9 per 14 giorni e in successivi studi di Roddy R.E., et al., (International Journal of STD & AIDS, 4 (1993) 165-170) in cui si è dimostrato che l'uso di una e due supposte al giorno da 150 mg di nonoxinolo-9 per 14 giorni, aumentano di 2.5 volte la comparsa di

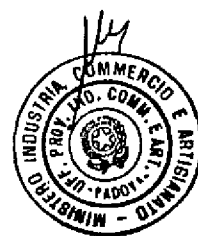


danno epiteliale rispetto al placebo e l'uso di quattro supposte al giorno porta all'aumento a 5 volte.

Inoltre, Cole et al. (US Pat. N. 5,089,606), hanno descritto la possibilità di usare tra vari polisaccaridi anche l'acido ialuronico associato a nonoxinolo-9 come composizione antimicrobica in cui l'acido ialuronico funziona come veicolo del principio attivo, non rivendicandone quindi alcuna azione farmacologica.

Ancora, Norpharmco nella sua domanda di brevetto (WO 91/04058), descrive potenziali applicazioni di formulazioni per uso topico contenenti acido ialuronico e sostanze farmacologicamente attive, tra cui il nonoxinolo-9, in cui specifici dosaggi delle formulazioni sono in grado di aumentare l'assorbimento del farmaco attraverso le membrane cellulari.

Tuttavia, nessuno ha descritto la possibilità di impiegare l'acido ialuronico o i suoi derivati, a specifici dosaggi, rivendicando un'attività protettiva dell'epitelio vaginale e contemporaneamente mantenendo il nonoxinolo-9 a concentrazioni ridotte rispetto alle formulazioni in commercio. Pertanto, dato che è noto che il nonoxinolo-9 oltre all'effetto spermicida e ad essere un potenziale inibitore della trasmissione di HIV produce un danno epiteliale dovuto alla propria azione detergente, la richiedente è in grado di dimostrare che è possibile trattare efficacemente disturbi provocati da agenti patogeni dovuti a contagio di tipo sessuale quali gonococchi, clamidie, virus



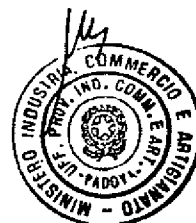
erpetici, trepomemi, tricomonas e altri microorganismi che possono causare vaginosi batteriche utilizzando formulazioni a dosaggi ridotti di principio attivo in grado di evitare tutti quegli effetti collaterali sopra richiamati.

Sono stati, infatti, eseguiti studi *in vivo* su un modello di ratto, che hanno dimostrato che l'acido ialuronico aumenta la velocità di cicatrizzazione dell'epitelio vaginale dopo trattamento con nonoxynolo-9 ed altri che hanno dimostrato che l'acido ialuronico agisce come eccellente agente idratante assicurando un'ottima condizione dell'epitelio vaginale eliminando la fragilità spesso associata alla secchezza vaginale.

Quanto sopra discusso dimostra che l'acido ialuronico ha una buona attività ai fini delle applicazioni della presente domanda di brevetto che richiedono un'azione che stimola la riparazione tissutale e inoltre, grazie alle proprietà bioadesive dell'acido ialuronico, è possibile ridurre la dose del principio attivo in associazione.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

La presente invenzione descrive, pertanto, nuove formulazioni farmaceutiche per la somministrazione vaginale di acido ialuronico o un suo derivato da solo e in associazione con agenti spermicidi, in particolare il nonoxynolo-9, in forma di gel, ovuli, creme e compresse, dove i principi attivi vengono miscelati con eccipienti opportuni e in cui l'acido ialuronico o i suoi derivati quali lo HYAFF® (brev. US



4,851,521; US 4,965,353) e l'estere intra- e inter-molecolare dell'acido ialuronico (EP 0341745), hanno la funzione di proteggere l'epitelio vaginale dal danno provocato dall'agente spermicida, quale il nonoxinolo-9. Inoltre si è notata una spiccata proprietà umidificante da parte dello HYAFF®11p50

E' possibile anche utilizzare biomateriali caricati di nonoxinolo-9, quali il tessuto non tessuto (WO 93/11803), o formulazioni farmaceutiche in forma di microsfere (EP 0517565) o schiuma secondo quanto descritto nella domanda di brevetto N. WO 95/03786.

ESEMPIO 1:

Effetti riepitelizzanti del gel di acido ialuronico in seguito al danno provocato dal nonoxinolo-9 sull'epitelio vaginale .

Scopo dello studio era di determinare se la somministrazione del gel di acido ialuronico allo 0,2 % (p/v) aumentava la velocità di riepitelizzazione vaginale dopo il danno provocato dal nonoxinolo-9.

E' stata instillata una soluzione di nonoxinolo-9 allo 2,5% (p/v) nella vagina dei ratti e dopo un'ora e mezza di incubazione è stata rimossa. I vari gruppi di animali sono stati sottoposti a diversi trattamenti: somministrazione giornaliera di gel di acido ialuronico allo 0,2 % (p/v), di una base gel o a nessun trattamento. Gli animali sono stati sacrificati 48 e 72 ore dopo la provocazione del danno ed è stato valutato istologicamente il grado di danneggiamento dell'epitelio. Gli animali che sono stati sacrificati dopo 72 ore e che non avevano



ricevuto alcun trattamento mostravano un epitelio danneggiato in modo significativo. Tra gli animali trattati con base gel quelli sacrificati dopo 48 ore presentavano condizioni simili a quelle del gruppo precedente, mentre quelli sacrificati dopo 72 ore mostravano leggeri segni di danneggiamento epiteliale.

Negli animali trattati con gel di acido ialuronico il danno epiteliale era molto leggero dopo solo 48 ore.

Preparazione degli animali

Ovariectomia

I ratti sono stati ovariectomizzati per eliminare il ciclo di estrogeni che influenza lo spessore e la condizione dell'epitelio, in quanto, dopo la ovariectomia, l'epitelio vaginale diventa molto sottile.

Femmine di Wistar rats del peso di 250-300 g., di 8 settimane di età, sono state anestetizzate attraverso somministrazione i.p. di Ketamine® della Gellin Pharmaceutical o Xilazine® della Bayer, rasate e poi disinfettate con soluzione alcolica di Citrosil®.

E' stata eseguita una incisione sui lati addominali destro e sinistro della pelle e della parete del muscolo e sono state rimosse le ovaie. Le incisioni della parete del muscolo sono state suturate e quelle della pelle sono state chiuse con clips. Le ferite sono state disinfettate con soluzione alcolica di Citrosil®.

Alla fine della operazione chirurgica, e per i tre giorni successivi, sono stati somministrati un antibiotico (Procacillina per via sottocutanea



30000 I.U./ratto) e un analgesico (Novalgina per via sottocutanea 50 mg./Kg.). Gli animali sono stati utilizzati dopo almeno 2 settimane dall'intervento chirurgico e ventiquattro ore prima dell'inizio dell'esperimento è stata somministrata per via sottocutanea una dose di estradiolo in olio di sesamo (40 µg/Kg.) per riprodurre un epitelio fisiologico.

Induzione del danno epiteliale

E' stata preparata una soluzione acquosa al 2,5 % di nonoxinolb-9 (Igepal C0-630 Special, Rhone-Poleunc). Gli animali sono stati anestetizzati con somministrazione i.p. di Ketamine® della Gellinin Pharmaceutical o Xilazine® della Bayer. E' stato inserito un batuffolo di cotone imbevuto di soluzione di nonoxinolo-9 al 2,5 % (p/v) nella vagina e ruotato gentilmente per aprirla. Sono stati, quindi, instillati 200 µl di soluzione di nonoxinolo-9. Il batuffolo di cotone doveva essere reinserito nella vagina in modo da assicurare il contatto del nonoxinolo-9 con l'epitelio vaginale e ridurre al minimo la perdita di soluzione. Il batuffolo di cotone è stato rimosso dopo un'ora e mezza e la soluzione di nonoxinolo è stata allontanata dalla vagina. I gruppi sono stati subito sottoposti a trattamento con 200 µl di gel somministrati giornalmente per 2-3 giorni in base al seguente schema:



Gruppi	Trattamento	Tempo tra trattamento con N9 e sacrificio	No. di Animali
1	nessun trattamento	48 ore	5
2	base	48 ore	5
3	HA	48 ore	5
4	nessun trattamento	72 ore	5
5	base	72 ore	5
6	HA	72 ore	5

Dopo il trattamento gli animali vengono riposti nelle proprie gabbie.

Ventiquattro ore dopo l'ultima somministrazione gli animali sono stati sacrificati con un eccesso di anidride carbonica ed è stata rimossa la vagina.

I campioni sono stati fissati con soluzione di Bouin e successivamente inclusi in paraffina secondo tecniche standard. La lunghezza completa della vagina è stata tagliata in sezioni di 6 μ m, sezionando ogni 400 μ m, che sono state colorate con ematossilina eosina.

Valutazione del danno dell'epitelio vaginale

L'attribuzione dei valori si basa sulla perdita in percentuale di epitelio per ogni sezione visualizzata. I dati sono stati rappresentati graficamente rispetto al numero delle sezioni, dove la sezione uno corrisponde a quella più vicina all'utero. E' stata calcolata l'AUC del grafico ed usata come valore per rappresentare il grado del danno epiteliale nella vagina. Le percentuali relative al danno per ognuna



delle cinque vagine di ogni gruppo sono state raggruppate ed espresse come valore $\pm$ deviazione standard (Figure 1a e 1b).

Risultati

Nessun animale è morto o ha mostrato segni di malattia durante i tre giorni di studio.

I risultati del grado di danneggiamento per ogni gruppo trattato è rappresentato graficamente in Figura 2.

Gli animali che non hanno ricevuto alcun trattamento hanno mostrato il danneggiamento più grave; la parte centrale della vagina è quella che ha presentato il massimo grado di danneggiamento e ancora dopo 48 ore dall'aggressione chimica con nonoxinolo-9 essa ha mostrato una perdita del 100% dell'epitelio vaginale. Il grado di danneggiamento epiteliale dopo altre 24 ore era ridotto ma ancora elevato.

E' chiaro che la riepitelizzazione procede velocemente dalle parti estreme della vagina (utero e vulva) verso la parte centrale. Seguendo l'andamento del grado di danneggiamento si può prevedere la riepitelizzazione completa entro 5 giorni dall'aggressione con nonoxinolo-9.

Negli animali trattati con una base gel il grado di danneggiamento epiteliale dopo 48 ore era simile a quello negli animali che non avevano subito alcun trattamento, mentre dopo altre 24 ore era trascurabile.

Negli animali, invece, ai quali era stato somministrato giornalmente il



gel a base di acido ialuronico, il grado di danneggiamento epiteliale già dopo 48 ore era fortemente ridotto rispetto a quello degli altri due gruppi, per cui è risultato chiaro il suo effetto riepitelizzante in seguito all'aggressione del nonoxinolo-9 e che questo effetto è maggiore rispetto a quello di base gel.

ESEMPIO 2:

Effetto idratante del gel a base di HYAFF®11p50 (estere benzilico parziale 50% di acido ialuronico) allo 0,2% sull'epitelio vaginale di ratti.

L'effetto idratante del gel a base di HYAFF®11p50 è stato confermato in un modello di ratti ovariectomizzati in cui l'epitelio vaginale era molto sottile e appariva secco e fragile.

L'epitelio degli animali trattati per due settimane con il gel a base di HYAFF®11p50 mostrava condizione e aspetto migliori rispetto a quello di animali trattati con un prodotto umidificante disponibile in commercio che presentava, peraltro, significanti reazioni infiammatorie.

La natura mucoadesiva dello HYAFF®11p50 assicurava che il gel rimanesse a stretto contatto con la superficie della mucosa per un periodo prolungato e la capacità di questo polimero di inglobare acqua permetteva al gel di umidificare il tessuto e quindi prevenire la secchezza vaginale. Grazie a questa caratteristica di mucoadesività e all'effetto umidificante, il gel a base di HYAFF®11p50 risulta particolarmente adatto ad essere utilizzato come umidificante



vaginale.

Scopo dello studio era pertanto quello di determinare se la somministrazione ripetuta di gel a base di HYAFF®11p50 aveva la capacità di ridurre la secchezza vaginale in un modello di animale che simula la condizione post menopausa.

E' stato usato un umidificante disponibile in commercio come controllo positivo. Il gel a base di HYAFF®11p50 è stato anche somministrato a un modello di animale non ovariectomizzato per determinare possibili problemi di tossicità.

Preparazione degli animali

L'ovariectomia è stata eseguita come nell'esempio precedente.

Somministrazione dei materiali

Sono stati somministrati agli animali 200 µl di gel a base di HYAFF®11p50 per via intravaginale, giornalmente per 13 giorni. Nei gruppi di controllo non è stata eseguita alcuna somministrazione. Il trattamento seguito è mostrato nel seguente schema:

Gruppi	Trattamento	Ovariectomia	No. di Animali
1	controllo	si	5
2	Base Gel (Zeta)	si	5
3	HYAFF®11p50	si	6
4	Replens® (Janssen)	si	5
5	controllo	no	2
6	Base Gel (Zeta)	no	4
7	HYAFF®11p50	no	4

Dopo il trattamento gli animali vengono riposti nelle proprie gabbie e, ventiquattro ore dopo l'ultima somministrazione sacrificati con un



eccesso di anidride carbonica, quindi è stata rimossa la vagina. I campioni sono stati fissati con soluzione di Bouin e successivamente inclusi in paraffina secondo tecniche standard. Sezioni di 6 µm sono state colorate con ematossilina eosina.

Risultati

Durante i 13 giorni di trattamento nessun animale era morto o aveva mostrato segni di malattia.

Dalle osservazioni istomorfologiche è stato rilevato che nel **1° gruppo** (controllo - animali ovariectomizzati) l'epitelio vaginale era sottile e molto fragile (Fig. 3); nel **2° gruppo** (trattamento con Base Gel - animali ovariectomizzati) l'epitelio vaginale era meno danneggiato (Fig. 4) ma tutti gli animali mostravano reazioni infiammatorie dell'epitelio che in alcuni casi erano molto gravi e interessavano sia l'epitelio sia il tessuto sottoepiteliale.

Nel **3° gruppo** (trattamento con gel a base di HYAFF®11p50 animali ovariectomizzati) l'epitelio aveva uno spessore maggiore in modo particolare vicino la vulva, rispetto a quello trattato con la Base Gel (Fig. 5); le singole cellule erano rigonfie per cui l'epitelio risultava meno fragile e con un aspetto generale simile a quello negli animali normali (Fig. 6). La maggior parte degli animali non mostrava segni di irritazione e solo alcuni soffrivano di una infiammazione molto leggera e confinata principalmente a livello dell'epitelio.

Nel **4° gruppo** (trattamento con Replens® - animali ovariectomizzati)



tutti gli animali presentavano un epitelio spesso e uniforme con un aspetto generale simile a quello negli animali normali (Fig. 6) ma tutti gli animali soffrivano di una significativa reazione infiammatoria che coinvolgeva sia l'epitelio sia il tessuto sotto l'epitelio (Fig. 7)

Nei **gruppi 5°** (controllo: nessun trattamento - animali non ovariectomizzati), **6°** (trattamento con Base Gel - animali non ovariectomizzati) e **7°** l'epitelio degli animali era molto spesso . Si è rilevato un leggero segno di risposta infiammatoria in seguito alla somministrazione cronica di gel a base di HYAFF®11p50 e di Base Gel in animali normali.

ESEMPIO 3

Preparazione di un gel ginecologico in tubo da 20g contenente HYAFF® 11p50 - estere benzilico parziale dell'acido ialuronico in cui il 50% dei gruppi carbossilici sono esterificati ed il 50% salificati con sodio .

g 20 di gel contengono:

- HYAFF®11p50	0.2 %
- glicole propilenico	10 %
- p-idrossi benzoato di metile	0.1 %
- p-idrossibenzoato di propile	0.05 %
- deidroacetato sodico	0.1 %
- carbomer (acido acrilico polimerizzato)	1 %
- sodio idrossido q.b. pH = 6.00	
- acqua depurata q.b. a	100 %



ESEMPIO 4:

Preparazione di un gel ginecologico in tubo da 30g contenente acido ialuronico frazione Hyalastine e nonoxinolo-9

g 30 di gel contengono:

- acido ialuronico frazione Hyalastine	0.2 %
- nonoxinolo-9	2.5 %
- sorbitolo 70/70	10 %
- p-idrossi benzoato di metil	0.1 %
- p-idrossibenzoato di propile	0.05 %
- prevan	0.1 %
- carbomer (acido acrilico polimerizzato)	0.7 %
- sodio idrossido q.b. pH = 6.5	
- acqua depurata q.b. a	100 %

ESEMPIO 5:

Preparazione di un gel ginecologico in tubo da 30g contenente acido ialuronico frazione Hyalectin e nonoxinolo-9

g 30 di gel contengono:

- acido ialuronico frazione Hyalectin	0.2 %
- nonoxinolo-9	2.5 %
- sorbitolo 70/70	10 %
- p-idrossi benzoato di metile	0.1 %
- p-idrossibenzoato di propile	0.05 %
- prevan	0.1 %



- carbomer (acido acrilico polimerizzato) 0.7 %
- sodio idrossido q.b. pH = 6.5
- acqua depurata q.b. a 100 %

ESEMPIO 6:

Preparazione di un gel ginecologico in tubo da 30g contenente acido ialuronico frazione HYAFF®11p50 - estere benzilico parziale dell'acido ialuronico in cui il 50% dei gruppi carbossilici sono esterificati ed il 50% salificati con sodio e nonoxinolo-9

g 30 di gel contengono:

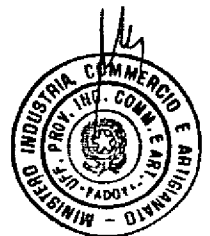
- HYAFF®11p50 0.2 %
- nonoxinolo-9 2.5 %
- sorbitolo 70/70 10 %
- p-idrossi benzoato di metile 0.1 %
- p-idrossibenzoato di propile 0.05 %
- prevan 0.1 %
- carbomer (acido acrilico polimerizzato) 0.7 %
- sodio idrossido q.b. pH = 6.5
- acqua depurata q.b. a 100 %

ESEMPIO 7:

Preparazione di un gel ginecologico in tubo da 30g contenente acido ialuronico frazione ACP - acido ialuronico autocrosslinkato e nonoxinolo-9

g 30 di gel contengono:

- ACP 0.2 %



- nonoxinolo-9	2.5%
- sorbitolo 70/70	10 %
- p-idrossi benzoato di metile	0.1 %
- p-idrossibenzoato di propile	0.05 %
- prevan	0.1 %
- carbomer (acido acrilico polimerizzato)	0.7 %
- sodio idrossido q.b. pH = 6.5	
- acqua depurata q.b. a	100 %

Preparazione di formulazioni farmaceutiche in forma di gel degli esempi 3-7

Si introduce nel turboemulsionatore l'acqua depurata e si scalda sotto agitazione a circa 80°C. Si introduce il p-idrossibenzoato di metile ed il p-idrossibenzoato di propile mantenendo l'agitazione. Si raffredda sotto agitazione a circa 30°C e si introduce il prevan o il deidroacetato sodico, l'acido ialuronico frazione Hyalastine o Hyalectin, l'ACP, lo HYAFF®11p50, il nonoxinolo-9 e il sorbitolo o il glicole propilenico..

Si disperde sotto vuoto il carbomer sotto energica agitazione con turbina e si procede alla neutralizzazione del carbomer con idrossido di sodio sciolto in acqua, controllando il pH.

Si trasferisce, infine, il gel ottenuto in appositi contenitori in acciaio inox, ai quali è stato applicato un dispositivo tarato in modo tale che il dosaggio del nonoxinolo-9 risulti pari a 50 mg per singola applicazione.



ESEMPIO 8:

Preparazione di una crema ginecologica in tubo da 30g contenente acido ialuronico frazione Hyalastine e nonoxinolo-9

g 30 di crema contengono:

- acido ialuronico frazione Hyalastine	0.2 %
- nonoxinolo-9	2.5 %
- pemulen TR1	0.3 %
- p-idrossi benzoato di metile	0.1 %
- p-idrossibenzoato di propile	0.05 %
- prevan	0.1 %
- carbomer (acido acrilico polimerizzato)	0.7 %
- myritol 318	5 %
- cetiol V	5 %
- olio di siliconi 350	1 %
- sodio idrossido q.b. pH = 6.5	
- acqua depurata q.b. a	100 %



ESEMPIO 9:

Preparazione di una crema ginecologica in tubo da 30g contenente acido ialuronico frazione Hyallectin e nonoxinolo-9

g 30 di crema contengono:

- acido ialuronico frazione Hyallectin	0.2 %
- nonoxinolo-9	2.5 %
- pemulen TR1	0.3 %

- p-idrossi benzoato di metile	0.1 %
- p-idrossibenzoato di propile	0.05 %
- prevan	0.1 %
- carbomer (acido acrilico polimerizzato)	0.7 %
- myritol 318	5 %
- cetiol V	5 %
- olio di siliconi 350	1 %
- sodio idrossido q.b. pH = 6.5	
- acqua depurata q.b. a	100 %

ESEMPIO 10:

Preparazione di una crema ginecologica in tubo da 30g contenente acido ialuronico frazione HYAFF®11p50 - estere benzilico parziale dell'acido ialuronico in cui il 50% dei gruppi carbossilici sono esterificati ed il 50% salificati con sodio e nonoxinolo-9

g 30 di crema contengono:

- HYAFF®11p50	0.2 %
- nonoxinolo-9	2.5 %
- pemulen TR1	0.3 %
- p-idrossi benzoato di metile	0.1 %
- p-idrossibenzoato di propile	0.05 %
- prevan	0.1 %
- carbomer (acido acrilico polimerizzato)	0.7 %
- myritol 318	5 %



- cetiol V	5 %
- olio di siliconi 350	1 %
- sodio idrossido q.b. pH = 6.5	
- acqua depurata q.b. a	100 %

ESEMPIO 11:

Preparazione di una crema ginecologica in tubo da 30g contenente acido ialuronico frazione ACP - acido ialuronico autocrosslinkato e nonoxinolo-9

g 30 di crema contengono:

- ACP	0.2 %
- nonoxinolo-9	2.5 %
- pemulen TR1	0.3 %
- p-idrossi benzoato di metile	0.1 %
- p-idrossibenzoato di propile	0.05 %
- prevan	0.1 %
- carbomer (acido acrilico polimerizzato)	0.7 %
- myritol 318	5 %
- cetiol V	5 %
- olio di siliconi 350	1 %
- sodio idrossido q.b. pH = 6.5	
- acqua depurata q.b. a	100 %



Preparazione di formulazioni farmaceutiche in forma di crema degli esempi 8-11

Si introduce nel turboemulsionatore l'acqua depurata e si scalda sotto

agitazione a circa 80°C. Si introduce il p-idrossibenzoato di metile ed il p-idrossibenzoato di propile mantenendo l'agitazione. Si raffredda sotto agitazione a circa 30°C e si introduce il pemulen TR1, il prevan, l'acido ialuronico frazione Hyalastine e Hyalectin, l'ACP, lo HYAFF®11p50 e il nonoxinolo-9.

Si disperde sotto vuoto il carbomer sotto energica agitazione con turbina e si procede alla neutralizzazione del carbomer con idrossido di sodio sciolto in acqua, controllando il pH.

Si aggiunge sotto energica agitazione con turbina il myritol 318, il cetiol V e l'olio di siliconi 350 e si trasferisce la crema ottenuta in appositi contenitori in acciaio inox, ai quali è stato applicato un dispositivo tarato in modo tale che il dosaggio del nonoxinolo-9 risulti pari a 50 mg per singola applicazione.

ESEMPIO 12:

Preparazione di formulazioni farmaceutiche in forma di ovuli contenenti acido ialuronico frazione Hyalastine e nonoxinolo-9

L'acido ialuronico frazione Hyalastine e il nonoxinolo-9 vengono dispersi omogeneamente tramite agitatore a pala in una miscela grassa fusa a base di trigliceridi semisintetici poliossietilenati (Suppocire BS2X) mantenendo la miscela a temperatura non superiore a 40°C. Il rapporto in peso tra principi attivi e la massa lipidica è compresa tra 1 e 30%. Una volta raggiunta una dispersione omogenea la massa viene ripartita in opportuni stampi e successivamente raffreddati a 4°C. Ad



esempio per un ovulo di 2 grammi il contenuto di acido ialuronico è di 4 mg e il contenuto di nonoxinolo-9 è di 50 mg.

ESEMPIO 13:

Preparazione di formulazioni farmaceutiche in forma di ovuli contenenti acido ialuronico frazione Hyallectin e nonoxinolo-9

L'acido ialuronico frazione Hyallectin e il nonoxinolo-9 vengono dispersi omogeneamente tramite agitatore a pala in una miscela grassa fusa a base di trigliceridi semisintetici poliossietilenati (Suppocire BS2X) mantenendo la miscela a temperatura non superiore i 40°C. Il rapporto in peso tra principi attivi e la massa lipidica è compresa tra 1 e 30%. Una volta raggiunta una dispersione omogenea la massa viene ripartita in opportuni stampi e successivamente raffreddati a 4°C. Ad esempio per un ovulo di 2 grammi il contenuto di acido ialuronico è di 4 mg e il contenuto di nonoxinolo-9 è di 50 mg.

ESEMPIO 14:

Preparazione di formulazioni farmaceutiche in forma di ovuli contenenti acido ialuronico frazione HYAFF®11p50 - estere benzilico parziale dell'acido ialuronico in cui il 50% dei gruppi carbossilici sono esterificati ed il 50% salificati con sodio e nonoxinolo-9

Lo HYAFF®11p50 e il nonoxinolo-9 vengono dispersi omogeneamente tramite agitatore a pala in una miscela grassa fusa a base di trigliceridi semisintetici poliossietilenati (Suppocire BS2X) mantenendo la miscela a temperatura non superiore i 40°C. Il rapporto in peso tra principi



attivi e la massa lipidica è compresa tra 1 e 30%. Una volta raggiunta una dispersione omogenea la massa viene ripartita in opportuni stampi e successivamente raffreddati a 4°C. Ad esempio per un ovulo di 2 grammi il contenuto di HYAFF®11p50 è di 4 mg e il contenuto di nonoxinolo-9 è di 50 mg.

ESEMPIO 15:

Preparazione di formulazioni farmaceutiche in forma di ovuli contenenti acido ialuronico frazione ACP - acido ialuronico autocrosslinkato e nonoxinolo-9

L'ACP e il nonoxinolo-9 vengono dispersi omogeneamente tramite agitatore a pala in una miscela grassa fusa a base di trigliceridi semisintetici poliossietilenati (Suppocire BS2X) mantenendo la miscela a temperatura non superiore a 40°C. Il rapporto in peso tra principi attivi e la massa lipidica è compresa tra 1 e 30%. Una volta raggiunta una dispersione omogenea la massa viene ripartita in opportuni stampi e successivamente raffreddati a 4°C. Ad esempio per un ovulo di 2 grammi il contenuto di ACP è di 4 mg e il contenuto di nonoxinolo-9 è di 50 mg.

ESEMPIO 16:

Preparazione di una formulazione farmaceutica in forma di compresse contenenti acido ialuronico frazione Hyalastine e nonoxinolo-9

L'acido ialuronico frazione Hyalastine e il nonoxinolo-9 vengono miscelati con eccipienti solidi opportunamente selezionati al fine di ottenere compresse ad alto potere disgregante di cui viene riportato a



titolo di esempio la composizione per una singola compressa.

- acido ialuronico frazione Hyalastine	mg	4
- nonoxinolo-9	mg	50
- cellulosa microcristallina	mg	400
- amido 1500	mg	130
- lattosio	mg	1300
- sodiometilcarbrossimetilcellulosa cross-linked	mg	100
- talco	mg	100
- magnesio stearato	mg	20

ESEMPIO 17:

*Preparazione di una formulazione farmaceutica in forma di compresse
contenenti acido ialuronico frazione Hyalectin e nonoxinolo-9*

L'acido ialuronico frazione Hyalectin e il nonoxinolo-9 vengono
miscelati con eccipienti solidi opportunamente selezionati al fine di
ottenere compresse ad alto potere disgregante di cui viene riportato a
titolo di esempio la composizione per una singola compressa.

- acido ialuronico frazione Hyalectin	mg	4
- nonoxinolo-9	mg	50
- cellulosa microcristallina	mg	400
- amido 1500	mg	130
- lattosio	mg	1300
- sodiometilcarbrossimetilcellulosa cross-linked	mg	100
- talco	mg	100



- magnesio stearato mg 20

ESEMPIO 18:

Preparazione di una formulazione farmaceutica in forma di compresse contenenti acido ialuronico frazione HYAFF®11p50 - estere benzilico parziale dell'acido ialuronico in cui il 50% dei gruppi carbossilici sono esterificati ed il 50% salificati con sodio e nonoxinolo-9

Lo HYAFF®11p50 e il nonoxinolo-9 vengono miscelati con eccipienti solidi opportunamente selezionati al fine di ottenere compresse ad alto potere disgregante di cui viene riportato a titolo di esempio la composizione per una singola compressa.

- HYAFF®11p50	mg 4
- nonoxinolo-9	mg 50
- cellulosa microcristallina	mg 400
- amido 1500	mg 130
- lattosio	mg 1300
- sodiometilcarbrossimetilcellulosa cross-linked	mg 100
- talco	mg 100
- magnesio stearato	mg 20

ESEMPIO 19:

Preparazione di una formulazione farmaceutica in forma di compresse contenenti acido ialuronico frazione ACP - acido ialuronico autocrosslinkato e nonoxinolo-9

L'ACP e il nonoxinolo-9 vengono miscelati con eccipienti solidi



opportunamente selezionati al fine di ottenere compresse ad alto potere disagregante di cui viene riportato a titolo di esempio la composizione per una singola compressa.

- ACP	mg 4
- nonoxinolo-9	mg 50
- cellulosa microcristallina	mg 400
- amido 1500	mg 130
- lattosio	mg 1300
- sodiometilcarbrossimetilcellulosa cross-linked	mg 100
- talco	mg 100
- magnesio stearato	mg 20

ESEMPIO 20:

Preparazione di una schiuma in forma di dispenser a base di acido ialuronico

frazione Hyalastine e nonoxinolo-9

ml 50 contengono:

- acido ialuronico frazione Hyalastine	mg 100
- nonoxinolo-9	g 1.25
- metilparaben	mg 30
- propilparaben	mg 15
- NaCl	mg 450
- Tween 20	g 1.5
- Isobutano	g 2.0
- acqua depurata q.b. a	ml 50



ESEMPIO 21:

Preparazione di una schiuma in forma di dispenser a base di acido ialuronico

frazione Hyalectin e nonoxinolo-9

ml 50 contengono:

- acido ialuronico frazione Hyalectin	mg 100
- nonoxinolo-9	g 1.25
- metilparaben	mg 30
- propilparaben	mg 15
- NaCl	mg 450
- Tween 20	g 1.5
- Isobutano	g 2.0
- acqua depurata q.b. a	ml 50

ESEMPIO 22:

Preparazione di una schiuma in forma di dispenser a base di acido ialuronico

frazione HYAFF®11p50 - estere benzilico parziale dell'acido ialuronico in cui

il 50% dei gruppi carbossilici sono esterificati ed il 50% salificati con sodio e nonoxinolo-9

ml 50 contengono:

- HYAFF®11p50	mg 100
- nonoxinolo-9	g 1.25
- metilparaben	mg 30
- propilparaben	mg 15
- NaCl	mg 450



-

mg per singola applicazione.

ESEMPIO 24:

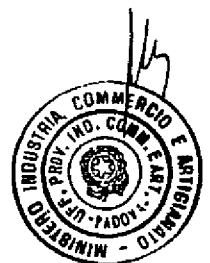
Preparazione di formulazioni farmaceutiche in forma di ovuli contenenti microsfere caricate con nonoxinolo-9

Le microsfere preparate come descritto nella domanda di brevetto EP 0517565 e caricate con nonoxinolo-9 vengono disperse omogeneamente tramite agitatore a pala in una miscela grassa fusa, a base di trigliceridi semisintetici poliossietilenati (Suppocire BS₂X), mantenendo la miscela a temperatura non superiore ai 40°C. Il rapporto in peso tra principi attivi e la massa lipidica è compreso tra 1 e 30%. Una volta raggiunta una dispersione omogenea, la massa viene ripartita in opportuni stampi e successivamente raffreddata a 4°C. Ad esempio, un ovulo di 2 grammi contiene microsfere pari a 50 mg, caricate a loro volta con nonoxinolo-9 ad una quantità pari a 50 mg.

ESEMPIO 25:

Preparazione di formulazioni farmaceutiche in forma di ovuli contenenti microsfere caricate con nonoxinolo-9

Le microsfere preparate come descritto nella domanda di brevetto PCT N. PCT/EP96/01354 e caricate con nonoxinolo-9 vengono disperse omogeneamente tramite agitatore a pala in una miscela grassa fusa, a base di trigliceridi semisintetici poliossietilenati (Suppocire BS₂X), mantenendo la miscela a temperatura non superiore ai 40°C. Il rapporto in peso tra principi attivi e la massa lipidica è compreso tra 1



e 30%. Una volta raggiunta una dispersione omogenea, la massa viene ripartita in opportuni stampi e successivamente raffreddata a 4°C. Ad esempio, un ovulo di 2 grammi contiene microsfere pari a 50 mg, caricate a loro volta con nonoxinolo-9 ad una quantità pari a 50 mg.

**** *

Essendo l'invenzione così descritta, è chiaro che questi metodi possono essere modificati in vari modi. Tali modificazioni non sono da considerarsi come divergenze dello spirito e dalle prospettive dell'invenzione e tutte quelle modificazioni che apparirebbero evidenti ad un esperto nel campo sono comprese nell'ambito delle seguenti rivendicazioni:

RIVENDICAZIONI

- 1) Composizione farmaceutica per uso vaginale e rettale comprendente:
 1. un polisaccaride ad una concentrazione efficace da indurre la riparazione epiteliale e avente effetto idratante;
 2. uno spermicida ad una concentrazione efficace per l'inattivazione esterna di virus e batteri.
- 2) Composizione farmaceutica di cui alla rivendicazione 1 in cui la componente 1) funge da agente protettore dell'epitelio ed è presente in una concentrazione compresa tra 1 e 50 mg/70 Kg di peso corporeo e, preferibilmente, tra 1 e 10mg/70 Kg di peso corporeo.



e 30%. Una volta raggiunta una dispersione omogenea, la massa viene ripartita in opportuni stampi e successivamente raffreddata a 4°C. Ad esempio, un ovulo di 2 grammi contiene microsfere pari a 50 mg, caricate a loro volta con nonoxinolo-9 ad una quantità pari a 50 mg.

**** *

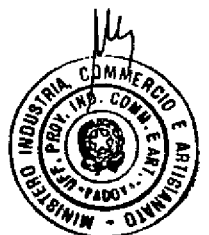
Essendo l'invenzione così descritta, è chiaro che questi metodi possono essere modificati in vari modi. Tali modificazioni non sono da considerarsi come divergenze dello spirito e dalle prospettive dell'invenzione e tutte quelle modificazioni che apparirebbero evidenti ad un esperto nel campo sono comprese nell'ambito delle seguenti rivendicazioni:

RIVENDICAZIONI

- 1) Composizione farmaceutica per uso vaginale e rettale comprendente:
 1. un polisaccaride ad una concentrazione efficace da indurre la riparazione epiteliale e avente effetto idratante;
 2. uno spermicida ad una concentrazione efficace per l'inattivazione esterna di virus e batteri.
- 2) Composizione farmaceutica di cui alla rivendicazione 1 in cui la componente 1) funge da agente protettore dell'epitelio ed è presente in una concentrazione compresa tra 1 e 50 mg/70 Kg di peso corporeo e, preferibilmente, tra 1 e 10mg/70 Kg di peso corporeo.



- 3) Composizione farmaceutica di cui alla rivendicazione 1 in cui la componente 1) svolge un effetto idratante nella prevenzione e/o nel trattamento dei disturbi connessi con la secchezza vaginale.
- 4) Composizione farmaceutica di cui alla rivendicazione 1 in cui la componente 2) funge da agente inattivatore della trasmissione del virus HIV e di altri virus trasmessi per contagio di tipo sessuale ed è presente ad una concentrazione compresa tra 10 e 100 mg/70 Kg di peso corporeo e, preferibilmente, tra 10 e 50 mg/70 Kg di peso corporeo.
- 5) Composizione farmaceutica di cui alle rivendicazioni 1-3, in cui il polisaccaride è costituito da un polimero mucoadesivo.
- 6) Composizione farmaceutica di cui alla rivendicazione 5, in cui il polimero mucoadesivo è l'acido ialuronico o un suo derivato.
- 7) Composizione farmaceutica di cui alla rivendicazione 6, in cui il derivato dell'acido ialuronico è un estere avente i gruppi carbossilici esterificati tutti o in parte con alcoli della serie alifatica e/o aromatica o un estere inter-e intramolecolare in cui parte o tutti i gruppi carbossilici sono esterificati con gruppi idrossilici della stessa e/o di diverse molecole del polisaccaride acido.
- 8) Composizione farmaceutica per uso vaginale e rettale di cui alla rivendicazione 7 in cui il derivato è l'estere benzilico parziale dell'acido ialuronico in cui il 50% dei gruppi carbossilici sono esterificati ed il 50% salificati con sodio.



- Fidia Advanced Biopolymers s.r.l.
Via Lanfranco Calligaris
Residenza

