



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

DOMANDA NUMERO	102007901550634
Data Deposito	20/08/2007
Data Pubblicazione	20/02/2009

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Titolo

NUOVO USO DI COMPOSTI ANTIDEPRESSIVI

DESCRIZIONE dell'invenzione industriale dal titolo:

"Nuovo uso di composti antidepressivi"

di: MEDESTEA INTERNAZIONALE S.P.A., nazionalità italiana, via Cernaia 31, 10121 Torino (Italia)

Inventori designati: Luisa GENNERO, Enrico DE VIVO, Chiara CESANO, Antonio PONZETTO, Gianfranco MERIZZI.

Depositata il: 20 Agosto 2007

DESCRIZIONE

La presente invenzione riguarda un nuovo uso di composti antidepressivi.

In particolare, l'invenzione riguarda l'uso di un composto antidepressivo, preferibilmente appartenente alla classe degli inibitori selettivi della ricaptazione della serotonina (SSRI), in applicazioni mediche o cosmetiche che richiedono la rigenerazione del tessuto cutaneo e/o la stimolazione della crescita dell'apparato tegumentario e dei relativi annessi cutanei, quali peli e capelli e/o il recupero della pigmentazione e/o del trofismo originari dei suddetti annessi cutanei, inclusa la stimolazione della vitalità dei follicoli piliferi.

SFONDO TECNICO DELL'INVENZIONE

LA PELLE

Il tessuto cutaneo, o cute, è caratterizzato da

due strati, ossia l'epidermide e il derma. L'epidermide è lo strato più esterno della cute ed è formata da cellule indurite dalla presenza di cheratina, chiamate cheratinociti. Alla base dello strato di cheratinociti vi sono numerosi altri strati di cellule che si riproducono continuamente per sostituire quelle che muoiono e si staccano. Si possono quindi riconoscere nell'epidermide i seguenti strati:

- un strato corneo (cellule apoptotiche ormai ridotte a lamine e cellule di Merkel con terminazioni nervose afferenti);
- uno strato granulare (cellule pavimentose ricche di cheratina);
- uno strato spinoso (cellule poliedriche in cui si verifica un progressivo accumulo di proteine di membrana e granuli lamellati e cellule ramificate di Langerhans con funzioni di difesa); e
- uno strato basale (cheratinociti dotato di cellule cubiche unite tra di loro da desmosomi ed i melanociti che producono melanina).

L'epidermide è quindi è composto da uno strato corneo più esterno, uno strato granuloso al di sotto dello strato corneo, uno strato spinoso che comprende tutta la zona intermedia, ed uno strato

basale che si attacca, mediante la membrana basale, direttamente al derma. L'epidermide ha la funzione di barriera nei confronti degli agenti fisici esterni (ad esempio caldo, freddo, raggi solari, ecc.) e degli agenti patogeni (batteri, ecc.).

Le rughe sono essenzialmente legate all'espressione - per un'azione riflessa dei muscoli facciali - o alla senescenza - per il rilassamento irreversibile della pelle.

Le rughe di espressione si manifestano anche sul viso giovane per un'azione riflessa dei muscoli facciali. Queste rughe, o "pieghe" di espressione, si differenziano da quelle di senescenza proprio perché si formano su un'epidermide che non ha perduto la propria normale elasticità. Alcune persone particolarmente emotive hanno un viso ricco di pieghe o rughe che riflettono di volta in volta e spesso involontariamente tutte le emozioni provate dalla persona.

Le rughe di vecchiaia sono invece causate dal rilassamento della pelle che inizia a manifestarsi già verso i 30 anni, con la comparsa delle prime pieghe ai lati della bocca, sotto le palpebre e sulla fronte.

I processi che si verificano all'interno della

pelle, dal derma all'epidermide, dall'apparato microvascolare a quello sebaceo-follicolare e a quello pigmentario, portano lentamente alla maturità prima e alla senescenza cutanea poi, e sono inevitabili e irreversibili.

Il quadro cutaneo comprendente le rughe, le zampe di gallina, l'avvizzimento e il rilassamento della pelle, è l'espressione del normale decadimento organico che si verifica con il passare degli anni. Incidono notevolmente nello sviluppo di questi inestetismi, il climaterio ed il crollo endocrino che lo caratterizza. Inoltre i disturbi interni associati all'invecchiamento possono certamente acuire e incidere sulla condizione della cute.

L'invecchiamento dell'epidermide determina una certa rarefazione della riproduzione cellulare, tipica dello strato germinativo della pelle e la diminuzione dello strato di cellule malpighiane che sono di estrema importanza per l'epidermide. Alcune sostanze, quali i fosfolipidi impiegati in forma di liposomi, si sono rivelati utili nel mantenere il turgore delle cellule dell'epidermide. Lo strato corneo, con il passare del tempo, appare incartapecorito, ruvido e disidratato, perciò è opportuno intervenire con sostanze di tipo

vitaminico, con fattori idratanti naturali ed altre, che limitano e rallentano la manifestazione di questi inestetismi. I prodotti per la pelle ben formulati, servono quindi come prevenzione e come coadiuvanti nel combattere la comparsa di rugosità, anche se non possono ringiovanire la pelle. Scopo principale è quello di mantenere l'umidità, impedire la perdita di elasticità e la disidratazione, tipica della pelle anziana tendenzialmente carente di acqua. Non devono però costituire una barriera verso la normale traspirazione della pelle.

Per prevenire o rallentare i processi di invecchiamento cutaneo, innanzitutto è necessario contrastare l'inevitabile modificazione della componente mucopolisaccaridica della sostanza fondamentale e l'allentamento della componente elastica e collagena del derma.

Rallentare l'appiattimento dei rilievi papillari, evitare il rallentamento del circolo sanguigno, impedire l'aumento delle tossine non asportate e cercare di impedire uno scarso apporto di nutrizione verso i tessuti soprastanti la zona papillare del derma sono una forma di prevenzione valida.

I prodotti per la pelle ben formulati servono,

quindi, come prevenzione e come coadiuvanti nel combattere la comparsa di rugosità, anche se certo non possono ringiovanire la pelle. Scopo principale è quello di mantenere l'umidità, impedire la perdita di elasticità e la disidratazione, tipica della pelle anziana tendenzialmente carente di acqua. Non devono però costituire una barriera verso la normale traspirazione della pelle.

IL CUOIO CAPELLUTO

Numerosi sono gli studi condotti sulla crescita dei peli in generale e dei capelli in particolare, così come i tentavi di mettere a punto composizioni che potessero risolvere i problemi di alopecia, effluvio e defluvio nei mammiferi, incluso l'essere umano.

A tale riguardo vale la pena citare lo studio di Robinson M et al. [6], in relazione allo sviluppo *in vitro* dei follicoli delle vibrisse di ratto adulto. Tale studio ha posto le basi per la definizione di un protocollo di coltura in grado di mantenere vitali i follicoli piliferi per oltre 20 giorni (prima di questa ricerca la crescita dei capelli "in vitro" generalmente si arrestava in modo prematuro a differenza di quanto accadeva *in vivo*) [6]. L'esame al microscopio ha mostrato che,

nonostante le diffuse modificazioni patologiche nell'epitelio del follicolo, le cellule del follicolo presentavano una notevole capacità di recupero. Questi dati hanno, pertanto, confermato che la caduta dei capelli non è riconducibile alla perdita della capacità rigeneratrice dei follicoli (che rimangono comunque vivi in uno stato di quiescenza o, meglio, di atrofia reversibile), bensì ad un insieme di fattori che condizionano il ciclo vitale del follicolo stesso [1-6].

Per alopecia si intende l'assenza o la carenza di peli o capelli nelle aree di cute in cui essi sono normalmente presenti. Il termine alopecia comprende sia l'ipotrichia, che indica la carenza di peli o capelli, sia la calvizie, che indica la mancanza irreversibile di capelli.

Il termine defluvio viene invece utilizzato per indicare una caduta di capelli anormale per quantità e qualità, mentre quello di effluvio va usato per riferirsi ai casi in cui la caduta è numericamente molto elevata, anche molte centinaia di capelli al giorno, e qualitativamente omogenea.

Classicamente le alopecie vengono distinte in temporanee (transitoria inibizione funzionale della papilla del pelo) e definitive (scomparsa del

follicolo e della papilla germinativa). Da queste vanno differenziate le pseudo-alopécie, nelle quali i capelli sono stati strappati via o si sono spezzati (tricoclasia) in seguito ad eventi traumatici, chimici, infettivi o per anomalie congenite del fusto.

L'alopecia può derivare da fattori genetici, dall'invecchiamento, da malattie locali o sistemiche. La dermatite seborroica e la psoriasi sono le patologie che più comunemente interessano il cuoio capelluto, ma provocano molto raramente alopecia. L'alopecia può essere di origine cicatriziale o non-cicatriziale, tossico-medicamentosa, areata o di tipo pseudoarea di Brocq, iatrogena (generalmente da farmaci), post-gravidica, post-infettiva, può inoltre essere determinata da tricotillomania, tigne, kerion e tigna favosa. Ancora, l'alopecia può essere determinata da lupus eritematosus (sia nella forma sistemica che in quella discoide fissa), sclerodermia, lichen planus, mucinosi follicolare o follicolite decalzante, nonché da aplasia cutis o tumori [1-4].

L'alopecia androgenetica non compare se le concentrazioni degli ormoni maschili non raggiungono i livelli presenti negli adulti, e quindi non

compare mai prima della pubertà. Nell'uomo la calvizie non dipende da un eccesso di ormoni androgeni, ma da un'eccessiva risposta dell'apparato tegumentario a questi ormoni [5].

La sensibilità dei capelli, o meglio dei follicoli piliferi, agli ormoni androgeni dipende soprattutto da un enzima, la 5-alfa-reduttasi di tipo 2, prodotto dalle cellule del follicolo [5]. Questo enzima trasforma il testosterone, il principale ormone maschile, nel suo derivato più potente, il diidrotestosterone o DHT, principale responsabile dell'alopecia androgenetica. I follicoli delle aree del cuoio capelluto che vanno incontro a calvizie producono, infatti, alte quantità di questo enzima e quindi alte quantità di DHT [5].

La forma di calvizie androgenetica della donna inizia verso i 35 anni e si manifesta tipicamente in tre stadi. Soprattutto nelle donne giovani il diradamento è spesso più evidente in corrispondenza della fronte [4-5]. Nella donna in menopausa è invece frequente notare anche una stempiatura, simile a quella che si osserva nel maschio. Anche nei casi più gravi però non si osserva mai una calvizie completa, ma, solo, un grave diradamento [4-5]. Nella donna la calvizie androgenetica può

essere conseguenza di un eccesso di ormoni maschili o di una eccessiva sensibilità dell'apparato tegumentario a livelli di androgeni assolutamente normali [4-5].

DESCRIZIONE DELL'INVENZIONE

La presente invenzione si prefigge lo scopo di trovare una soluzione valida ed efficace per stimolare e migliorare la vitalità ed il trofismo dell'apparato tegumentario nel suo complesso, ivi inclusi il tessuto cutaneo e i relativi annessi cutanei, quali peli o capelli, inducendone la rigenerazione.

Secondo la presente invenzione tale scopo è raggiunto grazie alla soluzione richiamata in modo specifico nelle rivendicazioni che seguono. Le rivendicazioni formano parte integrante dell'insegnamento tecnico qui fornito in relazione all'invenzione.

L'invenzione si fonda sull'osservazione di un particolare stimolo proliferativo esercitato sulla cute, sul cuoio capelluto e sui relativi annessi cutanei (peli e capelli) dai composti antidepressivi, soprattutto quelli appartenenti alla classe degli inibitori selettivi della ricaptazione della serotonina (SSRI). Tale attività è indotta

attraverso l'interazione con recettori loco-regionali di queste sostanze, atta ad indurre un recupero del trofismo del tessuto cutaneo senescente e del cuoio capelluto patologico [14,15].

Tale attività dei composti antidepressivi può essere utilmente applicata sia in campo cosmetico sia in campo medico.

In campo cosmetico, un composto antidepressivo può essere utilizzato per il trattamento cosmetico delle rughe, per il recupero della pigmentazione originaria degli annessi cutanei (peli e capelli) in un mammifero, ivi incluso l'essere umano, e per la stimolazione della crescita degli annessi cutanei (peli e capelli) in un mammifero.

In campo medico, il composto antidepressivo può essere utilizzato per la rigenerazione del tessuto cutaneo in pazienti che hanno subito un danneggiamento di tale tessuto o per il trattamento di alopecia, effluvio o defluvio.

Preferibilmente, il composto antidepressivo è un inibitore selettivo della ricaptazione della serotonina (SSRI), un suo precursore o un suo derivato naturale o di sintesi. Tra gli SSRI è particolarmente preferita la paroxetina.

Per gli scopi medici e cosmetici indicati sopra

e nelle annesse rivendicazioni, il composto antidepressivo può essere preparato sotto forma di una composizione cosmetica, una composizione farmaceutica, un *medical device*, o sotto forma di un terreno di coltura per la rigenerazione del tessuto cutaneo *in vitro* o per la stimolazione della crescita, il trofismo e/o la pigmentazione originaria degli annessi cutanei (peli e/o capelli) *in vitro*. Tali preparazioni, comprendenti il composto antidepressivo come principio attivo, possono inoltre opzionalmente comprendere uno o più ulteriori ingredienti attivi sinergici, quali un enzima proteolitico e/o una vitamina. Tali preparazioni possono inoltre opzionalmente comprendere un solvente e/o un diluente fisiologicamente accettabile, nonché usuali eccipienti e/o additivi per composizioni farmaceutiche o cosmetiche.

Come indicato in precedenza, il composto antidepressivo preferito nell'ambito della presente invenzione è la paroxetina, un farmaco ben conosciuto appartenente alla classe degli inibitori selettivi della ricaptazione della serotonina (SSRI). Tuttavia, per gli scopi dell'invenzione sono adatti anche altri composti antidepressivi naturali

o di sintesi, quali l'iperico (ottenuto dalla pianta officinale *Hypericum perforatum*), la fluoxetina, la fluvoxamina, l'mitriptilina, la desipramina, la clorimipramina, l'imipramina, la nortriptilina e la venlafaxina.

In generale, il composto antidepressivo è utilizzato in quantità fra 100 mg/Kg e 100 g/Kg, preferibilmente tra 0,5 g/Kg e 20 g/Kg, ancor più preferibilmente fra 1 g/Kg e 10 g/Kg per le composizioni sostanzialmente solide, e fra 100 mg/l e 100 g/l, preferibilmente fra 0,5 g/l e 20 g/l, ancor più preferibilmente fra 1 g/l e 10 g/l, per le composizioni sostanzialmente liquide.

Tra gli enzimi proteolitici che possono opzionalmente essere utilizzati in combinazione con l'antidepressivo si citano a titolo esemplificativo proteasi, peptidasi, papaina, collagenasi (preferibilmente di tipo Ia, tipo II, tipo IV), serratiopeptidasi, eparanasi, DNasi, elastasi, bromelaina, bradichinasi, *Clostridium* peptidasi, enzimi espressi da *Lactobacillus acidophilus*, enzimi espressi dal genere *Aspergillus*, aliinasi, fibrinolisinasi. Tra di essi sono preferite le proteasi, enzimi in grado di attivare tre fenomeni estremamente importanti, atti a produrre un effetto

sinergico con l'attività del composto antidepressivo, ovvero:

- l'attivazione dei fattori di crescita presenti sulla cute;
- un accelerato assorbimento dei nutrienti presenti nella preparazione;
- una esfoliazione profonda degli apparati tegumentari.

In generale, gli enzimi proteolitici possono essere utilizzati in quantità comprese fra 1 mg/Kg e 1 g/Kg, preferibilmente tra 10 mg/Kg e 100 mg/Kg per le composizioni sostanzialmente solide, e fra 1 mg/l ed 1 g/l, preferibilmente fra 10 mg/l e 100 mg/l, per le composizioni sostanzialmente liquide.

Come vitamine che possono opzionalmente essere utilizzate in combinazione con l'antidepressivo ed eventualmente anche con l'enzima proteolitico, si citano a titolo esemplificativo la retinaldeide (retinoide), i suoi precursori naturali o di sintesi e i suoi derivati naturali o di sintesi. Anche la retinaldeide esercita un effetto sinergico, in quanto è atta ad indurre una rapida rigenerazione dei tessuti.

In generale, la vitamina può essere utilizzata in una quantità compresa tra 0,01 mg/Kg e 10 g/Kg,

preferibilmente tra 0,1 mg/Kg e 1 g/Kg per le composizioni sostanzialmente solide, e fra 0,01 mg/l e 10 g/l, preferibilmente fra 0,1 mg/l e 1 g/l, per le composizioni sostanzialmente solide.

Il composto depressivo, eventualmente in combinazione con l'enzima proteolitico e/o la vitamina, può essere formulato in preparazioni solide o liquide, anidre o acquose, ad esempio creme, unguenti, pomate, polveri, cerotti, membrane impregnate, soluzioni, emulsioni, sospensioni, dispersioni vescicolari, lozioni, gel, spray.

L'esperto del settore è in grado di preparare queste preparazioni, utilizzando gli adatti additivi, eccipienti e/o diluenti.

L'invenzione sarà ora descritta in modo dettagliato, a puro titolo di esempio non limitativo, facendo riferimento ad alcune forme di realizzazione particolarmente preferite.

Tali forme di realizzazione sono rappresentate dalla composizione denominata Ru-BASE descritta qui sotto, che contiene paroxetina come principio attivo principale. La composizione Ru-BASE è stata preparata come crema e come infusione.

Composizioni in crema e infusionali comprendenti solamente l'antidepressivo come

principio attivo, in un mezzo fisiologicamente accettabile (quale una crema base o una soluzione fisiologica), sono indicate qui di seguito come composizioni Ru-BASE-CREMA e Ru-BASE-INFUS e sono illustrate rispettivamente nelle tabelle 1 e 2. Le successive tabelle 3 a 8 illustrano invece composizioni del tipo Ru-BASE in cui il composto antidepressivo paroxetina è combinato con uno o più ulteriori ingredienti attivi.

In particolare, le tabelle 3 e 4 illustrano rispettivamente composizioni Ru-BASE in crema e in forma di infusione, comprendenti la combinazione di paroxetina ed enzima proteasi. Tali composizioni sono rispettivamente denominate Ru-BASE-CREMA-PROTEO-PLUS e Ru-BASE-INFUS- PROTEO-PLUS.

Le tabelle 5 e 6 illustrano rispettivamente composizioni Ru-BASE in crema e in forma di infusione, comprendenti la combinazione di paroxetina e retinaldeide. Tali composizioni sono rispettivamente denominate Ru-BASE-CREMA-RET-PLUS e Ru-BASE-INFUS-RET-PLUS.

Le Tabelle 7 e 8 illustrano rispettivamente composizioni Ru-BASE in crema e in forma di infusione, comprendenti la combinazione di paroxetina, enzima proteasi e retinaldeide. Tali

composizioni sono rispettivamente denominate Ru-BASE-CREMA-COMBO-PLUS e Ru-BASE-INFUS-COMBO-PLUS.

I risultati istologici ottenuti *in vivo* dopo sei mesi di trattamento con le composizioni Ru-BASE sotto illustrate confermano la formazione di una ritrofizzazione delle rughe attraverso una modulazione del ciclo vitale del fibroblasto con recupero degli stati di atrofia e blocco di proliferazione dei medesimi. La ritrofizzazione indotta dalle composizioni Ru-BASE è morfologicamente comparabile a quella integra *in vivo* con caratteristiche isto-funzionali ottimali.

Queste osservazioni hanno spinto gli inventori a testare le composizioni Ru-BASE anche su biopsie di cuoio capelluto *in vitro* (aree colpite da alopecia di natura da determinarsi).

La composizione Ru-BASE-INFUS si è dimostrata utile a stimolare la crescita del pelo *in vitro*, migliorando la vitalità del follicolo pilifero atrofico e non. Tutti i peli, nuovi e non, dopo ventuno giorni di trattamento *in vitro* recuperano il trofismo originario, appaiono rinvigoriti, con una pigmentazione originaria e presentano, inoltre, un diametro aumentato del fusto sano e privo di desquamazione.

Tabella. 1 - Composizione Ru-BASE-CREMA

Sostanza	Conc. mg/Kg
Paroxetina	2500 (2,5gr/KG)
BASE in crema = ESSEX magra	q.b.

Tabella. 2 - Composizione Ru-BASE-INFUS

Sostanza	Conc. mg/Kg
Paroxetina	2500 (2,5gr/L)
fisiologica	q.b. per 1L di prodotto

Tabella. 3 - Composizione Ru-BASE-CREMA-PROTEO-PLUS

Sostanza	Conc. mg/Kg
Paroxetina	2500 (2,5gr/KG)
proteasi	22
BASE in crema = ESSEX magra	q.b.

Tabella. 4 - Composizione Ru-BASE-INFUS- PROTEO-PLUS

Sostanza	Conc. mg/L
Paroxetina	2500 (2,5gr/L)

proteasi	22
fisiologica	q.b. per 1L di prodotto

Tabella. 5 - Composizione Ru-BASE-CREMA-RET-PLUS

Sostanza	Conc. mg/Kg
Paroxetina	2500 (2,5gr/KG)
Retinaldeide	500
BASE in crema = ESSEX magra	q.b.

Tabella. 6 - Composizione Ru-BASE-INFUS-RET-PLUS

Sostanza	Conc. mg/L
Paroxetina	2500 (2,5gr/L)
Retinaldeide	500
fisiologica	q.b. per 1L di prodotto

Tabella. 7 - Composizione Ru-BASE-CREMA-COMBO-PLUS

Sostanza	Conc. mg/Kg
Paroxetina	2500 (2,5gr/KG)
Retinaldeide	500
proteasi	22

BASE in crema = ESSEX magra	q.b.
--------------------------------	------

Tabella. 8 - *Composizione Ru-BASE-COMBO-RET-PLUS*

Sostanza	Conc. mg/L
Paroxetina	2500 (2,5gr/L)
Retinaldeide	500
proteasi	22
fisiologica	q.b. per 1L di prodotto

Tutti i campioni bioptici di tessuto testati hanno risposto positivamente all'impiego delle composizioni Ru-BASE, restando vitali, depositando collagene ed avendo una distribuzione ordinata e tridimensionale durante 6 mesi di coltura in vitro. La vitalità dei tessuti epiteliali atrofici è apparsa nettamente migliorata dopo 15 giorni di trattamento.

Tutti i campioni testati di pazienti con alopecia maschile, femminile e cicatriziale sono rimasti in coltura vitali e con i follicoli piliferi attivi per sei mesi. Tutte le biopsie trattate presentano uno spiccato costante rinfoltimento delle filiere di capelli, sempre determinato da un ordine

di distribuzione topografica e da un tessuto sottostante trofico e privo di lesioni.

Senza volersi vincolare ad alcuna teoria specifica al riguardo, i presenti inventori ritengono che i risultati ottenuti con le composizioni Ru-BASE abbiano permesso di dimostrare che lo stato di atrofia cutanea, e più in generale tegumentaria, in corso in processi degenerativi è recuperabile. Le composizioni Ru-BASE si sono infatti dimostrate capaci di indurre una eccellente crescita e sviluppo di tessuto cutaneo, nonché di indurre *in vitro* la ricrescita di pelo con caratteristiche isto-funzionali normali.

Le sperimentazioni effettuate sono descritte in maggiore dettaglio nella sezione che segue.

Biopsie e soluzioni-prototipo

Tutti i campioni (biopsie di tessuto cartilagineo) sono stati lavati tre volte con soluzione fisiologica ed antibiotici (100 unità/ml di penicillina + 100 ug/ml streptomina + 160 mg/L gentamicina) per 10 minuti a temperatura ambiente.

Le biopsie sono quindi state sezionate in tre parti (due controlli e un campione per ciascun paziente). Il campione è stato trattato con una soluzione di Ru-BASE con concentrazione finale 1X

dentro piastre (Lab-Tek *chamber slides*, Nunc, Kamstrup, Danimarca) di 15-cm.

Sono state preparate due tipologie di controlli, un controllo negativo (1) trattato esclusivamente con soluzione fisiologica e antibiotici (come sopra descritto), e un controllo negativo (2) trattato con terreni per coltura cellulare comuni.

1. i reperti biotici di controllo sono stati sospesi in soluzione fisiologica dentro piastre (Lab-Tek *chamber slides*, Nunc, Kamstrup, Danimarca) di 15-cm.

2. i reperti biotici di controllo sono quindi stati posti dentro piastre (Lab-Tek *chamber slides*, Nunc, Kamstrup, Danimarca) di 15-cm in terreno RPMI 1640 supplementato con:

10% FBS (Celbio, Milano, Italia)

100 unità/ml di penicillina

100 ug/ml streptomina

160 mg/L gentamicina (Schering-Plough, Milano, Italia)

2 mM L-glutamina (Life Technologies; *growth medium*).

Tutti i campioni sono stati posti in un incubatore Heraeus termostaticamente controllato

alla temperatura di 37°C con una atmosfera contenente l'8% di apporto costante di CO₂ (v/v in aria).

BIOPSIE CUTANEE

Protocollo di colorazione della matrice

Dopo tre lavaggi per 10 minuti a temperatura ambiente in PBS (pH 7,4), i campioni sono stati risospesi in una soluzione fissante di paraformaldeide al 4% in D-MEM (Gibco) con pH 7,4, per un ora a temperatura ambiente. Tutte le biopsie oggetto di studio sono state trattate con azzurro di Alcian blu. Questo colorante è costituito da un gruppo dei colori basici polivalenti solubili in acqua. Il colore blu è dovuto la presenza di rame nella molecola.

L'azzurro di Alcian blu in soluzione con PBS (pH 7,4) all'1% di concentrazione finale p/V viene addizionato ad una soluzione di acido acetico al 3% (pH 2,5). Questa composizione, dopo incubazione di 2 ore a temperatura ambiente, colora indelebilmente legando i mucopolisaccaridi acidi e le glicoproteine sia solfonati che carbossilati. Per ogni campione sono stati allestiti controlli specifici.

Tutti i campioni sono stati lavati 3 volte con PBS (pH 7,4) a temperatura ambiente per cinque

minuti e poi osservati al microscopio ottico. Si nota un netto aumento di collagene tipo 2, collagene tipo 3 e collagene tipo 4, che si colorano di blu, nei campioni trattati con la composizione F-BASE sotto forma di soluzione rispetto al controlli 1 ed al controllo 2 [13].

BIOPSIE CUTANEE: RISULTATI

Colorazione con metodo colorimetrico Alcian blu

- Controllo 1 trattato con fisiologica: lievissima colorazione di fondo appena percettibile (punteggio=+/-).
- Controllo 2 trattate con comune terreno di coltura per biopsie D-MEM, 10% FBS addizionato, come descritto sopra. Si nota una lievissima colorazione di fondo azzurrina pallida diffusa (Alcian blu, (punteggio=++)).
- Campione trattato con F-BASE_INFUS. Si nota come le cellule, ove si è indotta una rideposizione di collagene, si colorino nettamente con Alcian blu, crescendo in strati sovrapposti (punteggio=+++++).

Western blot

I campioni sono stati sottoposti ad analisi fenotipiche con Western Blot per i marcatori anti collagene tipo II (Santa Cruz Biotechnology, America, California), anti collagene tipo III (Santa

Cruz Biotechnology, America, California), anti collagene tipo IV (Santa Cruz Biotechnology, America, California), anti aggrecano (Santa Cruz Biotechnology, America, California). Dopo cinque lavaggi, le membrane sono state incubate con i relativi anticorpi secondari (1:1000) coniugati con perossidasi di rafano (HRP, SantaCruz Biotechnologies Inc., Santa Cruz, California, USA) per 1h a temperatura ambiente, come riportato nella tabella 3 che segue.

Caratterizzazione del tessuto cutaneo trattato con Ru-BASE versus controlli non trattati

I risultati relativi all'espressione di collagene tipo II, collagene tipo III, collagene tipo IV e di aggrecano sono stati espressi con una scala quantitativa come segue:

Tabella 3

Marcatori	Controllo 1	Controllo 2	Campione
collagene tipo II	-/+	++	+++++
collagene tipo III	-/+	+	+++++
collagene tipo IV	-/+	++	+++++
aggrecano	---	---	++++

Legenda

---	= assenza di banda
-/+	= lieve presenza di banda
+	= banda presente sottile
++	= banda presente media
+++	= banda presente estesa
++++	= banda presente alta
+++++	= banda presente effusa

BIOPSIE DI CUVIO CAPELLUTO

Protocollo di immunofluorescenza

Dopo tre lavaggi per 10 min a temperatura ambiente in PBS (pH 7,4), i campioni sono stati risospesi in una soluzione fissante di paraformaldeide al 4% in RPMI 1640 con pH 7,4, per un'ora a temperatura ambiente. Dopo l'inclusione in paraffina, i campioni sono stati sezionati e posizionati su vetrini portaoggetti. Le sezioni sono state colorate con ematossilina/eosina, anticorpi monoclonali anti-citocheratina 10 (Santa Cruz Biotechnology, America, California), anticorpi monoclonali anti-citocheratina 11 (Santa Cruz Biotechnology, America, California). Per ogni anticorpo monoclonale sono stati allestiti controlli specifici con i relativi isotipi (Santa Cruz Biotechnology, America, California). Tutti i

campioni posizionati su vetrini portaoggetti sono stati osservati al microscopio ottico dopo essere stati sigillati con moviol e vetrini coprioggetti.

Western Blot per citocheratine

Le biopsie, sospese in tampone lisante (1% SDS, 30 mM Tris pH 6,8, 5% glicerolo) al quale sono stati aggiunti gli inibitori delle proteasi (Protease Inhibitor Cocktail, Calbiochem, San Diego, CA), hanno subito una omogeneizzazione, cui segue una incubazione dei campioni per 30 minuti a 4°C. I lisati ottenuti sono stati centrifugati a 12.000 rpm per 20 minuti a 4°C ed è stato raccolto il surnatante; la concentrazione proteica dei campioni è stata valutata con metodo Bio-Rad (Benchmark Plus assay, Bio-Rad). Prima della corsa elettroforetica, i campioni sono stati fatti bollire per 5 minuti in presenza di beta-mercaptoetanololo e blu di bromofenolo. I campioni sono stati sottoposti a corsa elettroforetica in un gel al 12% (SDS-PAGE) e trasferiti su membrana PVDF (Perkin Elmer Inc.). Le membrane sono state saturate con metanololo a temperatura ambiente e successivamente incubate con i seguenti anticorpi primari diluiti in PBS con 5% di latte in polvere scremato: anti-citocheratina 14 con titolo di diluizione 1:500 (SantaCruz

Biotechnologies Inc., Santa Cruz, California USA), anti-citocheratina 18 con titolo di diluizione 1:500 (SantaCruz Biotechnologies Inc., Santa Cruz, California USA) e anti-citocheratina 19 con titolo di diluizione 1:500 (SantaCruz Biotechnologies Inc., Santa Cruz, California USA) per tutta la notte a 4° C. Dopo cinque lavaggi, le membrane sono state incubate con i relativi anticorpi secondari (1:1000) coniugati con perossidasi di rafano (HRP, SantaCruz Biotechnologies Inc., Santa Cruz, California USA) per 1h a temperatura ambiente. Le bande corrispondenti sono state evidenziate con liquidi di chemiluminescenza (Super Signal Western Pico solution, Pierce Biotechnology Inc., Rockford, Illinois, USA) e fissate su lastre fotografiche.

BIOPSIE DI CUOIO CAPELLUTO: RISULTATI

Microscopia ottica

Questi risultati indicano un cuoio capelluto in ricrescita privo di patologia alopecica con distribuzione delle fasi di ricrescita normali.

I risultati relativi all'espressione delle citocheratina 10 e 11 e le colorazioni istologiche dei preparati bioptici con ematossilina/cosina (utilizzati per la visualizzazione della vitalità follicolare) sono riportati in tabella e sono stati

espressi con una scala quantitativa.

Dall'analisi dei risultati in Tabella 4 si evidenzia alla microscopia ottica (colorazione con eosina ed ematossilina) un netto incremento del numero di follicoli nei campioni trattati con la composizione oggetto di invenzione Ru-BASE rispetto ai controlli non trattati. Inoltre tutti i follicoli appaiono trofici, vitali ed attivi nei campioni trattati rispetto ai controlli non tratti dove si nota una atrofia o un ipotrofismo del follicolo stesso. Infine, si segnala una netta predominanza delle citocheratine 10 ed 11, tipiche dei tessuti tegumentari normali con follicoli vitali ed attivi nei campioni trattati con la composizione oggetto di invenzione Ru-BASE rispetto ai controlli non trattati [8].

Tabella 4.

Marcatori	Controllo 1	Controllo 2	Campione
Citocheratina 10	+	++	++++
Citocheratina 11	+	++	++++

Marcatori	Controllo 1	Controllo 2	Campione
<i>Eosina/ Ematossilina</i>	++	++	++++

Legenda

----- = assenza di fluorescenza

+ = bassa fluorescenza per campo ottico

++ = media fluorescenza per campo ottico

+++ = alta fluorescenza per campo ottico

++++ = altissima fluorescenza per campo ottico

pz = paziente

Western blot

I campioni sono stati sottoposti ad analisi fenotipiche con Western Blot per i marcatori citocheratina 14, citocheratina 18 e citocheratina 19, come di seguito discusso in Tabella 5.

I risultati evidenziano una forte positività per la produzione di citocheratina 14, citocheratina 18, citocheratina 19 nei campioni trattati, ed in particolare nei campioni di cicatrici trattate, per sei mesi *in vitro* con la composizione oggetto della presente invenzione, Ru-BASE, rispetto ad una solo lieve positività per la produzione di citocheratina 14, citocheratina 18, citocheratina 19 nei campioni

di controllo non trattati, come riportato in tabella 4. Le citocheratine 14, 18 e 19 sono espresse nei tessuti tegumentari normali con follicoli vitali ed attivi durante gli stati di differenziamento cellulare, di crescita del follicolo pilifero e di controllo della formazione del capello [8-9].

Tabella 5.

Marcatori	Controllo 1	Controllo 2	Campione
Citocheratina 14	+	+	++++
Citocheratina 18	+	+	++++
Citocheratina 19	+	+	++++

Legenda

- = assenza di banda
- /+ = lieve presenza di banda
- +
- ++ = banda presente sottile
- +++ = banda presente media
- ++++ = banda presente estesa
- ++++ = banda presente alta

+++++ = banda presente effusa

pz = paziente

BIBLIOGRAFIA

1. Robinson M, Reynolds AJ, Gharzi A, Jahoda CA. *In vivo* induction of hair growth by dermal cells isolated from hair follicles after extended organ culture. *J Invest Dermatol.* 2001 Sep;117(3):596-604.
2. Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions. Department of Health and Human Services. June 2001.
3. Griffith, L. G. & Naughton, G. Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities. *Science.* 2002;295:1009-1014 .
4. Wagers, A. J., Christensen, J. L., & Weissman, I. L. Cell fate determination from stem cells. *Gene Ther.* 2002;9:606-612 .
5. Bianco, P. and Cossu, G. Uno, nessuno e centomila: searching for the identity of mesodermal progenitors. *Exp Cell Res.* 1999 Sep 15;251(2):257-63.
6. Rabinovitch, M. & De Stefano, M. J. Cell shape changes induced by cationic anesthetics. *J. Exp. Med.* 1976;143: 290-304.
7. Parker F.: "Cute e ormoni" in Williams R.H. eds:

- "Trattato di Endocrinologia". III° edizione italiana, Piccin, Padova. 1979; vol II°, cap 23: 1115-19.
8. Miller EJ. A review of biochemical studies on the genetically distinct collagens of skeletal system. Clin Orthop. 1973;92:260-80.
 9. Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. J Bone Joint Surg. 1993;75/A:532-53.
 10. Nelea V, Luo L, Demers CN, Antoniou J, Petit A, Lerouge S, Wertheimer M, Mwale F. Selective inhibition of type X collagen expression in human mesenchymal stem cell differentiation on polymer substrates surface-modified by glow discharge plasma. J Biomed Mater Res A. 2005 Oct 1;75(1):216-23.
 11. Glowacki J, Yates KE, Maclean R, Mizuno S. In vitro engineering of cartilage: effects of serum substitutes, TGF-beta, and IL-1alpha. Orthod Craniofac Res. 2005 Aug;8(3):200-8.
 12. Chua KH, Aminuddin BS, Fuzina NH, Ruszymah BH. Insulin-transferrin-selenium prevent human chondrocyte dedifferentiation and promote the formation of high quality tissue engineered

- human hyaline cartilage. Eur Cell Mater. 2005 Jun 17;9:58-67; discussion 67.
13. French MM, Smith SE, Akanbi K, Sanford T, Hecht J, Farach-Carson MC, Carson DD. Expression of the heparan sulfate proteoglycan, perlecan, during mouse embryogenesis and perlecan chondrogenic activity in vitro. J Cell Biol. 1999 May 31;145(5):1103-15.
14. Kuhn C, Francis R. Gender difference in cocaine-induced HPA axis activation. Neuropsychopharmacology. 1997 Jun;16(6):399-407. PMID: 9165495.
15. Czeh B, Muller-Keuker JI, Rygula R, Abumaria N, Hiemke C, Domenici E, Fuchs E. Chronic Social Stress Inhibits Cell Proliferation in the Adult Medial Prefrontal Cortex: Hemispheric Asymmetry and Reversal by Fluoxetine Treatment. Neuropsychopharmacology. 2006 Dec 13. PMID: 17164819.

RIVENDICAZIONI

1. Uso di un composto antidepressivo per la stimolazione della rigenerazione dell'apparato tegumentario e/o per la stimolazione della crescita, del trofismo originario e/o della pigmentazione originaria dei relativi annessi cutanei, particolarmente peli e/o capelli, in un mammifero.
2. Uso secondo la rivendicazione 1, per il trattamento cosmetico delle rughe.
3. Uso secondo la rivendicazione 1, per la stimolazione della crescita di peli e/o capelli.
4. Uso secondo la rivendicazione 1, per il ripristino della pigmentazione originaria di peli e/o capelli.
5. Uso di un composto antidepressivo per la preparazione di un medicamento per la rigenerazione di tessuto cutaneo danneggiato o per il trattamento di alopecia, effluvio e/o defluvio in un mammifero.
6. Uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 5, in cui il composto antidepressivo è scelto fra gli inibitori selettivi della ricaptazione della serotonina (SSRI), i loro precursori e i loro derivati naturali o di sintesi.
7. Uso secondo la rivendicazione 6, in cui il composto antidepressivo è scelto fra iperico,

paroxetina, fluoxetina, fluvoxamina, amitriptilina, desipramina, clorimipramina, imipramina, nortriptilina, venlafaxina, i loro precursori e i loro derivati naturali o di sintesi.

8. Uso secondo la rivendicazione 7, in cui il composto antidepressivo è paroxetina.

9. Uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 8, in cui il composto antidepressivo è utilizzato in combinazione con un enzima proteolitico.

10. Uso secondo la rivendicazione 9, in cui l'enzima proteolitico è scelto nel gruppo che consiste di papaina, collagenasi, serratiopeptidasi, eparanasi, DNAsi, elastasi, bromelaina, bradichinasi, *Clostridium* peptidasi, enzimi espressi da *Lactobacillus acidophilus*, enzimi espressi dal genere *Aspergillus*, proteasi, aliinasi, fibrinolisinasi.

11. Uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 10, in cui il composto antidepressivo è utilizzato in combinazione con una vitamina.

12. Uso secondo la rivendicazione 11, in cui la vitamina è scelta fra retinaldeide, suoi precursori e suoi derivati naturali o di sintesi.

13. Uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni

1 a 12, in cui il composto antidepressivo è utilizzato in combinazione con un enzima proteolitico e una vitamina.

14. Uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 13, in cui il composto antidepressivo è formulato in una preparazione sostanzialmente solida o liquida, anidra o acquosa.

15. Uso secondo la rivendicazione 14, in cui il composto antidepressivo è formulato in una preparazione scelta nel gruppo comprendente creme, unguenti, pomate, polveri, cerotti, membrane impregnate, soluzioni, emulsioni, dispersioni vescicolari, lozioni, gel, spray e sospensioni.

16. Uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 15, in cui il composto antidepressivo è formulato in una preparazione sostanzialmente solida ed è utilizzato in una quantità compresa fra 100 mg/Kg e 100 g/Kg, preferibilmente tra 0,5 g/Kg e 20 g/Kg, ancor più preferibilmente fra 1 g/Kg e 10 g/Kg.

17. Uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 15, in cui il composto antidepressivo è formulato in una preparazione sostanzialmente liquida ed è utilizzato in una quantità compresa fra 100 mg/l e 100 g/l, preferibilmente tra 0,5 g/l e 20

g/l, ancor più preferibilmente fra 1 g/l e 10 g/l.

18. Uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 9 a 17, in cui in cui il composto antidepressivo è formulato in una preparazione sostanzialmente solida in combinazione con almeno un enzima proteolitico, che è utilizzato in una quantità compresa tra 1 mg/Kg e 1 g/Kg, preferibilmente tra 10 mg/Kg e 100 mg/Kg.

19. Uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 9 a 17, in cui in cui il composto antidepressivo è formulato in una preparazione sostanzialmente liquida in combinazione con almeno un enzima proteolitico, che è utilizzato in una quantità compresa tra 1 mg/l e 1 g/l, preferibilmente tra 10 mg/l e 100 mg/l.

20. Uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 11 a 19, in cui in cui il composto antidepressivo è formulato in una preparazione sostanzialmente solida in combinazione con almeno una vitamina, che è utilizzata in una quantità compresa tra 0,01 mg/Kg e 10 g/Kg, preferibilmente tra 0,1 mg/Kg e 1 g/Kg.

21. Uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 11 a 19, in cui in cui il composto antidepressivo è formulato in una preparazione sostanzialmente liquida in combinazione con almeno una vitamina, che

è utilizzata in una quantità compresa tra 0,01 mg/l e 10 g/l, preferibilmente tra 0,1 mg/l e 1 g/l.

22. Uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 21, in cui il composto cosmetico è preparato come composizione farmaceutica, composizione cosmetica, dispositivo medico (*medical device*) o terreno di coltura.