



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

DOMANDA NUMERO	102006901399060
Data Deposito	24/03/2006
Data Pubblicazione	24/09/2007

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Titolo

MEDICAZIONI INTERATTIVE PER LA CURA DI PATOLOGIE DERMATOLOGICHE

Domanda di brevetto per invenzione industriale dal titolo:

“Medicazioni interattive per la cura di patologie dermatologiche”

a nome di: UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PAVIA

con sede in: PAVIA

Inventori designati : PERUGINI Paola, HASSAN Khaolé, COLONNA

Claudia, GENTA Ida, MODENA Tiziana, PAVANETTO Franca,

IADAROLA Paolo, CONTI Bice .

depositata il

con n.



CAMPO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione riguarda il settore delle medicazioni per uso topico.

TECNICA ANTERIORE

Medicazioni interattive

MI 2006A 000556

Il trattamento delle ulcere o piaghe, ossia delle lesioni in cui vi è perdita di sostanza a carico dei tessuti molli dovuta a cause esterne o a processi patologici interni e con tendenza alla cronicizzazione, prevede l'eliminazione del tessuto necrotico, l'assorbimento dell'essudato e l'umidificazione della piaga per facilitare la guarigione.

E' fondamentale, per la cura di questo tipo di lesioni, che spesso cronicizzano in seguito a necrosi cellulare o infezioni, mantenere un ambiente umido; infatti, a differenza delle ferite, la formazione della crosta nelle ulcere è dannosa e ne ritarda la cicatrizzazione. A questo scopo sono state sviluppate diverse medicazione presenti in commercio (DuoDERM[®], Aquacel[®], Allevyn[®]) che agiscono sia passivamente,

assorbendo l'essudato, sia attivamente umidificando la piaga, ma che non contengono liposomi, né principi attivi di natura proteica.

I componenti principali delle medicazioni interattive sono polimeri quali alginati, gelatina, carbossimetil cellulosa in forma solida o di idrogel in grado di assorbire notevoli quantità di essudato.

I prodotti commerciali sono rappresentati da tubetti contenenti i geli, o da tessuti di diversi formati costituiti dai componenti principali eventualmente corredati di bordi adesivi e di pellicola idrorepellente.

I liposomi

I liposomi sono strutture vescicolari di natura lipidica costituiti da un doppio strato fosfolipidico che circonda uno o più compartimenti acquosi utilizzati da tempo in campo farmaceutico come sistemi terapeutici per la veicolazione di farmaci.

Questo tipo di sistema di veicolazione offre diversi vantaggi quali la possibilità di indirizzare il farmaco nel sito desiderato, stabilizzazione del farmaco nei confronti di fattori endogeni di degradazione e infine la possibilità di ottenere un effetto prolungato nel tempo (depot).

I liposomi possono avere caratteristiche chimico fisiche differenti quali: le dimensioni, variano infatti dai 30 nanometri ai 10 micrometri; carica superficiale, fluidità dello strato fosfolipidico e composizione della membrana, che possono influenzare la veicolazione del principio attivo.

La prolidasi e la Deficienza da Prolidasi

La prolidasi è un enzima citoplasmatico endoteliale coinvolto nel catabolismo proteico, più precisamente nello stadio finale della degradazione del collagene. La produzione di un enzima modificato e



inattivo determina la comparsa di una patologia rara, autosomica recessiva ed ereditaria, denominata deficienza da prolidasi (PD). Di tale patologia si riscontrano un centinaio di casi al mondo con prevalenza in Italia .

La patologia si manifesta con diversa gravità da soggetto a soggetto. In genere le conseguenze a carico del collagene sono le più comuni: ulcerazioni della pelle e formazione di cicatrici (soprattutto agli arti inferiori), ispessimento della pelle con linfoedema, telangiectasia, fotosensibilità, infezioni ricorrenti.

Non esiste a tutt'oggi una terapia risolutiva della deficienza da prolidasi.

La terapia convenzionale che viene utilizzata prevede:

- ✓ applicazione locale, sulle ulcere dei pazienti, di pomate cicatrizzanti e antibiotiche.
- ✓ Applicazioni topiche di pomate contenenti Pro o Gly-Pro sulle ulcere della pelle.
- ✓ Trasfusioni di sangue di individui sani con eritrociti contenenti le normali concentrazioni di prolidasi. Questo tipo di terapia è molto costosa e richiede ospedalizzazione.

Recentemente è stato proposto, dagli autori della presente invenzione, un sistema liposomiale per la veicolazione sistemica dell'enzima prolidasi. I risultati dimostrarono come i liposomi siano in grado di trasferire l'attività enzimatica a fibroblasti coltivati in vitro (*P.Perugini et al. Journal of Control. Rel. 102, 181-190, 2005*), geneticamente carenti dell'enzima prolidasi. Una formulazione per uso topico facilmente utilizzabile, ed in grado di rilasciare i liposomi direttamente sul tessuto

ulceroso e quindi di promuoverne l'azione diretta in modo efficiente, non era ancora stata messa a punto.

SOMMARIO

L'invenzione riguarda una medicazione interattiva comprendente:

- a) un supporto,
- b) un idrogelo veicolante costituito da polimeri di natura polisaccaridica, polimeri acrilici, proteine o composti poliossidrilici ad alto peso molecolare,
- c) liposomi contenenti un principio attivo consistente in un principio attivo di natura proteica.

Secondo un aspetto preferito tale principio attivo è un enzima selezionato tra: prolidasi, collagenasi, ialuronidasi, lipasi, amilasi, oppure è un fattore di crescita e l'idrogelo b) di natura polisaccaridica è selezionato nel gruppo consistente di: cellulosa e i suoi derivati, alginati o derivati, pectina o derivati, chitosano o i suoi derivati, condroitino o derivati, condroitin-solfato, gomme vegetali o derivati.

I liposomi c) comprendono lipidi selezionati tra: fosfolipidi e/o distearoilfosfatidilcolina e/o sfingolipidi (ceramidi) e/o colesterolo ed i fosfolipidi sono preferibilmente selezionati tra: fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina o loro derivati e derivatizzati e la distearoilfosfatidilcolina, quando presente, è preferibilmente derivatizzata con polietilenglicole.

La medicazione preferibilmente contenente una composizione liposomiale contenente l'enzima prolidasi è preferibilmente sterile e può essere in forma liofilizzata. Se ne rivendica l'uso per applicazione

topica direttamente sul sito della lesione o ulcera, in particolare in individui geneticamente affetti da deficienza di prolidasi.

DESCRIZIONE DELLE FIGURE

Figura 1 – Fotomicrografia dei liposomi contenenti prolidasi ottenuta tramite analisi TEM (microscopia elettronica a trasmissione).

Figura 2 – Fotomicrografia SEM (scansione al microscopio elettronico) di fibroblasti dopo 6 giorni di contatto con medicazione interattiva a base di chitosano (si evidenzia la fusione dei liposomi con le membrane cellulari).

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

L'invenzione è rappresentata da supporti, solidi semisolidi o flessibili, in grado di veicolare per mezzo di un idrogel, liposomi caricati con un principio attivo di natura proteica, preferibilmente l'enzima prolidasi, applicabili direttamente sulla cute.

Con la presente invenzione il richiedente ha risolto il problema di una efficace veicolazione dei liposomi contenenti il principio attivo attraverso la cute, mediante miscelazione di tali liposomi con un idrogelo, rendendo possibile, conveniente e facile l'applicazione per via topica.

Infatti il sistema come proposto è applicabile direttamente dal paziente sulla cute senza interventi di operatori sanitari o ospedalizzazione. Inoltre nel caso specifico, può essere conservato a lungo in forma sterile e/o liofilizzata.

Nella medicazione secondo l'invenzione, il supporto può essere in cotone, sotto forma di tessuto o garza o in tessuto non tessuto (tnt). Ad esso viene fatto aderire, tramite colatura o spalmatura, un idrogel

costituito da polimeri di natura polisaccaridica, poliacrilica, in genere dotato di proprietà bioadesive e biocompatibile.

Particolarmente preferiti sono i polimeri di natura polisaccaridica quali: chitosano, cellulosa, derivati della cellulosa, acido ialuronico, condroitin solfato, alginati. Ancor più preferito tra questi è il chiosano e/o i suoi sali o derivati.

Tali polimeri, in forma idratata o re-idratata, veicolano liposomi contenenti una sostanza di natura proteica quale un enzima ad attività farmacologica o cosmetica (es. prolidasi, collagenasi, ialuronidasi, fattori di crescita, lipasi amilasi). Particolarmente preferito è l'enzima prolidasi.

L'enzima prolidasi (Myara I. et al, Life Sciences, 34, 1985-1998, 1984) è una molecola dimerica, la cui forma umana è composta da 492 aminoacidi e con un peso molecolare complessivo pari a 110000 Daltons; dopo degradazione si separano 2 subunità da 55000 Daltons. Indispensabile per l'attività enzimatica è la presenza nel sito attivo dell'enzima del catione bivalente Mn^{2+} .

Tale enzima è solitamente estratto da fonti naturali, principalmente rene di maiale, ed è commercialmente disponibile da Biozyme Laboratories (Blaevon, GB). Alternativamente, l'enzima è ricombinante ed è preferibilmente umano

La prolidasi è classificata enzima essenziale in quanto è l'unico in grado di scindere gli immino peptidi con Pro (prolina) o anche Hyp (idrossiprolina) all'estremità C-terminale, stadio fondamentale per la scissione e sintesi di nuovo collagene. La prolidasi è presente, oltre che

nell'uomo, anche in altri animali e nei batteri. Nell'organismo umano l'attività prolidasica più elevata si riscontra nel rene, nella mucosa intestinale e negli eritrociti; è presente anche in altri organi quali fegato, cervello, cuore, utero, e in cellule quali leucociti e fibroblasti.

La produzione di un enzima modificato e inattivo determina la comparsa di una patologia rara, autosomica recessiva ed ereditaria, denominata deficienza da prolidasi (PD), che si manifesta con diversa gravità da soggetto a soggetto. La casistica ha evidenziato che il fenotipo della PD è molto eterogeneo, anche se le conseguenze a carico del collagene sono le più comuni e portano ad ulcerazioni spontanee della pelle e formazione di cicatrici (soprattutto agli arti inferiori), ispessimento della pelle con linfoedema, telangiectasia, fotosensibilità, infezioni ricorrenti.

Una delle realizzazioni preferite secondo l'invenzione comprende quindi l'uso dei supporti secondo l'invenzione, in cui i liposomi contengono l'enzima prolidasi, per la cura topica delle ulcere di pazienti affetti da deficienza di prolidasi.

I liposomi sono strutture vescicolari composte principalmente da lipidi. Esistono diversi metodi per la preparazione dei liposomi. Nel caso specifico, dovendo veicolare enzimi attivi, le condizioni di preparazione dei liposomi sono state ottimizzate per tener conto dei parametri che influiscono sulla stabilità chimica (deaminazione, idrolisi, B-eliminazione, ponti disolfuri) e fisica (denaturazione, precipitazione, aggregazione) del materiale proteico.

Secondo una realizzazione preferita i liposomi sono preparati come descritto in Perugini et al. J. Controlled Release, 2005, 102: 181-190,

disciogliendo le componenti lipidiche, preferibilmente fosfolipidi e colesterolo, in rapporto molare preferibilmente vicino a 1:1, in un solvente organico, preferibilmente cloroformio.

I liposomi utilizzati nell'invenzione hanno preferibilmente la seguente composizione in peso: fosfolipidi (comprendenti preferibilmente fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina o loro derivati e prodotti derivatizzati) tra 60 e 80%, colesterolo tra 20 e 40%. Brevemente i liposomi sono preparati evaporando il solvente organico dalla soluzione contenente i fosfolipidi, preferibilmente a temperatura superiore a 25°C e a pressione ridotta, ancor più preferibilmente a 40° C, per almeno 30'-1 ora, quindi i liposomi sono trattati con un flusso di azoto a 0,01 atm per almeno 30' (1 ora). Il film lipidico è successivamente idratato, (per 1 ora a temperatura ambiente), con una soluzione tampone, preferibilmente di tampone tris pH 8 contenente un agente riducente, ad es. glutatione 0,1 mM, e manganese cloruro 1,2 mM (TMG) e l'enzima prolidasi in concentrazioni 0.1-5 mg proteina/ml, più preferibilmente 0,2- 1 mg proteina/ml ed albumina serica bovina (BSA) in concentrazione inferiore o uguale al 2%, preferibilmente inferiore all'1%, ancor più preferibilmente in concentrazione dello 0,5% (p/v). Opzionalmente i liposomi sono purificati ad es. mediante centrifugazione preferibilmente effettuata a 16400 rpm, 15°C, per 20 minuti.

Nei liposomi dell'invenzione insieme con il colesterolo, possono essere utilizzati sfingolipidi in alternativa ai fosfolipidi (ceramidi).

Tuttavia, secondo una realizzazione preferita, i liposomi sono costituiti

da fosfolipidi, colesterolo e distearoilfosfatidilcolina derivatizzata con polietilenglicole di massa molecolare compresa tra 1000 e 7500 Dalton o preferibilmente compresa tra 1000 e 5000D, ancor più preferibilmente compresa tra 1500 e 3000D o 2000 D.

La distearoilfosfatidilcolina derivatizzata con polietilenglicole, cioè in cui il polietilenglicole è legato covalentemente alle molecole di fosfolipide, nella formulazione dei liposomi porta a modificazione della membrana liposomiale dando origine ad una classe di liposomi chiamati "*stealth*". Questi liposomi risultano invisibili alle cellule del sistema immunitario riuscendo a rimanere in circolo per un tempo molto più lungo dei liposomi convenzionali, e pertanto riuscendo a direzionarsi meglio nei distretti d'azione. L'effetto principale di queste molecole è quello di creare una nube idrofilica intorno al liposoma per ridurre la captazione da parte delle cellule del sistema RES. Pertanto tale realizzazione di liposomi *stealth* nella medicazione è particolarmente preferita. Secondo quest'ultima realizzazione i liposomi hanno la seguente composizione in peso: fosfolipidi (fosfatidilcolina fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina) in rapporti molari variabili e corrispondenti a concentrazioni in peso comprese tra il 25 e 70 %, colesterolo tra 10 ed 25%, distearoilfosfatidilcolina derivatizzata con polietilenglicole tra 20 e 50%.

La veicolazione di proteine ad attività farmacologica attraverso i liposomi è una tecnica nota, che offre i seguenti vantaggi: i liposomi stabilizzano il principio attivo, ne permettono la cessione protratta nel tempo e veicolano il principio attivo nella cellula con un meccanismo di fusione con le membrane cellulari. Oltre alla proteina farmacologicamente attiva,

all'interno del liposoma possono essere veicolati eccipienti, diluenti o stabilizzatori, o proteine senza attività farmacologica (es. albumina serica), possono inoltre essere presenti diluenti e/o eccipienti o ioni, in un sistema tampone che viene incluso nel liposoma insieme con il principio attivo mediante idratazione dei liposomi. Nel caso dell'enzima prolidasi il sistema tampone è preferibilmente Tris.

Secondo una realizzazione preferita, nella medicazione interattiva l'enzima prolidasi è in concentrazione non inferiore a $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ di supporto, più preferibilmente compresa tra 5 e $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, con un'attività enzimatica non inferiore a $3 \text{ UI}/\text{cm}^2$ o più preferibilmente compresa tra 2,5 e $15 \text{ UI}/\text{cm}^2$ (UI, 1 Unità Internazionale è definita come la quantità di enzima che idrolizza $1 \mu\text{mole}$ di Gly-Pro in 1 minuto a 37°C).

Il sistema terapeutico finito può essere liofilizzato, presentandosi in questo caso come sistema solido, mentre nel caso in cui il sistema terapeutico non venga liofilizzato, è in formulazione idratata. Nel caso in cui la medicazione debba essere sterile, ad esempio per l'applicazione su ulcere aperte, la sterilizzazione avviene mediante produzione in asepsi utilizzando materie prime sterili e liposomi sterilizzati mediante filtrazione.

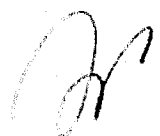
L'associazione dell'idrogel con sistemi liposomiali nella medicazione interattiva dell'invenzione permette il rilascio sito specifico e prolungato nel tempo di sostanze attive, tramite trasferimento intracellulare del liposoma e quindi del farmaco o enzima incapsulato. I liposomi, oltre ad agire come forma di deposito, proteggono l'enzima da degradazione e ne preservano l'attività. La presenza dell'idrogelo è inoltre indispensabile

per mantenere umidificata l'ulcera evitando la formazione di croste ed accelerando quindi la guarigione.

Il sistema terapeutico proposto che risulta quindi costituito dalla combinazione di idrogelo e liposomi è finalizzato al trattamento, nell'uomo e in mammiferi di patologie dermatologiche che si presentano preferibilmente con ulcere epiteliali. Tale sistema raggiunge i seguenti obiettivi:

- è in grado di veicolare sostanze proteiche con attività farmacologica, mantenendo inalterata la loro attività e stabilizzandole;
- è in grado di cedere le sostanze proteiche, in esso veicolate, in concentrazioni terapeutiche direttamente a livello cellulare;
- ottimizza la penetrazione del principio attivo nella cellula,
- mantiene l'ambiente della riparazione tissutale umidificato.

Secondo un ulteriore aspetto l'invenzione riguarda il procedimento per preparare tale medicazioni, mediante preparazione degli idrogeli contenenti i liposomi, che si attua miscelando a freddo una soluzione contenente il polimero, preferibilmente chitosano e/o i suoi sali o derivati, in concentrazione compresa tra 0,5-2% p/p, con una sospensione di liposomi in concentrazione comprese tra 0,2 mg/ml e 1,2 mg/ml, più preferibilmente tra 0,3 e 0,9 mg/ml. Tale miscela viene suddivisa mediante colatura o spalmatura su un supporto solido, in modo tale che la concentrazione finale della sospensione di liposomi nell'idrogelo non sia inferiore a 0,4 μmol lipidi/mg polimero e non sia mai superiore a 10 μmol lipidi/mg polimero o meglio sia compresa tra 0,5 e 2 μmol lipidi/mg



polimero o ancor più preferibilmente con una concentrazione delle vescicole tra 0,4 e 1,25 μ mol di lipidi/mg di polimero che risulta ottimale per la stabilizzazione del prodotto finito.

Secondo un aspetto preferito i liposomi sono preparati con la metodica dell'idratazione del film lipidico seguita da un processo di estrusione. L'idratazione viene condotta preferibilmente in condizioni di temperatura non superiori a 45°C per tempi compresi tra 30' e 2 ore, più preferibilmente 1 ora. Buffer preferito per l'idratazione dei liposomi in presenza dell'enzima prolidasi, è una soluzione tampone Tris a pH 8 contenente glutatione 0,1 mM e manganese cloruro 1,2 mM (TMG).

La fase di estrusione che permette di ottenere liposomi unilamellari di dimensioni desiderate può essere eseguita utilizzando filtri di policarbonato con porosità differenti che possono essere 50, 100, 200 nm, preferibilmente 100 nm. E' indispensabile utilizzare il flusso d'azoto ad una pressione non superiore a 5 atmosfere.

Il metodo comprende inoltre una eventuale liofilizzazione della medicazione finita.

La medicazione interattiva proposta è finalizzata all'applicazione locale preferibilmente su ulcere aperte: il supporto facilita l'applicazione del sistema, il gel bioadesivo ottimizza la permanenza del sistema in loco e serve come veicolo per i liposomi. I liposomi sono il veicolo del principio attivo, lo stabilizzano, permettono la sua cessione in modo prolungato nel tempo e veicolano il principio attivo nella cellula con un meccanismo di fusione con le membrane cellulari. Secondo quanto determinato per la realizzazione specifica della prolidasi, la medicazione preparata secondo

l'invenzione è in grado di cedere prolidasi attiva per almeno 6 giorni.

La medicazione interattiva proposta è finalizzata a terapie di malattie dermatologiche, come ad esempio nel caso di ulcere che si formano negli individui affetti da deficienza di prolidasi.

Oltre a questo tipo di applicazione la medicazione può essere utilizzata per il trattamento umido delle ferite con alterata tendenza alla guarigione (piaghe da decubito, ulcere venose) o per trattamenti cosmetici quali per esempio peeling enzimatico profondo per il trattamento dell'acne. Nel caso dei trattamenti cosmetici citati la medicazione può veicolare come sostanza attiva per esempio lipasi e amilasi per il *peeling*, collagenasi per il trattamento dei cheloidi. Nel caso di altri trattamenti farmacologici, la medicazione può veicolare fattori di crescita con azione cicatrizzante.

Secondo un suo ulteriore aspetto l'invenzione riguarda l'uso di liposomi contenenti l'enzima prolidasi per la preparazione di medicazioni in cui tali liposomi sono presenti in un idrogel, preferibilmente costituito da polimeri di natura polisaccaridica o proteica, da polimeri acrilici o da composti poliossidrilici ad alto peso molecolare. Secondo una realizzazione preferita il polimero di natura polisaccaridica è selezionato nel gruppo consistente di: cellulosa e i suoi derivati, alginati o derivati, pectina o derivati, chitosano o i suoi derivati, condroitino o derivati, condroitin-solfato, gomme vegetali o derivati.

PARTE SPERIMENTALE

Esempio 1. Preparazione dei liposomi

La soluzione cloroformica di lipidi, contenente fosfatidilcolina (EPC)

0,013 mM, colesterolo (Chol) 0,013 mM e distearoilfosfatidilcolina derivatizzata con polietilenglicole 2000 (DSPE-PEG) 0,0026 mM, fu tirata a secco in evaporatore rotante a 40° C e a pressione ridotta, per 1 ora, con velocità di rotazione di 110 rpm, seguita da un trattamento di un flusso di azoto a 0,01 atm per 1 ora.

L'idratazione del film lipidico fu effettuata, per 1 ora a temperatura ambiente, con una soluzione di tampone tris pH 8 contenente glutatione 0,1 mM, e manganese cloruro 1,2 mM (TMG) contenente prolidasi in concentrazioni 0,266 - 1,064 mg proteina/ml e albumina serica bovina (BSA) allo 0,5 %. La purificazione dei liposomi fu effettuata mediante centrifugazione a 16400 rpm, 15°C, per 20 minuti.

Infine, la sospensione fu sottoposta a 10 cicli di estrusione attraverso una membrana di policarbonato da 0,1 µm, in estrusore, utilizzando un flusso di azoto alla pressione di 5-6 atmosfere.

I liposomi estrusi, unilamellari e di dimensioni omogenee, furono filtrati sterilmente su membrana millex 0,22 µm e raccolti in una provetta batteriologica per garantirne la sterilità.

Con lo stesso procedimento furono preparati anche liposomi placebo con la stessa composizione dei liposomi descritti ma non contenenti l'enzima prolidasi.

I liposomi furono caratterizzati per morfologia mediante analisi al microscopio elettronico a trasmissione e per dimensioni mediante analisi con apparecchio a diffrazione di luce. Inoltre, i liposomi furono caratterizzati per contenuto di lipidi, mediante analisi HPLC, per contenuto di proteina totale mediante analisi spettrofotometrica e, nel

caso dei liposomi contenenti prolidasi, fu determinata mediante HPLC la quantità di enzima attivo incapsulato.

Si ottennero liposomi omogenei per forma e dimensioni (Fig. 1), con dimensioni pari a: d_{50} 0,122 μ , d_{90} 0,144 μ . La resa di produzione in termini di lipidi era sempre superiore al 60%, il contenuto di proteina totale e di proteina attiva variava in relazione al rapporto teorico p/p prolidasi/BSA utilizzato per la preparazione dei liposomi. I risultati migliori si ottennero per i liposomi costituiti da un rapporto teorico di prolidasi/BSA 1:5 (lotto a) che risultarono avere un contenuto di proteina pari a 167,69 μ g/ μ mol di lipidi, efficienza di incapsulazione della proteina pari a 72,08 % ed un'attività enzimatica pari a 8,67 unità/ μ mol di lipidi, dove 1 unità è definita come la quantità di enzima che idrolizza 1 μ mole di Gly-Pro in 1 ora a 37 °C.

I liposomi ottenuti si mostrarono con buone caratteristiche morfologiche per forma, dimensioni, e caricamento. La metodica di preparazione risultò vantaggiosa in quanto non veniva modificata negativamente la stabilità della proteina veicolata ed in quanto facilmente trasferibile su scala industriale.

Esempio 2. Preparazione della medicazione interattiva

Il polimero gelificante chitosano glutammato fu disciolto in acqua alla concentrazione del 1,5% a freddo sotto agitazione magnetica e la soluzione ottenuta fu sterilizzata in autoclave prima dell'uso.

I liposomi preparati come spiegato nell'esempio 1 furono dispersi in una sospensione ad una concentrazione 0.315mg/ml e quindi le due soluzioni miscelate. La sospensione liposomiale in chitosano fu

suddivisa su porzioni di garza di tnt in modo da ottenere una concentrazione finale di sospensione pari a $1,5 \text{ mg/cm}^2$; le garze così preparate furono sottoposte a liofilizzazione prima dell'uso.

Con lo stesso procedimento e utilizzando le medesime concentrazioni si prepararono delle garze in tnt contenenti sospensioni liposomiali in idrossietilcellulosa ad alta viscosità. Le garze così preparate furono sottoposte a liofilizzazione prima dell'uso.

Si valutò l'omogeneità di distribuzione della proteina all'interno della garza. Aree di $1,5 \text{ cm}^2$ di garza furono sezionate e analizzate separatamente per contenuto di proteina, dopo contatto con una soluzione di Triton TX 100 al 1% in tampone TRIS. La quantità di proteina fu determinata mediante analisi spettrofotometrica a 562 nm sfruttando la reazione colorimetrica che avviene con l'acido Bicinconinico (BCA protein assay).

I risultati evidenziarono una concentrazione media in proteina pari a $9 \pm 1 \mu\text{g/cm}^2$.

La medicazione interattiva risultò omogenea come morfologia, spessore e distribuzione della proteina.

Esempio 3. Valutazione della tossicità dei materiali costituenti la medicazione interattiva su colture di fibroblasti.

I liposomi placebo in concentrazioni variabili da 0,4 a $12 \mu\text{mol}$ di lipidi/ml, furono incubati con fibroblasti ottenuti da biopsia cutanea di pazienti affetti da deficienza da prolidasi. Le cellule furono fatte crescere in piastre di Petri di $3,5 \text{ cm}^2$ di diametro a cui si aggiunse il medium Dulbecco modified Eagle's (DMEM).

Dopo 5 e 10 giorni di incubazione con i liposomi a diversa concentrazione, le cellule furono tripsinate, centrifugate e risospese in una piccola aliquota di medium (circa 2 ml). La sospensione fu utilizzata per contare il numero di cellule mediante la camera di Neubauer.

La valutazione della crescita cellulare in funzione della concentrazione dei polimeri (chitosano o idrossietilcellulosa) a contatto con i fibroblasti fu saggiata tramite test della vitalità cellulare che utilizza il metiltiazolidifenil-tetrazolio bromuro (MTT) come agente rivelatore della vitalità cellulare.

Relativamente ai liposomi, i migliori risultati furono ottenuti per intervalli di concentrazione delle vescicole tra 0,4 e 1,25 μmol di lipidi/ml.

I risultati relativi al test di vitalità cellulare condotto sui polimeri evidenziarono che la concentrazione massima tollerata di idrossietilcellulosa era pari a 140 $\mu\text{g}/10000$ cellule, e pari a 15 $\mu\text{g}/10000$ cellule per il derivato del chitosano utilizzato in questo studio.

I risultati ottenuti permisero di determinare le concentrazioni dei singoli materiali utilizzabili per l'allestimento della medicazione interattiva. Tali concentrazioni erano confrontabili a quelle prevedibili in una medicazione di diametro pari a 10 cm.

Esempio 4. Valutazione ex-vivo dell'attività prolidasica su colture di fibroblasti.

I fibroblasti ottenuti da biopsia cutanea di pazienti affetti da deficienza da prolidasi (PD) furono distribuiti in apposite fiasche per coltura a cui si aggiunse il medium Dulbecco modified Eagle's (DMEM).

Per ogni esperimento si predisposero serie di colture di fibroblasti,

provenienti da pazienti affetti da PD: una fu trattata con campioni contenenti liposomi caricati con prolidasi (serie A), una fu incubata con campioni di medicazioni a base di gel di chitosano contenenti liposomi caricati con prolidasi (serie A₁), una fu incubata con campioni di medicazioni a base di gel di idrossietilcellulosa contenenti liposomi caricati con prolidasi (serie A₂), mentre l'altra, non trattata, costituì il controllo (serie B).

Dopo 24 ore il medium iniziale fu sostituito rispettivamente da: DMEM contenente l'1 % del sostituto del siero ITS+3 per la serie B; e dallo stesso medium contenente anche i campioni con prolidasi per le serie A, A₁ e A₂.

Con questo procedimento furono allestite 12 colture cellulari 4 per la serie A, 4 per la serie A₁, 4 per la serie A₂, e 4 per la B, con tempi di incubazione diversi rispettivamente dalle 24 ore ai 10 giorni per la serie A e B, 6 giorni per le serie A₁ e A₂.

A tempi determinati il medium fu rimosso, le piastre furono lavate con tampone PBS per eliminare le tracce del terreno di coltura. Il tampone PBS di lavaggio fu utilizzato per l'analisi dell'attività prolidasica, che fu determinata mediante analisi con elettroforesi capillare.

Agli stessi tempi i fibroblasti furono trattati con una soluzione di PBS, contenente KCl, inibitori di proteasi, TX-100; sottoposti ad agitazione per 30 minuti a temperatura ambiente; denaturati a 80° C per 15 minuti e centrifugati per 30 minuti a 8000 rpm, 4° C. Il surnatante fu concentrato attraverso un sistema filtrante microcon 3000, per 5 minuti, a 5000 rpm e temperatura ambiente, e costituiva l'estratto cellulare su cui fu

determinata l'attività prolidasica mediante elettroforesi capillare.

La massima attività enzimatica si rilevò dopo 6 giorni, ma ancora dopo 10 giorni residuava circa il 30 % di attività enzimatica. I risultati relativi alla determinazione quantitativa dell'attività prolidasica nei fibroblasti dopo 6 giorni di incubazione con liposomi contenenti prolidasi o con le medicazioni contenenti i liposomi veicolati in un gel di chitosano o di cellulosa, sono riportati in Tabella 1.

Non si rilevò alcuna attività enzimatica nel medium di coltura.

Negli estratti cellulari si determinò un'attività enzimatica molto elevata, corrispondente a tutta la proteina attiva caricata nei liposomi.

Questo risultato, abbinato all'assenza di attività enzimatica riscontrata nel medium cellulare, permette di concludere che la prolidasi entra in forma attiva nei fibroblasti.

L'analisi SEM (Figura 2) confermò questo risultato: si evidenziò un processo di fusione delle vescicole liposomiali con le membrane dei fibroblasti che poteva essere responsabile del trasferimento dell'enzima all'interno delle cellule.

Tabella 1 – Attività enzimatica determinata in estratti cellulari dopo 6 giorni di incubazione con liposomi contenenti prolidasi, medicazione interattiva a base di chitosano, medicazione interattiva a base di etilcellulosa.

	Attività enzimatica (unità)*
Controlli (1)	4,12 ± 0,4
Fibroblasti P.D. (2)	N.D.
Serie A (3)	3,70 ± 0,37
Serie A ₁ (4)	3,30 ± 0,16
Serie A ₂ (5)	2,88 ± 0,14

(1) Fibroblasti sani, valore medio calcolato su 20 determinazioni

(2) Fibroblasti di pazienti affetti da Prolidase Deficiency (P.D.), valore medio calcolato su 7 determinazioni.

(3) Fibroblasti PD + liposomi contenenti prolidasi, valore medio calcolato su 7 determinazioni.

(4) Fibroblasti P.D. + medicazione interattiva a base di chitosano, valore medio calcolato su 3 determinazioni.

(5) Fibroblasti P.D. + medicazione interattiva a base di etilcellulosa, valore medio calcolato su 3 determinazioni.

*1 unità è definita come la quantità di enzima che idrolizza 1µmole di Gly-Pro in 1 ora a 37 °C

I risultati evidenziarono che le medicazioni interattive oggetto della presente invenzione furono in grado di trasferire l'enzima attivo all'interno dei fibroblasti carenti dell'enzima. In particolare i risultati migliori si ottennero utilizzando come polimero il chitosano che sembra il più indicato per veicolare i liposomi mantenendo l'attività prolidasica praticamente inalterata.

Venne inoltre osservato, quale ulteriore segnale dell'efficienza del trasferimento del principio attivo, che i fibroblasti malati dopo contatto con la medicazione interattiva, riassumevano il loro aspetto normale, indice di una ripresa attività cellulare.

RIVENDICAZIONI

1) Medicazione interattiva comprendente:

- a) un supporto,
- b) un idrogelo veicolante costituito da polimeri di natura polisaccaridica o proteica, da polimeri acrilici, da composti poliossidrilici ad alto peso molecolare,
- c) liposomi contenenti un principio attivo consistente in uno o più enzimi o fattori di crescita.

2) Medicazione secondo la rivendicazione 1 dove tale supporto a) è costituito da garza, tessuto, tessuto non tessuto.

3) Medicazione secondo la rivendicazione 2 dove tale supporto è di cotone o cellulosa.

4) Medicazione secondo la rivendicazione 1 dove liposomi c) contengono un enzima selezionato tra: prolidasi, collagenasi, ialuronidasi, fattori di crescita, lipasi, amilasi.

5) Medicazione secondo la rivendicazione 4, dove tale enzima è prolidasi.

6) Medicazione secondo le rivendicazioni 1-5 dove l'idrogelo b) di natura polisaccaridica è selezionato nel gruppo consistente di: cellulosa e i suoi derivati, alginati o derivati, pectina o derivati, chitosano o i suoi derivati, condroitino o derivati, condroitin-solfato, gomme vegetali o derivati.

7) Medicazione secondo la rivendicazione 6 dove l'idrogelo è chitosano e/o i suoi sali o derivati.

8) Medicazione secondo la rivendicazione 1 dove l'idrogelo di natura



proteica è gelatina.

9) Medicazione secondo la rivendicazione 1 dove l'idrogelo di natura acrilica è un acido poliacrilico o un polimetacrilato.

10) Medicazione secondo la rivendicazione 1 dove tali composti poliossidrilici ad alto peso molecolare sono selezionati tra polialchilenglicole o derivati, polivinil-pirrolidone o derivati.

11) Medicazione secondo le rivendicazioni 1-10 dove tali liposomi c) comprendono lipidi selezionati tra: fosfolipidi o loro derivati, fosfolipidi derivatizzati con polietilen-glicole e/o sfingolipidi (ceramidi) e/o colesterolo.

12) Medicazione secondo la rivendicazione 11 dove i liposomi comprendono fosfolipidi in percentuale da 60 - 80 % e colesterolo da 20 a 40%.

13) Medicazione secondo la rivendicazione 11-12 dove tali fosfolipidi sono selezionati nel gruppo di fosfatidilcolina e/o fosfatidilserina e/o fosfatidiletanolamina o loro derivati ed in cui un fosfolipide è derivatizzato con polietilenglicole.

14) Medicazione secondo la rivendicazione 13 dove il polietilenglicole è di massa molecolare compresa tra 1000 e 7500 Dalton o preferibilmente compresa tra 1000 e 5000D, ancor più preferibilmente di 2000 D.

15) Medicazione secondo la rivendicazione 14 in cui il fosfolipide derivatizzato con polietilenglicole è distearoilfosfatidilcolina.

16) Medicazione secondo la rivendicazione 5 e 11-15 dove il principio attivo contenuto nei liposomi è in una soluzione acquosa.

17) Medicazione secondo la rivendicazione 16 dove tale soluzione acquosa è una soluzione tampone Tris (tris(idrossimetilammino metano) a pH superiore o uguale a 7.

18) Medicazione secondo la rivendicazione 17 dove tale soluzione tampone comprende inoltre glutatione e manganese cloruro.

19) Medicazione secondo le rivendicazioni 13-18 dove i liposomi hanno la seguente composizione in peso: fosfolipidi (fosfatidilcolina fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina in rapporti in peso compresi tra 25 e 70 %, colesterolo tra 10 e 25%, distearoilfosfatidilcolina derivatizzata con polietilenglicole tra 20 e 50%.

20) Medicazione secondo le rivendicazioni 5 e 13-21 comprendente quale enzima o fattore di crescita l'enzima prolidasi in concentrazione non inferiore a $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ e con attività non inferiore a $2.5 \text{ UI}/\text{cm}^2$ di supporto.

21) Medicazione secondo la rivendicazione 22 dove la concentrazione di tale enzima è compresa tra 5 e $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ di supporto e dove l'attività enzimatica è compresa tra 3 e $15 \text{ UI}/\text{cm}^2$ di supporto.

22) Medicazione secondo le rivendicazioni 1- 21 in forma liofilizzata.

23) Medicazione secondo le rivendicazioni 1- 22 in forma sterile.

24) Metodo per la preparazione di medicazioni interattive secondo le rivendicazioni 1-21 , comprendente:

i) preparazione di una sospensione di liposomi in concentrazione compresa compresa tra 0,2 mg/ml e 1,2 mg/ml, più preferibilmente tra 0,3 e 0,9 mg/ml, e di una soluzione di un polimero di natura polisaccaridica

- ii) opzionale sterilizzazione della sospensione di liposomi mediante filtrazione;
 - iii) miscelazione della sospensione di liposomi con la soluzione comprendente il polimero di natura polisaccaridica
 - iv) colatura o distribuzione della miscela su un supporto solido,
 - v) asciugatura e gelificazione della miscela,
 - vi) opzionale liofilizzazione e/o sterilizzazione.
- 25) Metodo secondo la rivendicazione 24 dove tale polimero di natura polisaccaridica è il chitosano e/o i suoi sali o derivati.
- 26) Metodo secondo la rivendicazione 24-25 dove la miscelazione al punto iii) avviene a freddo.
- 27) Metodo secondo la rivendicazione 24 dove i liposomi di utilizzo nella soluzione al punto i) del procedimento sono preparati mediante idratazione del film lipidico seguita da un processo di estrusione.
- 28) Metodo secondo la rivendicazione 27 dove tale idratazione viene condotta in condizioni di temperatura non superiori a 45°C per tempi compresi tra 30' e 2 ore.
- 29) Metodo secondo le rivendicazioni 24-28 dove la preparazione di liposomi è effettuata mediante dissolvimento della componente lipidica in un solvente organico, evaporazione del solvente, trattamento con un flusso di azoto, idratazione in una soluzione tampone comprendente un enzima e/o un principio attivo
- 30) Metodo secondo la rivendicazione 29 dove tale enzima è la prolidasi e l'idratazione avviene in una soluzione comprendente 0.1-5 mg/ml prolidasi ed albumina serica bovina (BSA) in concentrazione



inferiore al 2% (p/v) e dove la soluzione comprende inoltre agenti riducenti.

31) Metodo secondo le rivendicazioni 24-30 dove l'estrusione dei liposomi avviene con filtri di policarbonato di porosità compresa tra 50, 100, 200 nm, preferibilmente 100 nm, in flusso di azoto ad una pressione non superiore a 5 atmosfere.

32) Metodo secondo le rivendicazioni 24 - 31 dove la miscela risultante al punto iii) ha concentrazione finale di liposomi nell'idrogelo compresa tra 0.4 μmol e 10 μmol lipidi/mg polimero, ancor più preferibilmente tra 0,5 e 2 μmol lipidi/mg polimero.

33) Metodo secondo le rivendicazioni 24-31 dove i passaggi a)-e) sono effettuati in condizioni asettiche.

34) Medicazione secondo le rivendicazioni 5-23 per il trattamento di ulcere.

35) Medicazione secondo la rivendicazione 33 in individui affetti da deficienza di prolidasi.

36) Medicazione secondo le rivendicazioni 1-4 per uso cosmetico.

37) Uso della medicazione secondo le rivendicazioni 1-23 per applicazione topica.

38) Uso cosmetico della medicazione secondo le rivendicazioni 1-23.

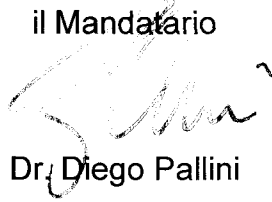
39) Uso di liposomi comprendenti l'enzima prolidasi in combinazione con un idrogelo veicolante costituito da polimeri di natura polisaccaridica, polimeri acrilici, proteine o composti poliossidrilici ad alto peso molecolare per la preparazione di medicazioni per uso topico.

(SM/pd)

Milano, 24 Marzo 2006

p. UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PAVIA

il Mandatario



Dr. Diego Pallini

NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.

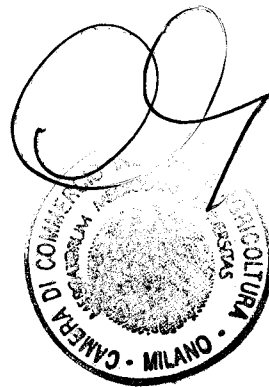
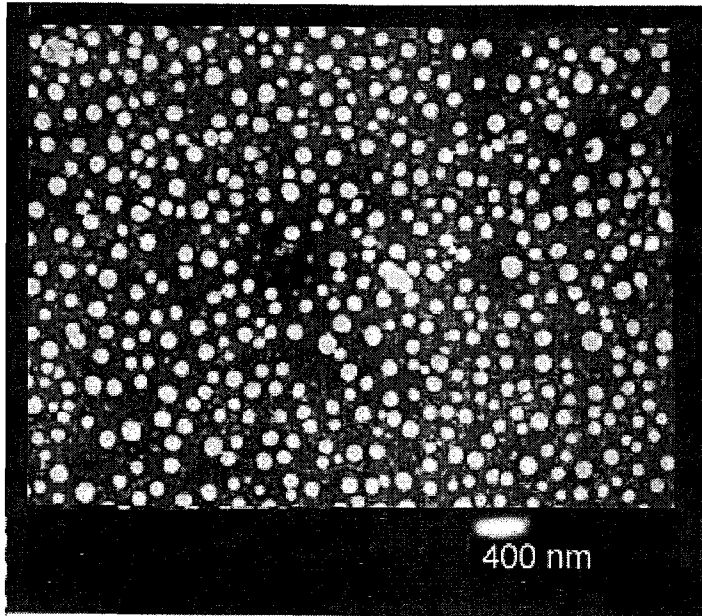




Figura 1



MI 7006A 000556

Figura 2

