

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102012902112287A1

Publication Date

20140619

Applicant

IDEA MEDICAL DEVICES S.R.L.

Title

COMPOSIZIONE A BASE DI POLIDESOSSIRIBONUCLEOTIDI E RELATIVI
USI

Descrizione dell'invenzione industriale dal titolo:

"Composizione a base di polidesossiribonucleotidi e relativi usi"

Di: Idea Medical Devices srl, nazionalità italiana, Piazza dell'Artigianato, 1/A - 35031 Abano Terme (PD), Italia

Inventori designati: Oscar Marco Ornaghi, Radames Binotto, Renzo Binotto, Valerio Vallana

Depositata il: 19 dicembre 2012

TESTO DELLA DESCRIZIONE**CAMPO DELL'INVENZIONE**

La presente descrizione concerne una composizione a base di polidesossiribonucleotidi (PDRN) in grado di stimolare la proliferazione cellulare.

SFONDO TECNOLOGICO

Sostanze e composizioni in grado di stimolare la proliferazione cellulare sono oggetto di grande interesse nell'ambito della medicina rigenerativa.

Tali composizioni trovano applicazione, ad esempio, nel trattamento di lacerazioni dovute ad eventi traumatici o di lesioni determinate da interventi chirurgici.

Sono note diverse classi di sostanze in grado di favorire la crescita di cellule attive nella rigenerazione tissutale quali ad esempio l'acido ialuronico, l'acido polilattico, acidi nucleici, frazioni di acidi nucleici quali polidesossiribonucleotidi (PDRN).

In particolare, PDRN sono impiegati nella chirurgia plastica grazie alla loro capacità di stimolare il metabolismo di fibroblasti così come la produzione di componenti della matrice del derma.

I PDRN sono inoltre in grado di favorire l'angiogenesi nel trattamento di ferite ed ustioni, di accelerare la cicatrizzazione di micro-lesioni cutanee e la produzione di citochine e fattori di crescita.

E' noto anche l'utilizzo di composizioni a base di acido desossiribonucleico (DNA) estratto ad esempio dal tessuto delle gonadi di storione e salificato come sale bisodico con ottenimento di PDRN-Na.

Oltre a trovare applicazione in patologie derivanti da un deficit funzionale dei processi immunitari, PDRN-Na presentano una capacità immunomodulante che consente il controllo delle infiammazioni ottimizzando la ricrescita tissutale.

Nonostante siano già note sostanze capaci di stimolare la rigenerazione tissutale è di notevole interesse identificare nuove sostanze o composizioni in grado di migliorare la capacità proliferativa cellulare da impiegarsi nelle più diverse applicazioni della medicina rigenerativa quali ad esempio nella chirurgia plastica, nel trattamento di complicanze post-operatorie, nel trattamento delle ustioni, delle piaghe correlate al piede diabetico, delle piaghe da decubito, delle ferite aperte sottoposte a radioterapia con difficoltà di cicatrizzazione, delle manifestazioni psoriasiche.

SOMMARIO DELL' INVENZIONE

Lo scopo della presente descrizione è quello di realizzare una composizione capace di migliorare ulteriormente la stimolazione della proliferazione cellulare attraverso gli effetti sinergici esercitati dai suoi componenti.

In accordo con l'invenzione, il suddetto scopo è

ottenuto grazie alla soluzione specificatamente richiamata nelle rivendicazioni allegate, che costituiscono parte integrale della presente descrizione.

Una forma di realizzazione della presente descrizione concerne una composizione comprendente polidesossiribonucleotidi (PDRN) e chitosano.

I PDRN possono essere impiegati sottoforma di sali.

I risultati riportati nel seguito mostrano che la presenza di chitosano nella composizione comprendente PDRN, eventualmente salificato, determina un aumento considerevole della proliferazione cellulare rispetto all'impiego di composizioni comprendenti PDRN ma prive di chitosano.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DI ALCUNE FORME DI REALIZZAZIONE

Nella seguente descrizione, vengono riportati numerosi dettagli specifici per permettere una completa comprensione delle forme di realizzazione. Le forme di realizzazione possono venire messe in pratica senza uno o più dei dettagli specifici, o con altri procedimenti, componenti, materiali, ecc. In altri casi, strutture, materiali, od operazioni ben noti non vengono mostrati o descritti dettagliatamente per evitare di confondere aspetti delle forme di realizzazione.

Il riferimento in tutta la presente descrizione a "una sola forma di realizzazione" o "una forma di realizzazione" indica che un aspetto, una struttura, o una caratteristica particolare descritta relativamente alla forma di realizzazione è inclusa in almeno una forma di realizzazione. Quindi, le forme delle espressioni "in una sola forma di realizzazione" o "in una forma di realizzazione" che compaiono in vari punti in tutta la

presente descrizione non si riferiscono necessariamente tutte alla stessa forma di realizzazione. Inoltre, gli aspetti, le strutture, o le caratteristiche particolari possono venire combinati in qualsiasi modo adatto in una o più forme di realizzazione.

I titoli qui forniti sono riportati solo a scopo di convenienza e non interpretano il campo o il significato delle forme di realizzazione.

Mentre le forme di attuazione esemplificative descritte in dettaglio nel seguito fanno riferimento in via primaria all'uso delle composizioni qui descritte in relazione alla proliferazione di fibroblasti, si comprenderà che l'ambito di questa descrizione non è in alcun modo limitato a tale uso prospettato, dal momento che le composizioni qui descritte possono essere utilizzate in relazione a qualunque tipo cellulare quale, ad esempio, cheratinociti, cellule endoteliali, osteoblasti.

La presente descrizione concerne una composizione comprendente polidesossiribonucleotidi (PDRN) e chitosano.

I PDRN possono essere impiegati sottoforma di sali quali ad esempio sali di sodio, ferro, cromo, magnesio, manganese e altri.

Il chitosano è un derivato deacetilato della chitina, comunemente estratto dal guscio di crostacei e dalla parete cellulare dei funghi.

Il chitosano utilizzabile nella composizione oggetto della presente descrizione ha un peso molecolare compreso tra 250 e 1 MDa, preferibilmente pari a 1MDa.

La composizione comprende PDRN o relativi sali in una quantità compresa tra 20 e 2500 µg/ml, preferibilmente pari a 80 µg/ml e chitosano in una quantità compresa tra 1 e 10% p/v, preferibilmente pari a 3% p/v.

Per via della sinergia tra gli effetti esercitati dai PDRN e dal chitosano la composizione qui descritta comporta un notevole aumento della proliferazione cellulare, come di seguito dimostrato.

La composizione può essere ottenuta mediante un procedimento che prevede le seguenti operazioni:

- preparare una prima soluzione contenente PDRN o relativi sali;
- preparare una seconda soluzione contenente chitosano;
- mescolare la prima soluzione e la seconda soluzione ad ottenere la composizione in forma liquida,
- opzionalmente lasciare riposare la composizione per un periodo di tempo compreso tra 8 e 24 ore, preferibilmente pari a 16 ore così da ottenere al termine una dispersione.

La prima soluzione comprende polidesossiribonucleotidi in una quantità compresa tra 15 e 50 mg/ml, preferibilmente pari a 25 mg/ml.

La seconda soluzione comprende chitosano in una quantità compresa tra 1 e 10% p/v, preferibilmente pari a 6% p/v.

La composizione ottenuta comprende PDRN o relativi sali in una quantità compresa tra 20 e 2500 µg/ml, preferibilmente pari a 80 µg/ml e chitosano in una quantità compresa tra 1 e 10% p/v, preferibilmente pari a 3% p/v.

La forma fisica (soluzione liquida o dispersione) in cui può presentarsi la composizione descritta dipende delle condizioni operative adottate durante la preparazione (quali, ad esempio, pH, temperatura, intervallo temporale in cui la composizione è lasciata riposare, ecc.).

La composizione può inoltre essere realizzata ad

esempio sottoforma di crema, unguento, gel, sospensione o soluzione, la soluzione essendo adatta a essere somministrata per via iniettabile o spray, oppure come prodotto liofilizzato da ricostituire, prima dell'uso, con acqua o altri opportuni veicoli.

Tale composizione potrà contenere eccipienti e/o carrier adatti al tipo di somministrazione scelto quali ad esempio conservanti, addensanti, antiossidanti, emollienti, agenti idratanti, profumi naturali o artificiali.

La composizione oggetto della presente descrizione potrà essere impiegata come composizione farmaceutica ogni qualvolta sia necessario ottenere un effetto proliferativo cellulare nell'ambito della medicina rigenerativa, come ad esempio nella chirurgia plastica, nel trattamento di complicanze post-operatorie, nel trattamento delle ustioni, delle piaghe correlate al piede diabetico, delle piaghe da decubito, delle ferite aperte sottoposte a radioterapia con difficoltà di cicatrizzazione, delle manifestazioni psoriasiche, nel trattamento delle piaghe ulcerose, per la detersione delle ferite aperte, per la stimolazione della granulazione, per la stimolazione del microclima dermale per la rigenerazione tissutale.

La composizione oggetto della presente descrizione troverà inoltre applicazione anche a livello cosmetico, ad esempio per il trattamento di cicatrici, cheloidi, smagliature, cellulite, rughe e per il ripristino in generale delle caratteristiche ottimali dell'epitelio.

Nel seguito verranno descritte in dettaglio diverse forme di attuazione preferite della presente invenzione che fanno riferimento all'impiego di PDRN sottoforma di sale sodico (PDRN-Na).

L'ambito di questa descrizione, tuttavia, non è in

alcun modo limitato all'impiego di PDRN-Na, in quanto le condizioni operative riportate negli Esempi che seguono possono essere applicate allo stesso modo per la preparazione di composizioni comprendenti PDRN in forma neutra o in forma di altri sali quali, ad esempio, sali di sodio, ferro, cromo, magnesio, manganese e altri.

Esempio 1. Effetto della composizione PDRN-Na e chitosano sulla proliferazione cellulare

PDRN in forma di sale sodico (PDRN-Na, Veritas srl; peso molecolare compreso tra 150 e 500 KDa, preferibilmente pari a circa 350 KDa; ipercromismo >37%; DNA tra 86% e 100%, RNA < 8%; proteine < 0,7%, rapporto azoto/fosforo compreso tra 1,3 e 1,8) sono stati disciolti in Tris 50 mM, pH 7,5 ad ottenere una prima soluzione alla concentrazione di 25 mg/ml.

Chitosano (1 MDa) è stato disciolto in acqua ad ottenere una seconda soluzione al 6% p/v.

Fibroblasti umani (HFF-1, ATCC® No: SCRC-1041™) sono stati utilizzati per gli esperimenti qui descritti.

Il monostrato di fibroblasti umani è stato dissociato mediante incubazione con tripsina e le cellule così ottenute sono state poste in terreno di coltura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; ATCC Catalog No. 30-2002) addizionato di siero fetale bovino (BSA) 10% v/v, penicillina e streptomycin 1% v/v ad una concentrazione di 100.000 cellule/ml.

In un primo set di esperimenti, i fibroblasti (100.000 cellule/ml) sono stati risospesi in terreno di coltura (volume finale 1 ml) addizionato di PDRN-Na (prima soluzione ad una diluizione 1:312,15 tale da ottenere una concentrazione finale di 80 µg/ml) e chitosano (seconda

soluzione ad una diluizione tale da ottenere una concentrazione finale pari a 3% p/v).

In un secondo set di esperimenti, i fibroblasti sono stati risospesi in terreno di coltura (100.000 cellule in un volume finale di 1 ml) senza l'aggiunta di altri composti (esperimento di controllo).

Le cellule sono state quindi seminate su piastre da 96 pozzetti (in un volume finale di 100 µl) e la valutazione della proliferazione cellulare è stata verificata dopo 48 ore mediante saggio MTT.

Il numero di cellule è stato calcolato mediante estrapolazione da una curva di calibrazione allestita parallelamente al saggio.

I dati riportati in Tabella 1 dimostrano che la composizione contenente PDRN-Na addizionata di chitosano determina un aumento significativo del numero di fibroblasti rispetto al numero di fibroblasti coltivati nel solo terreno di coltura (cellule di controllo, CTR).

Tabella 1

	CTR	PDRN-Na + chitosano
	8.682,51	11.692,13
	8.832,99	10.638,77
	8.682,51	10.789,25
MEDIA	8.733,00	11.040,00
ERRORE ST	50,16	328,90

Ogni condizione sperimentale è stata ripetuta in triplicato. I dati riportati rappresentano la media e l'errore standard del numero di fibroblasti analizzati e la significatività è stata calcolata mediante test One-way ANOVA e Newman-Keuls post test ($p < 0,05$).

Esempio 2. Effetto delle composizioni PDRN-Na e PDRN-Na + chitosano sulla proliferazione cellulare

PDRN-Na sono stati disciolti in Tris 50 mM, pH 7,5 in una prima soluzione alla concentrazione di 25 mg/ml.

Chitosano (1 MDa) è stato preparato in una seconda soluzione 6% p/v in acqua.

In un primo set di esperimenti una aliquota della seconda soluzione contenente chitosano è stata aggiunta ad 1 ml di terreno di coltura al fine di ottenere una concentrazione finale di chitosano pari al 3% p/v.

Il terreno di coltura dopo l'aggiunta di chitosano è stato lasciato riposare per 16 ore.

Fibroblasti umani (100.000 cellule/ml) sono stati risospesi nel terreno di coltura addizionato di chitosano.

In un secondo set di esperimenti a 1 ml di terreno di coltura sono state aggiunte:

- una aliquota della prima soluzione contenente PDRN-Na (al fine di ottenere una concentrazione finale pari a 80 µg/ml) e

- una aliquota della seconda soluzione contenente chitosano (al fine di ottenere una concentrazione finale pari a 3% p/v).

Fibroblasti umani (100.000 cellule/ml) sono stati risospesi nel terreno di coltura addizionato di PDRN-Na e chitosano, come descritto sopra, dopo un periodo di 16 ore dalla preparazione dello stesso.

In un terzo set di esperimenti, fibroblasti umani sono stati risospesi in terreno di coltura (100.000 cellule in un volume finale di 1 ml) senza l'aggiunta di altri composti quali esperimenti di controllo.

Ogni condizione sperimentale è stata valutata in triplicato.

I dati riportati in Tabella 2 dimostrano che la composizione contenente PDRN-Na e chitosano determina un aumento significativo ($p < 0,001$) della proliferazione di fibroblasti rispetto ad una composizione di controllo e rispetto ad una composizione contenente solo chitosano.

Tabella 2

	CTR	chitosano	PDRN-Na + chitosano
	12.143,60	28.124,90	89.386,55
	9.923,97	25.461,35	144.877,20
	9.923,75	29.456,68	132.003,40
MEDIA	10.664,00	27.681,00	122.089,00
ERRORE ST	739,90	1.175,00	16.768,00

Esempio 3. Effetto delle composizioni PDRN-Na e PDRN-Na e chitosano depositate su supporto plastico.

L'effetto della composizione comprendente PDRN-Na e chitosano sulla proliferazione di fibroblasti umani è stata valutata a seguito della deposizione della stessa su un supporto plastico su cui le cellule sono state successivamente (16 ore dopo) seminate.

Sono state preparate le seguenti soluzioni:

- prima soluzione di PDRN-Na disciolto in Tris 50 mM, pH 7,5 alla concentrazione di 25 mg/ml,
- seconda soluzione di chitosano 6% p/v in acqua.

Le soluzioni sono state miscelate al fine di ottenere una composizione contenente PDRN-Na alla concentrazione finale di 80 µg/ml e chitosano alla concentrazione finale al 3% p/v.

Cento μ l della soluzione suddetta (PDRN-Na e chitosano) sono stati depositati sul fondo di pozzetti di una piastra di plastica da 96 pozzetti.

Cento μ l di una soluzione contenente PDRN-Na senza chitosano sono stati depositati sul fondo di ulteriori pozzetti.

Cento μ l di una soluzione priva dei componenti suddetti (costituita essenzialmente dal terreno di coltura) sono stati depositati in pozzetti di controllo.

La soluzione depositata in ciascun pozzetto è stata lasciata riposare per 16 ore a temperatura ambiente in una cappa a flusso laminare costante.

Dopo tale intervallo temporale, fibroblasti umani (100.000 cellule/ml) sono stati seminati nei pozzetti e lasciati in incubazione per 48 ore.

Come riportato in Tabella 3, la composizione PDRN-Na e chitosano determina un incremento significativo del numero di fibroblasti pari a 15 volte rispetto al numero di fibroblasti seminati nei pozzetti di controllo ($p < 0,001$) e pari a circa 13 volte rispetto al numero di fibroblasti seminati su pozzetti trattati con solo PDRN-Na ($p < 0,001$).

Tabella 3

	CTR	PDRN-Na	PDRN-Na + chitosano
	7.270,01	9.666,08	103.511,90
	7.270,01	8.867,39	124.677,10
	10.464,77	10.464,77	139.852,20
MEDIA	8.335,00	9.666,00	122.680,00
ERRORE ST	1.065,00	461,10	10.538,00

Esempio 3a. Effetto delle composizioni PDRN-Na e PDRN-Na e chitosano depositate su supporto plastico.

Le condizioni sperimentali descritte nell'Esempio 3 sono state riprodotte nelle medesime condizioni sperimentali ed i risultati sono riportati in Tabella 4.

A conferma di quanto osservato e descritto per l'Esempio 3 la composizione PDRN-Na e chitosano depositata su un supporto e lasciata riposare per un periodo di 16 ore determina un aumento significativo della proliferazione cellulare rispetto a cellule di controllo ($p < 0,001$) e rispetto a una composizione contenente PDRN-Na ma priva di chitosano, come riportato in Tabella 4.

Tabella 4

	CTR	PDRN-Na	PDRN-Na + chitosano
	8.093,22	8.785,73	97.678,65
	5.723,25	11.552,21	95.412,16
	4.733,43	13.041,22	90.879,19
MEDIA	6.183,00	11.126,00	94.657,00
ERRORE ST	996,80	1.247,00	1.999,00

Anche in questi test sperimentali l'analisi è stata ripetuta in triplicato. I dati riportati rappresentano la media e l'errore standard del numero di fibroblasti analizzati e la significatività è stata calcolata mediante test One-way ANOVA e Newman-Keuls post test (GraphPad Prism).

Naturalmente, mentre il principio dell'invenzione rimane il medesimo, i dettagli strutturali e le forme di realizzazione possono ampiamente variare rispetto a quanto è stato descritto ed illustrato semplicemente a titolo di esempio, senza allontanarsi dallo scopo della presente

invenzione come specificato nelle rivendicazioni che seguono.

RIVENDICAZIONI

1. Composizione comprendente polidesossiribonucleotidi (PDRN) e chitosano.

2. Composizione secondo la rivendicazione 1, in cui detti polidesossiribonucleotidi sono presenti sotto forma di sale.

3. Composizione secondo la rivendicazione 2, in cui detto sale è selezionato fra almeno uno di sale di sodio, ferro, cromo, magnesio, manganese.

4. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui detti polidesossiribonucleotidi sono presenti in una quantità compresa tra 20 e 2500 µg/ml, preferibilmente pari a 80 µg/ml.

5. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui detto chitosano è presente in una quantità compresa tra 1 e 10% p/v, preferibilmente pari a 3% p/v.

6. Composizione comprendente polidesossiribonucleotidi (PDRN) e chitosano ottenuta mediante un procedimento che comprende le seguenti operazioni:

- preparare una prima soluzione contenente PDRN;
- preparare una seconda soluzione contenente chitosano;

- mescolare la prima soluzione e la seconda soluzione così da ottenere la composizione in forma liquida.

7. Composizione secondo la rivendicazione 6, in cui il procedimento comprende inoltre l'operazione di lasciare riposare la composizione per un periodo di tempo compreso tra 8 e 24 ore, preferibilmente pari a 16 ore, ottenendo una composizione sottoforma di dispersione.

8. Composizione secondo la rivendicazione 6 o 7, in cui detti polidesossiribonucleotidi sono presenti sotto forma di sale.

9. Composizione secondo la rivendicazione 8, in cui detto sale è selezionato fra almeno uno di sale di sodio, ferro, cromo, magnesio, manganese.

10. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 6 a 9, in cui detta prima soluzione comprende polidesossiribonucleotidi in una quantità compresa tra 15 e 50 mg/ml, preferibilmente pari a 25 mg/ml.

11. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 6 a 10, in cui detta seconda soluzione comprende chitosano in una quantità compresa tra 1 e 10% p/v, preferibilmente pari a 6% p/v.

12. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 6 a 11, in cui detta composizione comprende polidesossiribonucleotidi in una quantità compresa tra 20 e

2500 µg/ml, preferibilmente pari a 80 µg/ml.

13. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 6 a 12, in cui detta composizione comprende chitosano in una quantità compresa tra 1 e 10% p/v, preferibilmente pari a 3% p/v.

14. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti per l'uso nella stimolazione della proliferazione cellulare, preferibilmente di fibroblasti, cheratinociti, cellule endoteliali, osteoblasti.

15. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti per l'uso nella detersione di ferite.

16. Prodotto cosmetico comprendente una composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 13.

CLAIMS

1. Composition comprising polydeoxyribonucleotides (PDRN) and chitosan.

2. Composition according to claim 1, wherein said polydeoxyribonucleotides are present in the form of salt.

3. Composition according to claim 2, wherein said salt is selected from one of: sodium, iron, chromium, magnesium, manganese salt.

4. Composition according to any one of the preceding claims, wherein said polydeoxyribonucleotides are present in an amount between 20 and 2500 µg/ml, preferably equal to 80 µg/ml.

5. Composition according to any one of the preceding claims, wherein said chitosan is present in an amount comprised between 1 and 10% w/v, preferably equal to 3% w/v.

6. Composition comprising polydeoxyribonucleotides (PDRN) and chitosan obtained by a process which comprises the following steps:

- preparing a first solution containing PDRN;
- preparing a second solution containing chitosan;
- mixing the first solution and the second solution so as to obtain the composition in liquid form.

7. Composition according to claim 6, wherein the method further comprises the step of leaving the

composition to stand for a period of time comprised between 8 and 24 hours, preferably equal to 16 hours, obtaining a composition in dispersion form.

8. Composition according to claim 6 or 7, wherein said polydeoxyribonucleotides are present in the form of salt.

9. Composition according to claim 8, wherein said salt is selected from one of: sodium, iron, chromium, magnesium, manganese salt.

10. Composition according to any one of claims 6 to 9, wherein said first solution comprises polydeoxyribonucleotides in an amount between 15 and 50 mg/ml, preferably equal to 25 mg/ml.

11. Composition according to any one of claims 6 to 10, wherein said second solution comprises chitosan in an amount between 1 and 10% w/v, preferably equal to 6% w/v.

12. Composition according to any one of claims 6 to 11, wherein said composition comprises polydeoxyribonucleotides in an amount between 20 and 2500 µg/ml, preferably equal to 80 µg/ml.

13. Composition according to any one of claims 6 to 12, wherein said composition comprises chitosan in an amount of between 1 and 10% w/v, preferably equal to 3% w/v.

14. Composition according to any one of the preceding claims for use in the stimulation of cell proliferation,

preferably of fibroblasts, keratinocytes, endothelial cells, osteoblasts.

15. Composition according to any one of the preceding claims for use in the deteration of wounds.

16. Cosmetic product comprising a composition according to any one of claims 1 to 13.