

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 788**

51 Int. Cl.:

A61K 8/14 (2006.01)

A61K 8/60 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08103332 .6**

96 Fecha de presentación: **02.04.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2072032**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.06.2009**

54 Título: **Procedimiento de regeneración intracelular del ácido hialurónico y composición cosmética asociada**

30 Prioridad:
17.12.2007 IT MI20072348

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
31.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
31.10.2012

73 Titular/es:
MEDICHEM S.R.L. (100.0%)
VIA VERONA, 2
20063 CERNUSCO SUL NAVIGLIO (MI), IT

72 Inventor/es:
CAIRO, MARCELLO y
PERUGINI, PAOLA

74 Agente/Representante:
CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 389 788 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de regeneración intracelular del ácido hialurónico y composición cosmética asociada

5 La presente invención se refiere a un procedimiento cosmético para la regeneración del ácido hialurónico en células de tejidos conectivos, comenzando desde los precursores del ácido hialurónico, ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina, o sus derivados. Más específicamente, la invención proporciona una composición cosmética que contiene liposomas cargados con ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina, o sus derivados, en combinación con un transportador fisiológicamente aceptable.

Antecedentes de la invención

10 El uso de liposomas para la administración del ácido hialurónico se describe en varios documentos de patente. Por citar algunos ejemplos, el documento WO2006122638 desvela un material de carga para su uso en dermocosmética, que contiene ácido hialurónico o sus derivados estructurados en liposomas fosfolípidos. Los documentos WO03000190 y WO03000191 desvelan un procedimiento para la administración intraarticular del ácido hialurónico encapsulado en liposomas para el tratamiento de la osteoartritis. El documento WO9813024 desvela una formulación farmacéutica que contiene una mezcla de ácido hialurónico y liposomas.

15 El documento EP-A- 295 092 desvela preparaciones cosméticas que contienen vesículas liposomales cargadas con fragmentos de ácido hialurónico.

El documento US2007/077292 desvela preparaciones cosméticas que contienen vesículas liposomales cargadas con ácido hialurónico.

Descripción de la invención

20 La presente invención se basa en el descubrimiento de un procedimiento eficaz para la regeneración del ácido hialurónico dentro de las células administrando, a un sujeto que lo necesite, una preparación liposomal que contiene por separado - es decir, sin unión mediante enlace químico- los precursores del ácido hialurónico, ácido D-glucurónico (GA) y N-acetil-D-glucosamina (GlcNH₂), o sus derivados. La regeneración del ácido hialurónico dentro de las células permite la reconstrucción del tejido conectivo dañado por procesos degenerativos relacionados con la edad. Tal efecto regenerador es particularmente útil en dermatología, especialmente para el tratamiento de arrugas y envejecimiento de la piel.

Por consiguiente, en una primera realización, la invención proporciona una preparación cosmética que contiene vesículas liposomales cargadas con ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina, o sus derivados, en combinación con un transportador cosméticamente aceptable. Como se usa en el presente documento, el término "derivado" indica una forma activada del ácido D-glucurónico y la N-acetil-D-glucosamina, los derivados uridin difosfo del ácido UDP-D-glucurónico y UDP-N-acetil-D-glucosamina. Los dos principios activos (GA y GlcNH₂ o sus derivados) pueden cargarse en las mismas vesículas liposomales o en una mezcla de vesículas que encapsulan cualquiera de uno o los otros principios activos que pueden usarse de acuerdo con la invención. La composición también puede contener otros principios que facilitan la regeneración del ácido hialurónico dentro de las células, por ejemplo, inhibiendo su degradación por la hialuronidasa. Preferentemente, el inhibidor de la hialuronidasa es un extracto de *Echinacia angustifolia*.

Las vesículas liposomales pueden ser vesículas unilaminares (VUL) o multilaminares (VML) de diverso tamaño (pequeño, mediano, grande, gigante) y pueden estar formadas por fosfolípidos o esfingolípidos, preferentemente por fosfatidilcolina; las vesículas también pueden contener principios que modulen su resistencia, viscosidad o estabilidad.

Para cargar vesículas liposomales con ácido D-glucurónico y/o N-acetil-D-glucosamina, o sus derivados, pueden usarse procedimientos conocidos en la técnica; por ejemplo, los fosfolípidos pueden añadirse a una mezcla de los dos componentes, o por separado a cada componente individual disuelto en un medio adecuado, con agitación constante, seguido de homogeneización en turbina. En los casos en los que los componentes activos se añaden por separado a las vesículas liposomales, estos se mezclan posteriormente para formar una mezcla liposomal de ambos principios activos. Una vez terminado el proceso, los liposomas pueden dispersarse en una base o en una preparación cosmética, para formar una crema, emulsión, microemulsión, pomada, gel, loción y aceite.

En una realización preferida, la preparación liposomal se dispersa en una base cosmética que contiene agua y glicerol, preferentemente en presencia de principios adicionales tales como EDTA, piroglutamato sódico, lactato sódico, goma xantano o agentes espesantes similares, en condiciones adecuadas para formar un concentrado en gel.

En una realización adicional la invención proporciona el uso de las composiciones, desveladas en el presente documento, para tratamientos dermatológicos, particularmente para el tratamiento de elementos antiestéticos tales como arrugas, pliegues cutáneos, cicatrices producidas por acné, cicatrices post-traumáticas, cicatrices por rinoplastia, por levantamiento de labios o rostro (mejillas y mentón).

Descripción de la Figura 1

Electroforesis PAGEFS de cultivos de células; la flecha indica la banda de disacáridos correspondiente al ácido hialurónico;

- 5 S: solución de disacáridos indicativa de ácido hialurónico;
 A-B: placas control;
 C: placa tratada con liposomas placebo 15 mg/ml;
 D: placa tratada con liposomas placebo 60 mg/ml;
 E-F: placas tratadas con liposomas cargados con GA y GlcNH₂ a concentraciones de 0,5 y 10 mM, respectivamente;
 10 G-H: placas tratadas con liposomas cargados con GA y GlcNH₂ a concentraciones de 5 y 50 mM, respectivamente.

Ejemplo 1 – Preparación de sistemas liposomales basados en fosfatidilcolina para la administración del ácido D-glucurónico (GA) y de la N-acetil-D-glucosamina (GlcNH₂) y análisis del contenido de los principios activos.

Materiales

- 15 Fosfatidilcolina usada: FosFo LCN-DS, lecitina de soja, pureza mínima del 62%, Fancor; fosfatidilcolina del huevo (PC), de tipo XI-E, pureza del 99%, Sigma.

Sal sódica monohidrato del ácido D-glucurónico, N-acetil-L-glucosamina, Aldrich; Colesterol, Carlo Erba.

Los liposomas se prepararon con dos procedimientos para aumentar la encapsulación del GA y GlcNH₂.

Se introdujeron las siguientes variables:

- 20 • procedimiento de preparación (hidratación directa o hidratación después de la formación de una película lipídica)
 • cantidad y tipo de fosfatidilcolina
 • uso del colesterol
 • concentraciones de soluciones del GA y GlcNH₂.

25 Procedimiento A (hidratación directa):

Para los lotes de 'placebo' y 'cargados' se realizó el siguiente procedimiento:

- 30 • pesar la fase lipófila y añadir la fase hidrófila (volumen final de 200 µl a 1 ml);
 • hacer circular en un agitador vorticial hasta la dispersión completa del fosfolípido y posteriormente en una mezcladora térmica durante 15 minutos a 25 °C, 1400 rpm;
 • en algunos casos mantener la dispersión a 4 °C durante 24 horas;
 • centrifugar las muestras durante 60 minutos a 4 °C, 16400 rpm para eliminar el principio activo que no se haya encapsulado;
 • separar el sobrenadante del sedimento y mantener las dos partes congeladas por separado a -20 °C para dosificación específica posterior de los principios activos.

- 35 Mediante este procedimiento, se produjeron lotes formados por fosfatidilcolina FosFo LCN-DS; la composición de estos lotes se indica en la Tabla 1. A menos que se especifique de otra manera, el volumen de la fase hidrófila se mantuvo a 1 ml. Los lotes marcados con * se hidrataron durante 24 horas en un frigorífico antes de la centrifugación.

Tabla 1

Lote	Cantidad de fosfatidilcolina	Fase hidrófila	Concentración del principio activo (µmol/ml)
JALU 3,7	70 mg	Agua	-
JALU 20-22	60 mg	Agua	-
JALU 35	600 mg	Agua (10 µl)	-
JALU 42	15 mg	Agua (200 µl)	-
JALU 14-16	15 mg	Agua	-
JALU 8-10	7 mg	Agua	-

ES 2 389 788 T3

(continuación)

Lote	Cantidad de fosfatidilcolina	Fase hidrófila	Concentración del principio activo (μmol/ml)
JALU 4-6	70 mg	GA 1,5 mg	6,4
JALU 23-25	60 mg	GA 0,3 mg	1,3
JALU 17-19	15 mg	GA 0,3 mg	1,3
JALU 11-13	7 mg	GA 0,3 mg	1,3
JALU 36-38	15 mg	GA 1 mg	4,3
JALU 39-41	15 mg	GA 1 mg (200 μl)	21,5
JALU 56-58	15 mg	GA 5 mg (200 μl)	105
JALU 63	75 mg	GA 25 mg	105
JALU 32-34	60 mg	GlcNH2 0,3 mg	1,35
JALU 29-31	15 mg	GlcNH2 0,3 mg	1,35
JALU 26-28	7 mg	GlcNH2 0,3 mg	1,35
JALU 50-52	15 mg	GlcNH2 5 mg	22,6
JALU 59-61	15 mg	GlcNH2 5 mg (200 μl)	113
JALU 64-66*	15 mg	GA 5 mg (200 μl)	105
JALU 67-69*	30 mg	GA 5 mg (200 μl)	105
JALU 71-73*	15 mg	GlcNH2 5 mg (200 μl)	113
JALU 74-76*	30 mg	GlcNH2 5 mg (200 μl)	113
JALU 77-79*	15 mg	GlcNH2 10 mg (400 μl)	226

Procedimiento B

Se produjeron lotes de liposomas usando tanto la fosfatidilcolina FosFo LCN-DS como la PC. También en este caso se produjeron lotes de placebo y cargados, de acuerdo con el siguiente procedimiento:

- 5
- pesar la fosfatidilcolina en un matraz de fondo redondo
 - añadir CHCl₃ 500 μ que contiene colesterol 10 mg/ml
 - secar en un evaporador rotativo a presión reducida a 40 °C durante 10 min
 - rehidratar con 1 ml de fase hidrófila
- 10
- someter a agitación vorticial durante 10 minutos, centrifugar durante 60 minutos a 4 °C, 16400 rpm
 - separar el sobrenadante y el sedimento y congelar a -20 °C.

La Tabla 2 indica los lotes de liposomas producidos con el procedimiento B

Tabla 2

Lotes	Fosfatidilcolina	Fase hidrófila	Concentración de principio activo (μmol/ml)
JALU 43-45	FosFo LCNDS (15 mg)	GA 1 mg	4,3
JALU 46-48	PC (10 mg) GA	1 mg	4,3
JALU 49	PC (10 mg)	Agua	-
JALU 62	FosFo LCNDS (15 mg)	Agua	-
JALU 53-55	FosFo LCNDS 15 mg	GA 5 mg	21

Determinación del tamaño

Se realizó un análisis dimensional de los sistemas liposomales usando un aparato de difracción láser Mastersizer 2000 (Malvern), que funciona en un intervalo de tamaño que varía de 20 nm a 2 nm. El aparato está equipado con una unidad de dispersión conectada a una bomba para agitar la muestra durante el análisis. Cada muestra se analizó por triplicado y los resultados se expresaron como d_{10} , d_{50} y d_{90} , es decir, el diámetro del 10%, 50% y 90% de la muestra analizada.

La Tabla 3 indica el análisis realizado en lotes placebo a diferentes concentraciones de fosfatidilcolina, preparados de acuerdo con cada procedimiento.

Tabla 3

Lote	Cantidad de fosfatidilcolina	D _{10%} (µm)	D _{50%} (µm)	D _{90%} (µm)
JALU 8-10	FosFo LCNDS 7 mg	1,199	5,443	52,251
JALU 14-16	FosFo LCNDS 15 mg	1,598	8,766	52,908
JALU 20-22	FosFo LCNDS 60 mg	1,612	26,459	102,922
JALU 49**	PC (10 mg)	2,639	6,359	14,602
JALU 62**	FosFo LCNDS (15 mg)	2,903	14,162	47,823
** indica los lotes preparados con el procedimiento B				

10

Los resultados confirman la formación de vesículas de tamaño micrométrico, en lo que respecta a FosFo LCNDS, el tamaño es constante usando cualquiera de los dos procedimientos con la misma cantidad de fosfolípidos; el resultado de la muestra Jalu 49 indica que el tamaño depende de la pureza del fosfolípido de partida.

Ejemplo 2 – preparación de gel

15 Fase A (Formación de liposomas)

Los siguientes componentes se pesaron de manera precisa y se colocaron en un reactor de acero inoxidable equipado con una turbina a velocidad variable (0-3000 vueltas/minuto) y con un agitador de pala, en el siguiente orden:

- 20 - AGUA DESMINERALIZADA 56,400%
- GA 0,100%
- GlcNH₂ 1,100%

los componentes se mezclaron hasta obtener una disolución completa.

La Fase A' se añadió lentamente en la turbina (2.500 vueltas/min):

- LECITINA 1,500%

25 la homogeneización se realizó durante 15 min. La turbina se detuvo y la mezcla continuó con el agitador de pala durante 10 minutos más.

Fase B

En un reactor de acero distinto equipado con calentamiento, agitación y turbina, se preparó la siguiente solución:

- 30 - AGUA DESMINERALIZADA 30,000%
- EDTA DISÓDICA 0,500%
- GLICEROL 8,000%
- PIROGLUTAMATO SÓDICO 1,000%
- LACTATO SÓDICO 1,000%

35 la solución se agitó hasta que se hizo homogénea y la masa se calentó a 70 °C, después se añadió la Fase B' lentamente en la turbina (1.500 vueltas/min):

- GOMA XANTANO 0,400%

la homogeneización se realizó hasta la dispersión completa de la goma xantano con formación de un gel compacto y homogéneo. La mezcla se enfrió a 25 °C y la Fase A se vertió con agitación. La agitación continuó durante 20 minutos hasta obtener una masa homogénea y compacta.

Ejemplo 3 – preparación de gel (alternativa 1)

5 Fase A (1^{er} liposoma)

Los siguientes componentes se pesaron de manera precisa y se colocaron en un reactor de acero inoxidable equipado con una turbina a velocidad variable (0-3000 vueltas/min) y con un agitador de pala, en el siguiente orden:

- AGUA DESMINERALIZADA 18,800%
- ÁCIDO GLUCURÓNICO 0,100%

10 los componentes se mezclaron hasta la disolución completa. Se añadió LECITINA (0,500%) lentamente en la turbina (2.500 vueltas/min). La homogeneización continuó durante 15 minutos. La turbina se detuvo y la mezcla continuó con el agitador de pala durante 10 minutos más.

Fase A' (2^o liposoma)

15 Los siguientes componentes se pesaron de manera precisa y se colocaron en un reactor de acero inoxidable equipado con una turbina a velocidad variable (0-3000 vueltas/min) y con un agitador de pala, en el siguiente orden:

- AGUA DESMINERALIZADA 18,800%
- N-ACETIL-L-GLUCOSAMINA 1,100%

20 los componente se mezclaron hasta la disolución completa. Se añadió LECITINA (0,500%) lentamente en la turbina (2.500 vueltas/min). La homogeneización continuó durante 15 minutos. La turbina se detuvo y la mezcla continuó con el agitador de pala durante 10 minutos más.

Fase A'' (3^{er} liposoma)

Los siguientes componentes se pesaron de manera precisa y se colocaron en un reactor de acero inoxidable equipado con una turbina a velocidad variable (0-3000 vueltas/min) y un agitador de pala, en el siguiente orden:

- 25
- AGUA DESMINERALIZADA 18,800%
 - *Echinacea angustifolia* (extracto seco) 0,200%

los componente se mezclaron hasta la disolución completa. Se añadió LECITINA (0,500%) lentamente en la turbina (2.500 vueltas/min). La homogeneización continuó durante 15 minutos. La turbina se detuvo y la mezcla continuó con el agitador de pala durante 10 minutos más.

Preparación de liposomas

30 En un reactor de acero inoxidable equipado con agitador, se mezclaron lentamente las tres fases, A, A' y A'' durante 10 minutos hasta obtener una homogeneización completa.

Fase B

En un reactor de acero inoxidable equipado con calentamiento, agitación y turbina se preparó la siguiente solución:

- 35
- AGUA DESMINERALIZADA 29,800%
 - EDTA DISÓDICA 0,500%
 - GLICEROL 8,000%
 - PIROGLUTAMATO SÓDICO 1,000%
 - LACTATO SÓDICO 1,000%

40 La mezcla se agitó hasta la homogeneidad y se calentó a 70 °C. Una vez alcanzada la temperatura, la Fase B' se añadió lentamente en la turbina (1.500 vueltas/min):

- GOMA XANTANO 0,400%

La homogeneización continuó hasta la dispersión completa de la goma xantano y se obtuvo un gel compacto y homogéneo. La temperatura se enfrió a 25 °C y a la preparación de liposomas se añadió la masa con agitación. La agitación continuó durante 20 minutos hasta obtener una masa homogénea y compacta.

45 **Ejemplo 4 – preparación de gel (alternativa 2)**

Fase A (1^{er} liposoma)

Los siguientes componentes se pesaron de manera precisa y se colocaron en un reactor de acero inoxidable equipado con una turbina a velocidad variable (0-3000 vueltas/min) y con un agitador de pala, en el siguiente orden:

- 5
- AGUA DESMINERALIZADA 18,800%
 - ÁCIDO UDP-D-GLUCURÓNICO 0,100%

los componente se mezclaron hasta la disolución completa. Se añadió LECITINA (0,500%) lentamente en la turbina (2.500 vueltas/min). La homogeneización se realizó durante 15 minutos. La turbina se detuvo y la mezcla continuó con el agitador de pala durante 10 minutos más.

Fase A' (2^o liposoma)

- 10 Los siguientes componentes se pesaron de manera precisa y se colocaron en un reactor de acero inoxidable equipado con una turbina a velocidad variable (0-3000 vueltas/min) y con un agitador de pala, en el siguiente orden:

- AGUA DESMINERALIZADA 18,800%
- UDP-N-ACETIL-L-GLUCOSAMINA 1,100%

- 15 los componente se mezclaron hasta la disolución completa. Se añadió LECITINA (0,500%) lentamente en la turbina (2.500 vueltas/min). La homogeneización continuó durante 15 minutos. La turbina se detuvo y la mezcla continuó con el agitador de pala durante 10 minutos más.

Fase A'' (3^{er} liposoma)

Los siguientes componentes se pesaron de manera precisa y se colocaron en un reactor de acero inoxidable equipado con una turbina a velocidad variable (0-3000 vueltas/min) y con un agitador de pala, en el siguiente orden:

- 20
- AGUA DESMINERALIZADA 18,800%
 - *Echinacea angustifolia* (extracto seco) 0,200%

los componentes se mezclaron hasta la disolución completa. Se añadió LECITINA (0,500%) lentamente en la turbina (2.500 vueltas/min). La homogeneización continuó durante 15 minutos. La turbina se detuvo y la mezcla continuó con el agitador de pala durante 10 minutos más.

- 25 Preparación de liposomas

En un reactor de acero inoxidable equipado con agitador, se mezclaron lentamente las tres fases, A, A' y A'' durante 10 minutos hasta obtener una homogeneización completa.

Fase B

En un reactor de acero inoxidable equipado con calentamiento, agitación y turbina se preparó la siguiente solución:

- 30
- AGUA DESMINERALIZADA 29,800%
 - EDTA DISÓDICA 0,500%
 - GLICEROL 8,000%
 - PIROGLUTAMATO SÓDICO 1,000%
 - LACTATO SÓDICO 1,000%

- 35 La mezcla se agitó hasta la homogeneidad y se calentó a 70 °C. Una vez alcanzada la temperatura, la Fase B' se añadió lentamente en la turbina (1.500 vueltas/min):

- GOMA XANTANO 0,400%

- 40 La homogeneización continuó hasta completar la dispersión de la goma xantano y se obtuvo un gel homogéneo y compacto. La temperatura se enfrió a 25 °C y a la preparación de liposomas se añadió la masa con agitación. La agitación continuó durante 20 minutos hasta obtener una masa homogénea y compacta.

Ejemplo 5 – establecimiento de un sistema celular para la evaluación *in vitro* de los sistemas liposomales.

Los estudios de los efectos celulares se realizaron con células NHDF (Fibroblastos Dérmicos Normales Humanos), 6 pases en DMEM, FBS al 10%, PenStrep al 1%, glutamina al 1%, en placas multipocillo (área de cultivo para un solo pocillo = 9,6 cm²). Cada pocillo contenía 300.000 células confluentes.

- 45 Las muestras se inocularon de acuerdo con el siguiente esquema, en condiciones estériles y con flujo laminar a 37 °C colocando 2 ml de medio en cada pocillo y los pocillos se incubaron a 37 °C durante 60 horas, CO₂ al 5%, humedad al 97%.

Esquema de las muestras inoculadas en 8 placas:

- A-B placa de control;
- placa C tratada con liposomas (control) 15 mg/ml;
- placa D tratada con liposomas (control) 60 mg/ml;
- 5 ➤ placas E-F tratadas con liposomas cargados con GA y GlcNH₂ a concentraciones de 0,5 y 10 mM, respectivamente;
- placas G-H tratadas con liposomas cargados con GA y GlcNH₂ y concentraciones de 5 y 50 mM, respectivamente;

10 Al final del periodo de tiempo programado, las placas se analizaron con microscopía óptica de contraste de fase, mediante la cual se observó muerte celular en las placas D, E, F, G, H. Los sobrenadantes se recuperaron, se centrifugaron y se examinaron para determinar su contenido en ácido hialurónico. En resumen, se liofilizó 1 ml de medio aclarado, se extrajo con 300 ml de acetato de amonio, pH 7,0 y se precipitó con 4 volúmenes de etanol frío y se dejó a -20 °C durante 16-18 horas, se centrifugó y se recuperó el sedimento; esta etapa se repitió una segunda vez. Al final de la segunda precipitación, el sedimento se secó completamente y se digirió con 100 mU/ml de hialuronidasa SD a 37 °C durante 1 hora y con 100 mU/ml de Condroitinasa ABC a 37 °C durante 3 h. Después las muestras se liofilizaron y se derivatizaron con 2-aminoacridona (AMAC).

20 A cada muestra se añadieron alícuotas de 40 µl de solución de AMAC 12,5 mM en ácido acético/DMSO (3:17, v/v) y se incubó durante 10-15 minutos a temperatura ambiente; después se añadieron 40 µl de solución recién preparada de NaBH₃CN 1,25 M y las muestras se incubaron durante 16-18 horas a 37 °C. Después de la derivatización, las muestras se separaron por PAGEFS.

La Figura 1 muestra que la banda de disacáridos, que es indicativa de la síntesis de ácido hialurónico, está presente en muestras que contienen liposomas y resulta particularmente gruesa, lo que significa que, en las muestras que contienen una mayor concentración de precursores de GA y GlcNH₂, se forma una mayor concentración de ácido hialurónico.

25 En la Figura 2 los resultados se expresan como producción en % de ácido hialurónico con respecto al control, suponiendo el 100%.

Conclusiones

El tiempo de incubación en este experimento (60 horas) resultó demasiado largo para la supervivencia celular.

30 La electroforesis muestra que las muestras tratadas con concentraciones fosfolipídicas de 15 y 60 mg/ml no presentan efecto inhibitor en la biosíntesis del ácido hialurónico.

El inóculo de liposomas que contiene GA y GlcNH₂ a concentraciones de 5 y 50 mM, respectivamente, induce un aumento de la banda de disacáridos que es indicativa de la síntesis del ácido hialurónico.

Ejemplo 6 – Estudio de eficacia *in vitro*

35 Basándose en los resultados previos, se realizó el siguiente método: células NHDF (Fibroblastos Dérmicos Normales Humanos), 6 pasos en DMEM, FBS al 10%, PenStrep al 1%, glutamina 1%, en 6 placas multipocillo (área de cultivo de cada pocillo = 9,6 cm²). Cada pocillo se cargó con 300.000 células confluentes.

Las muestras se inocularon en condiciones estériles, a 37 °C añadiéndose 2 ml de medio a cada pocillo y se incubó a 37 °C durante 48 ó 72 horas, CO₂ al 5%, humedad al 97%. 12 horas después del inóculo se añadió medio recién preparado.

40 Las muestras se inocularon en 12 placas:

- 2 placas de control 48 h;
- Las placas B-C se trataron durante 48 horas con liposomas cargados con GA y GlcNH₂ a concentraciones de 0,25 y 5 mM, respectivamente;
- Las placas H-I se trataron durante 48 horas con liposomas cargados con GA y GlcNH₂ a concentraciones de 0,5 y 10 mM, respectivamente;
- 45 - 2 placas de control 72 h;
- Las placas D-E se trataron durante 72 horas con liposomas cargados con GA y GlcNH₂ a concentraciones de 0,25 y 5 mM, respectivamente;
- Las placas F-G se trataron durante 72 horas con liposomas cargados con GA y GlcNH₂ a concentraciones de 0,5 y 10 mM, respectivamente;
- 50

Al final del periodo de tiempo programado, las placas se analizaron con microscopía óptica de contraste de fase y se contaron las células vivas.

5 El análisis del ácido hialurónico producido por las células se realizó en el medio tratado con enzimas específicas (hialuronidasa y condroitinasa) mediante un análisis cromatográfico específico para proteínas (FPLC). La separación se realizó en una columna Superdex 200HR 10/30 previamente rellena a temperatura ambiente, con un caudal de 0,35 ml/min; como tampón se usó acetato amónico 0,1 M, pH 7, que contenía Tween 20 al 0,005%. El detector UV-Vis se ajustó a 280 nm.

Los resultados de viabilidad celular, expresados como porcentaje de células vitales se compararon con los controles, se indican en la Figura 3. Se obtuvieron resultados particularmente positivos con las placas B-C y D-E en las que la viabilidad resultó ser mayor del 80%.

10 Los resultados, en cuanto a producción de ácido hialurónico, a las 48 y 72 horas se indican en la Figura 4. Los resultados se expresan como % de AH determinado como la proporción de la cantidad de AH encontrado en las células tratadas con liposomas con respecto a la cantidad producida por las células control.

15 Los resultados demuestran que la producción de ácido hialurónico muy superior en las placas tratadas que en los controles; esto indica que los sistemas liposomales administran eficazmente los dos precursores del ácido hialurónico en los fibroblastos, conduciendo a la (re)constitución de su componente esencial de la estructura de la dermis y la piel.

Ejemplo 7 – estudio de eficacia *in vivo* usando procedimientos no invasivos para bioingeniería cutánea

Población: basándose en los siguientes criterios de exclusión generales se seleccionaron 20 voluntarios sanos (hombres y mujeres):

20 individuos que presentaban, en el área cutánea investigada, síntomas que podían interferir con los resultados del ensayo; hipersensibilidad o tolerancia conocida a productos cosméticos y/o a productos para la limpieza/higiene corporal, incluyendo protectores solares; susceptibilidad a exposición solar; sujetos tratados con fármacos fotosensibles menos de un mes antes; individuos tratados con radiaciones UVA y/o UVB menos de un mes antes.

Formulaciones sometidas a ensayo

25 Formulación A: ácido glucurónico al 0,1%, acetil glucosamina al 1,1%, fosfo LCN-DS al 1,5%, EDTA 2Na al 0,5%, glicerol al 8%, PCA Na al 1%, lactato Na al 1%, Sepiplus 400 al 2,3%, agua desmineralizada c.s. hasta 100.

Formulación B, usada como placebo: fosfo LCN-DS al 1,5%, EDTA 2Na al 0,5%, glicerol al 8%, PCA Na al 1%, lactato Na al 1%, Sepiplus 400 al 2,3%, agua desmineralizada c.s. hasta 100.

Área anatómica de aplicación

30 A los sujetos, divididos en grupos A y B, se les solicitó aplicar la formulación A o B, respectivamente, en el antebrazo izquierdo, mientras que el antebrazo derecho se usó como control.

Dosis y administración

Las formulaciones se aplicaron una vez al día

Periodo de tratamiento: 2 meses

35 Evaluación biométrica

En este estudio se consideraron los siguientes parámetros: contenido acuoso de la capa córnea, firmeza cutánea (R0), elasticidad total (R2) y buena (R5), grado de eritema, sensación dérmica. La medición de parámetros cutáneos se realizó al inicio del experimento (t0) y 15 (t1), 30 (t2) y 60 (t3) días después mediante la multi-sonda Cutometer® MPA 580 (CK electronic GmbH, G. F. Secchi, CO), de acuerdo con las directrices internacionales.

40 Aplicación simultánea de diferentes productos

Para evitar resultados ambiguos se solicitó a los sujetos no aplicar otros productos cosméticos en las áreas tratadas, 3 días antes y durante el periodo del estudio.

Resultados

Índice de eritema

45 Para determinar la tolerabilidad de las formulaciones aplicadas sobre la piel, en todos los periodos de tiempo comprobados durante el estudio se evaluó el nivel de eritema en los sitios tratados y de control. Se sabe que un aumento del nivel de eritema después de la aplicación de una formulación indica escasa tolerabilidad de la propia formulación.

50 Los resultados obtenidos en este estudio se describen en el presente documento como índices de eritema, es decir, como la proporción entre el nivel de eritema a tiempo t y el nivel de eritema básico para cada sitio examinado.

Cuando para cada periodo de tiempo se compara el histograma haciendo referencia al sitio de aplicación con el control (Figura 5), no pueden observarse diferencias significativas; por lo tanto, ningún aumento del nivel de eritema puede asociarse con la aplicación de las dos formulaciones.

- 5 Adicionalmente, cuando a lo largo del tiempo se observan los gráficos obtenidos para cada formulación, se observa que los índices de eritema se mantienen cercanos a la unidad en todos los tiempos considerados: la aplicación de las dos formulaciones no produce ningún cambio en el nivel de eritema incluso después de una aplicación prolongada.

Por lo tanto, las dos formulaciones usadas en este estudio se toleran bien y la no irritación puede atribuirse al vehículo, a los liposomas o a los principios activos a las concentraciones estudiadas.

10 **Hidratación de la piel**

La siguiente tabla 4 describe los valores de hidratación promedio de la población a examen obtenidos con un corneómetro así como el cambio con respecto al antebrazo usado como control en cada momento.

Tabla 4

Formulaciones	T ₁₅ días	T ₃₀ días	T ₆₀ días
Formulación A promedio ± d.t.	43,74 ± 7,62	47,52 ± 9,70	44,09 ± 7,10
% frente a control	(+34,05)	(+38,18)	(+28,96)
Formulación B promedio ± d.t.	46,47 ± 7,4	43,18 ± 5,15	44,25 ± 6,94
% frente a control	(+35,88)	(+22,88)	(+24,08)

- 15 Comparando los valores de corneometría de los antebrazos tratados con los controles correspondientes, se observa que aparece un aumento significativo muy similar después de 15 días de aplicación (34,05% y 35,88%). A partir de los datos anteriores, es evidente que la aplicación de ambas formulaciones viene acompañada por un aumento de contenido de agua en la capa córnea, en la que tal mejora de hidratación puede atribuirse a la composición de las formulaciones y a la presencia de liposomas, independientemente de los principios activos contenidos en su interior.

- 20 Después de aplicaciones repetidas de la formulación A durante 30 días, se obtuvo un aumento del 66,87% superior al aumento debido a la aplicación de la formulación B. El mayor aumento de la hidratación de la superficie después de la aplicación repetida de la formulación A se debe probablemente a la presencia de principios activos dentro de los liposomas.

- 25 Tal aumento de hidratación en sujetos que pertenecen al grupo A no se mantiene como tal después de 60 días de aplicación diaria (28,96% frente al 24,08% del grupo B). Este resultado puede deberse a un problema de estabilidad de los principios activos contenidos en las estructuras liposomales.

En la Figura 6, los resultados del estudio se indican como índices de hidratación, es decir, como la proporción entre los valores obtenidos a diferentes tiempos t y los valores iniciales (T₀).

- 30 Incluso comparando los resultados con los valores iniciales, el aumento de hidratación de la piel después de la aplicación de las formulaciones puede observarse en todos los tiempos evaluados en este estudio.

Elasticidad de la piel

Después de la aplicación de las formulaciones, el cambio de elasticidad y firmeza de la piel se sometió a ensayo por medio de un programa informático para realizar diversas operaciones obteniéndose curvas después de medir el área analizada. Las curvas ejemplares obtenidas durante el estudio se indican en la Figura 7.

- 35 A partir de tales curvas pueden obtenerse los siguientes parámetros, aprobados internacionalmente, para la evaluación de la elasticidad y firmeza:

- R0 = punto más elevado de la primera curva; índice de firmeza de la piel;
- R2 = parte de la curva comprendida entre la anchura máxima y la capacidad de la piel a la redefinición. Este parámetro es muy importante ya que indica la elasticidad total de la piel.
- 40 R5 = Este parámetro indica la elasticidad real, que es la elasticidad total menos la parte viscoelástica de la piel.

Los resultados relacionados con estos tres parámetros se analizarán por separado.

En cuanto a firmeza de la piel, la Figura 8 indica la variación del índice R0 con respecto al valor de partida, para las dos formulaciones sometidas a ensayo, en las áreas tratadas y de control.

5 Los resultados demuestran que después de 15 días de tratamiento, las dos formulaciones tienen un índice definitivamente más elevado con respecto a las áreas no tratadas, mostrando una clara mejora en cuanto a la firmeza de la piel; después de 30 días o más de tratamiento, solo se manifiesta mejora para la formulación A, que contiene los principios activos.

Estos resultados están perfectamente en consonancia con los resultados relacionados con la hidratación de la piel.

10 En cuanto a los parámetros de elasticidad de la piel, la Figura 9 muestra el porcentaje de variación de los índices R2 y R5 en comparación con el área no tratada, para las dos formulaciones sometidas a ensayo.

Los resultados están en línea con los indicados anteriormente: después de 15 días de tratamiento, puede observarse un efecto positivo debido a la aplicación de las formulaciones que contienen los liposomas, mientras que, en caso de prolongar la aplicación, la acción específica del ácido glucurónico y de la glucosamina contenidos en los sistemas liposomales puede dar como resultado un aumento constante de la elasticidad de la piel.

15 Conclusiones

1. los liposomas que contienen ácido glucurónico y acetil-glucosamina tienen características idóneas de tamaño y contenido de principios activos.
2. los resultados *in vitro* demuestran claramente un aumento en la cantidad de ácido hialurónico producido por las células después de la incubación los liposomas que contienen precursor, indicando de esta manera la capacidad de los sistemas liposomales para administrar principios activos dentro de los fibroblastos.
3. la formulación que contiene ácido glucurónico y acetil-glucosamina demostró tolerarse bien después de un uso continuado dos meses; tal formulación también demostró ser capaz de mejorar notablemente los parámetros de hidratación, firmeza y elasticidad de la piel después de 30 días de tratamiento con respecto a la formulación que contenía liposomas placebo.

25

REIVINDICACIONES

1. Una preparación cosmética que contiene vesículas liposomales cargadas con
 - i) ácido D-glucurónico o ácido UDP-D-glucurónico, y
 - ii) N-acetil-D-glucosamina o UDP-N-acetil-D-glucosamina, mezclado con un transportador cosméticamente aceptable.
2. Una preparación de acuerdo con la reivindicación 1, que adicionalmente contiene un inhibidor de hialuronidasa.
3. Una preparación de acuerdo con la reivindicación 2, en la que dicho inhibidor de hialuronidasa es un extracto de *Echinacea angustifolia*.
4. Una preparación de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, en la que las vesículas consisten esencialmente en fosfatidilcolina.
5. Una preparación de acuerdo con las reivindicaciones 1-4, que está en forma de crema, emulsión, microemulsión, pomada, gel, loción o aceite.
6. Una preparación de acuerdo con la reivindicación 5, que está en forma de un gel que contiene agua y glicerol.
7. Una preparación de acuerdo con la reivindicación 6, que adicionalmente contiene EDTA, piroglutamato sódico, lactato sódico y un agente espesante, preferentemente goma xantano.
8. El uso de liposomas de encapsulación
 - i) de ácido D-glucurónico o de ácido UDP-D-glucurónico, y
 - ii) de N-acetil-D-glucosamina o de UDP-N-acetil-D-glucosamina, en una composición cosmética.
9. El uso de una preparación de acuerdo con las reivindicaciones 1-7, para el tratamiento cosmético no terapéutico de arrugas, pliegues cutáneos, cicatrices por acné, cicatrices post-traumáticas, cicatrices por rinoplastia, por levantamiento de labios, mejillas o mentón.

Figura 1

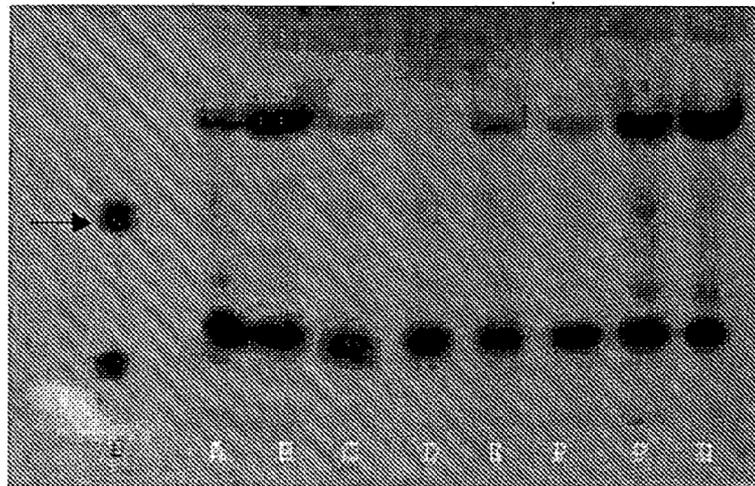


Figura 2

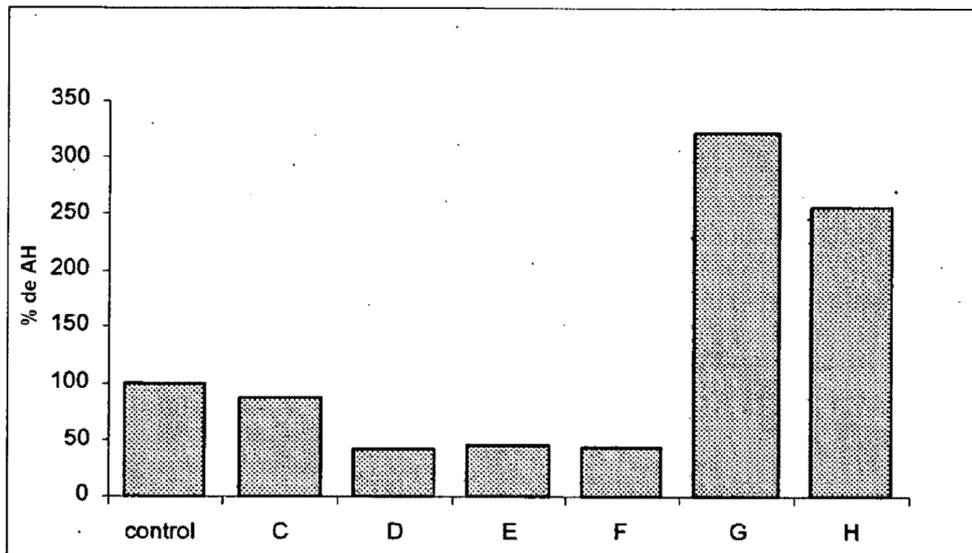


Figura 3

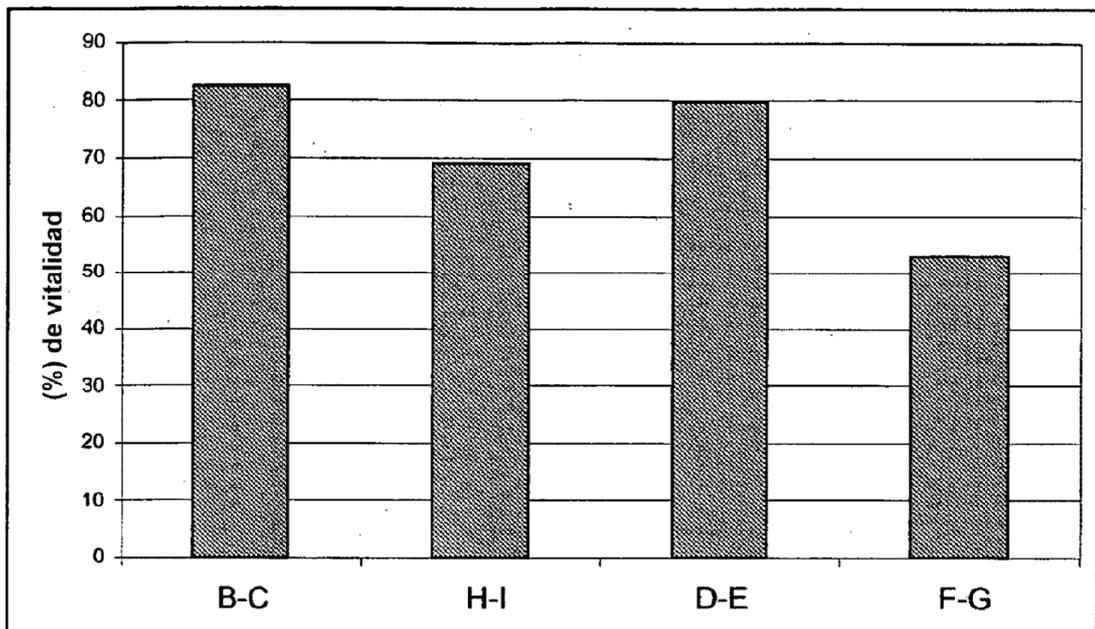


Figura 4

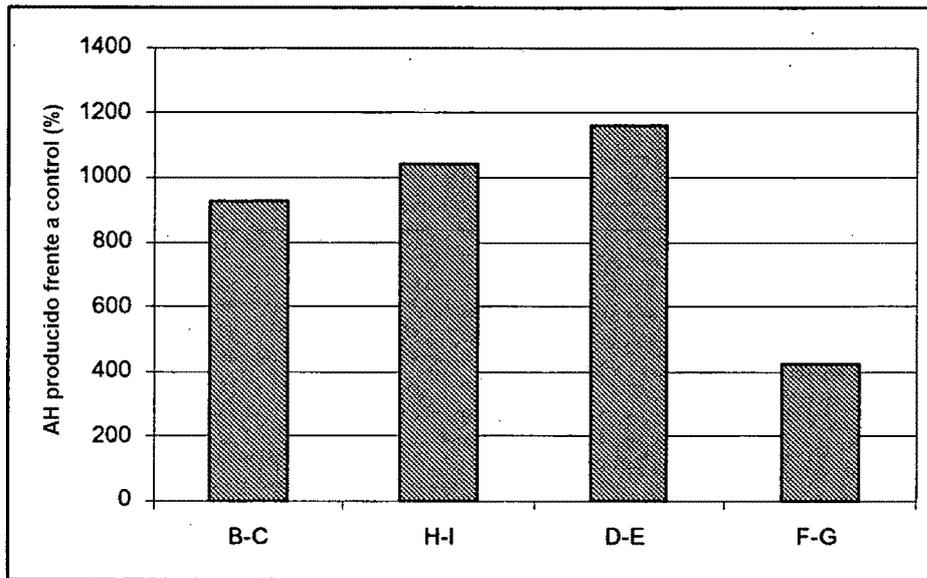


Figura 5

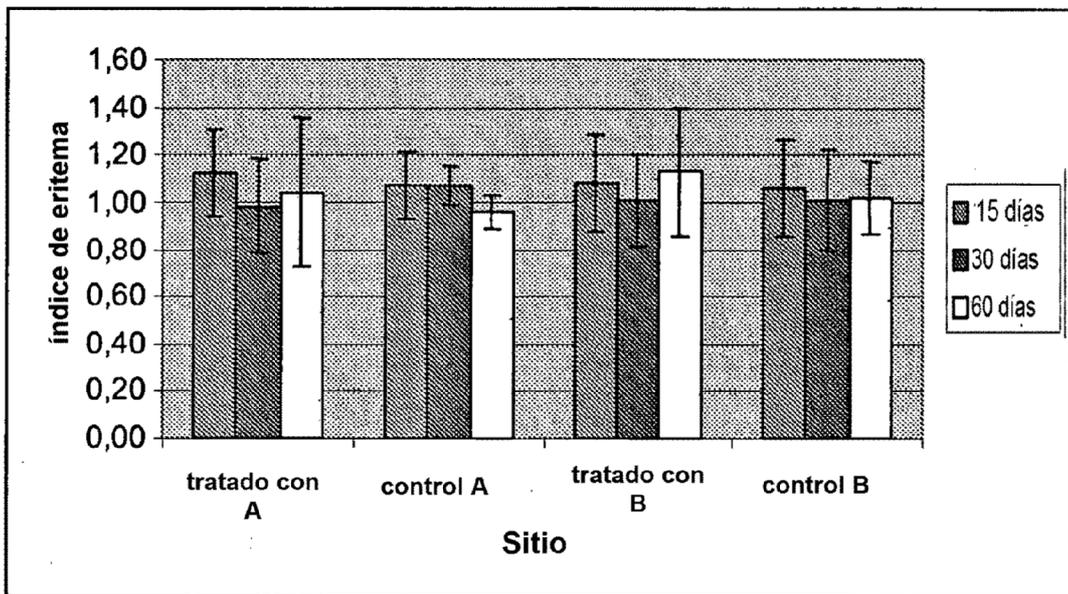


Figura 6

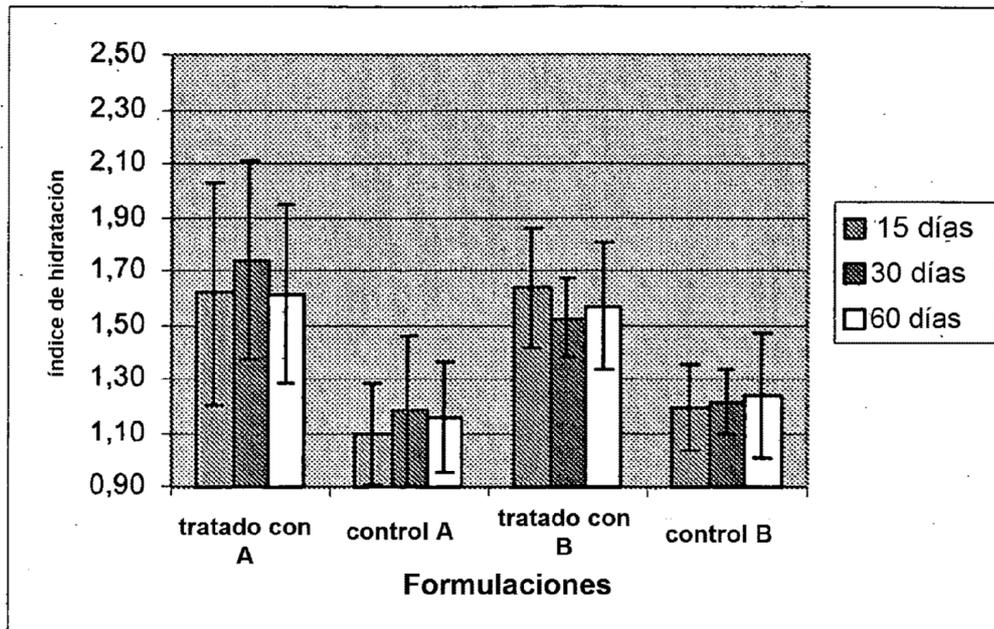


Figura 7

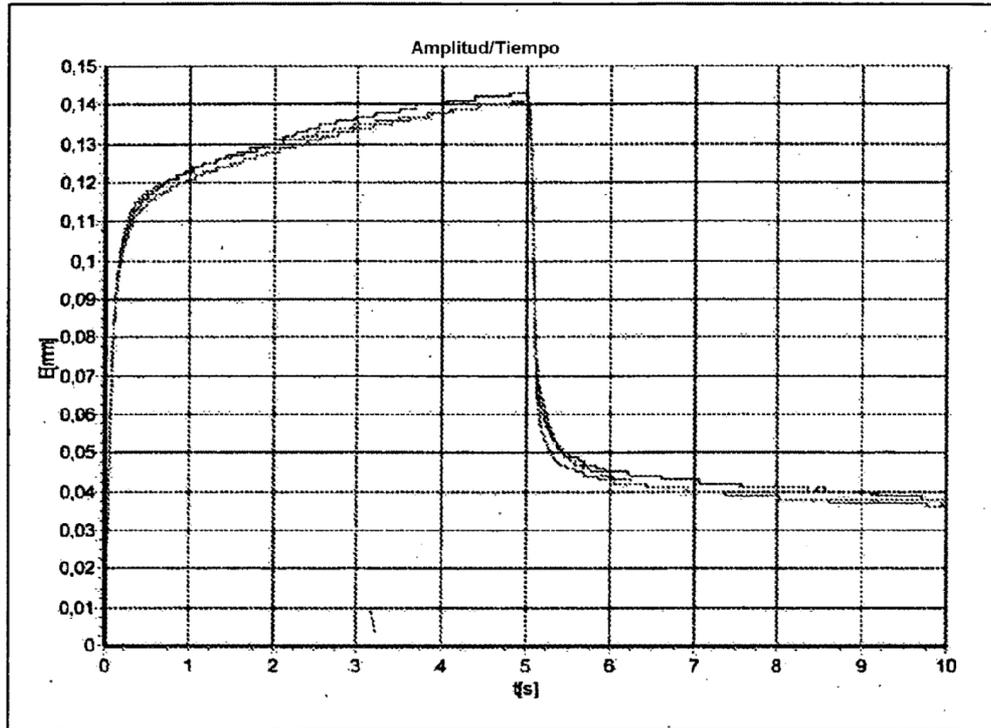


Figura 8

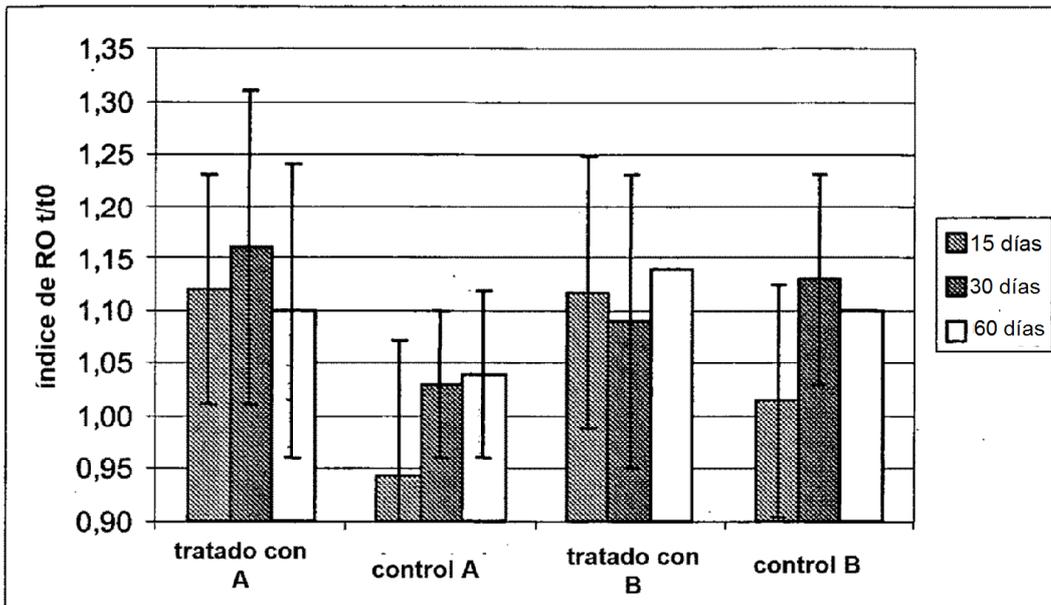


Figura 9

