

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 392 852**

(51) Int. Cl.:

**A61K 31/704** (2006.01)  
**A61K 31/728** (2006.01)  
**A61K 31/702** (2006.01)  
**A61K 8/73** (2006.01)  
**A61P 17/00** (2006.01)  
**A61K 31/07** (2006.01)  
**A61K 9/08** (2006.01)  
**A61K 9/06** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **06847181 .2**

(96) Fecha de presentación: **19.12.2006**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1965808**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **10.09.2008**

(54) Título: **Preparaciones farmacéuticas o cosméticas para aplicación tópica y/o parenteral, sus procedimientos de preparación y sus utilizaciones**

(30) Prioridad:

**21.12.2005 FR 0513055**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:

**14.12.2012**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:

**14.12.2012**

(73) Titular/es:

**GALDERMA RESEARCH & DEVELOPMENT  
(100.0%)  
LES TEMPLIERS, 2400 ROUTE DES COLLES  
06410 BIOT, FR**

(72) Inventor/es:

**MOUTET, MARC y  
YADAN, JEAN-CLAUDE**

(74) Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 392 852 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

Preparaciones farmacéuticas o cosméticas para aplicación tópica y/o parenteral, sus procedimientos de preparación y sus utilizaciones.

La presente invención se refiere a unas preparaciones para aplicación tópica y/o parenteral que comprenden, en un medio fisiológicamente aceptable, ácido hialurónico, a unos procedimientos de fabricación de dichas preparaciones y a sus utilizaciones como medicamento, estando dichas preparaciones destinadas al tratamiento de las afecciones dermatológicas, en particular, al tratamiento mediante relleno de las arrugas, arrugas pequeñas, depleciones fibroblásticas y cualquier cicatriz.

El envejecimiento de la piel es una de las modificaciones más visibles del proceso de senescencia. Además, la piel se encuentra expuesta a numerosos factores susceptibles de acelerar este proceso fisiológico. Se distinguen dos tipos diferentes de envejecimiento cutáneo. Por un lado, el envejecimiento intrínseco, que es más fácil de evaluar sobre unas zonas que normalmente no están expuestas al Sol y, por otro lado, el envejecimiento extrínseco, provocado por la interacción de factores medioambientales, en particular los rayos UV. Estos factores medioambientales tienen un efecto mucho más marcado en las partes del cuerpo expuestas al Sol, sobre todo en las personas de fototipo claro. Se habla entonces también de envejecimiento actínico. Otros factores tales como las costumbres alimenticias, el tabaquismo, el consumo excesivo de alcohol, las enfermedades crónicas y las disfunciones de las glándulas endocrinas contribuyen también a este envejecimiento.

Durante el envejecimiento intrínseco de la piel, la capa córnea está poco modificada. La epidermis es atrófica y la unión dermo-epidérmica está aplanada, de manera que la adhesión a la dermis es menos buena, lo cual facilita la formación de burbujas. El grosor de la dermis está claramente reducido; hay menos vasos sanguíneos. Se observa también menos fibroblastos y sus capacidades de biosíntesis y de proliferación están disminuidas. Las fibras elásticas sufren en primer lugar unas modificaciones, para después desaparecer.

En lo que se refiere al envejecimiento extrínseco, se observa una epidermis irregular, a veces atrófica, a veces hiperplásica, con unas señales de desorganización y de displasia. Los melanocitos son más numerosos en algunos sitios, y están en número reducido en otros. Hay también una irregularidad de la distribución de la melanina en la epidermis, a consecuencia de problemas de transferencia de los melanosomas. El número de células de Langerhans disminuye. Los pequeños vasos sanguíneos se dilatan en primer lugar, para después adelgazarse y atrofiarse.

Las arrugas son los signos más visibles del envejecimiento. Se distinguen varias naturalezas, en particular las arrugas superficiales y profundas. Las arrugas profundas se deberían a las modificaciones dermohipodérmicas, mientras que las arrugas superficiales se podrían explicar por unas modificaciones dérmicas y eventualmente epidérmicas. Las arrugas se deben sobre todo a la pérdida de elasticidad de la piel. El alcance de la red elástica sub-epidérmica da lugar a una laxitud superficial de la piel envejecida y a una plegadura de su superficie. La destrucción de las fibras elásticas en la dermis reticular es responsable de la pérdida de elasticidad y de la capacidad de la piel para recuperar su forma después del estiramiento. Según el tipo, la intensidad y la topografía, será posible un tratamiento adaptado.

El tratamiento de las modificaciones cutáneas inestéticas relacionadas con el envejecimiento ha experimentado enormes progresos estos últimos años.

Ya se ha descrito un número relativamente importante de sustancias naturales o sintéticas como implantes dérmicos, es decir como sustancias inyectadas directamente en la piel, con el fin de remediar las alteraciones cutáneas que resultan del envejecimiento, de traumatismos o de enfermedades.

Otras alternativas terapéuticas para estas aplicaciones son en particular la inyección local de la toxina botulínica (Botox®) o la utilización de técnicas láser. Estos diferentes tipos de tratamientos no son exclusivos y se ha recomendado incluso su combinación. Entre las sustancias naturales de origen humano, el colágeno y el ácido hialurónico son las que están en el origen de la mayoría de los productos disponibles en el mercado.

El ácido hialurónico es un polisacárido natural ubicuario que existe en la misma forma que la bacteria más simple en el ser humano. Es un polímero de disacáridos compuestos a su vez por ácido D-glucurónico y por N-acetilglucosamina, unidos entre sí por unos enlaces glicosídicos alternados beta-1,4 y beta-1,3. Los polímeros de esta unidad recurrente pueden tener un tamaño de entre 102 y 104 kDa *in vitro*. El ácido hialurónico representa en particular un constituyente natural de la dermis en la que desempeña un papel importante en la hidratación y la elasticidad de la piel. Disminuye sin embargo en cantidad y en calidad con la edad, provocando un desecado de la piel que se arruga. Es muy hidrosoluble y forma unas disoluciones de alta viscosidad en agua. Debido a estas propiedades particulares, el ácido hialurónico pertenece a los productos farmacéuticos más utilizados.

Sin embargo, en el ser humano, el ácido hialurónico se elimina muy rápidamente del plasma mediante degradación. Su semi-vida plasmática después de la inyección intravenosa es muy corta, entre 2,5 y 5,5 minutos, mientras que en la piel su semi-vida es de 0,5 a 2 días según su concentración. Su excreción urinaria es baja, menor que 1% del aclaramiento total. En el conejo, se ha medido en la piel la velocidad de eliminación, (Reed RK, Laurent UB, Fraser JR, Laurent TC. Removal rate of [3H]hyaluronan injected subcutaneously in rabbits. Am J Physiol. Agosto 1990;

259(2 Pt 2):H532-5). Es no exponencial con una semi-vida de 0,5 a 1 día cuando su concentración es de 5 mg/ml.

La tolerancia del ácido hialurónico es muy buena y no se ha asociado ninguna inmunogenicidad a esta sustancia. Se encuentra así una incidencia de efectos secundarios muy baja.

5 La utilización del ácido hialurónico, solo o en asociación, se ha descrito así para varias aplicaciones médicas, tales como, por ejemplo, el tratamiento de la osteoartritis así como la artritis reumatoide. Unas composiciones inyectables tales como, por ejemplo, el ácido hialurónico solo, el colágeno solo o la asociación "ácido hialurónico y colágeno" también se han utilizado en cirugía reparadora, en el marco de tratamiento por relleno de las arrugas, arrugas pequeñas, deplecciones fibroblásticas y cualquier cicatriz.

10 Actualmente, se utilizan numerosos implantes dérmicos, pero ninguna ha sido considerado todavía como ideal en el marco de un aumento tisular seguro y sano (Naoum C, Dasiou-Plakida D. Dermal filler materials and botulin toxin Int J Dermatol. Oct. 2001; 40(10): 609-21).

Sin embargo, el ácido hialurónico, debido a su biodisponibilidad demasiado baja después de la inyección y a su frecuencia de inyección demasiado elevada, no se puede utilizar como tal.

15 Unas microemulsiones que comprenden ácido hialurónico, eventualmente en forma de sal, un retinoide, y unos antioxidantes o conservantes se han descrito en la solicitud WO 2005/039532. Unas composiciones útiles en el campo de la dermatología que comprende ácido hialurónico, retinol y EDTA se han descrito en las solicitudes EP 0608433 y US nº .024.941.

20 Evidentemente, se ha buscado desarrollar unas composiciones a base de ácido hialurónico que poseen una muy buena biodisponibilidad y susceptibles de resistir mejor a la acción de las enzimas de degradación. Esto permite, en particular, espaciar las intervenciones y reducir su número.

Estas composiciones utilizadas como implante dérmico están todas compuestas por ácido hialurónico estabilizado y un gran número de ellas comprenden ácido hialurónico modificado químicamente con este objetivo. Además, el ácido hialurónico incluido en estos productos es mayoritariamente de origen no humano tal como, por ejemplo, de origen aviar o bacteriano.

25 Se encuentran así en estas composiciones numerosos derivados de ácido hialurónico modificados químicamente en forma, en particular, de ésteres, de amidas, así como de derivados que poseen unos "puentes intra y/o intercadenas" (cross-linked).

30 Sin embargo, estas modificaciones afectan a las características fisicoquímicas y a las propiedades biológicas del ácido hialurónico, así como a su futuro después de la administración. Estas modificaciones estructurales del ácido hialurónico pueden provocar unas reacciones inflamatorias como informa Sopaar CNS, Patrinely JR Ophtalmic plastic and reconstructive surgery Marzo de 2005; 21(2):151-53.

Además, aunque es superior a la del ácido hialurónico natural, la biodisponibilidad de estos derivados de ácido hialurónico sigue siendo todavía demasiado corta.

35 Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, un problema que se plantea resolver la invención es realizar unas preparaciones que comprenden ácido hialurónico que tenga una mejor biodisponibilidad conservando al mismo tiempo sus características fisicoquímicas y sus propiedades biológicas, así como un procedimiento de fabricación de dicho preparación.

40 La solución de la invención para este problema planteado tiene como primer objeto una composición o una preparación farmacéutica o cosmética, en particular para aplicación tópica y/o parenteral que comprende, en un medio fisiológicamente aceptable, ácido hialurónico, caracterizada porque comprende además al menos:

- un retinoide y/o sus sales y/o sus ésteres, tales como el retinil palmitato, el retinil acetato, el retinil estearato, el retinil oleato, el retinil propionato o el retinil linoleato,
- un pentámero del ácido hialurónico, y
- un inhibidor de la degradación del ácido hialurónico que se selecciona entre la glicirrizina o el ácido glicirretínico, sus sales, enantiómeros y/o racematos, considerados solos o en mezcla.

45 Tiene como segundo objeto un procedimiento de fabricación de una composición o de una preparación farmacéutica o cosmética para aplicación tópica y/o parenteral que comprende, en un medio fisiológicamente aceptable, ácido hialurónico y al menos un retinoide y/o sus sales y/o sus derivados, un oligosacárido, y un inhibidor de la degradación del ácido hialurónico, tales como se han definido anteriormente, caracterizado porque comprende la etapa de mezclado de una cantidad eficaz del ácido hialurónico con al menos un retinoide y/o sus sales y/o sus derivados, al menos un oligosacárido, y al menos un inhibidor de la degradación del ácido hialurónico, tales como se han definido anteriormente. Preferiblemente, el procedimiento según la invención comprende asimismo una etapa de preparación de un medio fisiológicamente aceptable, en el que se mezclan los principios activos.

Por último, tiene como tercer objeto la utilización de una preparación según la invención para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento y/o a la prevención de las afecciones dermatológicas.

Cuando una composición o preparación farmacéutica o cosmética para aplicación tópica y/o parenteral comprende, en un medio fisiológicamente aceptable, ácido hialurónico, y al menos un retinóide y/o sus sales y/o sus derivados, un oligosacárido y un inhibidor de la degradación del ácido hialurónico, tales como se han definido anteriormente, aumenta claramente la biodisponibilidad del ácido hialurónico, permite espaciar las aplicaciones y reducir su número, y presenta una eficacia importante en el relleno de las arrugas, arrugas pequeñas, depleciones fibroblásticas y cualquier cicatriz.

La invención se pondrá más claramente de manifiesto a partir de la lectura de la descripción no limitativa siguiente, en particular con respecto a los dibujos adjuntos, en los que:

- la figura 1 presenta, en una representación semilogarítmica, los resultados de un estudio que tiene como objetivo evaluar el efecto inhibidor de la glicirrizina sobre la actividad hialuronidasa de origen bovino.
- la figura 2 presenta los resultados de un estudio que tiene como objetivo evaluar el efecto de la asociación "GLZ + pentámero (NAG-ácido glucurónico) 5 + retinol" sobre la neosíntesis de ácido hialurónico mediante unos queratinocitos humanos normales.

La preparación según la invención comprende, en un medio fisiológicamente aceptable, ácido hialurónico y al menos un retinóide y/o sus sales y/o sus derivados, un oligosacárido y un inhibidor de la degradación del ácido hialurónico, tales como se han definido anteriormente.

La presente invención tiene también por objeto un producto que comprende, preferiblemente que contiene:

- ácido hialurónico,
- al menos un retinóide y/o sus sales y/o sus derivados,
- al menos un oligosacárido, preferiblemente uno, y
- al menos un inhibidor de la degradación del ácido hialurónico, preferiblemente uno,

tales como se han definido anteriormente,

como producto de combinación para una utilización simultánea, separada o espaciada en el tiempo, en el tratamiento de afecciones dermatológicas.

Dicho producto de combinación es eficaz en particular en el tratamiento de las arrugas, de las arrugas pequeñas, de las depleciones fibroblásticas y de las cicatrices.

Por producto de combinación, se entiende una composición única que comprende cada uno de los compuestos activos, pero también una composición compleja que comprende al menos dos composiciones diferentes que comprenden cada una, una parte de los principios activos de dicha preparación.

Por principios activos, se entienden según la presente invención los compuestos seleccionados entre el ácido hialurónico, al menos un oligosacárido, al menos un inhibidor de la degradación del ácido hialurónico y al menos un retinóide y/o sus sales y/o sus derivados, tales como se han definido anteriormente. Así, el producto de combinación según la invención comprende al menos 4 principios activos.

A título de ejemplo no limitativo de producto de combinación según la invención, se pueden citar:

- una composición única que comprende ácido hialurónico, un retinóide y/o sus sales y/o sus derivados, un oligosacárido y un inhibidor de la degradación del ácido hialurónico, tales como se han definido anteriormente;
- una composición que comprende uno solo de estos cuatro principios activos asociada a una composición que comprende al menos los otros tres principios activos;
- una composición que comprende dos de estos cuatro principios activos, asociados a una composición que comprende al menos los dos otros principios activos; y
- una composición que comprende tres de estos cuatro principios activos asociada a una composición que comprende al menos el cuarto principio activo.

Preferiblemente, el producto de combinación según la invención comprende una composición A que comprende al ácido hialurónico en forma de disolución inyectable (preferiblemente acuosa), asociada a una composición B que comprende al menos:

- un inhibidor de la degradación del ácido hialurónico, preferiblemente la glicirrizina,
- un oligosacárido, preferiblemente el pentámero (NAC-ácido glucurónico)5, y
- un retinoide y/o sus sales y/o sus derivados, preferiblemente el retinol,

en forma de composición para aplicación tópica.

5 Por medio fisiológicamente aceptable según la invención, se entiende un medio compatible con la piel y eventualmente con sus faneros (pestañas, uñas, cabellos) y/o las mucosas.

En las preparaciones según la invención, el ácido hialurónico, el retinoide y/o sus sales y/o sus derivados, el oligosacárido y el inhibidor de la degradación del ácido hialurónico, tales como se han definido anteriormente, están presentes en proporciones que pueden ir de 0,000001% a 10%, preferiblemente de 0,00001% a 1% en peso, con respecto al peso total de la preparación. En la presente descripción, y a menos que se especifique de otra manera, se entiende que, cuando se indican intervalos de concentraciones, estos incluyen los límites superiores e inferiores de dicho intervalo.

Las preparaciones según la invención comprenden ácido hialurónico.

15 Por ácido hialurónico se entiende el compuesto constituido por el encadenamiento de ácido glucurónico y de N-acetil-glucosamina.

De manera ventajosa, el ácido hialurónico es natural.

20 Por ácido hialurónico natural, se entiende un ácido hialurónico no estabilizado, no modificado químicamente en forma, en particular de ésteres, de amidas, o en forma de derivados que poseen unos "puentes intra y/o intercadenas" (cross linked), afectando dichas modificaciones a las características fisicoquímicas y a las propiedades biológicas de dicho ácido hialurónico, así como a su futuro después de la administración.

Las preparaciones según la invención comprenden además un retinoide y/o sus sales y/o sus ésteres, considerados solos o en mezcla.

25 Entre los retinoides susceptibles de entrar en las preparaciones según la invención, se seleccionará preferiblemente el retinol, el retinal y/o el ácido retinoico, sus sales y derivados, considerados solos o en mezcla, más preferiblemente el retinol.

Por sal de retinoide, se entiende en particular una sal de metal alcalino, o una sal alcalinotérrea, o una sal de amina orgánica. Por derivado de retinoide, se entienden los ésteres, tales como el retinil palmitato, el retinil acetato, el retinil estearato, el retinil oleato, el retinil propionato o también el retinil linoleato.

30 De manera ventajosa, los retinoides utilizados en las preparaciones según la invención son unos retinoides que existen naturalmente en el organismo humano.

Las preparaciones según la invención comprenden además un oligosacárido.

Por oligosacárido se entiende, en particular, cualquier oligosacárido que limita la penetración del ácido hialurónico en las células de la piel, en particular los queratinocitos y los fibroblastos.

35 Entre los oligosacáridos, considerados solos o en mezcla, susceptibles de entrar en las preparaciones según la invención, se seleccionará el pentámero del ácido hialurónico.

De manera ventajosa, los oligosacáridos utilizados en las preparaciones según la invención son unos compuestos que existen de manera natural en el organismo humano.

En las preparaciones según la invención, el oligosacárido se utiliza a unas concentraciones comprendidas entre  $10^{-9}$  M y  $10^{-3}$  M, preferiblemente entre  $10^{-8}$  M y  $10^{-5}$  M.

40 Las preparaciones según la invención comprenden además un inhibidor de la degradación del ácido hialurónico.

Por inhibidor de la degradación del ácido hialurónico, se entiende un compuesto capaz de disminuir, incluso bloquear, el catabolismo o bien extracelular, o bien intracelular del ácido hialurónico, preferiblemente un compuesto capaz de disminuir, incluso bloquear, el catabolismo extracelular del ácido hialurónico, más preferiblemente un compuesto capaz de inhibir la hialuronidasa extracelular presente en la piel.

45 Entre los inhibidores de la degradación del ácido hialurónico, considerados solos o en mezcla, susceptibles de entrar en las preparaciones según la invención, se seleccionará en particular la glicirrizina o el ácido glicirretínico, y sus derivados.

De manera ventajosa, los inhibidores de la degradación del ácido hialurónico utilizados en las preparaciones según

la invención son naturales.

En las preparaciones según la invención, el inhibidor se utiliza a concentraciones comprendidas entre  $10^{-9}$  M y  $10^{-2}$  M, preferiblemente entre  $10^{-6}$  M y  $10^{-3}$  M.

Por derivados de la glicirrizina o del ácido glicirretínico, se entiende en particular las sales, los enantiómeros y los racematos de dichos compuestos.

Como sales de dichos compuestos, se pueden citar las sales obtenidas mediante adición de dichos compuestos con una base inorgánica, seleccionada en particular entre los hidróxidos de sodio, de litio, de calcio, de potasio, de magnesio, de amonio o de zinc, los carbonatos de metales alcalinos o alcalinotérreos tales como los carbonatos y bicarbonatos de sodio, de litio, de calcio, de potasio, de magnesio, de amonio o de zinc, o con una base orgánica, seleccionada en particular entre la metilamina, la propilamina, la trimetilamina, la dietilamina, la trietilamina, la N,N-dimetiletilanolamina, el tris(hidroximetil)-aminometano, la etanolamina, la piridina, la picolina, la diciclohexilamina, la morfolina, la proceína, la lisina, la arginina, la histidina, la N-metilglucamina o también las sales de fosfonio tales como las sales de alquilfosfonio, las sales de arilfosfonio, las sales de alquil-arilfosfonio, los alquenil-arilfosfonio o las sales de amonio cuaternarias tales como las sales de tetra-n-butil-amonio. Dichas sales son en particular la sal de potasio del ácido glicirretínico, la sal de sodio del ácido glicirretínico, o también la sal monoamonio del ácido glicirretínico (amonio glicirretinato).

De manera ventajosa, los derivados deben ser de origen natural.

Los compuestos y sus derivados de origen natural son unos compuestos en el estado puro o en disolución a diferentes concentraciones, obtenidos mediante diferentes procedimientos de extracción o de hidrólisis de material biológico de origen natural.

De manera conocida, las preparaciones según la invención pueden contener también los adyuvantes habituales bien conocidos por el experto en la técnica.

Las preparaciones según la invención están formuladas para una aplicación por vía tópica y/o parenteral.

Por vía tópica, las preparaciones se pueden presentar en cualquier forma galénica utilizada normalmente para una administración por vía tópica. A título de ejemplo no limitativo de preparaciones tópicas, se pueden citar unas preparaciones en forma líquida, pastosa o sólida y, más particularmente, en forma de ungüentos, de disoluciones acuosas, hidroalcohólicas u oleosas, de dispersiones de tipo loción eventualmente bifásica, de suero, de geles acuosos, anhidros o lipófilos, de polvos, de tampones empapados, de sindet (detergente sintético), de toallita húmeda, de sprays, de espumas, de barras, de champúes, de compresas, de bases lavantes, de emulsiones de consistencia líquida o semi-líquida del tipo leche, obtenidas mediante dispersión de una fase grasa en una fase acuosa (H/E) o inversamente (E/H), de una microemulsión, de suspensiones o emulsiones de consistencia blanda, semi-líquida o sólida del tipo crema blanca o coloreada, gel o pomada, de suspensiones de microesferas o nanoesferas o de vesículas lipídicas o poliméricas, o de microcápsulas, micro- o nanopartículas o parches poliméricos o gelificados que permiten una liberación controlada.

Por vía parenteral, las preparaciones según la invención se pueden aplicar por vía sub-cutánea o intradérmica. A título de ejemplo no limitativo de preparaciones parenterales, se pueden citar unas preparaciones en forma de disoluciones o suspensiones para perfusión o para inyección.

Según la invención, los compuestos que constituyen la preparación se pueden administrar según un mismo modo de administración o según un modo de administración combinado.

Por modo de administración combinado, se entiende la administración de uno o de varios compuestos de la preparación según la invención por vía tópica combinada con una administración por vía parenteral, en particular mediante inyección subcutánea o intradérmica del o de los otros compuestos de la preparación.

De manera ventajosa, una parte de los compuestos se aplica en primer lugar por vía tópica y otra parte de dichos compuestos se aplica después por vía parenteral o inversamente.

Según una alternativa de la invención, se puede aplicar simultáneamente también una parte de los compuestos por vía tópica y otra parte de dichos compuestos por vía parenteral.

A título de ejemplo no limitativo dado simplemente a título de ilustración y que no podría limitar de ninguna manera el alcance de la invención, el ácido hialurónico se puede administrar en forma de una disolución acuosa inyectable, siendo el retinol, el pentámero de ácido hialobiurónico y la glicirrizina administrados en forma de una crema.

En el marco de una administración combinada, las frecuencias de administración pueden ser idénticas o diferentes.

A título de ejemplo no limitativo, la frecuencia de administración del ácido hialurónico inyectado en forma de una disolución acuosa inyectable puede variar de 1 a 12 meses, preferiblemente de 6 a 12 meses, mientras que las de los demás compuestos de la preparación según la invención administrados en forma de crema puede variar de 1 a 7

días, preferiblemente de 1 a 3 días.

El procedimiento de fabricación de una preparación según la invención se caracteriza porque comprende una etapa de mezclado de una cantidad eficaz de ácido hialurónico, de al menos un retinoide y/o sus sales y/o sus derivados, de al menos un oligosacárido, y de al menos un inhibidor de la degradación del ácido hialurónico, tales como se han definido anteriormente. Preferiblemente, dicho procedimiento comprende una etapa de preparación de un medio fisiológicamente aceptable, en el que se añaden los principios activos.

Según un modo particular de la invención, el procedimiento de fabricación de una preparación comprende las etapas de preparación de un medio fisiológicamente aceptable y de mezclado de una cantidad eficaz de ácido hialurónico, de retinol, de pentámero del ácido hialurónico, y de glicirrizina y/o sus derivados y/o sus análogos.

De manera ventajosa, el procedimiento de fabricación de un producto de combinación según la invención comprende una primera etapa de preparación de una disolución inyectable, que comprende mezclar el ácido hialurónico con un medio fisiológicamente aceptable, y una segunda etapa de preparación de una formulación adaptada a la vía tópica, que comprende mezclar al menos un retinoide y/o sus sales y/o sus derivados, con al menos un oligosacárido y al menos un inhibidor de la degradación del ácido hialurónico, tales como se han definido anteriormente, en un medio fisiológicamente aceptable.

La invención se refiere asimismo a la utilización de una preparación tal como se ha descrito anteriormente para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento y/o a la prevención de las afecciones dermatológicas.

Más particularmente, la invención se refiere a la utilización de una preparación tal como se ha descrito anteriormente para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de las arrugas, de las arrugas pequeñas, de las deplecciones fibroblásticas y de las cicatrices. Dicho medicamento está adaptado al tratamiento de la piel arrugada y/o mayor, y tiene como objetivo en particular prevenir y/o reducir sus efectos. El tratamiento de las arrugas, arrugas pequeñas, deplecciones fibroblásticas y cualquier cicatriz se realiza en particular por relleno.

En particular, la preparación según la invención se puede aplicar sobre las zonas de la cara o de la frente marcadas por unas arrugas de expresión.

La invención se refiere también a la utilización de una preparación tal como se ha descrito anteriormente para la fabricación de un medicamento destinado a ser utilizado en cirugía reparadora.

Además, la invención se refiere a la utilización de una preparación según la invención en el seno de un implante dérmico.

La presente invención se ilustrará ahora por medio de los ejemplos siguientes.

### **30 Ejemplo 1: Efecto inhibidor de la glicirrizina (GLZ) sobre la actividad hialuronidasa de origen bovino**

#### Determinación de la CI50 de GLZ, con o sin pre-incubación a 37°C:

La GLZ, a diferentes concentraciones, se pre-incuba o no durante 20 minutos a 37°C en presencia de la enzima. La reacción enzimática se inicia mediante la adición de la disolución de ácido hialurónico (tiempo T0). Después de 20 minutos de incubación, el ácido hialurónico no hidrolizado se precipita mediante adición de la disolución ácida de albúmina bovina.

Con el fin de verificar que la etapa de pre-incubación no influye en la estabilidad de la hialuronidasa, se coloca un alícuota de una disolución de la enzima a 37°C durante 20 minutos. Se conserva otro alícuota en un baño de hielo durante 19 minutos, y después se incuba a 37°C durante 1 minuto. Se añade entonces una disolución de ácido hialurónico en cada alícuota (T0). Tras 15, 30 o 45 minutos de incubación, se precipita el ácido hialurónico no hidrolizado mediante la adición de la disolución ácida de albúmina bovina.

#### Medición de la actividad hialuronidasa de origen bovino:

Después de la etapa de precipitación, se ha determinado la turbidimetría de las disoluciones con espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm. La densidad óptica (DO) de estas disoluciones se resta de la DO de una disolución de control de ácido hialurónico (de igual concentración) no hidrolizado por la enzima. Esta diferencia de DO, que es inversamente proporcional a la concentración de ácido hialurónico se utiliza para medir la actividad de la hialuronidasa.

El efecto inhibidor de la GLZ sobre la hialuronidasa bovina se ilustra en la figura 1 (representación semi-logarítmica).

Los resultados obtenidos muestran que este efecto es dosis-dependiente y que la concentración en GLZ que inhibe al 50% (CI50) la actividad hialuronidasa es de 400 µm sin preincubación con la enzima.

50 Cuando se preincuba la GLZ durante 20 minutos a 37°C en presencia de la enzima, la CI50 es de 350 µm.

**Ejemplo 2: Efecto inhibidor de la asociación "GLZ+ + pentámero (NAG-ácido glucurónico)5 + retinol" sobre la neosíntesis de ácido hialurónico por unos queratinocitos humanos normales.**

Según la técnica anterior, se admite que pre-existe un equilibrio entre la neosíntesis y la degradación del ácido hialurónico. En otras palabras, la neosíntesis del ácido hialurónico es el reflejo de su degradación: medir las variaciones de una equivale por lo tanto a medir las variaciones de la otra. Por razones de simplicidad técnica, se ha elegido medir la evolución de la neosíntesis de ácido hialurónico en presencia de la asociación "GLZ + pentámero (NAG-ácido glucurónico)5 + retinol", con respecto al control correspondiente.

El aislamiento de los queratinocitos adultos humanos (KHN) se realiza a partir de un fragmento de piel humana recogida después de una operación de plastia abdominal (sujeto CAOL, de 38 años de edad).

5 Se cultivan los KHN hasta la confluencia en monocapa en unas placas de 24 pocillos y se reinoculan. Los KHN se utilizan después de la tercera pasada.

10 El medio de cultivo utilizado es el medio MCK a 37°C en una atmósfera húmeda que contiene 5% de CO<sub>2</sub>.

El medio de cultivo MCK es un medio "SFM-defined keratinocytes" que comprende unos factores de crecimiento, a los que se adicionan penicilina (50 UI/ml) y estreptomicina (50 µg/ml).

15 Preparación de los principios reactivos:

El pentámero (NAG-ácido glucurónico)5 se disuelve a 2 mg/ml en el medio de cultivo MIK (medio MCK que contiene 2 µCi/ml de glucosamina radiomarcada). Se diluye a continuación en medio MIK que contiene 0,2% de DMSO.

Este producto se ensaya a 0,1-0,5 y 2 mg/ml.

- La glicirrizina (GLZ) se disuelve a 400 mM en DMSO.

20 Después, se diluye en el medio de cultivo MIK (medio MCK que contiene 2 µCi/ml de glucosamina radiomarcada).

Este producto se ensaya a 100 - 400 y 800 µM (concentración en DMSO conservada constante: 0,2%).

- El retinol se disuelve a 10 mM en DMSO. Después, se diluye en el medio de cultivo MIK (medio MCK que contiene 2 µCi/ml de glucosamina radiomarcada).

Este producto se ensaya a 1 - 10 y 100 nM (concentración en DMSO conservada constante: 0,2%).

25 - La asociación "GLZ + pentámero (NAG-ácido glucurónico)5 + retinol" se realiza mediante el mezclado de las disoluciones madres preparadas anteriormente. Después, se diluye en medio MIK (medio MCK que contiene 2 µCi/ml de glucosamina radiomarcada).

Este producto se ensaya a:

- 100 µM de GLZ + 0,1 mg/ml de pentámero (NAG-ácido glucurónico)5 + 1 nM de retinol.
- 400 µM de GLZ + 0,5 mg/ml de pentámero (NAG-ácido glucurónico)5 + 10 nM de retinol.
- 800 µM de GLZ + 2 mg/ml de pentámero (NAG-ácido glucurónico)5 + 100 nM de retinol.

Estas tres disoluciones tienen una concentración constante en DMSO de 0,2%.

Protocolo experimental: (según Pienimaki *et al.*, The Journal of Biological Chemistry (2001) vol. 276, nº 23, 8 junio, p 20428-20435).

35 El sistema de reacción está constituido por queratinocitos humanos normales en cultivo monocapa en placas de 24 pocillos (células con confluencia al inicio de la incubación).

Se incuban los KHN en presencia de los productos en el ensayo y de glucosamina radiomarcada durante 6-12-24 y 48 horas, en un volumen final de 400 µl de medio por pocillo de cultivo. La temperatura de incubación es de 37°C, la atmósfera húmeda contiene 5% de CO<sub>2</sub>.

40 a. Recuperación de todos los GAG que comprenden glucosamina radiomarcada:

Al final de la incubación, se recuperan los medios de cultivo mediante centrifugación; después se aclaran las alfombras celulares con PBS. Se recupera la mezcla compuesta por el medio de aclarado y por el sobrenadante inicial. Despues de la adición de ácido hialurónico (10 µg/fracción, papel de "carrier" durante las precipitaciones con cloruro de cetil-piridinio (CPC) y de papaina (200 µg/fracción, hidrólisis de los proteoglicanos con liberación de los GAG), se incuban las fracciones durante 2 horas a 60°C; después se incuban las fracciones durante 10 minutos a

100°C para desactivar las enzimas por desnaturación térmica. Por último, se precipitan los GAG por adición de CPC (concentración final de 1%) y se incuban durante una noche a temperatura ambiente. Después de la centrifugación durante 10 minutos a 15000 g, y después la eliminación de los sobrenadantes que contienen la glucosamina radiomarcada no incorporada, se aclaran los peletes mediante CPC al 1%, y se centrifuga nuevamente durante 10 minutos a 15000 g, y después se eliminan los sobrenadantes.

5

**b. Medición de la neosíntesis de ácido hialurónico:**

Se hidroliza específicamente el ácido hialurónico contenido en los peletes de centrifugación por incubación (3 horas a 37°C) de estos peletes con hialuronidasa (hialuronan liasa de *Streptomyces hyaloriticus*, 0,25 unidades/fracción). Para ello, se incuba el medio que contiene estos peletes y la hialuronidasa durante 3 horas a temperatura ambiente, y después se centrifuga durante 10 minutos a 15000 g. Por último, se precipitan los GAG no hidrolizados por adición de CPC (1% en concentración final) en presencia de sulfato de condroitina (50 µg/fracción - papel de "carrier"). La radioactividad del sobrenadante, determinada en centelleo líquido (contador β), es directamente proporcional a la cantidad de ácido hialurónico neosintetizado durante la incubación de las células con la glucosamina radiomarcada.

10

Las mediciones de radioactividad están presentadas en las tablas siguientes:

	Incubación 6h	Incubación 12h	Incubación 24h	Incubación 48h	Incubación 72h
dpm	4156	12216	38404	62938	64701
	3997	11874	34050	70271	74910
	4232	12463	30264	62411	79646
	Media	4128	12184	34239	65207
Desviación estándar	120	296	4073	4394	7638

15 Tabla 1: Medición de la neosíntesis de ácido hialurónico por unos queratinocitos humanos normales en ausencia de la asociación "GLZ + pentámero (NAG - ácido glucurónico)5 + retinol" (Control).

100 nM de GLZ + 0,1 mg/ml de pentámero (NAG-ácido glucurónico)5 + 1 nM de retinol					
	Incubación 6h	Incubación 12h	Incubación 24h	Incubación 48h	Incubación 72h
dpm	3508	12844	28289	51974	63822
	3388	14053	26971	55088	64251
	3697	13347	30200	56652	61504
	Media	3531	13415	28487**	54571**
Desviación estándar	156	607	1624	2381	1478
400 nM de GLZ + 0,5 mg/ml de pentámero (NAG-ácido glucurónico)5 + 10 nM de retinol					
	Incubación 6h	Incubación 12h	Incubación 24h	Incubación 48h	Incubación 72h
dpm	3672	9847	25363	26813	54202
	3698	10724	27404	36235	49799
	3461	10577	25351	29007	54488
	Media	3610	10383***	26039***	30685***
Desviación estándar	130	470	1182	4930	2629
800 nM de GLZ + 2 mg/ml de pentámero (NAG-ácido glucurónico)5 + 100 nM de retinol					
	Incubación 6h	Incubación 12h	Incubación 24h	Incubación 48h	Incubación 72h
dpm	3203	8263	17640	32714	33910
	3401	8875	19682	30070	29693
	2580	7590	21320	29092	29194
	Media	3061	8243***	19547***	30625***
Desviación estándar	428	643	1844	1874	2591

\*\*: media significativamente diferente de la del grupo control ( $p<0,05$ )

\*\*\*: media significativamente diferente de la del grupo control ( $p<0,01$ )

20 Tabla 2: Medición de la neosíntesis de ácido hialurónico por unos queratinocitos humanos normales en presencia de la asociación "GLZ + pentámero (NAG-ácido glucurónico)5 + retinol".

El efecto inhibidor de la asociación "GLZ + pentámero (NAG-ácido glucurónico)5 + retinol" sobre la neosíntesis de ácido hialurónico por unos queratinocitos humanos normales se ilustra en la figura 2.

25

Los resultados obtenidos muestran una inhibición marcada de la neosíntesis de ácido hialurónico. Este efecto es dosis-dependiente y, a las concentraciones más elevadas de los tres componentes, la inhibición de la neosíntesis es del orden de 50 a 60%. Debido al equilibrio pre-existente entre neosíntesis y degradación del ácido hialurónico, esta inhibición de la neosíntesis observada corresponde a una inhibición de la degradación equivalente.

Por lo tanto, se puede concluir que el efecto de la asociación protege el ácido hialurónico de la degradación. Este sistema permite por lo tanto aumentar la bioestabilidad del ácido hialurónico y, por consiguiente, mejorar su biodisponibilidad.

#### Ejemplo 3: Composición nº 1

5 Disolución inyectable nº 1 que contiene los 4 componentes

Esta composición se prepara de manera clásica para el experto en la materia:

Ácido hialurónico	2%
Glicirrizina	0, 02%
pentámero(NAC-ácido glucurónico)5	0,002%
Retinol	0,00001%
Agua	csp 100%

#### Ejemplo 4: Composición nº 2

Disolución inyectable nº2 de ácido hialurónico acoplada con una crema que contiene los otros 3 componentes

<i>Disolución inyectable</i>	
Ácido hialurónico	2%
Aqua	csp 100%

<i>Crema</i>	
Glicirrizina	0,02%
Pentámero (NAC-ácido glucurónico)5	0,002%
Retinol	0,00001%
Ácido esteárico	3,00%
Mezcla de mono estearato de glicerilo y de estearato de PEG (100 OE)	2,5%
Esterato de PEG (20 OE)	1,0%
Ciclopentadimetilsiloxano	10,00%
Aceites vegetales	7,00%
Aceites sintéticos	6,00%
Goma de silicona	0,20%
Alcohol esteárico	1,00%
Aqua	csp 100%

**REIVINDICACIONES**

1. Preparación farmacéutica o cosmética que comprende, en un medio fisiológicamente aceptable, ácido hialurónico, caracterizada porque comprende además al menos:

- un retinóide y/o sus sales y/o sus ésteres, tales como el retinil palmitato, el retinil acetato, el retinil estearato, el retinil oleato, el retinil propionato o el retinil linoleato,
- un pentámero del ácido hialurónico, y
- un inhibidor de la degradación del ácido hialurónico que se selecciona entre la glicirrizina o el ácido glicirretínico, sus sales, enantiómeros y/o racematos, considerados solos o en mezcla.

2. Preparación según la reivindicación 1, caracterizada porque el retinóide es el retinol.

3. Preparación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizada porque está formulada para una aplicación por vía tópica.

4. Preparación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizada porque está formulada para una aplicación por vía parenteral.

5. Preparación parenteral según la reivindicación 4, caracterizada porque se presenta en forma de disoluciones o suspensiones para perfusión o para inyección.

6. Producto que contiene:

- ácido hialurónico,
- al menos un retinóide y/o sus sales y/o sus ésteres, tales como retinil palmitato, el retinil acetato, el retinil estearato, el retinil oleato, el retinil propionato o el retinil linoleato,
- al menos un pentámero del ácido hialurónico, y
- al menos un inhibidor de la degradación del ácido hialurónico, que se selecciona entre la glicirrizina o el ácido glicirretínico, sus sales, enantiómeros y/o racematos, considerados solos o en mezcla,

como producto de combinación para una utilización simultánea, separada o espaciada en el tiempo, en el tratamiento de afecciones dermatológicas.

7. Producto de combinación según la reivindicación 6, caracterizado porque comprende una composición A que comprende el ácido hialurónico en forma de disolución inyectable, asociada a una composición B que comprende al menos:

- un inhibidor de la degradación del ácido hialurónico que se selecciona entre la glicirrizina o el ácido glicirretínico, sus sales, enantiómeros y/o racematos, considerados solos o en mezcla,
- un pentámero del ácido hialurónico, y
- un retinóide y/o sus sales y/o sus ésteres, tales como retinil palmitato, el retinil acetato, el retinil estearato, el retinil oleato, el retinil propionato o el retinil linoleato,

en forma de composición para aplicación tópica.

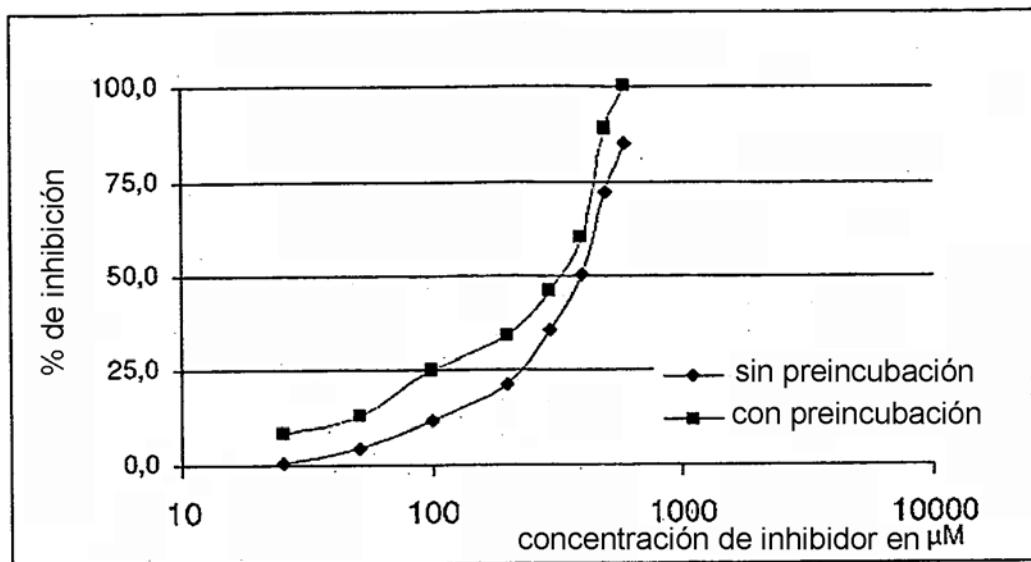
8. Procedimiento de fabricación de una preparación farmacéutica o cosmética según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque comprende la etapa de mezclar una cantidad eficaz de ácido hialurónico, al menos un retinóide y/o sus sales y/o sus ésteres, tales como el como retinil palmitato, el retinil acetato, el retinil estearato, el retinil oleato, el retinil propionato o el retinil linoleato, al menos un pentámero del ácido hialurónico, y al menos un inhibidor de la degradación del ácido hialurónico que se selecciona entre la glicirrizina o el ácido glicirretínico, sus sales, enantiómeros y/o racematos, considerados solos o en mezcla.

9. Procedimiento de fabricación de un producto según la reivindicación 7, caracterizado porque comprende:

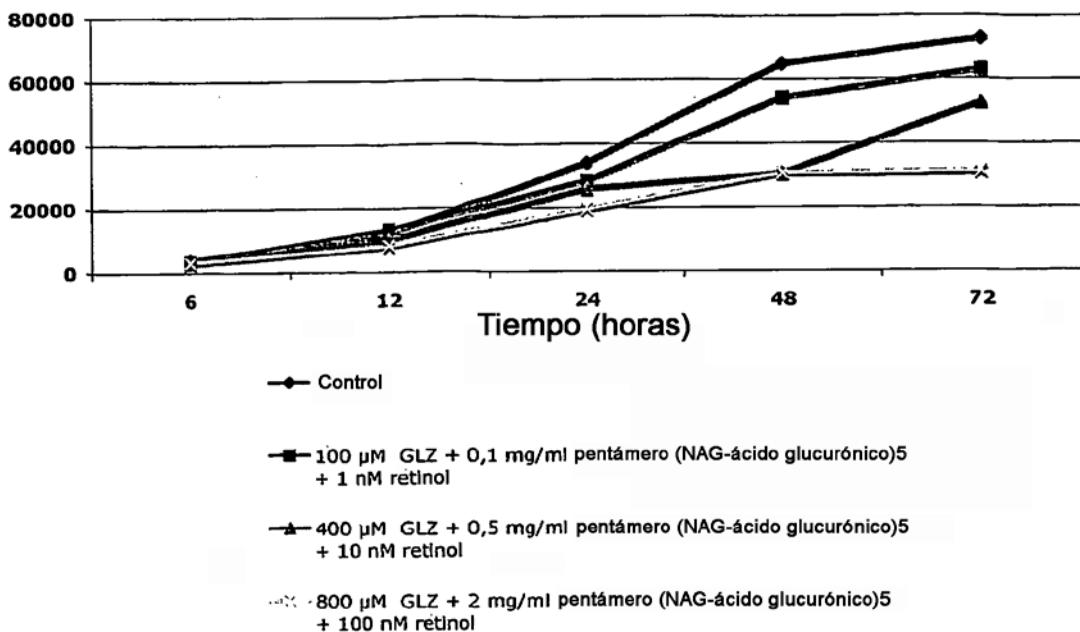
- una primera etapa de preparación de una disolución inyectable, que comprende mezclar el ácido hialurónico con un medio fisiológicamente aceptable,
- una segunda etapa de preparación de una composición adaptada a la vía tópica, que comprende mezclar al menos un retinóide y/o sus sales y/o sus ésteres, tales como el como retinil palmitato, el retinil acetato, el retinil estearato, el retinil oleato, el retinil propionato o el retinil linoleato, con al menos un pentámero del ácido hialurónico y al menos un inhibidor de la degradación del ácido hialurónico, que se selecciona entre la glicirrizina o el ácido glicirretínico, sus sales, enantiómeros y/o racematos, considerados solos o en mezcla,

en un medio fisiológicamente aceptable.

10. Utilización de una preparación según una de las reivindicaciones 1 a 5 para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento y/o a la prevención de las afecciones dermatológicas.
- 5      11. Utilización de una preparación según una de las reivindicaciones 1 a 5 para la fabricación de un medicamento destinado a ser utilizado en cirugía reparadora.
12. Utilización de una preparación según una de las reivindicaciones 1 a 5 para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento por relleno de las arrugas, de las arrugas pequeñas, de las depleciones fibroblásticas y de las cicatrices.



**Figura 1: Efecto de GLZ sobre la hialuronidasa bovina**



**Figura 2: Efecto de la asociación "GLZ + pentámero (NAG-ácido glucurónico) 5 + retinol" sobre la neosíntesis de ácido hialurónico mediante unos queratinocitos humanos normales.**