

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 957**

51 Int. Cl.:

**A61K 8/23** (2006.01)

**A61K 8/60** (2006.01)

**A61Q 19/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.03.2008 E 08718012 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2015 EP 2136771**

54 Título: **Composiciones que contienen N-acetilglucosamina para su utilización en dermatocosmetología y medicina estética**

30 Prioridad:

**22.03.2007 IT TO20070210**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**17.09.2015**

73 Titular/es:

**ROTTAPHARM S.P.A. (100.0%)  
GALLERIA UNIONE 5  
20122 MILANO, IT**

72 Inventor/es:

**SENIN, PAOLO;  
SANTORO, ANTONINO y  
ROVATI, LUIGI ANGELO**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 545 957 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

Composiciones que contienen N-acetilglucosamina para su utilización en dermocosmetología y medicina estética

### Introducción

Estructura de la piel

- 5 A diferencia de lo que pueda parecer, la piel tiene una estructura bastante compleja y puede asemejarse esquemáticamente a la superposición de tres capas de tejido, a saber, la epidermis, la dermis y el tejido cutáneo, cada una caracterizada por funciones precisas, bien diferenciadas.

10 La capa superior, conocida como epidermis, es algo resistente y aparece delgada al microscopio. Se erosiona progresivamente y se renueva constantemente. Es translúcida y permite que la luz pase sólo parcialmente a su través, algo así como el vidrio esmerilado. La epidermis no contiene vasos sanguíneos, recibe oxígeno y nutrientes de las capas más profundas del tejido cutáneo, impide la pérdida excesiva de humedad del cuerpo y da a la piel sana un aspecto atractivo.

15 Todas las células de la epidermis se originan a partir de una sola capa conocida como la capa basal. El tipo celular predominante en la epidermis es el de los queratinocitos, que toma su nombre de su capacidad para sintetizar queratina. Las queratinas son proteínas naturales no solubles en agua con alta resistencia a la temperatura y pH; que se dividen en queratinas duras y blandas: las queratinas duras del cabello, la piel y las uñas, mientras que las queratinas blandas son los principales componentes de las células queratinizadas de las capas más externas de la epidermis, y también se encuentran, como sustancias de conexión, en el espacio extracelular de otras capas de la epidermis.

20 Además de los queratinocitos, la epidermis también contiene melanocitos, que están localizados en la capa basal y producen el pigmento de la piel conocido como melanina, que, dependiendo de la cantidad, determina el color de la piel y el cabello; además, los melanocitos aumentan la expresión de la melanina como resultado del efecto de la radiación solar como una reacción de defensa contra el daño potencial causado por el impacto de los rayos ultravioleta en el tejido de la piel.

25 La capa basal ya mencionada, que separa la dermis de la epidermis, consiste precisamente en células melanocíticas y queratinocitos cilíndricos, al frente de la mitosis celular, garantizando la regeneración epidérmica continua, y la división celular de la cual depende, a su vez, en la función desempeñada por otras sustancias tales como los diversos factores de crecimiento, hormonas y vitaminas.

30 Entre la capa basal de la epidermis y la dermis se encuentra la membrana basal (en sí también desprovista de vasos sanguíneos), también conocida como la unión dermo-hipodérmica que, además de la separación de las dos capas cutáneas, también está implicada en el anclaje de las células basales a la dermis y la mediación de diversas funciones nutricionales y metabólicas.

La segunda capa, es decir, la dermis, contiene vasos sanguíneos, nervios, raíces capilares, glándulas sudoríparas y todas las estructuras que confieren resistencia y elasticidad a la piel.

35 La dermis está compuesta principalmente por haces de colágeno horizontales que corren a través de ella y se sumergen en sustancia gelatinosa conocida como sustancia fundamental, que a su vez forma parte de la matriz extracelular. El colágeno constituye hasta el 75% del peso de la dermis y es responsable de la tonicidad y elasticidad de la piel. Los haces de colágeno se mantienen unidos por fibras elásticas hechas de una proteína llamada elastina, que representa menos del 5% del peso de la dermis y, a pesar del nombre, no es directamente responsable de la elasticidad natural de la piel.

40 Tanto el colágeno como las fibras elásticas son producidas por células conocidas como fibroblastos, que se encuentran en la dermis. Los fibroblastos no sólo producen y organizan la matriz extracelular de la dermis, sino que también se comunican entre sí y con otros tipos de células, realizando funciones muy importantes en la fisiología de la piel, tales como, por ejemplo, la liberación de factores de crecimiento/citocinas que, a su vez, desempeña una función importante en la cicatrización de heridas al modular la actividad de los queratinocitos (Sorrell M. y Caplan A. I. 2004).

45 El ácido hialurónico (AH) es otro componente fundamental de la matriz extracelular elastoviscosa en la que están inmersas las fibras de colágeno, las fibras elásticas y otras estructuras celulares. Tiene capacidad para atraer agua en cantidades iguales a cientos de veces su peso, y por lo tanto representa una sustancia hidratante natural, responsable de la tonicidad de la piel y sus reservas de humedad. Además, el AH facilita el transporte de nutrientes esenciales de la sangre a las células de la piel. AH es un polisacárido natural, lineal compuesto de una unidad estructural de disacárido constituida por monosacáridos ácido D-glucurónico y N-acetil-glucosamina (NA), y está presente en todos los organismos vivos. A diferencia del colágeno, el ácido hialurónico no presenta especificidad de tejido o especie y no es ni alérgico ni irritante.

50 Otra clase de sustancias presentes en la matriz extracelular, y estrecha, estructural y funcionalmente relacionada con AH, está representada por los glucosaminoglicanos (GAG). Éstos están constituidos por largas cadenas de unidades de disacárido en donde los monómeros están representados por glucosamina o galactosamina y ácidos urónicos. Los GAG llevan cargas negativas, debido a la presencia de grupos sulfónicos y los ácidos urónicos anteriormente

mencionados (y esta estructura explica su potente capacidad para atraer iones negativos y enormes cantidades de H<sup>2</sup>O), y se adhieren a las cadenas de proteínas (proteínas del núcleo) para formar los proteoglicanos. Los proteoglicanos son el componente principal de la matriz extracelular y, junto con el AH, al que están unidos por enlace covalente (por medio de las proteínas de enlace), y fibras de colágeno, constituyen la estructura extracelular del tejido conectivo y por tanto la piel, confiriendo dicho tejido con la mayoría de sus características mecánicas/funcionales.

Por último, la parte más interna de la piel está representada por la hipodermis o capa subcutánea, que consta de vasos sanguíneos, nervios y grupos de adipocitos. Desde el punto de vista estructural, la separación de la dermis superpuesta no está bien definida, aunque más profunda, la hipodermis está unida al músculo y tejido adiposo subyacente, que se deposita en el mismo en cantidades variables, y ejerce una función bien definida de aislamiento y modelado.

#### 10 Características funcionales de la piel y factores de acondicionamiento

Se han realizado varios estudios con el alcance de determinar el efecto del ácido hialurónico y otras sustancias sobre la actividad celular de la piel.

- El ácido hialurónico exógeno puede influir en la proliferación de fibroblastos de la piel, y este efecto varía dependiendo de la densidad celular y la concentración de ácido hialurónico en sí. En este sentido, y como observan Yoneda M. *et al.* (1988), la adición de AH a cultivos primarios de fibroblastos de piel de ratón, provoca la síntesis temporal de ADN con la consiguiente reserva positiva constituida por un aumento de los propios fibroblastos de la piel, y por lo tanto de la expresión de AH endógeno.
- La importancia de AH exógeno se confirma además por el hecho de que, según Isnard N. *et al.* (2001), en cultivos de fibroblastos y queratinocitos humanos, la adición de AH (1 mg/ml) provoca un claro aumento en la expresión de metaloproteasas de la matriz extracelular, conocidas por desempeñar una función importante en la remodelación de tejidos en una variedad de procesos fisiológicos y patológicos.

Con el avance de la edad, la elasticidad y el tono de la piel se reduce visiblemente con la consiguiente aparición de arrugas de diferentes profundidades y la pérdida de la característica de la turgencia de la piel más joven más agradable desde el punto de vista estético. Este envejecimiento está relacionado esencialmente con el ritmo de renovación ralentizado tanto del AH, con capacidad por consiguiente reducida para absorber/retener la humedad del tejido, como del colágeno, con deterioro de las demás características funcionales de la piel, tales como la resistencia al estrés externo y la elasticidad.

La búsqueda de sustancias que se utilizará en dermocosmetología y medicina estética para uso tópico o como un relleno de la piel para la corrección de las arrugas faciales de la piel y para la mejora del tejido facial suave, ha sido objeto de un esfuerzo continuo durante numerosos años. Actualmente están disponibles varios biomateriales, pero todos han demostrado limitaciones onerosas: se absorben o bien demasiado rápidamente y por tanto no son de uso práctico, o pueden dar lugar a reacciones alérgicas (tales como por ejemplo en el caso del colágeno), o incluso migrar lejos del sitio de la inyección.

Una sustancia segura y eficaz para los usos anteriormente mencionados debe ser biocompatibles, no pirógena, no debe ser ni alérgica ni tóxica, no debe causar inflamación, debe ser fácil de usar, estable y no migrar después de la inyección, debe durar tanto tiempo como sea posible, pero al mismo tiempo, debe poder reabsorberse y debe dar a la piel un aspecto natural: por sus características físico-químicas y mecánicas/estructurales, el ácido hialurónico ha demostrado ser capaz de satisfacer simultáneamente todos estos requisitos funcionales. Fue desarrollado como un material de relleno de la piel por primera vez en 1989 por E. Balazs, quien observó la biocompatibilidad y ausencia de inmunogenicidad (Balazs E. A. y Leshchiner E. A. 1989). El ácido hialurónico exógeno es reabsorbido rápidamente por la dermis y metabolizado en el hígado con la formación de dióxido de carbono y agua. El proceso de reabsorción del AH es rápido y completo, y depende de la unión al receptor y de la degradación intracelular. La vida media en la piel es muy corta, es decir, menos de 24 horas.

Con el fin de obviar dicho inconveniente, el ácido hialurónico para su uso como un relleno de efecto prolongado puede reticularse químicamente. Mientras se mantiene inalterada su biocompatibilidad, el proceso de reticulación altera la solubilidad y las propiedades reológicas de este polisacárido, volviéndose cada vez más viscoso y asumiendo la consistencia de un gel. Los geles de ácido hialurónico utilizados como material de relleno de la piel son "hidrogeles", ya que se vuelven a esponjar el 95% de su peso en agua y permanecen estables en el tejido, reabsorbiéndose sólo después de varios meses, lo que los hace ventajosos para su utilización en dermocosmetología y medicina estética.

Una ventaja adicional está representada por el hecho de que, a diferencia de otros materiales de relleno temporales tales como colágeno, los geles a base de ácido hialurónico se eliminan del tejido por degradación isovolumétrica y que, poco a poco, como las moléculas de ácido hialurónico se degradan y eliminan, los residuos pueden aglutinar más agua, con la ventaja de que todo el volumen inyectado permanece inalterado.

Para completar el cuadro sobre el uso de ácido hialurónico en dermocosmetología, cabe subrayar que, en su forma no reticulada, puede utilizarse ventajosamente tal como es, y en relación con otros principios activos, en soluciones, geles, cremas u otras formas de aplicación tópica, con efectos beneficiosos evidentes sobre el tono y la turgencia de la piel, favoreciendo la hidratación y por lo tanto el aspecto estético.

Los resultados de varias pruebas clínicas publicados en la bibliografía, en varios geles de ácido hialurónico están generalmente de acuerdo: en efecto, tanto desde el punto de vista del médico como del paciente, se observan mejoras muy satisfactorias con defectos de la piel, y el grado de corrección se ha evaluado entre 60 y 90%, 6 a 9 meses después de la primera inyección (Duranti F. *et al.* 1998; Olenius M. 1998; Carruthers J. *et al.*, 2005; S. di Bosniak *et al.*, 2004; Narins R. S. *et al.* 2003; Lindqvist C. *et al.*, 2005; Carruthers J. y Carruthers A., 2003).

Como ya se ha mencionado anteriormente, entre los componentes fundamentales de la matriz extracelular del tejido conectivo y por lo tanto de la piel, los inventores han encontrado los glucosaminoglucanos (GAG) y ácido hialurónico, y las características, propiedades y funciones de este último ya se han descrito y especificado exhaustivamente.

En ambos casos, desde el punto de vista estructural, existen polímeros glucosídicos no ramificados, en donde la unidad repetitiva está constituida por disacáridos, cuyos monómeros están representados por los ácidos urónicos tales como el ácido glucurónico, galacturónico o idurónico y aminoazúcares tales como N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina, sustituidos de diversas formas.

A partir de lo anterior, es fácil deducir que, además del AH, hay otras sustancias que pueden ser sumamente importantes en la conservación y/o mejora de la funcionalidad de la piel y el aspecto estético. Uno de éstos es NAG.

Hay estudios disponibles en la bibliografía y las pruebas, descritos a continuación en el apartado experimental de la presente solicitud de patente, que muestran cómo NAG ejerce una acción positiva indiscutible en las características y funcionalidad de la piel, a fin de justificar y recomendar su uso ventajoso en dermo-cosméticos y medicina estética. Así, por ejemplo:

- NAG estimula la actividad de la enzima hialuronato sintetasa en las fracciones de membranas plasmáticas de fibroblastos de piel humana (Mian 1986), apoyando y sinergizando así la utilización de AH exógeno en la defensa de la piel contra el estrés externo y los procesos de envejecimiento naturales y/o patógenos con la consiguiente pérdida de tono, turgencia, luminosidad y la aparición de arrugas de profundidad variable.

- En un modelo "*in vitro*" que reproduce las diversas capas de la piel, es decir, el modelo de piel MatTek Human Skin EpiDemFT (Maktek Corp., Ashland, MA EE.UU.), la adición de NAG dio lugar a un aumento muy alto, significativo y dependiente de la dosis de AH y procolágeno 1 (Osborne R. *et al.* 2006).

- Para completar la documentación científica existente y a partir del apartado experimental detallado a continuación, es evidente que, en cultivos "*in vitro*" de fibroblastos y queratinocitos de origen humano, NAG ejerce un efecto claramente dependiente de la dosis en la expresión de AH (probado en fibroblastos solos), colágeno, elastina y otras proteínas producidas normalmente en la dermis, lo que justifica y apoyar aún más su uso en dermocosmetología, según los métodos descritos, ilustrados y reivindicados en la presente solicitud de patente.

El documento US-A-3697652 describe la N-acetilglucosamina y el sulfato sódico en preparados farmacéuticos para el tratamiento de afecciones degenerativas de las articulaciones.

El documento EP-A-1384482 describe composiciones para el cuidado de la piel que comprenden N-acetilglucosamina y al menos uno de retinoide y provitamina A.

El documento EP-A-1075838 describe la utilización de N-acetilglucosamina como agente para el cuidado de la piel para administración oral.

### Compendio de la invención

A partir de la descripción proporcionada en la introducción, es claramente evidente que la utilización tanto del AH exógeno como de la NAG es ciertamente eficaz y que se recomienda en los preparados para utilización tópica (dermocosmetología) e intradérmica (medicina estética).

La presente invención se basa en el reconocimiento del hecho de que la actividad de la NAG se potencia gracias a la asociación entre la NAG y un sulfato de metal alcalino en un intervalo de la relación en peso definido. Por lo tanto, una composición sinérgica, tal como se define en las siguientes reivindicaciones, constituye el objeto de la invención.

Según la invención, se ha realizado y estudiado una composición molecular entre NAG y un sulfato de metal alcalino (en lo sucesivo sulfato sódico anhidro (SSA) se utilizará como referencia ponderal), en donde la relación de peso equivalente entre NAG y SSA puede variar entre 1:0,5 y 1:3, a continuación utilizando prácticamente, por razones que se aclararán en el apartado experimental, la relación más ventajosa, es decir, 1:1 (correspondiente en términos ponderales a 75,7% de NAG y 24,3% de SSA). Con respecto a este asunto, cabe destacar que, para evitar confusiones, en adelante, la combinación molecular correspondiente a la relación experimentalmente más ventajosa entre las pesos equivalentes, es decir, 1:1 se conoce como Condramina (CA), mientras que todas las demás combinaciones en el intervalo de 1:0,5-1:3 (excluyendo obviamente 1:1), se identificarán por la abreviatura COMBI. Después de una etapa experimental preliminar, que pone de manifiesto la ventajosa utilización de CA con respecto a todas las demás preparaciones de COMBI (en cualquier caso conveniente con respecto a la utilización de NAG en dosis correspondientes), las actividades de CA en la estimulación de la expresión de AH, colágeno, elastina y otras proteínas, en cultivos "*in vitro*" de fibroblastos y queratinocitos, se han probado y comparado con los de NAG y sulfato sódico,

considerados individualmente y en dosis/concentraciones correspondientes a las presentes en CA, utilizado en las mismas pruebas.

- 5 - Como era de esperar, y como se describe con detalle en el apartado experimental, la NAG dio resultados óptimos tanto en cultivos de fibroblastos como de queratinocitos, mientras que, de una manera predecible de manera similar, se demostró que el sulfato sódico era totalmente inactivo, por lo tanto, con resultados no significativamente distinguibles de los de los cultivos de referencia.
- 10 - En una forma totalmente inesperada e impredecible, excepto en el caso en la estimulación de la expresión de elastina en cultivos de fibroblastos, donde no hay diferencia significativa con NAG, invariablemente, CA dio mejores resultados que los de NAG a las correspondientes dosis/concentraciones. Dichos efectos se mostraron constantemente que eran dependientes de la dosis y estadísticamente significativos, lo que lleva a la conclusión, totalmente impredecible de antemano, de la innegable existencia de una acción sinérgica entre NAG y SSA en ejercer una estimulación útil de la producción de sustancias útiles al trofismo cutáneo por esas células característicos del propio tejido cutáneo, tales como fibroblastos y queratinocitos.
- 15 - Por otra parte, como las concentraciones/dosis, utilizadas en las pruebas son absolutamente compatibles con potenciales aplicaciones prácticas y las pruebas en paralelo sobre la citotoxicidad potencial de CA han dado resultados bastante tranquilizadores, hay una posibilidad obvia práctica de usar ventajosamente CA, en lugar de NAG, tanto para uso oral como para uso tópico e intradérmico, preferiblemente junto con AH, en dermatocosmetología y medicina estética como se describe con detalle en los ejemplos descritos a continuación en la presente solicitud de patente.

20 Información sobre los principios activos utilizados en las composiciones descritas y reivindicados en la presente solicitud de patente

Ácido hialurónico (AH) utilizado como tal o como una sal de sodio:

- CAS nº (ácido): 9004-61-9
- CAS nº (sal de sodio): 9067-32-7
- 25 - Origen: biofermentación
- Peso molecular: comprendido entre 0,5 y  $3 \times 10^6$  Da
- Nivel de reticulación (donde se utiliza): comprendido entre 0,5 y 5%

Las concentraciones de AH descritas y reivindicadas en la presente solicitud de patente no exceden del 4% y están comprendidas preferiblemente en el intervalo de 1-3%.

30 Combinación NAG-SSA (COMBI):

COMBI se compone de NAG y SSA en relaciones de peso equivalente que varían entre 1:0,5 y 1:3 (excluyendo la relación de 1:1 ya identificada como Condramina (CA)), que corresponden a las proporciones ponderales que oscilan entre 86,17% y 50,93% para NAG y entre 13,83% y 49,07% para SSA:

Condramina (CA):

35 CA se compone de NAG y SSA en una relación de peso equivalente igual a 1:1, que corresponde en términos ponderales a 75,7% de CA y 24,3% de SSA

Tanto COMBI como CA están constituidas por:

a. NAG:

- Denominación: N-acetil-2-amino-2-desoxiglucosa
- 40 - CAS nº: 7512-17-6
- Peso molecular: 221,19
- Fórmula empírica:  $C_8H_{15}NO_6$

b. SSA:

- 45 - CAS nº: 7757-82-6
- Peso molecular: 142,05
- Fórmula empírica:  $Na_2O_4S$

Las concentraciones/dosis de CA usadas dentro del alcance de la invención están comprendidas preferiblemente entre 0,05% y 2,5% en peso, y más preferiblemente entre 0,1 y 0,5% con respecto a las formas tópicas e intradérmica,

mientras que, si se utiliza para administración oral, CA puede tomarse en dosis diarias, expresadas en términos de base de glucosamina, comprendidas entre 100 y 1.000 y preferiblemente 250-750 mg, en una o más administraciones, dependiendo de la de dosis y forma farmacéutica utilizada.

#### Apartado experimental

- 5 El efecto sinérgico conseguido por la composición según la invención se ha verificado mediante una serie de pruebas "*in vitro*", evaluando y comparando los resultados experimentales en relación con Condramina (CA) con los de sus componentes, es decir, N-acetilglucosamina (NAG) y sulfato sódico anhidro (SSA) considerados individualmente, a concentraciones coherentes con la relación entre sus pesos equivalentes en CA, que ha demostrado ser el más conveniente es decir, 1:1. Dicha relación se ha seleccionado basándose en los resultados de una prueba preliminar  
10 donde la evaluación se ha centrado en el efecto experimental de la variación de la relación recíproca de NAG y SSA en COMBI.

#### Métodos

Las pruebas seleccionadas han sido:

1. Evaluación *in vitro* de la estimulación de la síntesis de ácido hialurónico (AH) de CA, NAG y SSA en cultivos de  
15 fibroblastos humanos (Véase también: Sayo *et al.*, 2004)

La prueba se ha llevado a cabo en dos etapas, es decir:

- etapa A: en la que se ha evaluado la estimulación de la expresión de AH por COMBI mientras se mantiene la constante de concentración y se varían las cantidades recíprocas de sus componentes. La concentración utilizada se ha seleccionado con el fin de permitir la comparación con los resultados procedentes de la etapa B;
- 20 - etapa B: en la que se ha evaluado el efecto de la CA sobre la expresión del AH variando su concentración y en comparación con dosis coherentes con sus componentes.

#### Prueba fundamental

- Dado que el contenido de AH de la piel disminuye con la edad, dando lugar al envejecimiento de la piel, con la consiguiente aparición de arrugas y la pérdida de elasticidad, el alcance de la prueba ha sido la evaluación y  
25 comparación de la estimulación potencial, ejercida por las sustancias de ensayo, en la expresión de AH en cultivos "*in vitro*" de células procedentes de la piel tales como los fibroblastos. El ensayo en cuestión, aunque realizado "*in vitro*", puede considerarse predictivo de los efectos del uso de las mismas sustancias "*in vivo*".

#### Modelo celular

Se han utilizado fibroblastos humanos, Detroit 551 ATCC CCL III de LGC Promochem (Milán, Italia).

- 30 Sustancias de ensayo y concentraciones

Las sustancias ensayadas para determinar su efecto sobre la expresión de AH en cultivos de fibroblastos humanos han sido:

#### Etapas A:

- COMBI: a una concentración constante de 1,98 mg/ml con relaciones de NAG a SSA, en términos de peso  
35 equivalente, igual a 1:0,4; 1:0,5; 1:3 y 1:3,5
- CA: a una concentración de 1,98 mg/ml con una relación de peso equivalente, entre NAG y SSA, igual a 1:1

#### Etapas B:

- CA: en donde la relación entre los componentes, en términos de peso equivalente, se ha mantenido constante e igual a 1:1 y las concentraciones ensayadas son 0-66; 1,32; 1,98; 2,64 y 3,3 mg/ml
- 40 - NAG a concentraciones de 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 y 2,5, correspondiente al contenido de NAG en CA a las concentraciones y en la relación de peso equivalente (1:1) empleada en la misma prueba
- SSA en concentraciones de 0,16, 0,32, 0,48, 0,64 y 0,80 mg/ml, correspondiente al contenido de SSA en CA a las concentraciones y en la relación de peso equivalente (1:1) empleada en la misma prueba

#### Preparación de cultivos celulares

- 45 Se han cultivado fibroblastos humanos en un medio adecuado de crecimiento (medio esencial mínimo de Eagle) enriquecido con 10% de suero fetal bovino (SFB), piruvato sódico 1 mM, glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales y 50 µg/ml de glutamicina. Las células confluentes se han sembrado en placas de 24 pocillos,  $5 \times 10^4$  células/pocillo, utilizando el mismo medio. En la confluencia, las células se han expuesto previamente a un medio que contenía 5% de suero, antes de la adición de las sustancias de ensayo a las concentraciones deseadas. Después de 48 horas, se ha

eliminado el sobrenadante y se ha utilizado para la determinación de los parámetros de interés. La prueba se ha llevado a cabo por duplicado y los cultivos celulares no tratados se han utilizado como referencias.

#### Ensayo con AH

- 5 Se ha ensayado (administrado) AH mediante una prueba inmunoenzimática utilizando un kit disponible en el mercado (EIA, Corgenix). Se ha evaluado la síntesis de novo de AH en el medio de cultivo después del tratamiento con las sustancias de ensayo, según el protocolo proporcionado con la prueba, y frente a la curva de calibración obtenida utilizando el patrón de AH contenido en el kit.

#### Evaluación de los resultados

##### Etapa A:

- 10 - la evaluación de los efectos de COMBI y CA en cultivos de fibroblastos, en diferentes proporciones recíprocas de sus componentes dentro de una concentración mantenida constante, se ha expresado como el aumento o la disminución de la expresión de AH absoluto y porcentual con respecto al cultivo de referencia correspondiente después de 48 horas de incubación, y en comparación con los efectos ejercidos por NAG a las concentraciones correspondientes exacta o aproximadamente a las presentes en CA y en COMBI, a diferentes proporciones recíprocas entre sus componentes NAG y SSA.
- 15

##### Etapa B:

- la evaluación de los efectos de las sustancias ensayadas, a las diversas concentraciones, en cultivos de fibroblastos se ha expresado como el aumento o disminución absoluto y porcentual de la expresión de AH, con respecto al cultivo de referencia correspondiente, después de 48 horas de incubación.
- 20 El aumento o disminución de diferencia porcentual de los efectos ejercidos por CA y NAG, a las concentraciones correspondientes, se ha calculado a continuación, con la evaluación de su potencial significación mediante la prueba "t" de Student.

2. Evaluación *in vitro* de la estimulación de la síntesis de colágeno y elastina por CA, NAG y SSA en cultivos de fibroblastos humanos (véase también: Booth *et al.* 1980; Fenwick *et al.* 2001)

#### 25 Prueba fundamental

El alcance de la prueba ha sido la evaluación y la comparación de la estimulación potencial ejercida por las sustancias de ensayo sobre la expresión de colágeno y elastina en cultivos "*in vitro*" de células de la piel, tales como fibroblastos. El ensayo en cuestión, aun cuando se realiza "*in vitro*", puede considerarse que es predictivo de los efectos del uso de las mismas sustancias "*in vivo*".

#### 30 Modelo celular

Se han utilizado fibroblastos humanos, Detroit 551 ATCC CCL III de LGC Promochem (Milán, Italia).

#### Sustancias de ensayo y concentraciones

Las sustancias y concentraciones ensayadas han sido las mismas que las ya descritas para la etapa B de la prueba en la estimulación de la expresión de AH, es decir:

- 35 - CA: 0,66, 1,32, 1,98, 2,64 y 3,3 mg/ml  
- NAG: 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 y 2,5 mg/ml  
- SSA: 0,16, 0,32, 0,48, 0,64 y 0,80 mg/ml

#### Preparación de cultivos celulares

- 40 Se han sembrado células en placas de 96 pocillos, 2500 células/pocillo durante 24 horas en medio de cultivo celular (medio esencial mínimo de Dulbecco, DMEM) + 10% de suero bovino fetal (SBF). Se ha agregado a continuación medio de cultivo fresco, enriquecido con sólo 5% de SBF y que contiene las sustancias a ensayar, así como para alcanzar las concentraciones finales deseadas. Las muestras se han disuelto directamente en el medio de cultivo. Cada muestra se ha probado por duplicado y los experimentos se han repetido dos veces. Se han determinado los parámetros de interés después de 24 horas en placas separadas. Los cultivos de células no tratadas se han utilizado como referencias.

#### 45 Ensayo con colágeno

- Para los ensayos con colágeno se ha utilizado un kit disponible en el mercado (Sircol™, biodye science), que utiliza la capacidad de la cepa Sirius Red para interactuar con las cadenas laterales básicas de los aminoácidos presentes en el propio colágeno. Se ha evaluado la síntesis de novo de colágeno en el medio de cultivo después del tratamiento con las sustancias de ensayo, siguiendo el protocolo proporcionado con el kit, y mediante el uso de la curva de calibración obtenida empleando el patrón de colágeno contenido a su vez en el kit.
- 50

#### Ensayo con elastina

Se ha ensayado la elastina utilizando un ensayo disponible en el mercado (Fastin™, biodye science). El ensayo se basa en la interacción de 5,10,15,20-tetrafenil-21,23-porfirina con moléculas de elastina.

- 5 Se ha evaluado la síntesis de novo de elastina en el medio de cultivo después del tratamiento con las sustancias de ensayo, siguiendo el protocolo proporcionado con el ensayo, y utilizando la curva de calibración obtenida empleando el patrón de la elastina contenido en el propio kit.

#### Evaluación de los resultados

- 10 La evaluación de los efectos de las sustancias ensayadas, a las diversas concentraciones, en cultivos de fibroblastos, se ha expresado como el aumento o disminución absoluto y porcentual de la expresión de colágeno y elastina, con respecto al cultivo de referencia correspondiente, después de 24 horas de incubación.

El aumento o disminución de la diferencia porcentual de los efectos ejercidos por CA y NAG, a las concentraciones correspondientes, se ha calculado a continuación, con la consiguiente evaluación de su significación estadística potencial mediante la prueba de la "t" de Student.

- 15 3. "Evaluación *in vitro*" de la estimulación de la síntesis de proteínas por CA y NAG en cultivos de fibroblastos y queratinocitos humanos: (Véase también: Lowry *et al.* 1951; Creighton *et al.* 1984; Sengupta *et al.*, 1993)

#### Información preliminar

- 20 Los fibroblastos y queratinocitos, presentes en la dermis y la epidermis, además de estar involucrados en la síntesis de colágeno, elastina y AH, también están involucrados en la expresión de diversas especies de proteínas incluidas, por ejemplo, la queratina por los queratinocitos y las llamadas proteínas nucleares y de enlace, sobre la que se fijan varios tipos de GAG para formar proteoglucanos, que son, a su vez, componentes fundamentales de la matriz extracelular.

El nivel de viabilidad y la eficacia de dichas células, en presencia o ausencia de agentes cuya acción beneficiosa hacia la piel que se desea verificar, puede evaluarse y deducirse de su capacidad de síntesis de proteínas.

#### Modelos celulares

Se han utilizado los siguientes:

- 25 - Fibroblastos humanos, Detroit 551 ATCC CCL III de LGC Promochem (Milán, Italia);  
- Cultivo primario de queratinocitos humanos: HEKA, Cascade Biologics, cat. 005-5C.

#### Sustancias y concentraciones de ensayo

Las sustancias y concentraciones probadas son las que se presentan a continuación (tanto en fibroblastos como queratinocitos):

- 30 - CA: 0,13, 0,66, 1,32 y 2,64 mg/ml  
- NAG: 0,1, 0,5, 1,0, y 2,0 mg/ml

#### Prueba fundamental

- 35 Basándose en la información mencionada anteriormente con relación a los indicadores de eficiencia de las células presentes en la piel, el alcance de la prueba ha sido la evaluación y comparación de la estimulación potencial, ejercida por las sustancias de ensayo, sobre la expresión proteica en cultivos de fibroblastos y queratinocitos "*in vitro*".

El ensayo en cuestión, aun cuando realizado "*in vitro*", puede considerarse como predictivo de los efectos del uso de las mismas sustancias "*in vivo*".

#### Preparación de cultivos celulares

- 40 El método es idéntico al ya descrito para el colágeno y la elastina con la diferencia de que, tras la adición de las sustancias de prueba en el medio de cultivo, el medio se ha sustituido diariamente durante tres días. Cada muestra se ha probado por duplicado y los experimentos se han repetido dos veces. El parámetro de interés, es decir, la síntesis de proteínas, se ha evaluado en 24, 48 y 72 horas en placas separadas. Como referencias se han utilizado cultivos de células no tratadas.

#### Ensayo con proteínas

- 45 Se han ensayado proteínas por el método de Lowry [Lowry *et al.* 1951] que consiste en una reacción de reducción de Biuret que prevé el empleo de reactivo de Folin-Ciocalteu como cromóforo, con un cambio de color amarillo a azul y la medición espectrofotométrica a 750 nm [Creighton *et al.* 1984; Sengupta *et al.* 1993].

El contenido de proteínas de los cultivos en cuestión se ha obtenido a partir de la comparación de sus densidades ópticas con una curva de valoración construida utilizando albúmina como patrón de proteínas.

Evaluación de los resultados

La evaluación del efecto de las sustancias ensayadas, a las diversas concentraciones y tiempos, sobre cultivos tanto de fibroblastos como de queratinocitos se ha expresado tanto en términos absolutos (producción de proteínas expresada en mg/ml) como en porcentaje de aumento o disminución con respecto a los cultivos de referencia.

- 5 El aumento o disminución de la diferencia porcentual de los efectos ejercidos por CA y NAG, durante varios días y a las concentraciones correspondientes, se han calculado a continuación, con la evaluación de su potencial significación estadística mediante la prueba de la "t" de Student.

4. Evaluación "*in vitro*" del potencial citotóxico de sustancias para el uso del cosmético tópico e intradérmico: (véase también: Mossman, 1993)

10 Prueba fundamental

Las características particulares de las sustancias que deben utilizarse para uso tópico o intradérmico en los cosméticos debe estar absolutamente ausente de efectos citotóxicos en el intervalo de dosis/concentración para su aplicación práctica prevista.

- 15 Hay pruebas apropiadas "*in vitro*", llevadas a cabo en células procedentes de tejido cutáneo, tales como fibroblastos y queratinocitos, para predecir la citotoxicidad potencial de las sustancias de ensayo "*in vivo*".

Con este objeto se ha seleccionado la prueba de viabilidad celular usando MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio) [Mossman 1993] un reactivo colorimétrico, mediante el cual es posible distinguir entre las células vivas, dañadas o muertas, siendo así predictivo de la seguridad del uso de sustancias de ensayo, incluso "*in vivo*".

Modelos celulares

- 20 Se han utilizado los siguientes:

- fibroblastos humanos, Detroit 551 ATCC CCL III de LGC Promochem (Milán, Italia);
- cultivo principal de queratinocitos humanos (HEKA), Cascade Biologics, cat.-005-5c.

Sustancias y concentraciones de ensayo

- 25 Dado que, en la composición que constituye el objeto de la presente invención, NAG y SSA nunca se reivindican para uso individual, sino siempre juntos en la composición de CA, la única sustancia ensayada por su potencial efecto citotóxico ha sido CA, en concentraciones tales como para ser predictiva y referibles a las utilizadas en ensayos de actividad "*in vitro*" en los cultivos de fibroblastos y queratinocitos descritos anteriormente.

En el estudio en cuestión, se ha disuelto CA previamente y se ha puesto en contacto con los cultivos celulares seleccionados de una manera tal como para alcanzar directamente las concentraciones deseadas, es decir:

- 30 0,026, 0,053, 0,106, 0,211, 0,409, 0,818, 1,65 y 3,30 mg/ml.

Se han utilizado muestras análogas de fibroblastos y/o queratinocitos humanos sin tratar como referencias negativas.

Se han tratado muestras análogas de fibroblastos o queratinocitos humanos con un agente tensioactivo de actividad conocida (SDS), disuelto en el medio de cultivo a concentraciones comprendidas entre 0,05 y  $1,6 \times 10^{-3}$  mg/ml, y se ha utilizado como referencia positiva.

- 35 La exposición ha sido durante un período de 24 horas, al término de la cual, se ha realizado la prueba de citotoxicidad.

Descripción del ensayo de citotoxicidad utilizando MTT

- 40 Como ya se ha mencionado, el reactivo clave es MTT, una sustancia de color amarillo en solución acuosa que, cuando es actuada por las deshidrogenasas mitocondriales presentes en las células vivas, se transforma en cristales de color púrpura, insolubles en agua, pero solubles en isopropanol acidificado. La absorbancia de la solución de color púrpura resultante a 540 nm se utiliza como indicador del nivel de citotoxicidad de las sustancias a prueba.

- 45 En términos operativos, el reactivo clave se prepara añadiendo 15 mg de MTT a 30 ml de medio de cultivo. Aparte, después de 24 horas en contacto con la sustancia de ensayo y/o SDS, los fibroblastos o queratinocitos se lavan con 400  $\mu$ l de solución de lavado (solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, DPBS) y, tras la eliminación de la solución, se añaden 200  $\mu$ l de medio MTT, y las muestras de células se incuban durante 4 horas a 37°C. Una vez finalizado el período de incubación, se retira el medio MTT y se añaden 400  $\mu$ l de solución disolvente MTT (Triton X-100 al 10%+ HCl 0,1 N en isopropanol anhidro). Las placas se agitan durante 20-30 minutos hasta que se forme una solución homogénea, la absorbancia se lee a continuación a 540 nm con una lectura de fondo a 670 nm.

Los resultados se expresan como:

$$\text{inhibición y viabilidad celular (\%)} = \left[ 1 - \frac{D.O. \text{ células tratadas}}{D.O. \text{ células no tratadas}} \right] \times 100$$

#### Evaluación de los resultados

Los datos de citotoxicidad, obtenidos utilizando la prueba de MTT, se representan en un gráfico frente a la concentración del producto a prueba, dando así una curva de dosis y respuesta, lo que permite la determinación de:

- 5 - la curva de regresión teórica;
- el valor teórico de  $CI_{50}$ , o la concentración resultante en una reducción del 50% en la viabilidad celular con respecto a la de las células no tratadas.

El potencial irritante de un compuesto está relacionado con el valor de  $CI_{50}$  según el criterio de evaluación siguiente:

- $CI_{50} < 0,5$ : efecto citotóxico/estimulante fuerte
- 10 -  $CI_{50}$  entre 0,5 y 1,5: efecto citotóxico/estimulante moderado
- $CI_{50} > 1,5$ : ausencia de cualquier efecto citotóxico e/o irritante

#### Resultados

##### 1. Estimulación de la síntesis de AH por CA, NAG y SSA en cultivos de fibroblastos humanos

##### Etapa A:

- 15 A partir de los resultados presentados en la Tabla 3, etapa A, es obvio que existe sinergia clara entre NAG y SSA dependiendo de las relaciones, en términos de peso equivalente, variando entre 1:0,5 y 1:3 siendo la relación verificable más favorable 1:1. Para las combinaciones fuera de dicho intervalo favorable, ninguna sinergia es detectable, ya que el efecto de la combinación entre NAG y SSA en dichas condiciones es incluso menor que la de NAG sola y en concentraciones correspondientes a la presente en la propia combinación. De hecho, puede observarse cómo para una
- 20 relación de NAG/SSA igual a 1:0,4 (la más favorable para NAG), el aumento en la expresión de AH es de aprox. 65%, notablemente inferior que la de NAG a la misma concentración, que es ciertamente mayor del 75%. Análogamente, para una relación NAG/SSA igual a 1:3,5 (la más favorable para SSA), el incremento es de aprox. 50% en comparación con la de NAG sola, que se aproxima a 60% a la misma concentración.

##### Etapa B:

- 25 A partir de los resultados presentados en las tablas 1 a 3, Etapa B, es posible extraer las conclusiones siguientes:
  - SSA solo, en dosis crecientes correspondientes a las presentes en CA, probado en el mismo experimento, no ejerce estimulación ni inhibición, y en efecto, a todas las concentraciones probadas, las diferencias con respecto a la expresión de AH del cultivo inicial son irrelevantes, tanto en términos absolutos como en valores porcentuales. En confirmación de lo anterior, a partir del examen de los datos experimentales, no es posible identificar ninguna
  - 30 correlación entre la concentración de SSA y la expresión AH, ya que el coeficiente de correlación asociado a la regresión correspondiente, calculado empleando el método de mínimos cuadrados, no es estadísticamente significativo ( $r = 0,345$  con  $GdL = 4$ ).
  - A diferencia de los hallazgos de Sayo T. *et al.*, 2004 para NAG, tanto CA como NAG, a las concentraciones ensayadas absolutamente coherentes como expresión de la dosis de NAG correspondiente muestra una clara
  - 35 estimulación de la secreción de AH en cultivos de fibroblastos procedentes de la piel humana. En ambos casos, dicho efecto es muy evidente, con una diferencia que aparece ya a 0,66 mg/ml de CA (correspondiente a 0,5 mg/ml de NAG), mientras que se retrasa a 1 mg/ml en el caso de NAG. También se observa que, en ambos casos, la intensidad del efecto depende de la dosis ( $r = 0,973$  para NAG y 0,939 para CA, ambos estadísticamente significativos para los grados de libertad de las correlaciones correspondientes) y que la expresión de AH aparece, a
  - 40 todas las concentraciones, más marcada en el caso de la estimulación por CA con un incremento igual a aprox. 99% a 1,98 mg/ml (correspondiente a 1,5 mg/ml de NAG), un aumento solamente alcanzado por NAG, tal cual, a la dosis más alta ensayada, es decir, 2,5 mg/ml.
  - Con relación a la Tabla 4, para evaluar la diferencia en la estimulación de la expresión de AH por CA y NAG, se ha calculado la diferencia entre los aumentos porcentuales, a las dosis correspondientes de ambas sustancias de
  - 45 ensayo, y se ha confirmado que, a todas las concentraciones, CA ejerce un mayor porcentaje de estimulación que NAG. Aplicando entonces la prueba de la "t" de Student para las diferencias entre los incrementos porcentuales anteriormente mencionados, se desprende que el valor observado para "t" es muy significativo, lo que lleva a la conclusión altamente imprevisible y sorprendente que existe un claro efecto sinérgico entre SSA y NAG ya que, como ya se ha visto, SSA solo no tiene efecto sobre fibroblastos H, mientras que por otra parte, existe una clara

acción estimulante si se asocia con NAG en la composición de CA, haciendo uso funcional y de formulación en lugar de NAG, si se utiliza solo, clara e inesperadamente ventajoso.

2. Estimulación de la síntesis de colágeno y elastina por CA, NAG y SSA en cultivos de fibroblastos humanos

A. Colágeno

5 A partir de los resultados presentados en las tablas 5-7 es posible extraer las conclusiones siguientes:

- De nuevo en este caso, SSA, considerado individualmente en el intervalo de concentración coherente con el utilizado para las otras 2 sustancias de prueba, es decir CA y NAG, no ejerce ningún tipo de estimulación o inhibición de la expresión de colágeno en cultivos de fibroblastos de la piel humana. De nuevo en este caso, para SSA, no es posible identificar ningún tipo de relación concentración/efecto, ya que el coeficiente de correlación de la regresión entre su concentración y la expresión de colágeno ( $r = 0,298$ ) es estadísticamente significativa.
- Tanto CA como NAG, a las concentraciones ensayadas y enteramente coherentes como expresión de la misma dosis de NAG, ejercen un efecto claro sobre la estimulación de la secreción de colágeno en cultivos de fibroblastos procedentes de la piel humana. En ambos casos, la intensidad de este efecto es muy marcada y dependiente de la dosis, de modo que para ambos, es posible calcular una regresión de concentración/efecto caracterizada por un coeficiente de correlación alto y estadísticamente significativo ( $r = 0,927$  para la estimulación por NAG y  $0,929$  para la estimulación por CA).
- A partir de los datos de la tabla 11, que presentan los aumentos porcentuales con respecto a la referencia inicial, para la expresión de colágeno estimulado por CA y NAG, de nuevo a niveles comparables, se observa que el efecto de la estimulación porcentual de CA es mayor que la de NAG a todas las concentraciones ensayadas. Aplicando a continuación la prueba de la "t" de Student para las diferencias entre los incrementos porcentuales anteriormente mencionados se desprende que el valor determinado para la "t" es muy significativo, destacando por lo tanto, de nuevo, en este caso, el efecto sinérgico y previamente inesperado que existe entre SSA y NAG en CA, lo que confirma el uso funcional y de formulación ventajoso de esta última en lugar de NAG sola.

B. Elastina

25 A partir de los resultados presentados en las tablas 8-10 se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Como ya se ha verificado en el caso de las pruebas de la expresión de colágeno y AH, SSA, a concentraciones coherentes con los de las otras dos sustancias de ensayo, es decir, CA y NAG, es incapaz de ejercer ningún efecto, ya sea estimulador o inhibidor, sobre la expresión de elastina por los fibroblastos procedentes de la piel humana.

30 Por otra parte, tanto CA como NAG, a las concentraciones ensayadas y coherentes entre sí, ejercen un efecto estimulador muy marcado que, en ambos casos, es ya evidente a la concentración más baja ensayada es decir, 0,5 mg/ml de NAG y 0,66 mg/ml de CA (correspondiente a 0,5 mg/ml NAG) aumentando en función de la dosis hasta que exceda de 300% con respecto a la referencia inicial, a la máxima concentración es decir, 2,5 mg/ml de NAG y 2,64 mg/ml de CA (correspondiente a 2,5 mg/ml de NAG).

- A partir de los datos presentados en la Tabla 12, donde los resultados de la prueba se expresan en aumento porcentual con respecto a la referencia porcentual, y al contrario de la imagen que surge para las pruebas relativas a la expresión de AH y el colágeno, en este caso, no es posible identificar cualquier diferencia entre las acciones estimulantes ejercidas por CA y NAG. Esta prueba experimental se confirma por el hecho de que la prueba de la "t" de Student aplicado a las diferencias entre los aumentos porcentuales en relación con los dos principios activos a prueba, no presenta ninguna significación estadística. Esta tendencia, que no confirma que ya se ha visto en cuanto a los efectos sobre la expresión de AH y el colágeno, donde la estimulación ejercida por CA es siempre mayor, es más probable que se atribuya a la alta intensidad de la propia estimulación, lo que provoca un aumento de la expresión de elastina igual a aprox. 200 ya a la concentración más baja, es decir, correspondiente a 0,5 mg/ml de NAG.

3. Estimulación de la síntesis de proteínas por CA y NAG en cultivos de fibroblastos y queratinocitos humanos

45 A. Queratinocitos

A partir de los resultados presentados en la tabla 13 se pueden extraer las conclusiones siguientes:

- Tanto para NAG como para CA, la estimulación de la expresión de la proteína se observa a las concentraciones más altas, es decir, 1 y 2 mg/ml, después de tan sólo 24 horas, también con considerables aumentos porcentuales, es decir, más del 50% para NAG, a la dosis más alta y casi el 70% a la concentración correspondiente a la de CA.
- Como consecuencia, se observa la culminación de la acción de estimulación por ambas sustancias de ensayo después de 48 horas cuando, a diferencia de las observaciones a las 24 horas, ya a las concentraciones más bajas, es decir, 0,1 y 0,5 mg/ml de NAG y 0,66 de CA, el aumento de la expresión de la proteína por los queratinocitos supone un valor positivo de alrededor del 20% de NAG e incluso alcanza 30-40% para CA. Sin embargo, una imagen concluyente se obtiene donde ambas sustancias de ensayo muestran una clara estimulación de la expresión proteica en los queratinocitos a todas las concentraciones ensayadas y en función de la dosis, como se demuestra

por la significación estadística de los coeficientes de correlación asociados a la regresión de concentración/efecto, igual a 0,726 para NAG y 0,909 para CA.

- Después de 72 horas, todavía hay acción estimuladora residual a las dos concentraciones más altas, pero parece obvio que este efecto es sólo la cola del pico alcanzado a las 48 horas, y como tal no es significativo.
- 5 - Con respecto a la comparación de las actividades entre CA y NAG, las diferencias entre los incrementos de estimulación porcentual ejercida por las dos sustancias de prueba se han evaluado utilizando la prueba "t" de Student, como ya se ha hecho para los resultados experimentales de las otras pruebas previamente examinadas (véase la estimulación de la expresión de AH, colágeno y elastina).

En particular, al examinar y comparar las acciones ejercidas por las dos sustancias a las 48 horas, es decir, en el pico de su efecto estimulante (dicha comparación a las 24 y 72 horas tiene poca importancia, ya que es temporalmente prematura o tardía) está claro que CA ejerce una acción estimuladora marcadamente superior sobre la expresión proteica en los queratinocitos que la de NAG a las dosis correspondientes. Estos resultados experimentales se confirman aún más por el valor de la "t" de Student, aplicado sobre las diferencias en la estimulación porcentual de las dos sustancias de ensayo, lo que es muy significativo.

- 15 Por lo tanto, una vez más, se ha demostrado el efecto sinérgico inesperado e imprevisto entre SSA y NAG, haciendo uso funcional y de formulación de CA sin duda preferible y ventajoso con respecto a NAG a concentraciones y/o dosis equivalentes.

#### Fibroblastos

A partir de los resultados presentados en la tabla 14 se pueden extraer las conclusiones siguientes:

- 20 - De nuevo, en cultivos de fibroblastos de piel humana, es posible observar una clara estimulación de la secreción de proteínas tanto por NAG como por CA. Dicha estimulación alcanza su máximo después de 24 horas restantes indistinguible del expresado de forma natural por las células no tratadas a las 48 y 72 horas.

La aparición del efecto estimulante ya es evidente a 0,5 mg/ml para NAG y a 0,66 mg/ml para CA, aumentando en función de la dosis (coeficiente de correlación significativa para la regresión de concentración/efecto en ambos casos, es decir,  $r = 0,844$  para NAG y  $0,845$  para CA) hasta la concentración máxima ensayada, es decir, 2 mg/ml para NAG y 2,64 mg/ml para CA.

- 25 Como ya se ha resaltado anteriormente, la estimulación ejercida por ambas sustancias de prueba es muy marcada, alcanzando y superando, a las concentraciones máximas ensayadas, un aumento del 50% con respecto a la expresión proteica de cultivos de referencia, y confirmando de este modo el efecto muy positivo ejercido por ambas sustancias
- 30 activas sobre las funciones específicas de las células de origen cutáneo, tales como fibroblastos y queratinocitos.

- En cuanto se refiere a la comparación entre CA y NAG, de nuevo también en este caso una posible diferencia en la actividad se ha evaluado utilizando la prueba de la "t" de Student, aplicada a las diferencias entre los aumentos en la estimulación porcentual ejercida por las dos sustancias de ensayo, a las concentraciones correspondientes. Dicha evaluación se ha realizado en los valores medidos a las 24 horas, ya que son muy significativos, proporcionando así
- 35 la confirmación estadística de la imagen que ya ha surgido para la comparación en relación con la expresión de elastina, colágeno y AH por las células de la piel, es decir, que CA, gracias a la sinergia imprevista entre SSA y NAG, de las que se compone, se demuestra que es más activa que la propia NAG, y de una manera estadísticamente significativa, haciendo así uso funcional y de formulación más ventajoso.

#### 4. Evaluación "in vitro" del potencial efecto citotóxico de CA mediante la prueba MTT

- 40 A. En fibroblastos humanos de la piel

Como ya se ha explicado en la parte descriptiva, se ha calculado la inhibición de la viabilidad celular en una serie de cultivos de fibroblastos, en presencia de una serie de concentraciones establecidas para CA, y mediante la aplicación de la fórmula (I) en la que "células tratadas con OD<sub>540</sub>" representa la absorbancia a 540 nm de los cultivos que contienen CA y "células no tratadas con OD<sub>540</sub>" las de la referencia negativa (blanco). La eficiencia de la prueba se evalúa en un

45 cultivo que contiene un agente tensioactivo muy citotóxico, es decir, dodecilsulfato sódico (SDS), a una concentración (0,05 mg/ml) a la que la absorbancia a 540 nm debería ser prácticamente cero estando el crecimiento bacteriano completamente inhibido:

$$\text{inhibición y viabilidad celular (\%)} = \left[ 1 - \frac{D.O. 540 \text{ células tratadas}}{D.O. 540 \text{ células no tratadas}} \right] \times 100 \quad (i)$$

Los resultados obtenidos se presentan en la siguiente tabla:

Prueba MTT en fibroblastos en presencia de CA – Resultados

Conc. de CA (mg/ml)	Inhibición de viabilidad celular (%) Media ± d.t.
Blanco	0,00
0,026	0,19
0,053	0,24
0,106	1,66
0,211	4,02
0,409	4,36
0,818	5,86
1,650	12,78
3,300	18,44

De los datos tabulados, pueden extraerse las siguientes conclusiones:

- 5 - La eficiencia de prueba se confirma por el hecho de que, después de la exposición de fibroblastos humanos a 0,5 mg/ml de SDS, se ha verificado mortalidad celular de aprox. 100% (96,05%).
- Como ya se ha indicado, el parámetro que permite la evaluación del potencial irritante de una sustancia que va a ser utilizada para aplicación tópica o como relleno intradérmico, se basa en la determinación de la  $CI_{50}$ , calculada a partir de la correlación entre la concentración y los valores correspondientes de inhibición de viabilidad celular, suponiendo el criterio de evaluación siguiente:
  - 10 •  $CI_{50}$  = 0,5 mg/ml: efecto citotóxico/irritante fuerte
  - $CI_{50}$  entre 0,5 y 1,5 mg/ml: efecto citotóxico/irritante moderado
  - $CI_{50}$  > 1,5 mg/ml: sin efecto citotóxico/irritante

15 En el caso de CA, ya que a la concentración máxima ensayada, es decir, 3,30 mg/ml, el porcentaje de inhibición de la viabilidad celular no alcanza ni el 20% (18,44%), es obvio que la  $CI_{50}$  es mucho menor que 1,5 mg/ml y, por lo tanto, CA, según los datos deducidos del modelo predictivo "*in vitro*", se puede considerar desprovisto de cualquier potencial citotóxico hacia los fibroblastos de la piel humana, y como tal de libre uso, tanto para uso tópico y como un relleno intradérmico.

B. En queratinocitos:

20 En el caso de los queratinocitos, para los que se han utilizado la misma prueba MTT y los mismos criterios de evaluación, deducibles del valor de  $CI_{50}$ , los resultados obtenidos se presentan en la tabla siguiente:

Prueba MTT en queratinocitos en presencia de CA – Resultados

Conc. de CA (mg/ml)	Inhibición de viabilidad celular (%) Media ± d.t.
Blanco	0,00
0,026	0,00
0,053	0,028
0,106	0,056
0,211	0,089
0,409	1,166
0,818	6,280
1,650	11,330
3,300	17,690

A partir de los datos tabulados, pueden extraerse las conclusiones siguientes:

- De nuevo en este caso, la eficiencia de prueba se confirma por el hecho de que la mortalidad del cultivo de queratinocitos, expuestos a 0,5 mg/ml de SDS, es prácticamente 100% (94,28%).
- Con respecto a los cultivos de queratinocitos; ya que, de nuevo también en este caso, a la concentración máxima de CA ensayada (3,30 mg/ml), el% de inhibición de la vitalidad celular no llega al 20% y por lo tanto la  $Cl_{50}$  es mucho menor de 1,5 mg/ml, CA puede considerarse totalmente desprovista de efectos citotóxicos, también hacia los queratinocitos humanos.

Conclusiones

Los resultados experimentales resumidos anteriormente destacan al menos dos consideraciones fundamentales, es decir, en primer lugar, el sorprendente efecto relacionado con la combinación entre NAG y SSA (tanto como CA como con COMBI), impredecible e inesperadamente ventajoso con respecto a NAG a dosis constantes pero sin el apoyo sinérgico de SSA (SSA solo no tiene ningún efecto), y en segundo lugar, el efecto sinérgico entre los componentes que alcanzan su máximo, en el caso de CA, a una relación, expresada en peso equivalente, igual a 1:1, disminuyendo progresivamente a valores de ambos lados de este valor central.

Si a lo anterior se añade la ausencia completa de cualesquiera de los posibles efectos citotóxicos de la composición según la invención (siendo bien conocida la falta de toxicidad de sus componentes, si se administran por vía oral), puede concluirse que su posible uso junto con otros principios activos, tal como por ejemplo AH, preferiblemente a dosis/concentraciones y según las formulaciones descritas y reivindicadas en la presente solicitud de patente, resulta ventajoso y de uso seguro, tanto por administración oral, por ejemplo en formulaciones de complementos alimenticios, y para aplicación tópica o como relleno intradérmico en la recuperación del tono y vigor de la piel.

Tablas

Tabla 1: Expresión de AH en cultivos de fibroblastos en presencia de SSA

Conc. de SSA (*) (mg/ml)	AH (ng/pocillo) (Media ± d.t.)	AH (ng/pocillo) (Dif. desde valor inicial)	AH (%) (Dif. desde valor inicial)	
0,00 (valor inicial)	576 ± 52	0	0,00	r (coef. Corr.) (conc. de SSA frente a AH) - 0,345 [NS(**)]
0,16	611 ± 44	35	+6,07	
0,32	622 ± 91	46	+7,99	
0,48	630 ± 37	54	+9,38	
0,64	427 ± 24	-149	-25,87	
0,80	587 ± 56	11	+1,91	

(\*) La concentración de SSA corresponde a la porción del mismo componente presente en CA utilizado en la misma prueba (véase Tabla 3 - etapa B)  
 (\*\*) NS = Estadísticamente no significativo

Tabla 2: Expresión de AH en cultivos de fibroblastos en presencia de NAG

Conc. de NAG (*) (mg/ml)	AH (ng/pocillo) (Media ± d.t.)	AH (ng/pocillo) (Dif. desde valor inicial)	AH (%) (Dif. desde valor inicial)	
0,00 (valor inicial)	490 ± 20	0	0,00	r (coef. Corr.) (conc. de NGA frente a AH) 0,973 [ES(***)]
0,50	544 ± 132	+54	+14,02	
1,00	779 ± 94	+289	+58,98	
1,50	863 ± 25	+373	+76,12	
2,00	876 ± 70	+386	+78,78	
2,50	964 ± 192	+474	+96,73	

(\*) La concentración de NGA corresponde a la porción del mismo componente presente en CA utilizada en la misma prueba (véase Tabla 3 - etapa B)  
 (\*\*\*) ES = Estadísticamente significativo

ES 2 545 957 T3

Tabla 3 - Etapa A: Expresión de AH en cultivos de fibroblastos en presencia de combinaciones de NAG/SSA a concentración constante y relaciones variables NAG a SSA

Conc. de CA/SSA (mg/ml)	Relación (*) NAG/SSA	AH (ng/pocillo) de NAG/SSA (Media ± d.t.)	AH (%) de NAG/SSA (dif. desde valor inicial)	AH (%) de NAG (**) (dosis constantes)	Sinerg. (***) NAG/SSA
0,00 (valor inicial)	-	511 ± 18,4	0	0	-
1,98 (1,75 NAG + 0,23 SSA)	1:0,4 <sup>(1)</sup>	843 ± 26,9	+64,97	+ 76,12- + 78,8	No
1,98 (1,71 NAG + 0,27 SSA)	1:0,5 <sup>(2)</sup>	942 ± 50,2	+84,25	+ 76,12- + 78,8	Sí (+)
1,98 (1,50 NAG + 0,48 SSA)	1:1 <sup>(3)</sup>	997 ± 15,6	+95,11	+76,12	Sí (++)
1,98 (1,00 NAG + 0,98 SSA)	1:3 <sup>(2)</sup>	873 ± 19,8	+70,84	+58,98	Sí (+)
1,98 (0,93 NAG + 1,05 SSA)	1:3,5 <sup>(1)</sup>	769 ± 25,5	+50,49	≈59	No

(\*) Expresada en peso equivalente  
(\*\*) véase la tabla 2  
(\*\*\*) NO = sin sinergia; Sí (+) = sinergia marcada; Sí (++) = máxima sinergia  
(1): relación NAG a SSA fuera del intervalo de COMBI  
(2): relación NAG a SSA dentro del intervalo de COMBI  
(3): relación NAG a SSA correspondiente a CA

Tabla 3 - Etapa B: Expresión de AH en cultivos de fibroblastos en presencia de concentraciones variables de CA

Conc. de CA(*) (mg/ml)	AH (ng/pocillo) (Media ± d.t.)	AH (ng/pocillo) (Dif. desde valor inicial)	AH (%) (Dif. desde valor inicial)	R (coef. de corr.) (Conc. de CA frente a AH) 0,939 [ES (***)]
0,00 (valor inicial)	523 ± 31	0	0,00	
0,66 (0,5 NAG + 0,16 SSA)	770 ± 98	+247	+47,22	
1,32 (1,0 NAG + 0,32 SSA)	884 ± 151	+361	+69,02	
1,98 (1,5 NAG + 0,48 SSA)	1009 ± 86	+486	+92,93	
2,64 (2,0 NAG + 0,64 SSA)	1029 ± 3	+506	+96,75	
3,30 (2,5 NAG + 0,80 SSA)	1070 ± 14	+547	+104,59	

(\*) La concentración de CA corresponde a la suma de los correspondientes a NAG y SO<sub>4</sub><sup>-2</sup> de las tablas 1 y 2  
(\*\*\*) ES = Estadísticamente significativa

Tabla 4: Expresión de AH en cultivos de fibroblastos: % de diferencia entre los estímulos de CA y NAG

Conc. ag. estimul. (NAG/CA - mg/ml) (*) (1)	Expr. de AH de CA (% incr. sobre valor inicial) (2)	Expr. de AH de NAG (% incr. sobre valor inicial) (3)	Diff. CA-NAG. (Dif. entre % incr.) (2) - (3)	"t" de Student (4GdL**) = 3,637 p = 2,2% [(ES ***)]
0,5/0,66	+47,22	+11,02	+36,20	
1,0/1,32	+69,02	+58,98	+10,04	
1,5/1,98	+92,93	+76,12	+16,81	
2,0/2,64	+96,75	+78,78	+17,97	
2,5/3,3	+104,59	+96,73	+7,86	

(\*): Las proporciones entre NAG y CA son constantes; p. ej., 0,5 mg/ml de NAG correspondiente al contenido de NAG

## ES 2 545 957 T3

en 0,66 mg/ml de CA.

(\*\*): GdL = Grados de libertad

(\*\*\*): ES = estadísticamente significativo

Tabla 5: Expresión de colágeno en cultivos de fibroblastos en presencia de SSA

Conc. de SSA (*) (mg/ml)	Colágeno (µg/ml) (Media ± d.t.)	Colágeno (µg/ml) (Dif. desde valor inicial)	Colágeno (%) (Dif. desde valor inicial)	r (Coef. corr.) (Conc SSA. frente a colágeno) -0,298 [NS (**)]
0,00 (valor inicial)	5,09 ± 0,45	0,00	0,00	
0,16	4,66 ± 0,50	-0,43	-8,45	
0,32	5,29 ± 0,51	0,20	3,93	
0,48	5,18 ± 0,41	0,09	1,77	
0,64	5,55 ± 0,49	0,46	9,03	
0,80	4,92 ± 0,56	-0,17	-3,34	

(\*) La concentración de SSA corresponde a la porción del mismo componente presente en la CA utilizada en la misma prueba (véase la tabla 7)

(\*\*) NS = No estadísticamente significativo

Tabla 6: Expresión de colágeno en cultivos de fibroblastos en presencia de NAG

Conc. de NAG (*) (mg/ml)	Colágeno (µg/ml) (Media ± d.t.)	Colágeno (µg/ml) (Dif. desde valor inicial)	Colágeno (%) (Dif. desde valor inicial)	r (Coef. corr.) (Conc. NAG. frente a colágeno)
0,00 (valor inicial)	4,26 ± 0,18	0,00	0,00	
0,50	4,33 ± 0,13	+0,07	+1,64	
1,00	5,55 ± 0,28	+1,29	+30,28	
1,50	5,80 ± 0,28	+1,54	+36,15	
2,00	5,66 ± 0,16	+1,33	+32,86	
2,50	6,29 ± 0,28	+2,03	+47,65	

(\*) La concentración de NAG corresponde a la porción del mismo componente presente en la CA utilizada en la misma prueba (véase la tabla 7)

(\*\*) ES = Estadísticamente significativo

Tabla 7: Expresión de colágeno en cultivos de fibroblastos en presencia de concentraciones variables de CA

Conc. de CA (*) (mg/ml)	Colágeno (µg/ml) (Media ± d.t.)	Colágeno (µg/ml) (Dif. desde valor inicial)	Colágeno (%) (Dif. desde valor inicial)	r (Coef. corr.) (Conc. CA frente a colágeno) 0,929 [SS (***)]
0,00 (valor inicial)	4,67 ± 0,22	0,00	0,00	
0,66 (0,5 NAG + 0,16 SSA)	4,96 ± 0,19	0,29	6,22	
1,32 (1,0 NAG + 0,32 SSA)	6,46 ± 0,23	1,045	38,48	
1,98 (1,5 NAG + 0,48 SSA)	6,57 ± 0,24	1,905	40,84	
2,64 (2,0 NAG + 0,64 SSA)	6,89 ± 0,25	2,225	47,70	
3,30 (2,5 NAG + 0,80 SSA)	7,03 ± 0,27	2,365	50,70	

(\*) La concentración de CA corresponde a la suma de las correspondientes a NAG y SO<sub>4</sub><sup>-2</sup> de las tablas 5 y 6

(\*\*) ES = Estadísticamente significativo

Tabla 8: Expresión de elastina en cultivos de fibroblastos en presencia de SSA

Conc. de SSA (*) (mg/ml)	Elastina ( $\mu\text{g/ml}$ ) (Media $\pm$ d. t.)	Elastina ( $\mu\text{g/ml}$ ) (Dif. desde valor inicial)	Elastina (%) (Dif. desde valor inicial)	r (Coef. corr.) (Conc SSA. frente a elastina) 0,230 [NS(**)]
0,00 (valor inicial)	4,72 $\pm$ 0,38	0,00	0,00	
0,16	4,61 $\pm$ 0,41	-0,11	-2,33	
0,32	4,79 $\pm$ 0,44	+0,07	+1,98	
0,48	5,18 $\pm$ 0,36	+0,46	+9,75	
0,64	4,54 $\pm$ 0,47	-0,18	-3,81	
0,80	4,83 $\pm$ 0,30	+0,16	-3,39	

(\*) La concentración de SSA corresponde a la porción del mismo componente presente en la CA utilizada en la misma prueba (véase la tabla 10)  
(\*\*): NS = No estadísticamente significativo

Tabla 9: Expresión de elastina en cultivos de fibroblastos en presencia de NAG

Conc. de NAG (*) (mg/ml)	Elastina ( $\mu\text{g/ml}$ ) (Media $\pm$ d. t.)	Elastina ( $\mu\text{g/ml}$ ) (Dif. desde valor inicial)	Elastina (%) (Dif. desde valor inicial)	r (Coef. corr.) (Conc de NAG frente a elastina) 0,859 [SS (***)]
0,00 (valor inicial)	5,08 $\pm$ 0,32	0,00	0,00	
0,50	16,29 $\pm$ 0,83	+11,21	+220,67	
1,00	19,25 $\pm$ 0,99	+14,17	+278,94	
1,50	21,35 $\pm$ 1,01	+16,27	+320,28	
2,00	22,62 $\pm$ 1,03	+17,54	+345,27	
2,50	22,30 $\pm$ 1,04	+17,22	+339,00	

(\*) La concentración de NAG corresponde a la porción del mismo componente presente en la CA utilizada en la misma prueba (véase la tabla 10)  
(\*\*\*) ES = Estadísticamente significativa

Tabla 10: Expresión de elastina en cultivos de fibroblastos en presencia de concentraciones variables de CA

CA conc. (*) (mg/ml)	Elastina ( $\mu\text{g/ml}$ ) (Media $\pm$ d. t.)	Elastina ( $\mu\text{g/ml}$ ) (Dif. desde valor inicial)	Elastina (%) (Dif. desde valor inicial)	r (Coef. corr.) (Conc CA. frente a elastina) 0,874 [SS (***)]
0,00 (valor inicial)	5,17 $\pm$ 0,12	0,00	0,00	
0,66 (0,5 NAG + 0,16 SSA)	14,85 $\pm$ 0,27	+9,69	+187,51	
1,32 (1,0 NAG + 0,32 SSA)	20,13 $\pm$ 0,38	+14,96	+289,64	
1,98 (1,5 NAG + 0,48 SSA)	20,19 $\pm$ 0,68	+15,03	+290,96	
2,64 (2,0 NAG + 0,64 SSA)	21,36 $\pm$ 0,35	+16,19	+313,46	
3,30 (2,5 NAG + 0,80 SSA)	22,72 $\pm$ 0,42	+17,66	+339,88	

(\*) La concentración de CA corresponde a la suma de los correspondientes a NAG y  $\text{SO}_4^{2-}$  de las tablas 8 y 9  
(\*\*\*) ES = Estadísticamente significativa

Tabla 11: Expresión de colágeno en cultivos de fibroblastos: % de diferencia entre estímulos de CA y NAG

ES 2 545 957 T3

Conc. de ag. estimul. (NAG/CA - mg/ml) (*) (1)	Expr. de colágeno desde CA (% incr. sobre valor inicial) (2)	Expr. de colágeno desde NAG (% incr. sobre valor inicial) (3)	Dif. CA-NAG (dif. entre % incr.) (2) - (3)	"t" de Student (4GdL **) = 3,34 p = 2,9% [(ES ***)]
0,5/0,66	+6,22	+1,64	+4,58	
1,0/1,32	+38,48	+30,28	+8,20	
1,5/1,98	+40,84	+36,15	+4,69	
2,0/2,64	+47,70	+32,86	+14,84	
2,5/3,3	+50,70	+47,65	+3,05	

(\*) Las proporciones entre NAG y CA son constantes; p. ej., 0,5 mg/ml de NAG correspondiente al contenido de NAG en 0,66 mg/ml de CA  
 (\*\*) GdL = Grados de libertad  
 (\*\*\*) ES = Estadísticamente significativa

Tabla 12: Expresión de elastina en cultivos de fibroblastos: % de diferencia entre estímulos de CA y NAG

Conc. de ag. estimul. (NAG/CA - mg/ml) (*) (1)	Expr. de elastina desde CA (% incr. sobre valor inicial) (2)	Expr. de elastina desde NAG (% incr. sobre valor inicial) (3)	Dif. CA-NAG (dif. entre % incr.) (2) - (3)	"t" de Student (4GdL **) = 1,78 p = 14,9 [(NS***)]
0,5/0,66	+187,51	+220,67	-33,16	
1,0/1,32	+289,64	+278,94	+10,70	
1,5/1,98	+290,96	+320,28	-29,42	
2,0/2,64	+313,46	+345,27	-31,81	
2,5/3,3	+339,88	+339,00	+0,88	

(\*) Las proporciones entre NAG y CA son constantes; p. ej., 0,5 mg/ml de NAG correspondiente al contenido de NAG en 0,66 mg/ml CA  
 (\*\*) GdL = Grados de libertad  
 (\*\*\*) NS = No estadísticamente significativa

Tabla 13: Expresión proteica en cultivos de queratinocitos en presencia de NAG y CA, y diferencia en % de estimulación entre las dos sustancias

Conc. de ag. estimul. (NAG/CA - mg/ml) (*) (1)	Expresión proteica después de 24 horas						Dif. CA-NAG (dif. entre % incr.) (5)-(3)	"t" de Student (3GdL**) = 0,70 p = 53,5% [(NS***)]
	Expr. prot. de NAG (mg/ml)-media ±d.t. (2)	Expr. prot. de NAG % incr. sobre valor inicial (3)	Expr. prot. de CA (mg/ml)- media ± d.t. (4)	Expr. prot. de CA % incr. sobre valor inicial (5)				
0,00 (valor inicial)	0,245 ±0,039	0,00	0,245 ±0,039	0,00	0,00	0,00		
0,10/0,132	0,16 ± 0,037	-34,7	0,22 ± 0,053	-10,2	-10,2	+24,5		
0,50/0,66	0,22 ± 0,039	-10,2	0,255 ± 0,044	+4,1	+4,1	+14,3		
1,00/1,32	0,36 ± 0,047	+44,9	0,30 ± 0,120	+22,4	+22,4	-22,4		
2,00/2,64	0,38 ± 0,050	+55,1	0,41 ± 0,060	+67,3	+67,3	+12,2		
	Expresión proteica después de 48 horas							
0,00 (valor inicial)	0,340 ± 0,11	0,00	0,340 ± 0,11	0,00	0,00	0,00		
0,10/0,132	0,42 ± 0,15	+23,5	0,45 ± 0,10	+32,4	+32,4	+8,8	"t" de Student (3GdL**) = 5,74 p = 1,05%[(****SS)]	
0,50/0,66	0,40 ± 0,12	+17,6	0,47 ± 0,060	+38,2	+38,2	+20,6		
1,00/1,32	0,48 ± 0,11	+41,2	0,53 ± 0,08	+55,9	+55,9	+14,7		
2,00/2,64	0,47 ± 0,12	+38,2	0,54 ± 0,08	+58,8	+58,8	+20,6		
	Expresión proteica después de 72 horas							
0,00 (valor inicial)	0,58 ± 0,10	0,00	0,58 ± 0,10	0,00	0,00	0,00		
0,10/0,132	0,67 ± 0,09	+15,5	0,65 ± 0,08	+12,1	+12,1	-3,4		
0,50/0,66	0,64 ± 0,12	+10,3	0,63 ± 0,09	+8,6	+8,6	-1,7		
1,00/1,32	0,70 ± 0,08	+20,7	0,69 ± 0,09	+19,0	+19,0	-1,7		
2,00/2,64	0,83 ± 0,070	+43,1	0,85 ± 0,11	+46,6	+46,6	+3,4		

(\*) Las proporciones entre NAG y CA son constantes; p. ej., 0,5 mg/ml NAG correspondiente al contenido de NAG en 0,66 mg/ml CA

(\*\*) GdL = Grados de libertad

(\*\*\*) NS = No estadísticamente significativa

(\*\*\*\*) ES = estadísticamente significativa

Tabla 14: Expresión proteica en cultivos de fibroblastos en presencia de NAG y CA, y diferencia en % de estimulación entre las dos sustancias.

Conc. de ag. estimul. (NAG/CA - mg/ml) (*) (1)	Expresión proteica después de 24 horas					Dif. CA-NAG (dif. entre % incr.) (5)-(3)	"t" de Student (3GdL **) = 3,79 p = 3,2% [(****SS)]
	Expr. prot. de NAG % incr. sobre valor inicial (3)	Expr. prot. de CA (mg/ml)- media $\pm$ d.t. (4)	Expr. prot. de CA % incr. sobre valor inicial (5)				
0,00 (valor inicial)	0,82 $\pm$ 0,15	0,82 $\pm$ 0,12	0,00	0,00	0,00	0,00	
0,10/0,132	0,70 $\pm$ 0,11	0,84 $\pm$ 0,17	-14,6	0,84 $\pm$ 0,17	+2,40	+17,1	
0,50/0,66	1,08 $\pm$ 0,29	1,14 $\pm$ 0,21	+31,7	1,14 $\pm$ 0,21	+39,0	+7,3	
1,00/1,32	1,11 $\pm$ 0,22	1,20 $\pm$ 0,12	+35,4	1,20 $\pm$ 0,12	+46,3	+11,0	
2,00/2,64	1,24 $\pm$ 0,17	1,28 $\pm$ 0,30	+51,2	1,28 $\pm$ 0,30	+56,1	+4,9	
	Expresión proteica después de 48 horas						
0,00 (valor inicial)	1,03 $\pm$ 0,25	1,03 $\pm$ 0,25	0,00	1,03 $\pm$ 0,25	0,00	0,00	
0,10/0,132	0,95 $\pm$ 0,08	1,06 $\pm$ 0,17	-7,8	1,06 $\pm$ 0,17	+2,9	+10,7	
0,50/0,66	0,93 $\pm$ 0,08	1,01 $\pm$ 0,22	-9,7	1,01 $\pm$ 0,22	-1,9	+7,8	
1,00/1,32	0,81 $\pm$ 0,11	0,88 $\pm$ 0,17	-21,4	0,88 $\pm$ 0,17	-14,6	+6,8	
2,00/2,64	1,10 $\pm$ 0,20	1,06 $\pm$ 0,20	+6,8	1,06 $\pm$ 0,20	+2,9	-3,9	
	Expresión proteica después de 72 horas						
0,00 (valor inicial)	1,10 $\pm$ 0,18	1,10 $\pm$ 0,18	0,00	1,10 $\pm$ 0,18	0,00	0,00	
0,10/0,132	1,03 $\pm$ 0,18	0,96 $\pm$ 0,21	-6,4	0,96 $\pm$ 0,21	-12,7	-6,4	
0,50/0,66	1,14 $\pm$ 0,16	1,13 $\pm$ 0,20	+3,6	1,13 $\pm$ 0,20	+2,7	-0,9	
1,00/1,32	1,04 $\pm$ 0,20	1,20 $\pm$ 0,20	-5,5	1,20 $\pm$ 0,20	+9,1	+14,5	
2,00/2,64	1,11 $\pm$ 0,19	1,08 $\pm$ 0,27	+0,91	1,08 $\pm$ 0,27	-1,8	-2,7	

(\*): Las proporciones entre NAG y CA son constantes; por ejemplo, 0,5 mg/ml NAG corresponde al contenido de NAG en 0,66 mg/ml CA  
(\*\*): GdL = Grados de libertad  
(\*\*\*): NS = No estadísticamente significativa  
(\*\*\*\*): ES = estadísticamente significativa

## Ejemplos

A. Soluciones y/o lipogeles que contienen CA y AH no reticulado que debe utilizarse para aplicación tópica

Las formulaciones indicadas a continuación, junto con la descripción de los procedimientos operativos utilizados en los ejemplos 1 y 2, ilustran posibles aplicaciones prácticas de la presente invención y, puesto que son meramente a modo de ejemplo, no deben considerarse limitativas de la invención en sí misma en modo alguno.

Se hace especial referencia a los excipientes, que pueden utilizarse alternativamente a los mencionados explícitamente en la presente invención, según requisitos de formulación-tecnológicos, y que, en cualquier caso, se pueden seleccionar entre una amplia gama de productos disponibles en el mercado y bien conocidos por los expertos en el sector farmacéutico, y por lo tanto sin originalidad inventiva.

10 Con respecto a la dosis de los principios activos, las muestras descritas presentan cantidades puramente indicativas, cualquier variación de las cuales no da lugar a la modificación sustancial de los métodos de preparación ilustrados.

Más exactamente, AH, expresado como sal de sodio, puede utilizarse ventajosamente en concentraciones no mayores de 4% (preferiblemente 1-3%), mientras que CA puede variar entre 0,05 y 2,5% (preferiblemente 0,1-0,5%) según las concentraciones utilizadas en los ensayos "in vitro", descritos en el apartado experimental y con la cantidad que figura en las reivindicaciones de la presente solicitud de patente.

Ejemplo 1: Solución en monodosis para aplicación tópica

La formulación, descrita en la Tabla 1, se refiere a principios activos y excipientes (con descripción de la correspondiente función tecnológica) que pueden utilizarse en la preparación de una solución para aplicación tópica, que debe dosificarse automáticamente en recipientes desechables de volumen fijo.

20 El material utilizado para los recipientes, por ejemplo polietileno, debe ser compatible con los componentes de la formulación y con las normas actuales para materiales para utilización en el campo cosmético o para un dispositivo médico.

Un ejemplo de preparación de la formulación en cuestión para dosificar en recipientes de polietileno para monodosis, se describe a continuación:

25 - pesar los componentes de la formulación por separado según las indicaciones en las instrucciones de fabricación;  
 - en un recipiente de disolución, equipado con un sistema de agitación adecuado, se añade una cantidad de agua doblemente destilada correspondiente a aproximadamente la mitad del peso final de la solución. Se inicia el proceso de agitación a fin de obtener un vórtice y a continuación se añade, en orden: metil-para-hidroxi-benzoato sódico (Me-parabeno Na), CA, EDTA disódico, 2-fenoxietanol y propil-para-hidroxi-benzoato sódico (Pr-parabeno Na)  
 30 garantizando que cada componente haya pasado completamente en solución antes de la adición de lo subsiguiente;

- comprobar el pH de la solución resultante y, si es necesario, ajustarlo con ácido sulfúrico diluido hasta que se obtiene un valor de pH igual a  $7,2 \pm 0,4$ ;

-añadir la cantidad pesada de AH sódico muy lentamente y con agitación vigorosa continua y mantener en agitación vigorosa hasta que se alcanza la disolución completa;

35 - añadir la cantidad restante de agua doblemente destilada hasta que se alcance el peso final;

- continuar agitando durante el tiempo necesario para obtener la viscosidad deseada (comprendida entre 2.500 y 4.500 Pa  $\times$  s<sup>-1</sup> medido con esfuerzo cortante igual a 5 s<sup>-1</sup>), comprobar el pH una vez más y, si es necesario, ajustarlo con ácido sulfúrico o hidróxido sódico diluidos;

40 - la solución final resultante se dosifica en recipientes de polietileno del volumen y la forma deseados de una línea automática especializada.

Tabla 1: Solución en monodosis para aplicación tópica - composición

Ingrediente	Contenido (%)	Función tecnológica
Hialuronato sódico <sup>(1)(2)</sup>	1,000	Ingrediente funcional
Condramina <sup>(3)</sup>	1,321	Ingrediente funcional
Me-parabeno Na	0,150	Conservante
Pr-parabeno Na	0,035	Conservante
2-fenoxietanol	0,300	Conservante
EDTA sódico	0,100	Coadyuvante de los conservantes

Ácido sulfúrico diluido	c.s.p. pH 7,2	ajustador de pH
Agua doblemente destilada	c.s.p. 100	disolvente/excipiente
(1): Peso molecular comprendido entre 0,5 y $3 \times 10^6$ Da (2): La cantidad de hialuronato sódico pesada puede ajustarse debidamente según su concentración para cumplir con el contenido indicado en la solución final. (3): Compuesto de 75,7% de NAG y 24,3% de sulfato sódico anhidro, es decir, según la relación en peso correspondiente a los respectivos pesos equivalentes.		

Ejemplo 2: Lipogel hidratante para aplicación tópica:

La formulación, indicada en la tabla 2, se refiere a principios activos y excipientes (con descripción de la correspondiente función tecnológica) que pueden utilizarse en la preparación de un lipogel hidratante para aplicación tópica, que debe dosificarse, por ejemplo, en recipientes multidosis. El material utilizado para el recipiente, por ejemplo polietileno, debe ser compatible con los componentes de la formulación y con las normas actuales de los materiales para su uso en dermocosmetología o para un dispositivo médico.

A modo de ejemplo se describe a continuación un ejemplo de preparación de la formulación en cuestión para la dosificación en envases multidosis:

- 10 - pesar los componentes de la formulación por separado según las indicaciones en las instrucciones de fabricación;
  - etapa 1 (preparación de la solución CA): en un turbo-emulsionador adecuado, añadir la cantidad establecida de agua purificada y CA; mezclar, utilizando las paletas solamente, durante 30 minutos hasta que se obtiene una solución;
  - etapa 2 (fase acuosa): en el turbo-emulsionador que contiene la solución CA, agregar la glicerina, el polímero de polietileno-dimeticonol, el 2-fenoxietanol y el EDTA sódico; agitar utilizando sólo las paletas durante 30 minutos hasta que los componentes estén completamente homogeneizados;
  - etapa 3 (fase oleosa): en un recipiente de fusión, equipado con un sistema de agitación adecuado y conectado por medio de un sistema de transferencia de vacío al turbo-emulsionador que contiene la fase acuosa, añadir los PEG-6 caprílico/capricoglicéridos, el Me-parabeno, el Pr-parabeno y agitar durante 20 minutos; a continuación, añadir el capril-carbonato y agitar durante 10 minutos más;
- 20 - etapa 4 (formación de la emulsión): activar el sistema de conexión recipiente de fusión con turbo-emulsionador, transferir la etapa 3 en la etapa 2 y utilizar el turbo-emulsionador hasta que se obtenga una emulsión homogénea;
  - etapa 5 (adición de espesante): estabilizar la emulsión resultante mediante la adición de poliacrilamida C<sub>13-14</sub> isoparafina/lauriléter-7 y agitar durante 20 minutos;
  - etapa 6 (fase de silicona): añadir a la etapa que resulta 5, y en secuencia, polímero reticulado dimeticona/dimeticona y ácido hialurónico/etil-hexil-palmitato, mantener la agitación durante 20 minutos hasta que se alcanza una homogeneización completa del gel final; antes del envasado primario, comprobar el pH que debe estar comprendido entre 5.0 y 6.0, y la viscosidad, que debe estar comprendida entre 22.000 y 32.000 cPs;
  - etapa 7 (envasado primario): el gel resultante de la etapa 6 puede transferirse y dosificarse en una línea automática para el llenado de tubos polivalentes, preferentemente equipados con un aplicador de precisión. Como ya se ha explicado anteriormente, el material seleccionado para los tubos, por ejemplo polietileno, debe ser compatible con los componentes de la formulación y con las normas actuales para los materiales que se utilizarán en dermo-cosmetología o para un producto médico.

Tabla 2: Lipogel hidratante para aplicación tópica - composición

Ingrediente	Contenido (%)	Función tecnológica
Condramina <sup>(1)</sup>	0,66	Ingrediente funcional
AH/etil-hexil-palmitato <sup>(2)(3)</sup>	1,00	Ingrediente funcional
Glicerina	4,00	Agente humectante/disolvente
2-fenoxietanol	0,30	Conservante
EDTA disódico	0,10	Agente quelante/aditivo reológico
Polímero reticulado de dimeticona/dimeticona	20,00	Aditivo reológico
Poliacrilamida/Isoparafina de C <sub>13-14</sub> /lauriléter-7	5,00	Aditivo reológico
Glicéridos de PEG-6 caprílico/cáprico	2,00	Emoliente

Caprilil carbonato	5,00	Emoliente
Me-parabeno	0,15	Conservante
Pr-parabeno	0,10	Conservante
Copolímero de polietileno dimeticonol <sup>(4)</sup>	3,00	Relleno Soft-focus
Agua desmineralizada	c.s.p. 100	Disolvente/excipientes

(1): Compuesto de 75,7% de NAG y 24,3% de sulfato sódico anhidro, es decir según la relación en peso correspondiente a los respectivos pesos equivalentes  
 (2): Una composición especial de AH en biosferas (véase la Tabla 3) que, después de la aplicación sobre la superficie de la piel en la cara, penetra en las arrugas finas y captura de agua de evaporación, esponjándose así con la consiguiente reactivación natural de la superficie de la piel. La actividad de suavizado resultante es también debido al llenado externo de las propias arrugas por las biosferas restantes en la superficie de la piel  
 (3): El uso de biosferas es una mejora completamente opcional. Alternativamente, pueden reemplazarse con dichas cantidades de AH como para obtener los mismos resultados estéticos. AH/etil-hexilo-palmitato está normalmente disponible en el mercado  
 (4): Un componente que consiste en elastómeros de silicona especiales, en forma de pequeñas partículas esféricas, es capaz de reflejar la luz incidente de manera uniforme. Las partículas se adhieren en el interior del surco de las arrugas, con un efecto de suavizado de la superficie y un impacto estético obvio.

Tabla 3: Composición de AH/etil-hexil-palmitato

Ingrediente	Contenido (%)	Función tecnológica
Hialuronato sódico de BPM(*)	0,145	Ingrediente funcional
Hialuronato sódico de APM(**)	0,055	Ingrediente funcional
Etil-hexil-palmitato	95,300	Acondicionador/filmógeno de la piel
Silica dimetil silicato	2,500	Espesante
Butilenglicol	1,000	Conservante
Caprililglicol	1,000	Conservante
(*) : Bajo peso molecular		
(**) : Alto peso molecular		

B. Soluciones viscoelásticas que contienen CA y AH no reticulado, para ser utilizadas para revitalización de la piel

5 La serie de operaciones descritas en el ejemplo 3 debe considerarse exclusivamente como uno de los ejemplos explicativos de la presente invención y como los procedimientos descritos no tienen originalidad inventiva y no representan ninguna novedad tecnológica para los expertos en la materia, no deben considerarse restrictivos de la propia invención de ninguna manera.

Con respecto a las concentraciones y características físico-químicas de los dos principios activos, la información proporcionada para los ejemplos 1 y 2 sigue siendo válida.

10 Ejemplo 3: Soluciones viscoelásticas para utilizar como revitalizadoras para uso intradérmico

La formulación presentada en la tabla 4 se refiere a principios activos y excipientes (con descripciones de las funciones tecnológicas correspondientes) que pueden utilizarse en la preparación de soluciones viscoelásticas, para ser utilizadas como un dispositivo médico para uso intradérmico en dermocosmetología y medicina estética.

15 Del mismo modo, los materiales de envasado utilizados deben ser compatibles con los componentes de la formulación y con la normativa vigente que rige la utilización en la producción de un dispositivo médico.

Se presenta a continuación un ejemplo de preparación de la clase de formulación en cuestión, para la dosificación en jeringuillas monodosis del volumen deseado:

- pesar los componentes de la formulación por separado según las indicaciones en las instrucciones de fabricación

- Etapa 1 (solución salina isotónica): en un mezclador equipado con un sistema de agitación adecuado, preparar la solución salina isotónica, tamponada a pH 7,2, la introducir los componentes enumerados a continuación, en los porcentajes descritos en la tabla 4 y agitar hasta que se obtiene una solución transparente :

- Cloruro sódico (NaCl)
- 5     • Fosfato sódico dibásico dihidratado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )
- Fosfato disódico monobásico decahidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ )
- Agua para inyectables.

Verificar y si es necesario ajustar el pH a 7,2 con HCl 1 N o NaOH 1 N;

10 - Etapa 2 (hidratación): en un mezclador adecuado, equipado con sistema de agitación, calorifugado y sistema de aplicación/control de vacío, añadir la cantidad deseada de solución salina isotónica (etapa 1) y la CA en cantidades tales como para obtener la concentración deseada. Mantener la agitación durante 10 minutos, a continuación, añadir la cantidad deseada de AH a la solución resultante y dejar que la mezcla repose durante un día a una temperatura comprendida entre 2°C y 6°C, es decir, hasta la completa hidratación del AH;

15 - etapa 3 (homogeneización): después de haber completado el proceso de hidratación, con el fin de evitar la incorporación de burbujas de aire, aplicar un vacío de 0,2 bar a la mezcladora y dejar la masa, obtenida como se describe en el párrafo anterior, agitar lentamente hasta que esté completamente homogeneizada;

- antes de la dosificación en jeringuillas, comprobar el valor de la osmolaridad de la masa homogénea resultante, que debe estar comprendido entre 260 y 360 mOsm/l;

20 - La solución viscoelástica final, que debe administrarse utilizando agujas hipodérmicas finas (calibres 27 y 30), se puede rellenarse en jeringuillas monouso, del volumen deseado, bajo flujo laminar en un entorno de contaminación controlada;

- el envase final se somete posteriormente a un proceso de esterilización, compatible con la formulación y los materiales con los que está compuesta.

Tabla 4: Solución viscoelástica que contiene CA y AH no reticulado - composición

Ingrediente	Contenido (%)	Función tecnológica
Ácido hialurónico <sup>(1)(2)</sup>	1,40	Ingrediente funcional
Condramina <sup>(3)</sup>	0,25	Ingrediente funcional
Cloruro sódico	0,70	Agente de tonicidad
Fosfato ácido de sodio • 2H <sub>2</sub> O	0,0056	Agente tamponante
Fosfato ácido disódico • 10H <sub>2</sub> O	0,07	Agente tamponante
Agua para inyectables	c.s.p. 100	Disolvente/excipientes
(1): Peso molecular comprendido entre 0,5 y $3 \times 10^6$ Da (2): La cantidad de hialuronato sódico pesado puede ajustarse debidamente según su concentración con el fin de cumplir con el contenido establecido en la solución final (3): Compuesto de 75,7% NAG y sulfato sódico anhidro 24,3%, es decir según la relación en peso correspondiente a los respectivos pesos equivalentes.		

25 C. Hidrogeles que contienen CA y AH reticulado para utilizar como relleno intradérmico

Los ejemplos 4 y 5 describen dos procedimientos en los que CA y AH reticulado se incorporan en una única formulación, dando hidrogeles para ser utilizados para administración intradérmica.

30 En ambos casos, hay una etapa preliminar, es decir, la reticulación de AH, que no está cubierta por las reivindicaciones contenidas en la presente invención, pero que se describe de igual forma, al menos en resumen, con el fin de hacer comprensibles y homogéneos los procedimientos descritos en los ejemplos en cuestión.

El proceso de reticulación descrito no presenta ninguna novedad tecnológica para el sector, de modo que se hizo hincapié en que no puede atribuírsele ninguna originalidad inventiva, a diferencia de los hidrogeles finales, que contienen AH reticulado junto con CA, nunca antes se ha descrito y reivindicado debido a la novedad absoluta representada por las formulaciones que incluyen éstos.

35 El proceso de reticulación anteriormente mencionado consiste esencialmente en la formación de puentes moleculares que conectan cada una de las unidades de AH entre sí mediante la formación de enlaces covalentes con las moléculas

bifuncionales del agente de reticulación. De esta manera, se forman estructuras tridimensionales de consistencia variable, que, en agua o en líquidos fisiológicos, tienen capacidad de volver a esponjarse a un estado de equilibrio directamente en proporción al grado de reticulación.

En el AH, hay dos centros de reacción, adecuados para la formación de puentes mediante la interacción con agentes bifuncionales, es decir:

- el grupo carboxilo del ácido glucurónico, con la formación de puentes de éster;
- el grupo hidroxilo en la posición 6 de la molécula de N-acetilglucosamina, con la formación de puentes de éter.

Hay una amplia gama de agentes de reticulación conocidos, ampliamente utilizados y fácilmente disponibles en el mercado, y de entre ellos, podemos citar a modo de ejemplo: Éter 1,4-butanodiol-diglicidílico (BDDE), éter diglicidílico de polietilenglicol, divinilsulfona (DVS), epiclorhidrina, 1,2,3,4 di-epoxibutano, 1,2,7,8 di-epoxibutano y otros.

Entre los agentes de reticulación mencionados anteriormente, es preferible BDDE debido a su muy baja toxicidad y, por esta razón, se utiliza en las formulaciones descritas y reivindicadas en la presente solicitud de patente, y, en consecuencia, en el detalle de los ejemplos 4, 5.

Para cada agente de reticulación, hay modos prácticos precisos de uso y, en el caso del BDDE, el proceso se consigue mediante la formación de enlaces éter con los grupos hidroxilo de NAG en las condiciones de operación especificadas en el presente documento:

- Relación de BDDE/AH (p/p): 1/1-1/50
- Concentración de BDDE en la mezcla de reacción: 0,5-20% (p/v)
- Concentración de AH en la mezcla de reacción: 10-20%
- Peso molecular del AH:  $0,5-3 \times 10^6$  Da
- Temperatura de reacción: 30 a 60°C.
- pH de reacción: > 11
- Tiempo de reacción: 2-4 horas

Con respecto a la dosis de los principios activos, las muestras descritas presentan cantidades puramente indicativas, y cualquier variación de las mismas no da lugar a la modificación de los métodos de preparación ilustrados. Además, dichas cantidades están en consonancia con las condiciones requeridas para el uso de BDDE como agente de reticulación, y están dentro de los intervalos ya especificados en los ejemplos 1, 2 y 3. Para mayor claridad, la formulación relativa a los ejemplos 4 y 5 se resume cuantitativamente en la tabla 5.

Ejemplo 4: Hidrogeles de 2% de AH que contienen 0,1% de CA (incorporación de CA mediante rehidratación de AH reticulado)

El procedimiento se describe con detalle por medio de los pasos y etapas descritos a continuación:

a. Preparación del hidrogel de 2% de AH reticulado

- etapa 1 (disolución del AH): en un reactor adecuado, equipado con agitador, calorifugado y sistema de control de vacío, introducir NaOH 0,25 N y AH (como sal sódica) obtenido por biofermentación (peso molecular comprendido entre 0,5 y  $3 \times 10^6$  Da) en cantidades tales como para dar una concentración final de AH igual a 12% (p/v); dejar hidratar el AH durante una hora a 2-6°C, a continuación aplicar un vacío de 0,2 bar, con el fin de evitar la incorporación de burbujas de aire en la masa, y empezar la agitación suave como para obtener una homogeneización completa;
- etapa 2 (reacción de reticulación): en el reactor que contiene la etapa 1, restablecer la presión atmosférica, a continuación, añadir una cantidad tal de BDDE como para dar una relación de 1:16 (p/p) con respecto al contenido de AH, y mantener agitación durante otros diez minutos para dispersar uniformemente el BDDE en toda la masa de reacción; en este momento, detener la agitación, y dejar la reacción en reposo durante 2-4 horas a 50°C hasta que el proceso de reticulación sea completo; utilizando un aparato adecuado, moler el gel resultante para dar partículas de dimensiones iguales a aprox.  $1 \text{ cm}^3$ ;
- etapa 3 (purificación/hidratación): transferir el producto procedente de la etapa 2 a un recipiente equipado con un agitador, preparar por separado una solución salina isotónica, tamponada a pH 7,2 según la composición descrita en la Tabla 6, y añadir una cantidad tal al AH reticulado como para dar una relación de 5:1 (p/p) con respecto al gel de la etapa 2; comenzar la agitación suave y ajustar el pH a 7 con HCl 1 M y dejar agitando durante 24 horas. Repetir la operación al menos tres veces, es decir, hasta alcanzar el equilibrio de reesponjamiento, con la obtención de un hidrogel de AH con la concentración deseada.

En el transcurso de las operaciones anteriormente descritas, comprobar repetidamente el pH de la solución isotónica externa y la osmolaridad del hidrogel final, que debe corresponder a la relacionada con la concentración de AH predefinida (osmolaridad comprendida entre 260 y 360 mOsm/l y pH comprendido entre 6,8 y 7,6).

- b. Preparación de la solución isotónica, tamponada a pH 7,2, que contiene la concentración predeterminada de CA (0,1%)
- en un recipiente adecuado equipado con agitador, se carga la cantidad predefinida de solución salina tamponada a pH 7,2, obtenido según las instrucciones dadas en la etapa 3 del paso a., comprobar el pH y, si es necesario, ajustar con HCl 1 N o NaOH 1 N.
  - Añadir la cantidad predeterminada de CA y dejar agitando hasta disolución completa. Transferir y almacenar la solución así obtenida a un recipiente cerrado, apartado de fuentes de calor.
- c. Preparación de un hidrogel que contiene 2% de AH reticulado y 0,1% de CA
- etapa 1 (precipitación y secado de AH reticulado): en un sistema de diálisis adecuado, equipado con una membrana adaptada con esta finalidad (p. ej., spectra 4 MWCO:12-14000), introducir la cantidad indicada de hidrogel de AH reticulado, obtenida según la descripción dada en la etapa 3 del paso a, transferir el dializador a un recipiente de tamaño adecuado e introducir una cantidad de agua tal que permita la diálisis exhaustiva con eliminación completa de la sal (sustituyendo el medio de diálisis si es necesario); transferir el gel resultante a un recipiente adecuado equipado con un agitador, añadir un gran exceso de etanol y comenzar una agitación vigorosa hasta la precipitación completa del AH reticulado; separar la fase sólida por filtración y secarla, al vacío, a una temperatura no superior a 40°C; después del secado y para facilidad de uso, reducir el AH reticulado resultante a partículas de tamaño comprendido entre 20 y 50 µm por medio de un sistema adecuado de molienda/micronización;
  - etapa 2 (incorporación de CA por rehidratación): en un recipiente adecuado equipado con un agitador, transferir la cantidad requerida de AH reticulado, obtenido según la descripción dada en la etapa 1, y añadir una cantidad adecuada de solución isotónica de CA tamponada a pH 7,2 (véase el paso b.), a fin de dar las concentraciones predefinidas de los principios activos, y a continuación llevar a cabo la rehidratación, mientras se agita muy lentamente, hasta que se forma el hidrogel deseado;
  - etapa 3 (llenado en jeringuillas): el hidrogel final resultante es adecuado para la dosificación en jeringuillas monodosis por medio de una máquina de llenado adecuada, en un entorno exclusivo en flujo laminar; el envase final se somete a un proceso de esterilización compatible con la formulación y los materiales de los que está compuesto.

Ejemplo 5: Hidrogeles de 2% de AH que contienen 0,1% de CA (incorporación de CA por difusión en el hidrogel de AH)

El procedimiento se describe con detalle por medio de los pasos y etapas descritas a continuación:

- etapa 1 (precipitación del hidrogel de AH reticulado): Preparado según los métodos operativos descritos en el ejemplo 4 - paso a. - etapa 2;
  - etapa 2 (preparación de la solución isotónica, tamponada a pH 7,2, que contiene la concentración predeterminada de CA (0,1%)): preparada según la descripción dada en el ejemplo 4 - paso b.
  - etapa 3 (preparación de un hidrogel de AH reticulado al 2% y CA (0,1%)): en un recipiente apropiado equipado con un sistema de agitación adecuado, introducir la cantidad predefinida de hidrogel de AH, obtenido según el método operativo de la etapa 1, iniciar el proceso de difusión mediante la adición de una cantidad calculada de la solución isotónica de CA (véase la etapa 2) y mantener en agitación suave durante 24 horas; desechar la solución isotónica residual y comprobar que los parámetros del hidrogel resultantes corresponden a los establecidos es decir:
    - el valor de osmolaridad debe estar comprendido entre 260 y 360 mOsm/ml
    - el valor del pH debe estar comprendido entre 6,8 y 7,6;
 repetir la operación el número de veces necesarias y suficientes para obtener la formulación final que contiene AH reticulado y CA en las concentraciones establecidas;
  - etapa 4 (llenado en jeringuillas): el producto resultante de la etapa 3 se homogeneiza y reduce en partículas de dimensiones comprendidas entre 100 y 300 µm es decir, de manera que sea capaz de dosificarse en jeringuillas monodosis, utilizando una máquina de llenado adecuada en un entorno exclusivo con flujo laminar.
- El envase final se somete posteriormente a un proceso de esterilización, compatible con la formulación y los materiales de los que está compuesto.

Tabla 5: Formulación correspondiente a los ejemplos 4 y 5

Ingrediente	Contenido (%)	Función tecnológica
Ácido hialurónico reticulado <sup>(1)(2)</sup>	2,0	Ingrediente funcional
Condramina <sup>(3)</sup>	0,1	Ingrediente funcional
Cloruro sódico	0,7	Agente de tonicidad
Fosfato sódico dibásico • 2 H <sub>2</sub> O	0,0056	Agente tamponante

Fosfato disódico monobásico • 10 H <sub>2</sub> O	0,07	Agente tamponante
Agua para inyectables	c.s.p. 100	Disolvente/excipiente
(1): en forma de sal de sodio. Peso molecular comprendido entre 0,5 y 3×10 <sup>6</sup> Da (2): la cantidad de hialuronato sódico pesada puede ajustarse debidamente según su concentración con el fin de cumplir con el contenido establecido en la solución final (3): compuesta de 75,7% de NAG y 24,3% de sulfato sódico anhidro, es decir según la relación en peso correspondiente a los respectivos pesos equivalentes.		

Tabla 6: Solución tampón isotónica a pH 7,2 - Composición

Ingrediente	Contenido (%)	Función tecnológica
Cloruro sódico	0,7	Agente isotonzante
Fosfato sódico dibásico • 2 H <sub>2</sub> O	0,0056	Agente tamponante
Fosfato disódico monobásico • 10 H <sub>2</sub> O	0,07	Agente tamponante
Ácido clorhídrico 1 N <sup>(*)</sup>	según sea necesario	Ajustador de pH
Hidróxido sódico 1 N <sup>(*)</sup>	según sea necesario	Ajustador de pH
Agua para inyectables	c.s.p. 100	Disolvente/excipiente
(*) Para utilizar sólo si es necesario		

### C. Formas orales

Las formulaciones indicadas de aquí en adelante ilustran posibles aplicaciones prácticas de la presente invención, y como tal, no debe considerarse que sean limitativas de la propia invención en modo alguno.

Se hace especial referencia a los excipientes de las diversas presentaciones consideradas, que pueden utilizarse alternativamente a las mencionadas explícitamente en los ejemplos ilustrados a continuación, dependiendo de los requisitos de formulación-tecnológicos, y que, en cualquier caso, se puede seleccionar de una amplia gama de productos disponibles en el mercado y bien conocidos por los expertos en el sector farmacéutico, y por consiguiente sin originalidad inventiva.

También en el caso de las formas orales, la dosis CA dada en los ejemplos es puramente indicativa y en cualquier caso está dentro del rango de dosificación reivindicado en la presente descripción de la invención, es decir, variable entre 100-1.000 y preferiblemente 250-750 mg por día, expresado en base de glucosamina.

Lo mismo también es cierto para la relación NAG a SSA dentro de CA, que, tal como se especificó anteriormente, pueden variar libremente en términos de peso equivalente entre 1:0,5 y 1:3 y que, en los ejemplos descritos, se ha mantenido constante e igual a 1:1 siendo la más ventajosa según los resultados del apartado experimental.

También debe precisarse que, cualquier variación en la dosis de CA y en su contenido en relación con NAG y SSA no implican modificaciones sustanciales a los métodos de preparación ilustrados.

#### Ejemplo 6: Comprimidos para uso oral

Además del principio activo, la formulación descrita en la Tabla 7 comprende excipientes (con una descripción de la función tecnológica correspondiente) que puede usarse en la preparación de comprimidos que se utilizarán para administración oral de la materia de la presente invención, sola o junto con otros principios activos.

La técnica de vehiculación de la dosis seleccionada de CA, sola o junto con otros principios activos, en un comprimido, sólo requiere operaciones que son tecnológicamente bien conocidos y completamente normales para cualquier operador en la técnica, es decir:

- pesada de cada uno de los componentes de la formulación
- granulación en húmedo, mediante una solución acuosa de polividona K-25, NAG y celulosa microcristalina (granulado A) en un granulador adecuado
- secado del granulado A en una estufa de secado con aire circulante a una temperatura no superior a 50°C hasta peso constante (puede utilizarse cualquier otro tipo de secado siempre que sea validado previamente)
- tamizado del granulado A y los demás componentes de la formulación;
- preparación de la mezcla para compresión por homogeneización de granulado A con los demás componentes de la formulación en un mezclador adecuado;

- compresión de la mezcla resultante en una máquina adecuado de formación de comprimidos automatizada, con la eventual realización de comprimidos de forma y tamaño adecuados.

Tabla 7: Ejemplo de formulación en forma de comprimidos

Ingredientes	mg/comprimido	Función tecnológica
Principio activo		
Condramina <sup>(1) (2)</sup>	815,6	Ingrediente funcional
(correspondiente a glucosamina)	(500)	
Excipientes		
Celulosa microcristalina <sup>(2)</sup>	61,2	Diluyente/disgregante
Polividona K-25 <sup>(2)</sup>	10,6	Aglutinante
Carboximetilcelulosa sódica reticulada <sup>(3)</sup>	según sea necesario	Disgregador
Talco <sup>(3)</sup>	según sea necesario	Agente deslizante/antiaglomerante
Estearato de Mg <sup>(3)</sup>	según sea necesario	Agente lubricante/antiaglomerante
Agua <sup>(4)</sup>	según sea necesario	Apoyo de formulación
<p>(1): la cantidad de CA se formula y se calcula de manera que la relación entre NAG y SSA, en términos de peso equivalente, es 1: 1 (75,7% de NAG y 24,3% en peso de SSA) correspondiente a un contenido, expresado en glucosamina base, igual a 500 mg (PM de NAG = 221,2; PM de glucosamina base = 179,2: por lo tanto, en términos ponderales, 221,2 mg de NAG corresponde a 179,17 mg de glucosamina base)</p> <p>(2): utilizada en la preparación del granulado de CA</p> <p>(3): las cantidades absolutas y relativas de dichos excipientes dependen del tamaño y forma del molde de compresión, del tipo de máquina de formación de comprimidos y el sistema para la carga de los polvos en la cámara de compresión instalado en el interior</p> <p>(4): el agua se utiliza en la preparación de granulado A y su cantidad depende de los componentes del granulado así como del tipo y del tamaño del granulador utilizado. Se elimina completamente durante el secado</p>		

Ejemplo 7: Cápsulas para uso oral

5 Además del principio activo, la formulación descrita en la tabla 8 comprende excipientes (con una descripción de la función tecnológica correspondiente) que puede usarse en la preparación de cápsulas de gelatina dura que se utilizará para la administración oral de la materia de la presente invención, solo o opcionalmente junto con otros principios activos.

10 La técnica de vehiculación de la dosis seleccionada de CA, sola o junto con otros principios activos, en una cápsula de gelatina dura, sólo requiere operaciones que son tecnológicamente bien conocidas y completamente normales para cualquier operador experto en la técnica, es decir:

- pesada de cada uno de los componentes de la formulación
- preparación de la mezcla a encapsular por homogeneización en seco en un mezclador adecuado
- llenado automatizado en cápsulas de gelatina dura de tamaño adecuado y el color deseado

Tabla 8: Ejemplo de una formulación en forma de cápsulas

Ingredientes	mg/cápsula	Función tecnológica
Principio activo		
Condramina <sup>(1)</sup>	407,8	Ingrediente funcional
(correspondiente a glucosamina)	(250)	
Excipientes		
Celulosa microcristalina <sup>(2)</sup>	según sea necesario	Aglutinante/Diluyente
Talco <sup>(2)</sup>	según sea necesario	Agente fluidificante/antiaglomerante

Estearato de Mg <sup>(2)</sup>	según sea necesario	Agente lubricante/antiaglomerante
<p>(1): véase los comentarios en la nota (1) de la tabla 7 para calcular la dosis de CA y de las relaciones de masas entre NAG y SSA.</p> <p>(2): las cantidades absolutas y relativas de los excipientes dependen del tamaño de las cápsulas utilizadas como excipiente de administración y del tipo de dosificación/sistema instalado en el relleno utilizado para la dosificación de la formulación en cápsulas de gelatina dura.</p>		

Ejemplo 8: Bolsitas termoselladas que contienen polvos para la preparación improvisada de soluciones/suspensiones bebibles

5 Además del principio activo, la formulación descrita en la tabla 9 comprende excipientes (con una descripción de la función tecnológica correspondiente) que puede usarse en el uso de la materia de la presente invención, sola u opcionalmente junto con otros principios activos, en el formulación de un polvo para la preparación de soluciones/suspensiones improvisadas para tomar por vía oral.

10 Con esta finalidad, la formulación en cuestión puede vehiculizarse adecuadamente en una bolsita termosellada constituida por una capa externa de papel, una interfaz de aluminio y una capa interior de polietileno, empleando operaciones de preparación bien conocidas y utilizables por cualquier personal técnico que opera en este campo específico, es decir:

- pesada y tamizado de cada uno de los componentes de la formulación;
  - preparación de la mezcla de componentes por homogeneización en seco en un mezclador adecuado;
  - termomoldeo de las bolsitas en una línea automatizada adecuada
- 15 - utilizando la misma línea automatizada para el llenado y sellado de las bolsitas con la forma y dimensiones deseadas y que contiene los polvos que se utilizarán para la preparación de soluciones/suspensiones para tomar por vía oral improvisadamente.

Tabla 9: Ejemplo de formulación en forma de polvo para la preparación de soluciones/suspensiones para tomar improvisadamente

Ingredientes	mg/bolsita	Función tecnológica
Principio activo		
Condramina <sup>(1)</sup>	815,6	Ingrediente funcional
(Correspondiente a glucosamina)	(500)	
Excipientes		
Sorbitol <sup>(2)</sup>	según sea necesario	Diluyente/edulcorante
Ácido cítrico <sup>(2)</sup>	según sea necesario	Potenciador del sabor
Polietilenglicol 4000 <sup>(2)</sup>	según sea necesario	Lubricante/plastificante
Otros <sup>(3)</sup>	según sea necesario	Edulcorantes/aromas
<p>(1): véase los comentarios en la nota (1) de la tabla 7 para calcular la dosis de CA y de las relaciones de peso entre NAG y SSA.</p> <p>(2): las cantidades absolutas y relativas de dichos excipientes dependen del tipo de relleno de la bolsita utilizada y de los tamaños de la bolsita.</p> <p>(3): pueden añadirse libremente aromas y edulcorantes, dependiendo de las preferencias organolépticas.</p>		

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición útil para el tratamiento cosmético y estético de la piel, que contiene N-acetilglucosamina y un sulfato de metal alcalino en la relación de peso equivalente de 1:1.
2. La composición según la reivindicación 1, en donde dicho sulfato de metal alcalino es el sulfato sódico anhidro.
- 5 3. La composición según la reivindicación 1 o 2, que comprende además ácido hialurónico o una de sus sales.
4. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además ácido hialurónico o una de sus sales en concentraciones de hasta el 4% en peso, con referencia al peso total de la composición.
5. La composición según la reivindicación 4, que comprende ácido hialurónico o una de sus sales en concentraciones entre 1% y 3% en peso.
- 10 6. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en una forma adecuada para uso tópico o intradérmico, que comprende N-acetilglucosamina y sulfato sódico anhidro en cantidades totales comprendidas entre 0,05% y 2,5% en peso, con referencia al peso total de la composición.
7. La composición según la reivindicación 6, que comprende N-acetilglucosamina y sulfato sódico anhidro en cantidades totales entre 0,1% y 0,5% en peso.
- 15 8. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende portadores, excipientes y/o conservantes para uso cosmético.
9. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en forma de solución, lipogel o hidrogel para aplicación tópica sobre la piel.
10. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la forma de una dosis unitaria para administración oral.
- 20 11. La composición según la reivindicación 10, que comprende N-acetilglucosamina y sulfato sódico anhidro en una relación de peso equivalente de 1:1 y que contiene una cantidad de N-acetilglucosamina comprendida entre 100 y 1.000 mg, expresada en base de glucosamina.
12. El uso de una composición según la reivindicación 1 que contiene N-acetilglucosamina y sulfato sódico anhidro en una relación de peso equivalente entre 1:0,5 y 1:3 para el tratamiento cosmético de la piel.
- 25 13. El uso de la reivindicación 12, en donde N-acetilglucosamina y sulfato de metal alcalino están en la relación de peso equivalente de 1:1.
14. El uso de las reivindicaciones 12 o 13, en donde dicha composición comprende además ácido hialurónico o una de sus sales.
- 30 15. Un relleno intradérmico útil para restablecer el tono y vigor de la piel, que comprende una composición que contiene N-acetilglucosamina y sulfato de metal alcalino en una relación de peso equivalente entre 1:0,5 y 1:3.
16. Un complemento alimenticio para el trefismo de la piel, que comprende una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.