

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 650 937**

51 Int. Cl.:

A61Q 19/00 (2006.01)

A61K 8/73 (2006.01)

A61K 31/726 (2006.01)

A61P 17/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.09.2009 E 13159487 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017 EP 2679278**

54 Título: **Composiciones dermatológicas que comprenden sulfato de heparano**

30 Prioridad:

20.11.2008 EP 08169547

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

23.01.2018

73 Titular/es:

**LABORATORI DERIVATI ORGANICI S.P.A.
(100.0%)
Via M. Barozzi, 4
20122 Milano, IT**

72 Inventor/es:

DE AMBROSI, LUIGI

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 650 937 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 dermatológicas que comprenden sulfato de heparano

5 La invención se refiere a preparaciones cosmetológicas y dermatológicas que hacen uso de sulfato de heparano.

Los heparanos se extraen de heparinoides que constituyen un subproducto en la purificación de la heparina a partir de mucosa intestinal de cerdo. Son isómeros estructurales formados durante la síntesis de los glicosaminoglicanos (GAG); estructuras altamente sulfatadas y epimerizadas son típicas de la heparina, mientras que estructuras altamente epimerizadas y menos sulfatadas en N y O son típicas de estructuras similares a la heparina que presentan baja actividad anticoagulante.

10 Se sabe que los proteoglicanos endógenos (PG) desempeñan una función importante en la cicatrización (V. Prathiba y S. Gupta: Cutaneous wound healing: Significance of proteoglycans in scar formation". Current Science, vol. 78, N° 6, 2000). Sin embargo, la técnica anterior no describe el efecto de la administración de proteoglicanos y, más específicamente, de sulfato de heparano en aplicaciones cosmetológicas y dermatológicas.

15 La presente invención se refiere a preparaciones cosmetológicas y dermatológicas que comprenden sulfato de heparano, y su uso como paliativo y agente. Se ha encontrado sorprendentemente que el sulfato de heparano es eficaz en el tratamiento de las condiciones anteriormente mencionadas.

20 En una realización preferida, las preparaciones cosmetológicas y dermatológicas según la invención hacen uso de sulfato de heparano purificado. En realidad, la purificación del sulfato de heparano es una etapa importante con el fin de eliminar compuestos residuales que se extraen con el sulfato de heparano, pero presentan diferentes características.

25 El procedimiento de purificación se caracteriza por las siguientes etapas: solubilización del sulfato de heparano en agua, adsorción sobre una resina de intercambio aniónico, desorción de la resina en condiciones que producen desorción selectiva del sulfato de heparano.

30 La resina de intercambio aniónico es preferentemente una resina de intercambio aniónico macroporosa de base fuerte tal como, por ejemplo, Lewatit™ S 6328 A. La adsorción se realiza mezclando una cantidad suficiente de perlas de resina. Preferentemente, la cantidad de perlas es superior a 15 g de resina por gramo de sulfato de heparano, más preferentemente comprende entre 18 y 25 g de resina por gramo de sulfato de heparano.

35 Después de la adsorción sobre la resina de intercambio aniónico, el sulfato de heparano se desorbe selectivamente usando una sal de metal alcalino o alcalinotérreo, preferentemente un halogenuro o un acetato. Ejemplos de sales adecuadas son dicloruro de magnesio, diacetato de magnesio, cloruro sódico, acetato sódico, cloruro de potasio y acetato de potasio. El pH de la disolución de sal está preferentemente comprendido entre 7.0 y 10.0. La concentración de sal es importante con el fin de lograr la desorción completa y selectiva del sulfato de heparano. Un intervalo preferido de concentración comprende entre 0.3 M y 1.0 M, más preferentemente entre 0.5 M y 0.8 M. En realidad, si la concentración de sal es demasiado baja, la desorción del sulfato de heparano es incompleta. Si la concentración es demasiado alta, la desorción no es selectiva y, junto con el sulfato de heparano, también se desorben compuestos altamente sulfatados.

40 Después de la desorción de la resina de intercambio aniónico, el sulfato de heparano se pasa además opcionalmente sobre una resina catiónica y sobre una resina aniónica. Un ejemplo de resina aniónica adecuada es Amberlite Forte IR 120™. Un ejemplo de una resina catiónica adecuada es Amberlite Forte IRA 410™.

45 El sulfato de heparano purificado según la invención se probó en diversas aplicaciones dermatológicas y cosmetológicas. Más específicamente, el sulfato de heparano se probó para efectos paliativos. En todas estas aplicaciones, el sulfato de heparano mostró una actividad significativa.

50 Una realización preferida de la presente invención se refiere a una composición cosmetológica que comprende sulfato de heparano.

55 Preferentemente, las composiciones cosmetológicas según la invención comprenden 0.05 % en peso al 2 % en peso, de sulfato de heparano, más preferiblemente de 0.5% en peso a 1.0 % en peso.

60 El peso molecular en peso (Mw) del sulfato de heparano adecuado en las aplicaciones cosmetológicas y dermatológicas de la invención está preferentemente comprendido entre 6,000 y 12,000 Da.

Las composiciones cosmetológicas según la invención comprenden opcionalmente otras sustancias tales como conservantes, emulsionantes, estabilizadores, humectantes, antioxidantes, que se incluyen normalmente en composiciones cosmetológicas y dermatológicas.

65 Parte experimental

Se midieron azufre orgánico, ácido urónico, glucosamina, rotación óptica, nitrógeno total y APTT según la Farmacopea Europea, 4ª edición. Se realizó electroforesis según R. Cappelletti et al. "A new Electrophoretic method for the separation of all Gags" Anal. Biochem. 99:311-315 (1979).

5

Se determinó la masa molecular (Mw) por cromatografía de exclusión por tamaño (Farmacopea Europea 4ª ed.: 2.2.30 y 2.2.46 para técnicas de cromatografía y 01/2002:0828 pág. 1297 para el procedimiento).

Purificación de sulfato de heparano

10

Se disolvieron 5 g de sulfato de heparano de mucosa intestinal de cerdo en 200 ml de agua desmineralizada. Se añadieron 90 g de Lewatit S 6238 A™ a la disolución. La mezcla se agitó lentamente a temperatura ambiente durante 72 h y luego se filtró. El filtrado se analizó y no se detectó sulfato de heparano.

15

La resina se lavó, se transfirió a una columna (diámetro 3 cm, longitud 40 cm) y se eluyó con una disolución al 5 % en peso de MgCl₂ a pH 8.5.

Se recogen los primeros 300 ml, después de lo cual la disolución no mostró presencia de sulfato de heparano (reacción negativa a amonio cuaternario).

20

La disolución se lleva a pH = 6 con una disolución al 10 % de ácido clorhídrico y el sulfato de heparano se precipita añadiendo 600 ml de acetona. La suspensión se deja a 15°C durante 12 h. Entonces, el sólido se recoge, se disuelve en 50 ml de agua y se precipita añadiendo 100 ml de acetona.

25

Entonces, el sulfato de heparano se disuelve en 100 ml de agua y la disolución se pasa sobre una resina Amberlite Forte IR 120™ y luego sobre una resina Amberlite Forte IRA 410™. El eluado se neutraliza añadiendo una disolución al 5% en peso de NaOH hasta pH 6. El agua se evapora en vacío, el sólido se filtra sobre un filtro de 0.45 µm y se liofiliza. Rendimiento: 4.12 g.

30

Análisis: Rotación = +50.62°. S orgánico = 9.07%. Ácido urónico = 31.97%. Glucosamina = 37%. N total = 2.26%. APTT = 6.31 U/mg. Mw = 7538 Da (antes de la purificación 8729 Da).

Ensayo para evaluación de eficacia paliativa

35

In vitro - Ensayo de desgranulación en células basófilas con materia prima cosmética – procedimiento de ensayo.

Las células basófilas, cuando entran en contacto con sustancias irritantes, dan sus respuestas bioquímicas que es la secreción (por desgranulación) de sustancias (tales como la histamina, leucotrienos, enzimas proteolíticas como hexosaminidasa) que contribuyen a los eventos inflamatorios.

40

La inhibición en la desgranulación de las células basófilas es una medida del efecto paliativo (antipicazón) de una sustancia. El efecto paliativo in vitro del HS se detectó mediante la medición de la liberación de la β-hexosaminidasa después de 2 h de contacto con HS a 4 concentraciones diferentes: 10 mg/ml (1%), 5 mg/ml (0.5%), 1 mg/ml (0.1%), 0.2 mg/ml (0.02%).

45

El control negativo (NC) se representó mediante células no tratadas (células sin ninguna sustancia). El control positivo (PC) se representó mediante estímulo de desgranulación de basófilos (al reticular el receptor FcεRI con un anticuerpo policlonal específico contra la cadena α estimula la desgranulación). La estimulación máxima (desgranulación) es: células tratadas con 1% de Triton X-100. Los resultados se reportaron como densidad óptica (OD) a 405 nm.

50

Tabla III

	Liberación de β-hexosaminidasa OD a 450 mn
NC: células no tratadas	0.054
PC: desgranulación de basófilo	0.117
Estimulación Max	0.377
HS 10 mg/ml	0.066
HS 5 mg/ml	0.059
HS 1 mg/ml	0.062
HS 0.2 mg/ml	0.061
HS 10 mg/ml +PC	0.061
HS 5 mg/ml + PC	0.055
HS 1 mg/ml + PC	0.110
HS 0.2 mg/ml + PC	0.112

Sobre la base de los resultados obtenidos, la sal de sodio de sulfato de heparano (HS) muestra un efecto paliativo in

vitro.

El nivel "natural" de la β -hexosaminidasa, nivel sin ningún contacto con sustancia irritante es 0.054 (OD a 450 nm). El HS solo (a diferente concentración) tiene el mismo efecto del control negativo, lo que significa que deja la célula con su nivel "natural" de la β -hexosaminidasa. Esto confirma que el HS no tiene ningún efecto sobre la desgranulación de las células basófilas.

Cuando las células entran en contacto con una sustancia irritante (control positivo), el valor se incrementa a 0.117, o es mayor de 0.377 cuando está en contacto con Triton X-100 (1%).

Cuando las células entran en contacto tanto con una sustancia irritante (control positivo) como y el HS, el nivel de β -hexosaminidasa disminuye de una manera dependiente de la dosis, con la mejor eficacia con HS a 0.5% y 1%, por lo tanto, HS tiene un efecto paliativo (antipicazón).

In vivo - Evaluación de la eficacia paliativa en una formulación cosmética en 20 voluntarios – ensayo de corto plazo – procedimiento de ensayo

El ensayo se efectuó de modo ciego simple. 20 voluntarios (de edad entre 36-52 años) fueron tratados en una zona tratada circunscrita de 1 cm² sobre la espalda de cada voluntario: una para la aplicación de la sustancia ensayo, una para aplicación del placebo, y una para el control (zona no tratada). El ensayo se efectuó mediante una aplicación sencilla (2 mg de sustancia) en el área ensayada (1 cm²) [de acuerdo con la guía Colipa]. Tiempo total: 60 minutos después de la aplicación

La sustancia ensayada fue una emulsión de la siguiente composición: agua, etilhexil palmitato, cetearil alcohol 0.9% de sal de sodio de sulfato de heparano, carbómero, acrilatos/polímero reticulado de acrilato de alquilo c-10-30, hidróxido de sodio, fenoxietanol, propilenglicol, metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, edta disódico.

El placebo fue una emulsión de la siguiente composición: agua, etilhexil palmitato, cetearil alcohol, carbómero, acrilatos/polímero reticulado de acrilato de alquilo c-10-30, hidróxido de sodio, fenoxietanol, propilenglicol, metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, edta disódico.

La reacción eritemagénica transitoria se indujo al exponer a una cantidad conocida de radiación UVB proveniente de un Estimulador Solar. La evaluación (EI - Índice de eritema por el Mexamétro MX 18) se realizó de la siguiente manera:

- o T₀ - valor basal, valor del índice de eritema después de la radiación UVB y antes de la aplicación de la sustancia
- o T₁₅ - valor del índice de eritema después de 15 minutos desde la aplicación de la sustancia
- o T₃₀ - valor del índice de eritema después de 30 minutos desde la aplicación de la sustancia
- o T₆₀ - valor del índice de eritema después de 60 minutos desde la aplicación de la sustancia

Tabla IV

	T ₀ EI ± des est	T ₁₅ EI ± des est	T ₃₀ EI ± des est	T ₆₀ EI ± des est
Sustancia ensayada	455.75 ± 64.63	439.55 ± 82.67	421.59 ± 72.31	406.39 ± 77.06
Placebo	453.21 ± 71.50	430.26 ± 76.22	415.69 ± 67.42	415.79 ± 75.18

Tabla V

	T ₀ vs T ₁₅	T ₀ vs T ₃₀	T ₀ vs T ₆₀
Sustancia ensayada	- 4.19	- 8.29	- 11.24
Placebo	- 5.36	- 8.29	- 8.58

La disminución del EI (índice de eritema) en el área tratada con la sustancia probada, frente al EI de la tratada con placebo, después de 60 minutos de aplicación, resultó ser estadísticamente relevante (p<0.1), y es estadísticamente relevante (p<0.01) Por tanto, se confirmó el efecto paliativo de la sustancia probada (emulsión con 0.9% de sal de sodio de sulfato de heparano).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición dermatológica que comprende sulfato de heparano y uno o más de los siguientes ingredientes: conservantes, emulsionantes, estabilizadores, humectantes, antioxidantes, en donde el sulfato de heparano está presente en una concentración comprendida entre 0.5% en peso y 5% en peso.
- 10 2. Composición dermatológica de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el sulfato de heparano está presente en una concentración comprendida entre 0.5% en peso y 2% en peso.
- 10 3. Composición dermatológica de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el sulfato de heparano está presente en una concentración comprendida entre 0,5% en peso y 1% en peso.
4. Composición de acuerdo con las reivindicaciones 1-3 para uso como un agente paliativo.
- 15 5. Sulfato de heparano para uso como agente paliativo.