



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA NUMERO	102007901560739
Data Deposito	02/10/2007
Data Pubblicazione	02/04/2009

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Titolo

COMPOSIZIONI OFTALMICHE A BASE DI POLISACCARIDE DEL SEME DI TAMARINDO E ACIDO IALURONICO.

DESCRIZIONE

a corredo di una domanda di brevetto per invenzione industriale avente per titolo:

"Composizioni oftalmiche a base di polisaccaride del seme di tamarindo e acido ialuronico"

a nome: RMFA Trading S.A.

Inventore: Antonio DEL PRETE, Marco SANSONI

- - - - -

La presente invenzione riguarda composizioni oftalmiche a base di polisaccaride del seme di tamarindo e acido ialuronico. Più in particolare, l'invenzione concerne soluzioni oftalmiche indicate per l'uso come sostituti lacrimali, contenenti un'associazione di acido ialuronico e di un polisaccaride noto come TSP (*Tamarindus indica* Seed Polysaccharide) i quali, somministrati in miscela tra loro, sono in grado di agire sinergicamente nello stimolare il ritorno alla normalità nella mucosa congiuntivale interessata dalla sindrome dell'occhio secco, inducendo un notevole miglioramento del numero e della morfologia dei microvilli congiuntivali.

Come è noto, la superficie dell'occhio viene mantenuta costantemente umida grazie alla presenza del film lacrimale precorneale, una struttura liquida organizzata che ricopre la congiuntiva e la superficie esposta del globo oculare. È di fondamentale importanza che tale struttura sia quantitativamente e qualitativamente adeguata al fine di ottenere una detersione ed una protezione appropriate. Il film lacrimale, inoltre, contiene sostanze ad alto potere battericida quali lisozima ed anti-

corpi, che proteggono gli occhi dall'attacco di molti antigeni.

In condizioni normali le lacrime, che sono il risultato di una serie di soluzioni escrete da ghiandole differenti nel sacco congiuntivale, vengono stratificate sulla superficie congiuntivale e corneale grazie ai movimenti palpebrali, andando a costituire una complessa struttura a tre strati, comprendente:

- uno strato interno di muco, costituito da una miscela di glicoproteine (mucina) prodotta da cellule specializzate (le goblet cells o cellule caliciformi congiuntivali) presenti negli epiteli congiuntivali; tale strato si adsorbe sulla cornea trasformando l'epitelio corneale in una superficie idrofila: in assenza di mucina le cellule epiteliali sono idrofobe e non potrebbero essere idratate dalle lacrime;
- uno spesso strato intermedio acquoso (secreto dalle ghiandole lacrimali principali ed accessorie) composto essenzialmente da acqua, elettroliti, proteine, enzimi e mucina, che si distribuisce su detta superficie idrofila, le cui funzioni sono fornire ossigeno atmosferico all'epitelio corneale, esercitare un'attività antibatterica e lavare via i detriti;
- un sottile strato esterno lipidico (secreto dalle ghiandole sebacee palpebrali tarsali o di Meibomio) che ha le seguenti funzioni: ritardare l'evaporazione dello strato acquoso sottostante, aumentare la tensione superficiale per stabilizzare il film impedendone la fuoriuscita sulla cute e lubrificare le palpebre.

Il movimento palpebrale spreme il muco prodotto dalle cellule congiuntivali e lo immette nei fornici, e da qui esso viene uniformemen-

te distribuito su tutta la superficie corneale attraverso i movimenti di ammiccamento delle palpebre.

La struttura a tre strati descritta costituisce un complesso sistema fisiologico, le cui funzioni principali sono quelle di proteggere la superficie dell'occhio, di mantenere l'idratazione, la lubrificazione e la trasparenza della superficie corneale e di cooperare nel produrre una visione corretta. Il perfetto equilibrio e il continuo rinnovamento di detto sistema fisiologico è una condizione necessaria perché esso possa assolvere a tali funzioni. Perché l'equilibrio e il rinnovamento citati si verifichino, si deve avere una costante ma non eccessiva evaporazione di acqua dal fluido lacrimale, tale da mantenerne l'osmolarità al valore fisiologico di circa 300 mOsm/l, e il film lacrimale deve essere continuamente ridistribuito sulla superficie corneale per effetto degli ammiccamenti.

Non solo la stratificazione delle diverse componenti è importante, ma anche i soluti presenti in esse. I lipidi dello strato esterno sono organizzati in una doppia fase: una polare, adiacente allo strato intermedio, e una più spessa all'interfaccia con l'aria. La fase acquosa, invece, presenta concentrazioni ioniche fisse: sodio, potassio, calcio, magnesio, zinco, cloro e bicarbonato sono importanti soprattutto per il mantenimento dell'osmolarità delle lacrime.

L'integrità dello strato interno di mucina rappresenta uno dei fattori essenziali nel mantenimento della stabilità del film lacrimale, perché la mucina migliora la bagnabilità della superficie corneale, permette al film acquoso di rimanere aderente alla superficie esposta in modo con-

tinuo ed omogeneo, assicurandone così la stabilità, e aumenta la viscosità del fluido lacrimale, impedendogli di defluire troppo rapidamente dal sacco congiuntivale. Come già notato, quando la mucina è assente o insufficiente la cornea diventa non bagnabile e, per effetto dello squilibrio tra elettroliti e glicoproteine presenti, il film lacrimale diviene instabile e soggetto a rompersi con formazione di zone secche.

Varie situazioni patologiche o anomale dell'occhio si manifestano con discontinuità del film lacrimale, in conseguenza, ad esempio, di una inadeguata velocità di ammiccamento, dell'uso prolungato di lenti a contatto, dell'impiego di alcuni farmaci sistemici o, più frequentemente, di una iposecrezione senile. Più spesso, il deterioramento dell'efficace sistema di lubrificazione e protezione sopra descritto si manifesta nella **“sindrome da occhio secco”**, la cui incidenza è in grande aumento, soprattutto a causa dell'inquinamento atmosferico e della conseguente insorgenza di nuove allergie. In effetti, la sindrome da occhio secco è la patologia più frequente in oftalmologia, con una prevalenza tra il 10 al 15% della popolazione generale. In questo contesto, il termine **“occhio secco”** è comunemente utilizzato per indicare i problemi oculari connessi con la riduzione o l'instabilità del film lacrimale - caratterizzati dal punto di vista soggettivo da un corteo sintomatologico fastidioso comprendente bruciore, senso di corpo estraneo, fotofobia e visione appannata, senso di peso oculare, facile irritazione a vento, fumo e polveri e disturbi visivi - mentre le alterazioni caratteristiche della superficie corneale che si manifestano in questa situazione vengono identificate generalmente con il termine di **“cheratocongiuntivite secca”**.

In tali situazioni si determina una degenerazione delle cellule congiuntivali con aumento della desquamazione, perdita delle micropli-
che della superficie cellulare, rottura della membrana delle cellule epite-
liali e riduzione del numero di cellule caliciformi (goblet cells) produttrici
della mucina. Le cellule epiteliali corneali e congiuntivali appaiono soffe-
renti e con un numero ridotto di microvilli, fino alla loro totale scompa-
sa. La riduzione del numero di microvilli è con buona approssimazione
proporzionale alla severità della malattia e alla gravità della sintomato-
logia, e a questo quadro anatomopatologico si associa, in vario grado,
un'infiltrazione di cellule infiammatorie a livello dei tessuti congiuntivali
(Cennamo G.L., Del Prete A., Forte R., Cafiero G., Del Prete S., Mara-
sco D., Impression cytology with scanning electron microscopy: a new
method in the study of conjunctival microvilli, *Eye* (2007), 1–6).

Oltre a ciò la sindrome da occhio secco, in mancanza dell'ef-
fetto protettivo del film lacrimale, predispone ad altre condizioni patolo-
giche quali cheratocongiuntiviti attiniche, batteriche, virali ed allergiche.

Mentre gli studi sulle patologie umane hanno mostrato tutti i
cambiamenti che avvengono in un occhio secco, lo studio preclinico di
un modello animale di cheratocongiuntivite secca ha aiutato a delineare
la causa naturale di questi cambiamenti (Gilbard J.P., Rossi S.R., Gray
K.L.: A new rabbit model for keratoconjunctivitis sicca, *Invest. Ophthal-
mol. Vis. Sci.* **28**(2):225-228, (1987); Gilbard J.P., Rossi S.R., Gray
K.L., Hanninen L.A.: Natural history of disease in a rabbit model for ke-
ratoconjunctivitis sicca, *Acta Ophthalmol.* (Suppl.) **192**:95-101, (1989).
Si sa ora che l'occhio secco evolve attraverso quattro fasi distinte:

1. perdita di acqua dal film lacrimale con aumento dell'osmolarità del film stesso;
2. diminuzione della densità delle cellule caliciformi e diminuzione del glicogeno corneale (fonte energetica per la cicatrizzazione di eventuali lesioni corneali);
3. aumento della desquamazione corneale (dovuto all'aumento del gradiente osmotico tra il film lacrimale e la superficie oculare, ed alla diminuzione delle cellule caliciformi, che richiamano acqua dalle cellule epiteliali della congiuntiva);
4. destabilizzazione dell'interfaccia cornea-film lacrimale.

Da un punto di vista diagnostico, la sindrome dell'occhio secco può essere rilevata e monitorata non solo con la valutazione dei sintomi che le sono propri, ma anche attraverso procedure consolidate, tra cui le più comuni sono la misura della secrezione lacrimale (**test di Schirmer**), del tempo necessario per la rottura del film lacrimale dopo un ammiccamento completo (**break-up time, BUT**) e la valutazione della **colorazione della superficie corneale** con il rosa bengala o con la fluoresceina. Una descrizione più dettagliata di alcuni di questi metodi diagnostici sarà fornita più avanti, con riferimento alla sperimentazione condotta in relazione all'invenzione.

Un'altra manifestazione ritenuta concordemente un indice di un film lacrimale irregolarmente strutturato è la riduzione del fenomeno di **felcizzazione del muco**. In condizioni normali il muco ha la caratteristica di cristallizzare sotto forma di felci per evaporazione a temperatura ambiente da una soluzione acquosa. Il fenomeno della felcizzazione,

che si ritiene essere il risultato dell'interazione degli elettroliti con le glicoproteine ad alto peso molecolare del muco, si evidenzia dopo qualche minuto dalla raccolta del muco lacrimale dal fornice inferiore della congiuntiva. È accertato che i vari diversi aspetti di tale fenomeno, evidenziati dal test di felcizzazione (**ferning test**) (Tipo I, felcizzazione uniforme; Tipo II, felcizzazione abbondante con felci di dimensioni ridotte e spazi vuoti; Tipo III, felcizzazione presente in modo solo parziale; Tipo IV, felcizzazione assente) sono collegati allo stato normale o patologico del liquido lacrimale. Una fitta arborizzazione, ad esempio, è considerata espressione del perfetto equilibrio tra mucina ed elettroliti, mentre la presenza parziale o l'assenza della felcizzazione della lacrima, che si rileva in occhi con cheratocongiuntivite secca, indica una mancanza quantitativa del muco lacrimale o un'alterazione qualitativa delle glicoproteine o del loro ambiente (pH, idratazione, equilibrio elettrolitico).

La sindrome dell'occhio secco viene normalmente trattata con preparati oftalmici liquidi noti genericamente come "lacrime artificiali", da instillare in gocce allo scopo di sostituire o integrare la produzione lacrimale naturale. Nel caso più semplice tali preparati hanno unicamente un'azione umidificante, essendo costituiti da soluzioni saline fisiologiche, neutre e isotoniche con il fluido lacrimale, a base di solo cloruro di sodio o di miscele bilanciate di vari elettroliti.

Per superare l'inconveniente della ridotta ritenzione nel sacco congiuntivale che è tipica di tali soluzioni saline sono state introdotte formulazioni di lacrime artificiali viscosizzate mediante l'aggiunta di agenti ad elevato peso molecolare, normalmente polimeri idrosolubili di

origine sintetica, semisintetica o naturale. Tuttavia, si è rilevato che perché tali agenti viscosizzanti possano conferire caratteristiche vantaggiose ad una formulazione da utilizzare come lacrima artificiale non basta che essi aumentino genericamente la viscosità del prodotto, ma è necessario che le dispersioni da essi formate abbiano proprietà più simili possibile a quelle delle dispersioni di mucina. Specificamente, dette dispersioni devono comportarsi il più possibile come sostanze mucomimetiche. Ciò richiede, prima di tutto, un comportamento reologico particolare, non-newtoniano (specificamente, pseudoplastico), simile a quello delle lacrime naturali. In effetti, solo alcuni dei prodotti macromolecolari utilizzabili come agenti viscosizzanti per lacrime artificiali sono realmente in grado di mostrare un simile comportamento.

Esempi di formulazioni per lacrime artificiali aventi caratteristiche reologiche non-newtoniane sono quelle contenenti polimeri carbosivinilici del tipo del Carbopol[®], gli esterî della cellulosa come la metilcellulosa e i suoi derivati alcoolici (ad es. idrossipropilcellulosa e idrossipropilmetilcellulosa) e l'acido ialuronico. Quest'ultimo è un polisaccaride di origine naturale presente in molti tessuti e fluidi sia umani che animali, largamente utilizzato in preparati oftalmici in virtù dello spiccato comportamento pseudoplastico delle sue soluzioni acquose e della sua buona capacità di legarsi sia con l'acqua che con la parete cellulare dell'epitelio.

Un polimero polisaccaridico naturale che può essere considerato incluso nella categoria citata è il polisaccaride ottenuto dai semi dell'albero del tamarindo, il *Tamarindus indica*, una pianta sempreverde

che raggiunge i 15 m di altezza e produce frutti a legume, ampiamente diffuso in India, in Africa e in tutto l'Estremo Oriente, dove viene coltivato essenzialmente a scopo alimentare. Il frutto contiene dei grossi semi con una elevata percentuale di polisaccaridi, che hanno la funzione di accumulare e preservare sostanze energetiche vitali.

Il seme del tamarindo, che rappresentava originariamente un sottoprodotto, ha trovato varie utilizzazioni, una volta macinato in modo da ridurlo ad un prodotto farinoso (correntemente indicato come "gomma di tamarindo" o "polvere di nocciolo di tamarindo"). Le più importanti di tali applicazioni sono nell'industria tessile e nell'industria della carta, dove la gomma di tamarindo viene utilizzata rispettivamente come agente di imbozzimatura e di collatura, e nell'industria alimentare, dove serve come addensante, gelificante, stabilizzante e legante in prodotti di ogni tipo, in modo analogo ad altri prodotti polisaccaridici, come gli alginati, le pectine, la gomma guar o la farina di carruba. La gomma di tamarindo grezza, reperibile in commercio come tale, contiene dal 65 al 73% in peso di polisaccaride, dal 15 al 23% di materiale proteico, dal 3 all'8% di oli e grassi e dal 2 al 4% di ceneri, oltre a quantità minori di fibra grezza, tannini ed altre impurità.

Nel campo farmaceutico, la frazione polisaccaridica della gomma di tamarindo (polisaccaride del seme di tamarindo, nel seguito indicato anche come **TSP**) ha trovato una valida applicazione come componente attivo di sostituti lacrimali e veicolo per farmaci oftalmici topici a rilascio protratto, come descritto, in particolare, nel brevetto europeo EP 0892636 (Farmigea) e nel corrispondente brevetto US 6.056.950, il cui

contenuto si intende qui incorporato per riferimento. Tra le proprietà mucomimetiche di cui la frazione polisaccaridica della gomma di tamarindo si è dimostrata in possesso è da ricordare la capacità di "felcizzazione" precedentemente citata. Così, a pari dell'acido ialuronico, tale frazione polisaccaridica è in grado di dare per evaporazione prodotti cristallini di morfologia del tutto analoga a quella del muco lacrimale cristallizzato.

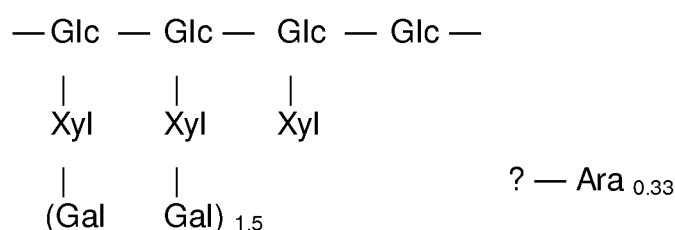
Alla luce di quanto precede, la presente invenzione si è posta lo scopo di mettere a punto un trattamento farmacologico per la terapia della sindrome da occhio secco in cui il sostituto lacrimale non solo sia in grado di rimanere a lungo sulla superficie oculare e di integrarsi con la superficie degli epitelii esercitando un ruolo protettivo su questi ultimi, ma sia anche in grado di favorire il ripristino dell'integrità degli stessi, in particolare di favorire un più rapido ritorno alla normalità della mucosa congiuntivale, soprattutto per quanto riguarda il numero e la morfologia dei microvilli.

Nell'ambito degli studi che hanno condotto all'invenzione si è considerato che sia le soluzioni oftalmiche note a base di TSP che quelle ancora più diffuse a base di acido ialuronico hanno dimostrato poter produrre un miglioramento della sintomatologia dell'occhio secco, miglioramento che a sua volta è alla base del loro successo commerciale nel trattamento di questo disturbo, ma sia le une che le altre hanno prodotto benefici relativamente modesti per quanto riguarda un efficiente e rapido recupero dai danni isto-fisiologici tipici della patologia considerata, in modo particolare per quanto riguarda la struttura

superficiale microscopica dell'epitelio congiuntivale.

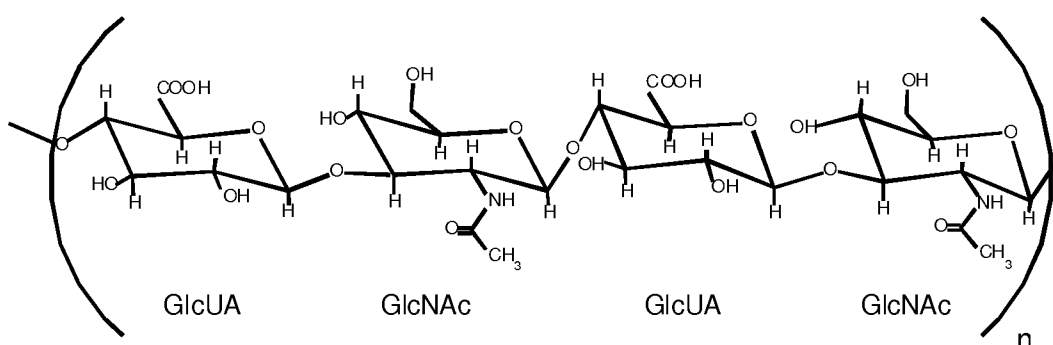
Sulla base delle considerazioni che precedono è stato trovato, secondo la presente invenzione, che la specifica associazione di principi attivi TSP e acido ialuronico, applicata alla superficie oculare in un singolo prodotto oftalmico, assume nuove proprietà terapeutiche, non possedute dai due prodotti singolarmente, particolarmente nel favorire un più rapido ritorno alla normalità della mucosa congiuntivale, soprattutto per quanto riguarda il numero e la morfologia dei microvilli. Il ripristino della normale integrità dei microvilli si associa ad un più duraturo effetto sul miglioramento dei segni e sintomi che si accompagnano alla sindrome da occhio secco.

Secondo numerosi studi condotti sulla struttura della frazione polisaccaridica della gomma di tamarindo, è accertato che il polisaccaride del seme di tamarindo è costituito da una catena principale di unità glucopiranosidiche legate l'una all'altra in posizione (1→4), a cui sono collegate brevi ramificazioni laterali costituite da unità di xilopiranosio legate in posizione (1→6) (xiloglucano). Dette unità di xilopiranosio possono essere singole oppure legate a loro volta a singole unità di galattopiranosio collegate in posizione (1→2). È anche stata riportata l'ulteriore presenza di unità arabinofuranosiliche. Pertanto, la struttura del polisaccaride del seme di tamarindo (**TSP**) può essere rappresentata come segue:



Il processo di estrazione, filtrazione e purificazione del polimero dal materiale grezzo di partenza richiede un'alta specializzazione tecnologica per mantenere inalterate le caratteristiche funzionali, visto anche l'elevato peso molecolare, che nel prodotto correttamente purificato è compreso tra 600.000 e 750.000 Da.

L'acido ialuronico è chimicamente definibile come un glicosamminoglicano non ramificato, costituito da unità alternate di acido D-glucuronico (GlcUA) e N-acetil-D-glucosammina (GlcNAc), la cui struttura può essere rappresentata dalla seguente formula:



dove sono mostrate due unità disaccaridiche successive, e dove il numero **n** di coppie di unità ripetitive è tale che il peso molecolare del polisaccaride è compreso tra 50.000 e diversi milioni di dalton. Il peso molecolare medio dell'acido ialuronico utilizzato in oftalmologia (in forma dal relativo sale sodico) per le soluzioni di lacrime artificiali è normalmente compreso tra 700.000 e 1 milione di Da.

In vivo tutti i gruppi carbossilici dell'acido glucuronico e della N-acetilglucosammina sono completamente ionizzati, conferendo alla molecola di acido ialuronico elevata polarità, e di conseguenza una elevata

solubilità in acqua. Grazie alla buona capacità di legarsi sia con l'acqua sia con la parete cellulare dell'epitelio, è utilizzato come componente principale di molti sostituti lacrimali nella cura della patologia di secchezza oculare.

Nell'ambito degli studi connessi con la presente invenzione, alcuni test di laboratorio basati sull'impiego di tecniche di risonanza magnetica (che saranno descritti più dettagliatamente nel seguito) hanno dimostrato che il TSP è in grado di interagire in soluzione con l'acido ialuronico (**HA**) inducendo variazioni conformazionali che interessano prevalentemente le unità interne di glucosio e galattosio del TSP e i gruppi acetile dell'HA. Ciò agisce sulla capacità della miscela di trattenere acqua che, per certi rapporti di concentrazione, risulta assai maggiore di quanto mostrato dai due polimeri in forma non miscelata.

Poiché la capacità di trattenere acqua è fondamentale ai fini delle caratteristiche di adesività e di biocompatibilità di un polimero da utilizzare per il trattamento dell'occhio secco, le ricerche sulla miscela TSP-HA sono state ulteriormente espanse, conducendo test di preclinica su un modello di occhio secco indotto nel ratto con atropina, per valutare la sicurezza e tollerabilità dell'associazione. Sulla base dei risultati ottenuti sul tale modello (anch'essi riportati in sintesi nel seguito) è possibile affermare che la miscela di TSP e HA non mostra interazioni negative tra i due prodotti, e che favorisce un miglior recupero dai danni isto-fisiologici successivi ad una riduzione acuta della lacrimazione.

Un successivo test clinico condotto a titolo di studio pilota su un numero relativamente ristretto di pazienti (riportato più avanti) ha con-

fermato l'efficacia del trattamento proposto, mettendo in evidenza un notevole effetto sinergico dell'associazione tra TSP e HA.

Forma pertanto oggetto specifico della presente invenzione un preparato oftalmico per l'uso come sostituto lacrimale contenente, in associazione, dallo 0,05 al 2% in peso di polisaccaride del seme di tamarindo e dallo 0,05 all'1% in peso di acido ialuronico in soluzione acquosa.

Con l'espressione "**polisaccaride dal seme di tamarindo**" (*Tamarindus indica* Seed Polysaccharide o TSP, a volte anche genericamente indicato con il termine "**xiloglucano**") come utilizzata nella presente domanda, si intende una frazione arricchita in polisaccaridi ottenibile dalla gomma di tamarindo (o polvere di nocciolo di tamarindo, tamarind kernel powder), quest'ultima essendo il prodotto grezzo normalmente reperibile in commercio. Una frazione polisaccaridica parzialmente purificata della gomma di tamarindo è commercializzata, ad esempio dalla Dainippon Pharmaceutical Co. LTD di Osaka, Giappone, con il nome commerciale di Glyloid®. Ai fini della presente invenzione, comunque, la frazione polisaccaridica in questione viene preferibilmente ulteriormente purificata a dare un polisaccaride del seme di tamarindo praticamente puro.

Con l'espressione "**acido ialuronico**" come utilizzata nella presente domanda, si intende il polisaccaride precedentemente descritto (genericamente indicato anche come "**glicosamminoglicano**"), in particolare nella forma salificata comunemente in uso per la formulazione di lacrime artificiali, il sodio ialuronato.

Preferibilmente, il preparato oftalmico secondo l'invenzione contiene, in associazione in soluzione acquosa, dallo 0,1 all'1% in peso di polisaccaride del seme di tamarindo e dallo 0,1 allo 0,5% in peso di acido ialuronico.

Preferibilmente, le concentrazioni ponderali nel preparato oftalmico secondo l'invenzione sono comprese tra lo 0,1 e l'1% di polisaccaride del seme di tamarindo e tra lo 0,1 e lo 0,5% in peso di acido ialuronico. Una forma di realizzazione che è stata specificamente oggetto di studio nel lavoro sperimentale presentato nel seguito, e che ha fornito prestazioni cliniche superiori per quanto riguarda la capacità dei due agenti attivi di cooperare al ripristino della normalità dell'epitelio congiuntivale, contiene, in soluzione acquosa, lo 0,2% in peso di polisaccaride del seme di tamarindo e lo 0,4% in peso di acido ialuronico.

Preferibilmente, il polisaccaride del seme di tamarindo utilizzato nelle formulazioni dell'invenzione ha peso molecolare compreso tra 450.000 Da e 750.000 Da (preferibilmente 600.000-750.000 Da), e l'acido ialuronico ha peso molecolare compreso tra 600.000 Da e 1.000.000 Da (preferibilmente 700.000-1.000.000 Da).

Nella formulazione per lacrima artificiale secondo l'invenzione dovrebbero essere aggiunti uno o più agenti regolatori della tonicità, che portino la soluzione al giusto valore di osmolarità. A tale scopo si può utilizzare uno qualsiasi dei prodotti convenzionalmente usati nella tecnica come agenti regolatori della tonicità, quali, ad esempio, il cloruro di sodio o di potassio, il mannitolo, il destrosio, l'acido bórico, il sorbitolo o il glicol propilenico.

Altri ingredienti che possono essere aggiunti nella formulazione, in accordo con la tecnica nota, sono acidi o basi con funzioni di correttori di pH, nonché tamponi, come ad esempio il tampone fosfato (sodio fosfato monobasico e sodio fosfato bibasico) o il tampone acetato (sistema acetato - acido acetico). Altri tamponi utilizzabili sono il tampone borato, il tampone citrato, il tampone bicarbonato, il tampone trizma (tri-idrossimetil-amminometano).

La composizione può anche comprendere conservanti e agenti antimicrobici, come cloruro di benzalconio, sodio mertiolato o timerosale, metil-, etil- e propilparaben, clorobutanolo, fenilmercurio nitrato o acetato, alcool feniletilico, clorexidina acetato o gluconato, nonché agenti chelanti come gli edetati o EDTA. A causa di possibili problemi di intolleranza nei confronti dei conservanti, sarebbe preferibile non inserire tali ingredienti nelle formulazioni per l'uso come lacrima artificiale. Ciò è senz'altro possibile quando il prodotto è confezionato in flaconi monodose. In alcuni casi, tuttavia, e in particolare quando il prodotto è confezionato in flaconi multidose, l'aggiunta di conservanti è indispensabile.

In base ad un suo ulteriore aspetto, l'invenzione ha ugualmente ad oggetto l'uso un'associazione di polisaccaride del seme di tamarindo e di acido ialuronico in soluzione acquosa per la produzione di un sostituto lacrimale, ovvero per la produzione di un preparato per il trattamento della sindrome dell'occhio secco.

Come già notato, detto sostituto lacrimale o preparato comprende di preferenza dallo 0,05 al 2% in peso di polisaccaride del seme di tamarindo e dallo 0,05 all'1% in peso di acido ialuronico, e ancora

preferibilmente comprende dallo 0,1 all'1% in peso di polisaccaride del seme di tamarindo e dallo 0,1 allo 0,5% in peso di acido ialuronico.

Il polisaccaride del seme di tamarindo del preparato proposto per gli usi sopra enunciati ha opportunamente un peso molecolare compreso tra 600.000 Da e 750.000 Da, mentre il peso molecolare dell'acido ialuronico è preferibilmente compreso tra 700.000 Da e 1.000.000 Da.

La presente invenzione viene anche descritta nei seguenti esempi non limitativi, con riferimento ad alcune sue forme di realizzazione specifiche, che illustrano esempi di formulazioni a base di xiloglucano e acido ialuronico impiegati come sostituti lacrimali ad attività protettiva e riepitelizzante, secondo quanto accertato sperimentalmente e riportato nel rapporto sperimentale che segue.

ESEMPI DI FORMULAZIONI PER LACRIMA ARTIFICIALE

Esempio 1

Ingredienti	% in peso
TSP	0,1
acido ialuronico	0,1
mannitolo	2,00
acqua deionizzata	q.b. a 100
sodio fosfato monobasico e sodio fosfato bibasico	q.b. per pH 7,0±0,5

Il prodotto viene preparato nel seguente modo:

- in un adatto recipiente di vetro si pesa la quantità di TSP e di HA;
- si aggiunge il 90% dell'acqua disponibile lasciando in blanda agitazione fino a dissoluzione completa del prodotto;

- si aggiunge, sotto agitazione, la quantità indicata di mannitolo e si lascia la miscela sotto agitazione fino a dissoluzione completa del prodotto;
- si aggiunge acqua deionizzata fino al peso finale (100%);
- si aggiungono sodio fosfato monobasico e sodio fosfato bibasico fino al pH desiderato;
- la soluzione così ottenuta viene sterilizzata in autoclave o o alternativamente sterilizzata per filtrazione con filtro da 0,22 micron.

Esempio 2

Ingredienti	% in peso
TSP	0,1
acido ialuronico	0,4
mannitolo	2,00
acqua deionizzata	q.b. a 100
sodio fosfato monobasico e sodio fosfato bibasico	q.b. per pH $7,0 \pm 0,5$

Il prodotto viene preparato operando in modo analogo all'esempio 1.

Esempio 3

Ingredienti	% in peso
TSP	0,2
acido ialuronico	0,1
mannitolo	2,00
acqua deionizzata	q.b. a 100
sodio fosfato monobasico e sodio fosfato bibasico	q.b. per pH $7,0 \pm 0,5$

Il prodotto viene preparato in modo analogo all'esempio 1.

Esempio 4

Ingredienti	% in peso
TSP	0,2
acido ialuronico	0,2
mannitolo	2,00
acqua deionizzata	q.b. a 100
sodio fosfato monobasico e sodio fosfato bibasico	q.b. per pH 7,0±0,5

Il prodotto viene preparato in modo analogo all'esempio 1.

Esempio 5

Ingredienti	% in peso
TSP	0,2
acido ialuronico	0,4
mannitolo	2,00
acqua deionizzata	q.b. a 100
sodio fosfato monobasico e sodio fosfato bibasico	q.b. per pH 7,0±0,5

Il prodotto viene preparato in modo analogo all'esempio 1.

Esempio 6

Ingredienti	% in peso
TSP	0,4
acido ialuronico	0,1
mannitolo	2,00
acqua deionizzata	q.b. a 100
sodio fosfato monobasico e sodio fosfato bibasico	q.b. per pH 7,0±0,5

Il prodotto viene preparato operando in modo analogo all'esempio 1.

Esempio 7

Ingredienti	% in peso
TSP	0,4
acido ialuronico	0,2
mannitolo	2,00
acqua deionizzata	q.b. a 100
sodio fosfato monobasico e sodio fosfato bibasico	q.b. per pH 7,0±0,5

Il prodotto viene preparato in modo analogo all'esempio 1.

Esempio 8

Ingredienti	% in peso
TSP	1,0
acido ialuronico	0,1
mannitolo	2,00
acqua deionizzata	q.b. a 100
sodio fosfato monobasico e sodio fosfato bibasico	q.b. per pH 7,0±0,5

Il prodotto viene preparato in modo analogo all'esempio 1.

Esempio 9

Ingredienti	% in peso
TSP	1,0
acido ialuronico	0,4
mannitolo	2,00
acqua deionizzata	q.b. a 100
sodio fosfato monobasico e sodio fosfato bibasico	q.b. per pH 7,0±0,5

Il prodotto viene preparato in modo analogo all'esempio 1.

Alcuni risultati sperimentali relativi alle caratteristiche delle as-

sociazioni di polisaccaridi secondo l'invenzione e alle prestazioni dei preparati che li contengono sono riportati nel seguito, assieme ad alcuni diagrammi e immagini fotografiche rappresentati nelle figure allegate, in cui:

la **Figura 1** mostra in forma di istogramma i risultati di uno studio pilota sull'efficacia dell'associazione secondo l'invenzione nel trattamento della sindrome da occhio secco, in relazione alla valutazione dei microvilli congiuntivali, in termini di valori assoluti;

la **Figura 2** mostra i risultati, nell'ambito dello stesso studio pilota, della valutazione dei microvilli congiuntivali, in termini di variazione rispetto ai valori basali;

la **Figura 3** mostra un'immagine di SEM 7500x dell'epitelio congiuntivale dell'occhio sinistro di una paziente dello stesso studio pilota, inserita nel gruppo TSP+HA, prima del trattamento;

la **Figura 4** mostra un'immagine di SEM 7500x dell'epitelio congiuntivale dell'occhio sinistro della stessa paziente di Figura 3, dopo 60 gg di trattamento con TSP+HA;

la **Figura 5** mostra in forma di istogramma i risultati dello stesso studio pilota di Figura 1, in relazione alla valutazione degli effetti sulla sintomatologia soggettiva, in termini di valori assoluti;

la **Figura 6** mostra i risultati, nell'ambito dello stesso studio pilota, della valutazione degli effetti sulla sintomatologia soggettiva, in termini di variazione rispetto ai valori basali;

la **Figura 7** mostra in forma di istogramma i risultati dello stesso studio pilota di Figura 1, in relazione alla valutazione degli effetti sulla

sintomatologia oggettiva, in termini di valori assoluti;

la **Figura 8** mostra i risultati, nell'ambito dello stesso studio pilota, della valutazione degli effetti sulla sintomatologia oggettiva, in termini di variazione rispetto ai valori basali;

la **Figura 9** mostra in forma di istogramma i risultati dello stesso studio pilota di Figura 1, in relazione alla valutazione degli effetti sulla citologia, in termini di valori assoluti;

la **Figura 10** mostra i risultati, nell'ambito dello stesso studio pilota, della valutazione degli effetti sulla citologia, in termini di variazione rispetto ai valori basali;

la **Figura 11** mostra in forma di istogramma i risultati dello stesso studio pilota di Figura 1, in relazione al punteggio totale (score composito) delle valutazioni precedenti, in termini di valori assoluti; e

la **Figura 12** mostra i risultati, nell'ambito dello stesso studio pilota, allo score composito delle valutazioni precedenti, in termini di variazione rispetto ai valori basali.

Indagine NMR su miscele di acido ialuronico (HA) e TSP in soluzione acquosa

Gli idrogel polisaccaridici sono dotati di struttura tridimensionale assai intricata, all'interno della quale l'acqua può essere incorporata. Il contenuto di acqua, il tipo di interazione che si instaura tra l'acqua e i materiali polimerici, così come la sua distribuzione all'interno del polimero stesso ne influenzano in modo critico le proprietà meccaniche, la mucoadesività e sono alla base dell'elevato grado di biocompatibilità. Comunemente vengono distinti tre tipi di acqua nei gel polisaccaridici:

acqua legata, acqua intermedia e acqua libera.

La spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) rappresenta una delle tecniche più utili per lo studio della struttura, la mobilità e le proprietà di idratazione dei sistemi polimerici. In particolare, assai utile risulta la misura dei tempi di rilassamento spin-spin (T_2) o spin-reticolo (T_1) dei nuclei protonici dell'acqua. Il tempo di rilassamento T_2 rappresenta la costante di tempo che descrive il decadimento della magnetizzazione trasversa nel tempo, mentre il tempo di rilassamento T_1 descrive il processo di recupero della magnetizzazione longitudinale.

Quando un polisaccaride viene disciolto in acqua, le molecole di acqua formano legami ad idrogeno con esso e, quindi, la loro mobilità risulta ridotta, conducendo ad una diminuzione sia del T_1 sia del T_2 . Comunemente, tuttavia, non si osservano segnali distinti per l'acqua legata e l'acqua libera, ma un unico segnale che rappresenta la media pesata dei contributi derivanti dai due tipi di acqua. Come conseguenza, il parametro NMR misurato (T_1 e/o T_2) rappresenta la media pesata del parametro nello stato libero e legato, secondo l'equazione di seguito rappresentata (equazione 1):

$$\frac{1}{T_{obs}} = X_b \frac{1}{T_b} + X_f \frac{1}{T_f} \quad (1)$$

dove $\frac{1}{T_{obs}}$ descrive la velocità di rilassamento (reciproco del tempo T_1 o T_2) misurata per l'acqua nella soluzione in esame, $\frac{1}{T_b}$ è la velocità di rilassamento dell'acqua legata e $\frac{1}{T_f}$ è la velocità di rilassamento dell'acqua libera, pari a quella misurata in una soluzione priva di materiale po-

limerico. X_b e X_f sono, rispettivamente, le frazioni molari dell'acqua legata e libera.

Il numero di molecole di acqua legata può essere espresso nel modo seguente, come dipendente dalla superficie S del polimero, dallo spessore K dello strato superficiale di acqua legata e dal volume totale V dell'acqua (equazione 2):

$$X_b = K \times \frac{S}{V} \quad (2)$$

All'aumentare della concentrazione del polimero sia il T_1 che il T_2 diminuiscono come conseguenza dell'incremento della superficie del polimero e, quindi, del numero di molecole di acqua legata, a meno di variazioni conformazionali o fenomeni di autoaggregazione dipendenti dalla variazione di concentrazione stessa; tuttavia l'effetto sulla velocità di rilassamento trasversa ($\frac{1}{T_2}$) è assai più pronunciato di quello osservato sulla velocità di rilassamento longitudinale ($\frac{1}{T_1}$).

Su questa base, sono stati condotti i seguenti esperimenti di misura di velocità di rilassamento trasverso ($\frac{1}{T_2}$) dei nuclei protonici dell'acqua nelle seguenti soluzioni:

- a) soluzioni di TSP di concentrazione variabile da 0,1% (w/w) a 1%;
- b) soluzioni di HA di concentrazione variabile da 0,1% (w/w) a 1%;
- c) miscele contenenti concentrazioni variabili di HA e TSP, di concentrazione totale costante pari allo 0,5% ,ottenute mescolando volumi opportuni di soluzioni madre a concentrazione totale 0,5%;
- d) miscele contenenti concentrazioni variabili di HA e TSP, di concentrazione totale costante pari all'1% ,ottenute mescolando vo-

lumi opportuni di soluzioni madre a concentrazione totale 1%.

Allo scopo di ottenere informazioni sulla natura dell'interazione che si instaura tra i due materiali polimerici sono stati inoltre confrontati i parametri spettrali dei due polimeri HA e TSP alle diverse concentrazioni e nelle loro miscele. I parametri spettrali che sono stati presi in considerazione sono i seguenti:

1. chemical shift del ^{23}Na dell'HA;
2. misure di rilassamento spin-reticolo selettivo su protoni anomerici di TSP e su protoni acetilici di HA;
3. misure di rilassamento spin-spin su protoni di HA e TSP;
4. misure DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy) per la determinazione del coefficiente di diffusione dell' H_2O (determinazione di acqua inglobata nel polimero).

Le misure di chemical shift di ^{23}Na e le misure effettuate sul gruppo acetile dell'acido ialuronico hanno lo scopo di stabilire se l'interazione tra i due materiali polimerici coinvolge i gruppi ionizzati polari dell'acido ialuronico o il suo gruppo acetile.

Le misure effettuate sui protoni anomerici hanno lo scopo di stabilire quali tipi di unità del TSP sono prevalentemente coinvolte nell'interazione con HA.

Preparazione dei campioni per le analisi NMR e metodi di misura

Le soluzioni madre sono state preparate disciogliendo in D_2O i polimeri solidi alle concentrazioni desiderate. Sono state preparate due serie di soluzioni, la prima ottenuta dopo agitazione a temperatura ambiente per 12 h e la seconda dopo agitazione per 12 h a temperatura

ambiente e agitazione in riscaldamento a 80 °C per per 60 min circa. Per le due serie di soluzioni sono stati ottenuti risultati completamente sovrapponibili e, quindi, nella discussione che segue non si distinguerà tra di esse.

Gli studi NMR sono stati effettuati su uno spettrometro NMR Varian INOVA 600 14T, operante a 600 MHz per ^1H e 158,6 MHz per ^{23}Na , equipaggiato con un probe 5 mm a tripla risonanza per rivelazione inversa e un probe 5 mm per osservazione diretta a larga banda. Lo spettrometro è dotato di un sistema di controllo della temperatura a $\pm 0,1$ °C.

I tempi di rilassamento protonico selettivi T_1 sono stati ottenuti con la sequenza standard inversion-recovery ($180^\circ\text{-}\tau\text{-}90^\circ\text{-acquisizione}$) per applicazione selettiva di un impulso di inversione alla frequenza desiderata.

I tempi di rilassamento spin-spin T_2 sono stati misurati utilizzando la sequenza Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) ($90^\circ\text{-}\tau\text{-(}180^\circ\text{-}2\tau)_n$).

Le mappe DOSY (Diffusion Ordered SpectroscopY) sono state registrate utilizzando un tempo di rilassamento di 3 s con un numero di transienti pari a 4. Sono stati utilizzati 30 gradienti ed i parametri δ e Δ sono stati ottimizzati (1 ms e 80 ms, rispettivamente) per ottenere un decadimento fino al 10-5% del segnale iniziale.

Misura della velocità di rilassamento spin-spin ($R_2 = \frac{1}{T_2}$) dell'acqua

È stato, innanzitutto, misurato il tempo di rilassamento T_2 dell'acqua in soluzioni contenenti i due polimeri puri a concentrazioni

variabili dallo 0,1% all'1%.

Per il TSP si misurano valori che aumentano da $0,90 \text{ s}^{-1}$ nella soluzione più diluita (0,1% w/w) fino a $3,08 \text{ s}^{-1}$ nella soluzione di concentrazione 1%. L'aumento della velocità di rilassamento spin-spin è in accordo con quanto atteso sulla base dell'aumento della frazione molare di acqua legata, conseguente l'aumento della concentrazione del polimero.

Per l'acido ialuronico puro si osserva un analogo incremento del parametro di rilassamento dell'acqua all'aumentare della concentrazione del polimero e, non solo i valori misurati sono significativamente più bassi rispetto a quanto osservato per il TSP a parità di concentrazione, ma anche la variazione totale è significativamente più bassa. Tenuto conto che i pesi molecolari dei due polimeri sono entrambi assai elevati, la suddetta differenza può ragionevolmente essere correlata alla diversa tendenza all'autoaggregazione dei due polimeri: probabilmente il TSP ha una maggiore tendenza ad autoassociare all'aumentare della concentrazione rispetto ad HA e come conseguenza dei fenomeni di autoaggregazione si ha un incremento della frazione di acqua legata rispetto all'acqua libera.

Sono state quindi misurate le velocità di rilassamento dell'acqua in miscele TSP-HA di concentrazione totale costante e pari allo 0,5% (soluzione c), ma rapporti variabili dei due componenti. I valori misurati sono stati confrontati con quelli ottenuti per i due polimeri puri alla stessa concentrazione della miscela o alla sua concentrazione totale. I risultati ottenuti al variare dei rapporti ponderali tra TSP e HA consento-

no di concludere che per rapporti TSP/HA variabili da 3:2 a 4:1 l'interazione tra i due materiali polimerici diventa fortemente cooperativa, conducendo ad un brusco incremento della frazione molare di acqua legata rispetto a quella caratteristica dei singoli polimeri alla massima concentrazione.

Nelle soluzioni di concentrazione totale pari all'1% (soluzioni d), l'andamento viene riprodotto, ovvero per rapporti TSP/HA compresi tra 6:4 e 8:2, la velocità di rilassamento dell'acqua nella miscela subisce un brusco aumento fino ad un valore che è maggiore di quello misurato per il TSP e per HA sia alla stessa concentrazione in cui esso è presente nella miscela sia alla concentrazione corrispondente al valore totale (1%). Si conferma, pertanto, l'andamento cooperativo dei due polimeri, che sembra essere criticamente dipendente più dal rapporto tra i due polimeri che dalla concentrazione totale

Misura della velocità di rilassamento longitudinale ($R_1 = \frac{1}{T_1}$) del gruppo acetile dell'acido ialuronico

È stata misurata la velocità di rilassamento longitudinale R_1 dei protoni acetile dell'acido ialuronico in miscele a concentrazione totale costante pari a 0,5% e rapporti variabili TSP/HA. Particolarmente interessante si presenta l'andamento delle velocità di rilassamento R_1 del raggruppamento acetile nelle miscele HA/TSP di concentrazione totale 0,5%, nelle quali viene osservata ancora una volta una diminuzione della velocità di rilassamento R_1 all'aumentare della concentrazione di HA, ma con valori assoluti delle velocità di rilassamento ancora più bassi di quelli misurati in assenza del TSP alle stesse concentrazioni. L'entità

della diminuzione prodotta nella velocità di rilassamento del gruppo acetile come conseguenza della presenza del TSP diventa assai elevata a rapporti variabili da 3:2 a 4:1, intervallo all'interno del quale è confermato il notevole effetto sinergico dei due polimeri.

Anche la velocità di rilassamento spin-spin R_2 dei protoni acetilici segue lo stesso andamento, sia nel polimero puro sia nella sua miscela con il TSP, ovvero all'aumentare della concentrazione di HA si ha una diminuzione del parametro di rilassamento, ma le velocità di rilassamento nella miscela sono più basse e la diminuzione in miscela rispetto al componente puro aumenta per alti rapporti TSP/HA.

Misura di velocità di rilassamento spin-spin R_2 di selezionati protoni del TSP in presenza e in assenza di acido ialuronico alla concentrazione totale di 0,5%

Nello spettro delle miscele i protoni anomerici del TSP a 5,06 ppm, 4,85 ppm e 4,45 ppm risultano non sovrapposti a segnali dell'acido ialuronico e, come tali, sono stati presi come base allo scopo di ottenere informazioni sui protoni del TSP coinvolti nell'interazione con HA.

In particolare, il protone a 4,45 ppm corrispondente alle unità di Glucosio e Galattosio si comporta in modo nettamente diverso rispetto agli altri protoni. Infatti il suo valore è scarsamente dipendente dalla concentrazione della soluzione nel componente puro, mentre varia in modo assai significativo in presenza di HA e in particolare, a differenza degli altri protoni, subisce una significativa diminuzione all'aumentare del contenuto di HA. Tale andamento non può che essere attribuito alle variazioni conformazionali indotte nel TSP come conseguenza

dell'interazione con HA.

Conclusioni

I risultati delle indagini NMR sopra sintetizzati mostrano chiaramente che l'interazione tra TSP e HA diventa cooperativa in dipendenza dal rapporto in peso tra i due polimeri. Tale interazione conduce a variazioni conformazionali che interessano prevalentemente le unità interne di glucosio e galattosio del TSP e i gruppi acetile dell'HA. Non sembrano essere influenzati invece i gruppi carbossilato dell'HA stesso che, probabilmente, essendo presenti in forma ionica tendono sempre a disporsi affacciati alla fase acquosa piuttosto che al TSP con cui HA interagisce. Quest'ultima conclusione è supportata dallo scarso effetto sul chemical shift del sodio conseguente le variazioni di concentrazione totale e del rapporto tra i due polimeri.

Assai importante è l'effetto dell'interazione sulla capacità dei due polimeri di legare l'acqua: questo è più marcato nelle miscele rispetto ai polimeri puri. Gli studi effettuati hanno chiaramente dimostrato che esiste un intervallo di rapporti TSP/HA compreso fra 3:2 e 4:1, all'interno del quale la capacità delle miscele di inglobare acqua diventa assai elevata. Tale proprietà risulta fondamentale ai fini delle caratteristiche di adesività e biocompatibilità della miscela polimerica risultante.

Valutazione dell'efficacia di miscele di HA e TSP in modello animale, in confronto a preparati in commercio come lacrime artificiali

Uno dei presupposti per l'applicazione delle lacrime artificiali è una normale condizione del film lacrimale. Gli occhi presentano sempre più spesso problemi di lacrimazione anche dovuti all'impiego dei video-

terminali, a causa dell'inquinamento atmosferico, dell'alimentazione e delle allergie ambientali che incidono sulla qualità e quantità della lacrimazione e di conseguenza sulla possibilità di applicazione di lenti a contatto. È bene ricordare, a questo proposito, che un'alterazione del film lacrimale porta inevitabilmente a un definitivo rifiuto della terapia con lacrime artificiali.

Data l'assunzione prolungata di un prodotto ad uso topico quale le lacrime artificiali, è di particolare importanza poter disporre di test atti a garantire l'assenza di gravi effetti secondari, quali l'opacizzazione della lente ed una sofferenza retinica.

Nella prima sezione della sperimentazione preclinica condotta sono stati valutati l'efficacia e i possibili effetti collaterali del prodotto proposto secondo l'invenzione in confronto a cinque altri prodotti già in commercio su modello animale sano; la seconda parte, invece, si avvale di un opportuno modello patologico per approfondire quali siano gli effettivi vantaggi apportati dalla cura con lacrime artificiali.

Test di lacrimazione

Il **test di Schirmer I** prevede l'introduzione di una striscia di carta bibula, di misura e materiali standard, nel fornice congiuntivale inferiore, verso il canto esterno. La striscia viene lasciata *in situ* per un tempo predeterminato (3 min) e dopo tale tempo si misura la parte bagnata, escludendo la porzione ripiegata. Il tempo impiegato dal fluido lacrimale a salire e la lunghezza in mm della porzione di carta impregnata dalle lacrime forniscono la misura della secrezione lacrimale.

Nella pratica quotidiana è possibile eseguire il test per un tem-

po di 1 min. e moltiplicare per 3 il valore ottenuto. Si confronta poi il valore risultato - meno inficiato dalla lacrimazione riflessa - con i valori impostati da Schirmer. Una porzione bagnata inferiore ai 5 mm (in 5 minuti) è considerata patologica.

La **valutazione del pH**, che si effettua utilizzando apposite cartine di tornasole, è un test importante come rivelatore nelle variazioni patologiche dell'epitelio. Il pH delle lacrime ha valori normali che, nell'uomo, oscillano tra 6,8 e 7,4, mentre nel ratto il range si sposta verso valori più alti (tra 7 e 8). Nel caso di stati patologici, però, il fluido lacrimale diventa basico.

Il **Ferning test** è stato descritto nelle sue linee generali nella sezione introduttiva.

L'**esame corneale** comprende la **marcatura con fluoresceina** sodica, dopo la quale la superficie corneale viene esaminata al microscopio a fluorescenza. Una marcatura a macchie rivela la presenza di zone secche sulla superficie oculare, sintomo di essiccamento corneale. La **marcatura con Lissamine Green**, invece, consente di rivelare la presenza di zone ulcerate o necrotiche sulla superficie oculare.

Esecuzione della sperimentazione

La sperimentazione prevedeva l'allestimento dei seguenti gruppi sperimentali, ciascuno composto da 3 ratti albini (= 6 occhi).

1. gruppo di controllo
2. associazione secondo l'invenzione (0,4% acido ialuronico + 0,2% TSP): (**TSP+HA**)
3. miscela di glicoli ed idrossipropil-guar (Systane flacone multidose,

Alcon): (**Gomma Guar**)

4. acido ialuronico 0,15% (Blu Yal monodose, Sooft): (**HA 0,15%**)
5. acido ialuronico 0,4% (Dropstar monodose, Farmigea): (**HA 0,4%**)
6. galattoxiloglucano (TSP 0,2% monodose, Farmigea): (**TSP 0,2%**)
7. carbossimetilcellulosa sodica 0,5% (Celluvisc monodose, Allergan): (**CMC 0,5%**)
8. acido ialuronico 0,2% (Hyalistil 0,2%, Sifi): (**HA 0,2%**)

Fase 1

Durante la prima fase sperimentale è stata valutata la bontà dei prodotti su un modello di animali sani, trattati con le rispettive soluzioni per 3 volte al giorno per 5 giorni. Sono stati eseguiti i test con le seguenti modalità.

Il **test di Schirmer I** è stato effettuato dopo 2, 3, 4, e 5 giorni, previa somministrazione di atropina, su entrambi gli occhi di tutti gli animali, mantenendo per 3 min le strisce di carta bibula nel terzo esterno del fornice congiuntivale. La **misura del pH** è stata effettuata al giorno 0 e al giorno 5 utilizzando le apposite cartine tornasole. Il **Ferning test** è stato effettuato su prelievi di film lacrimale degli animali trattati con le diverse formulazioni al giorno 5, mescolando 10 µl di ciascuna formulazione con 2 µl di lacrime artificiali. La miscela è stata esaminata al microscopio, a temperatura ambiente ($20\pm 1^{\circ}\text{C}$). Per quanto riguarda l'**esame corneale**, è stato eseguito dopo 3, 4 e 5 giorni, previa somministrazione di atropina. Dopo la marcatura con fluoresceina e con Lissamine Green, la superficie corneale è stata osservata utilizzando una lampada con appositi filtri.

L'esecuzione dello Schirmer test non ha evidenziato differenze quantitative nel volume lacrimale successivamente al trattamento degli animali con l'associazione dell'invenzione e con le altre soluzioni già disponibili in commercio. Anche la valutazione del pH lacrimale non ha evidenziato variazioni patologiche né per il prodotto secondo l'invenzione né per alcuna delle altre sostanze in esame. Neanche l'esame corneale dopo marcatura con fluoresceina e con Lissamine Green ha evidenziato alterazioni patologiche della cornea successivamente al trattamento con il prodotto secondo l'invenzione, analogamente a quanto osservato per le altre sostanze già disponibili in commercio. I test di felpizzazione hanno prodotto immagini delle lacrime cristallizzate che non mostrano differenze significative tra i vari trattamenti a confronto.

I test della Fase 1 hanno pertanto evidenziato l'assenza di interazioni negative tra l'associazione proposta e l'assetto fisiologico della congiuntiva-cornea, al pari delle altre formulazioni di lacrima artificiale già in commercio.

Fase 2

In questa fase sperimentale sono stati valutati diversi possibili modelli animali, ed è stato messo a punto un modello di occhio secco nel ratto albino che prevede l'utilizzo di tre cicli di 2,5 h così composti:

T0 (0 min): Iniezione intraperitoneale di atropina 4 mg/kg ed applicazione topica di atropina 1%

T1 (40 min): Anestesia con cloralio idrato 8,5% ed esposizione ad un flusso continuo e costante di aria secca per 1 h

T2 (100 min): Fine del flusso d'aria

T3 (130 min): Atropina 1% topica

T4 (150 min): Fine ciclo

Gli animali trattati con le lacrime in studio hanno ricevuto una applicazione topica delle formulazioni dopo 30 min dal T0 e al T2.

La valutazione del **test di Schirmer** evidenzia una iperlacrimazione a termine dei tre cicli, come risposta soprattutto a carattere infiammatorio-essudativo. Se pure non è possibile rilevare differenze significative a causa dell'alta variabilità registrata tra gli animali, risulta evidente un ridotto trend a carico dell'associazione (TSP+HA) secondo l'invenzione e di TSP 0.5%, indice di una miglior protezione agli stimoli lesivi. La valutazione del **pH lacrimale** non ha evidenziato variazioni patologiche dopo i tre cicli per nessun gruppo sperimentale.

Per quanto riguarda il **Ferning test**, pur non essendo state rilevate dalle immagini significative differenze tra i gruppi analizzati, è possibile affermare la presenza di proprietà protettive in alcuni prodotti, tra cui l'associazione dell'invenzione, nei confronti del gruppo di controllo. Il risultato del **test corneale** con fluoresceina e Lissamine Green, valutato come percentuale della superficie corneale interessata dalla lesione ulcerosa o necrotica, ha evidenziato una protezione simile delle varie formulazioni nei confronti del danno indotto dall'esecuzione dei tre cicli sopra descritti.

In conclusione, i test sopra riportati utilizzati hanno evidenziato non solo l'assenza di interazioni negative tra l'associazione secondo l'invenzione e l'assetto fisiologico della congiuntiva-cornea (Fase 1), ma anche un miglior recupero dai danni isto-fisiologici successivi ad una ri-

duzione acuta della lacrimazione, e consentono di stabilire che l'associazione proposta presenta le caratteristiche adatte per un valido utilizzo come lacrima artificiale e nel trattamento della sindrome da occhio secco.

Studio clinico pilota sull'efficacia di miscele di una combinazione di TSP 0,2% e HA 0,4% nel trattamento della sindrome da occhio secco

Per valutare l'efficacia di una combinazione di TSP e HA del trattamento della sindrome da occhio secco è stato eseguito un test clinico preliminare su ventuno (21) soggetti di ambo i sessi (42 occhi). L'assenza di infezioni oculari, l'assenza di qualsiasi patologia oculare diversa dalla sindrome da occhio secco (ad eccezione dei disturbi della rifrazione) ed in non utilizzo di lenti a contatto erano tra i criteri di inclusione.

Il test consisteva in uno studio randomizzato in aperto, controllato su tre gruppi paralleli, con valutazione in cieco, senza fase di wash out, in cui i prodotti somministrati come lacrima artificiale erano i seguenti:

- Gruppo in studio: Miscela in pari proporzioni ponderali di TSP soluzione oftalmica (TSP 0,2%) e HA soluzione oftalmica (HA 0,4%), in seguito indicata come "**TSP+HA**";
- 1° gruppo di controllo: TSP soluzione oftalmica 0,2% (TSP, Farmigea), in seguito indicata "**TSP**";
- 2° gruppo di controllo: HA soluzione oftalmica 0,4% (Dropstar, Farmigea). in seguito indicata "**HA**".

Al momento della randomizzazione i pazienti sono stati istruiti dal medico oculista a provvedere alla auto-instillazione, due gocce due volte al giorno, direttamente nel sacco congiuntivale, di ciascuno dei tre prodotti a confronto sopra indicati.

Come **end-point primario** del test è stata fissata la variazione del punteggio (score) tra inizio e fine trattamento del numero dei microvilli congiuntivali. Come **end-point secondari** sono stati fissati la variazione degli score della sintomatologia soggettiva, della sintomatologia oggettiva, del pattern citologico congiuntivale (scraping), dello score composito (definito più avanti) e della tollerabilità e sicurezza.

Le valutazioni della sintomatologia soggettiva, della sintomatologia oggettiva e della tollerabilità e sicurezza sono state eseguite in aperto, mentre quelle della citologia congiuntivale e dei microvilli sono state eseguite in cieco, da un osservatore ignaro del trattamento associato a ciascun reperto.

La durata totale del trattamento è stata di 60 giorni ($\pm$ 8 giorni) per tutti e tre i gruppi di pazienti.

Valutazioni

Valutazione dei microvilli - Gli effetti del trattamento sui microvilli sono stati valutati con microscopia elettronica a scansione (SEM). Per ciascun occhio esaminato sono stati identificati punti di repere utilizzando la trama vascolare, allo scopo di effettuare i prelievi basale e finale sulla stessa area. Un campione di epitelio è stato prelevato, separatamente per ciascun occhio, dalla congiuntiva bulbare supero-temporale utilizzando la tecnica della "impression cytology".

Il prelievo è stato effettuato tra un minimo di 48 ore ed un massimo di 7 giorni dopo l'esame oftalmoscopico. Nella stessa seduta in cui è stato prelevato il campione per lo studio dei microvilli era stato eseguito, alcuni minuti prima, uno scraping congiuntivale per la valutazione citologica.

I campioni sono stati quindi trattati e fissati per una visione con SEM e misurati attraverso una scala a 4 punti (da 1 a 4).

Sintomatologia soggettiva - È stato il primo dei parametri valutati nel corso di ciascuna visita (basale o finale), quando il paziente veniva invitato a riferire il grado soggettivo di fastidio provato nell'ultima settimana per i seguenti sintomi oculari: prurito, bruciore, irritazione, lacrimazione. In base alle indicazioni fornite direttamente dal paziente, il medico sperimentatore convertiva l'intensità complessiva del disagio oculare su una scala analogica a 4 punti (da 1 a 4), in cui il grado 1 rappresentava l'assenza di sintomi, il grado 2 sintomatologia lieve, il grado 3 sintomatologia moderata e il grado 4 coincideva con la sintomatologia più severa.

Sintomatologia oggettiva - La sofferenza epiteliale e l'eventuale estensione delle lesioni cherato-congiuntivali è stata determinata dopo quella oggettiva. Essa è stata valutata dall'oculista, dopo la determinazione della sintomatologia soggettiva, con lampada a fessura e fluoresceina e misurata mediante scala analogica a 4 punti (da 1 a 4) in base ai seguenti criteri: grado 1, sofferenza assente o limitata ad un solo quadrante; grado 2, sofferenza epiteliale limitata a due quadranti; grado 3, sofferenza epiteliale che interessa due quadranti in modo net-

to con segni di sofferenza a carico degli altri quadranti; grado 4, sofferenza epiteliale estesa a tutta la superficie oculare.

Citologia congiuntivale - La componente cellulare infiammatoria è stata prelevata, mediante scraping e senza anestetico dalla congiuntiva, fissata con soluzione di May-Grunwald (eosinato di blu di metilene) proveniente dal commercio.

Lo scraping è stato effettuato tra 2 e 7 giorni dopo l'esame oftalmoscopico, nella stessa seduta in cui era previsto il prelievo del campione per lo studio dei microvilli.

Il vetrino è stato colorato in laboratorio ed osservato al microscopio ottico. La valutazione è stata effettuata in cieco in base ad una scala a 4 punti: 1 = solo cellule epiteliali e/o linfociti (+); 2 = linfociti (+), neutrofili (+); 3 = linfociti (++), neutrofili (++); 4 = linfociti (++), neutrofili (++) e/o eosinofili (+).

Score composito - Rappresenta la sommatoria dei quattro parametri sopra descritti ed è stato valutato come indice surrogato di efficacia globale.

Sicurezza e tollerabilità - La sicurezza e la tollerabilità dei prodotti oggetto dello studio sono state determinate con domande dirette poste dal medico oculista al paziente.

Effetti sui microvilli

Come notato, gli effetti del trattamento sui microvilli fotografati con microscopia a scansione sono stati determinati valutando con una scala a 4 punti. Prima della randomizzazione, i tre gruppi si presentavano piuttosto omogenei, con il gruppo "TSP" avente uno score medio

di 3,0 ed i gruppi “TSP+HA” e “HA” con uno score medio di 3,3. Anche la dispersione dei dati appariva moderata, con un coefficiente di variazione di 26% vs 22% vs 22%, rispettivamente per TSP, TSP+HA, HA.

TABELLA 1
Microvilli – Confronto pre-post sulle medie

	TSP		TSP+HA		HA	
	Basale	Giorno 60	Basale	Giorno 60	Basale	Giorno 60
N	14	14	14	14	14	14
Min	2	1	2	1	2	2
Max	4	4	4	3	4	4
Media	3,0	2,7	3,3	1,4	3,3	3,0
Dev.St.	0,8	0,9	0,7	0,6	0,7	0,8
Coeff.Var.	0,26	0,34	0,22	0,45	0,22	0,26
p (Wilcoxon)	0,602		<0,0001		0,219	

Come illustrato nella Tabella 1 e negli istogrammi delle **Figure 1 e 2**, dopo 60 giorni di trattamento nel gruppo TSP si è osservato un lieve miglioramento nel numero dei microvilli congiuntivali (-0,3 punti), pari al -9,5% rispetto al valore basale (NS al test di Wilcoxon). Simile è stato l’andamento nel gruppo trattato con HA dove, dopo 60 giorni, si è osservato un miglioramento medio di 0,3 punti, pari al -8,7% rispetto al valore basale (NS al test di Wilcoxon).

Nel gruppo trattato con TSP+HA, invece, si è osservato un miglioramento medio oltre 5 volte maggiore, con uno score che si è mosso verso la normalità di 1,9 punti, pari ad un miglioramento percentuale del 56,5% rispetto al valore basale ($p < 0,0001$ al test di Wilcoxon).

Come è mostrato nella seguente Tabella 2, diversamente da quanto è avvenuto per gli occhi trattati con solo TSP o con solo HA, tutti

i 14 occhi trattati con TSP+HA sono andati incontro, dopo 60 giorni, ad un miglioramento dello score (da 1 a 3 punti).

TABELLA 2

	TSP 0,2%		TSP 0,2% / HA 0,4%		HA 0,4%	
3	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
2	1	7,1%	0	0,0%	0	0,0%
1	2	14,3%	0	0,0%	1	7,1%
0	5	35,7%	0	0,0%	8	57,1%
-1	4	28,6%	6	42,9%	5	35,7%
-2	2	14,3%	4	28,6%	0	0,0%
-3	0	0,0%	4	28,6%	0	0,0%

Per l'analisi statistica si è applicato il test di significatività di Kruskal-Wallis sui valori assoluti delle differenze tra le osservazioni basali e finali. Nonostante la numerosità del campione esaminato fosse relativamente ridotta, l'analisi ha evidenziato una differenza statisticamente altamente significativa tra i gruppi di trattamento ($p < 0,0001$).

Le **Figure 3** e **4** allegate mostrano, al microscopio elettronico a scansione, l'evoluzione della presenza dei microvilli sull'epitelio congiuntivale in una paziente di 64 anni trattata per 60 giorni con TSP+HA. La **Figura 3** consente di apprezzare una superficie epiteliale glabra a causa della pressoché totale assenza di microvilli; in base ai criteri descritti precedentemente a questo quadro istologico di superficie era stato assegnato lo score di 4 (massima compromissione della presenza dei microvilli). Nella stessa paziente e nella stessa zona della congiuntiva dello stesso occhio, la **Figura 4** documenta una ricca vegetazione di microvilli, che consentono di assegnare a questo quadro lo score di 1,

sostanzialmente tipico di una condizione normale.

Come indicato nella Tabella 2, nel gruppo trattato con TSP+HA, 4 occhi (28,6%), in 3 soggetti, hanno avuto un miglioramento dello score dei microvilli pari a 3, mentre altrettanti hanno avuto un miglioramento dello score pari a 2 punti. Sei occhi (42,9%) hanno avuto un miglioramento nello score pari ad un solo punto.

Effetti sulla sintomatologia soggettiva

L'intensità della sintomatologia soggettiva è stata determinata mediante scala analogica a 4 punti sotto forma di intensità del fastidio oculare, come descritto sopra. Al basale i tre gruppi si presentavano relativamente omogenei, sia come valori assoluti degli score (mediamente con uno scarto massimo di 0,3 punti), sia come dispersione dei valori misurata sotto forma di coefficiente di variazione (33% vs 12% vs 29%, rispettivamente per TSP, TSP+HA e HA).

TABELLA 3

Sintomatologia soggettiva – Confronto pre-post sulle medie

	TSP		TSP+HA		HA	
	Basale	Giorno 60	Basale	Giorno 60	Basale	Giorno 60
N	14	14	14	14	14	14
Min	1	1	2	1	1	2
Max	4	4	3	4	4	4
Media	2,6	2,6	2,9	1,9	2,8	2,6
Dev.St.	0,9	0,9	0,4	1,1	0,8	0,6
Coeff.Var.	0,33	0,33	0,13	0,59	0,29	0,25
p (Wilcoxon)	1,000		0,014		0,375	

Dopo 60 giorni di trattamento, come è illustrato negli istogrammi

delle **Figure 5 e 6**, nel gruppo TSP non si è osservata alcuna variazione della sintomatologia soggettiva, con uno score che è rimasto fisso a 2,6, mentre nel gruppo trattato con HA si è avuto un lieve miglioramento, non statisticamente significativo, pari a -0,2 punti dello score medio (-7,7%).

Sensibilmente più evidente, e statisticamente significativo al test di Wilcoxon, è stato invece il miglioramento nel gruppo trattato con TSP+HA il cui score medio si è ridotto di 1,0 punti, pari al 35,0% rispetto al valore basale.

Come è mostrato nella seguente Tabella 4, solo due dei 14 occhi trattati con TSP+HA hanno avuto un peggioramento dello score della sintomatologia soggettiva e uno è rimasto invariato, mentre per 6 e 5 occhi si sono registrati miglioramenti, rispettivamente, di 1 e di 2 punti.

TABELLA 4

	TSP 0,2%		TSP 0,2% / HA 0,4%		HA 0,4%	
3	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
2	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
1	3	21,4%	2	14,3%	1	7,1%
0	8	57,1%	1	7,1%	9	64,3%
-1	3	21,4%	6	42,9%	4	28,6%
-2	0	0,0%	5	35,7%	0	0,0%
-3	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%

L'analisi statistica è stata effettuata applicando il test di Kruskal-Wallis a valori assoluti delle differenze tra le osservazioni basali e finali ed ha evidenziato una diversità statisticamente significativa tra i tre gruppi ($p=0,005$).

Effetti sulla sintomatologia oggettiva

La sintomatologia oggettiva è stata misurata mediante scala a 4 punti valutando il grado di interessamento dei 4 settori corneo-congiuntivali mediante lampada a fessura, secondo quanto descritto sopra. Al basale i tre gruppi si presentavano un lieve grado di disomogeneità, non statisticamente significativa, con il gruppo TSP+HA assestato su uno score medio di 2,8, più grave di 0,3 punti quello del gruppo TSP e di 0,1 punti di quello HA. La dispersione dei dati risulta relativamente elevata per tutti e tre i gruppi, con un coefficiente di variazione di 41% vs 29% vs 34%, rispettivamente per TSP, TSP+HA, HA.

TABELLA 5

Sintomatologia oggettiva – Confronto pre-post sulle medie

	TSP		TSP+HA		HA	
	Basale	Giorno 60	Basale	Giorno 60	Basale	Giorno 60
N	14	14	14	14	14	14
Min	1	1	1	1	1	1
Max	4	4	4	3	4	4
Media	2,5	2,2	2,8	1,9	2,7	2,6
Dev.St.	1,0	1,0	0,8	0,8	0,9	0,8
Coeff.Var.	0,41	0,44	0,29	0,41	0,34	0,29
p (Wilcoxon)	0,125		0,006		0,347	

Come è meglio illustrato negli istogrammi delle **Figure 7 e 8**, oltre che nella Tabella 5, dopo 60 giorni di trattamento nel gruppo TSP si è osservato un lieve miglioramento della sintomatologia oggettiva (-0,3 punti), pari al 11,4% rispetto al valore basale: Più lieve il progresso nel gruppo trattato con HA che, dopo 60 giorni, ha mostrato una riduzione

dello score medio pari a -0,1 punti (-5,3%). In entrambi i casi le differenze non erano statisticamente significative al test di Wilcoxon.

Nel gruppo trattato con TSP+HA, invece, al termine dei 60 giorni di trattamento si è osservato, con 1,9, lo score medio più basso, nonostante si partisse da valori basali lievemente più elevati. Ciò equivale ad un miglioramento di -0,9 punti, statisticamente significativo, che rappresenta una variazione del 33,3% rispetto al valore basale

Come è mostrato nella seguente Tabella 6, dei 14 occhi trattati con TSP+HA, solo uno ha avuto un peggioramento dello score della sintomatologia oggettiva, uno è rimasto invariato, mentre 12 hanno avuto un miglioramento.

TABELLA 6

	TSP 0,2%		TSP 0,2% / HA 0,4%		HA 0,4%	
3	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
2	0	0,0%	0	0,0%	1	7,1%
1	0	0,0%	1	7,1%	0	0,0%
0	10	71,4%	1	7,1%	9	64,3%
-1	4	28,6%	10	71,4%	4	28,6%
-2	0	0,0%	2	14,3%	0	0,0%
-3	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%

Per l'analisi statistica si è applicato il test di Kruskal-Wallis sui valori assoluti delle differenze tra le osservazioni basali e finali. Per quanto riguarda la sintomatologia oggettiva è possibile concludere che le differenze osservate nei tre gruppi di pazienti sono statisticamente significative ($p=0,02$).

Effetti sulla citologia

La presenza di cellule infiammatorie è stata valutata attraverso una scala a 4 punti, secondo quanto già descritto sopra. Al basale, dopo prima della randomizzazione, i tre gruppi si presentavano molto disomogenei, anche se non in modo statisticamente significativo. Infatti, nel gruppo HA, il meno grave, si aveva uno score medio di 1,9, nel gruppo TSP di 2,1 e nel gruppo TSP+HA, il più grave, si aveva uno score medio di 2,7, con uno scarto tra i due estremi di 0,9. Anche la dispersione dei dati appariva sensibile con un coefficiente di variazione di 44% vs 37% vs 55%, rispettivamente per TSP, TSP+HA, HA.

TABELLA 7

Citologia – Confronto pre-post sulle medie

	TSP		TSP+HA		HA	
	Basale	Giorno 60	Basale	Giorno 60	Basale	Giorno 60
N	14	14	14	14	14	14
Min	1	1	1	1	1	1
Max	4	3	4	3	4	3
Media	2,1	2,3	2,7	1,9	1,9	2,0
Dev.St.	0,9	0,9	1,0	0,8	1,0	0,6
Coeff.Var.	0,44	0,40	0,37	0,43	0,55	0,28
P (Wilcoxon)	0,688		0,094		1,000	

La Tabella 7 e le **Figure 9 e 10** allegate mostrano che, dopo 60 giorni di trattamento sia nel gruppo TSP che nel gruppo HA si è osservato un lieve peggioramento del profilo citologico. Al contrario, nel gruppo trattato con TSP+HA si è osservato un marcato miglioramento del profilo citologico, anche se non statisticamente significativo, che passava da uno score medio di 2,7 ad uno di 1,9, con un miglioramento per-

percentuale del 28,9% rispetto al valore basale.

Come è mostrato nella seguente Tabella 8, dei 14 occhi trattati con TSP+HA, 7 occhi sono andati incontro, dopo 60 giorni, ad un miglioramento dello score, mentre 6 sono rimasti inalterati e uno è peggiorato.

TABELLA 8

	TSP 0,2%		TSP 0,2% / HA 0,4%		HA 0,4%	
3	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
2	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
1	4	28,6%	1	7,1%	5	35,7%
0	8	57,1%	6	42,9%	6	42,9%
-1	2	14,3%	4	28,6%	3	21,4%
-2	0	0,0%	1	7,1%	0	0,0%
-3	0	0,0%	2	14,3%	0	0,0%

Analogamente agli altri parametri, per l'analisi statistica si è applicato il test di significatività di Kruskal-Wallis sui valori assoluti delle differenze tra le osservazioni basali e finali. Da questa analisi è emersa una differenza statisticamente significativa tra i gruppi ($p=0,031$).

Score composito

Come notato, lo score composito rappresenta la sommatoria dei quattro parametri precedentemente descritti (microvilli, sintomatologia soggettiva, sintomatologia oggettiva, citologia) ed è un indice surrogato di efficacia globale. Il suo valore massimo teorico è di 16. Nonostante la fonte di possibile sbilanciamento tra i gruppi dovuta soprattutto alla citologia, dopo la randomizzazione, al basale, i due gruppi si presentavano abbastanza omogenei, come risulta dalla seguente Tabella.

TABELLA 9

Score totale – Confronto pre-post sulle medie

	TSP		TSP+HA		HA	
	Basale	Giorno 60	Basale	Giorno 60	Basale	Giorno 60
N	14	14	14	14	14	14
Min	6	4	8	4	5	6
Max	16	13	14	11	15	14
Media	10,2	9,8	11,6	7,1	10,6	10,1
Dev.St.	2,8	2,8	2,0	2,3	2,7	2,2
Coeff.Var.	0,27	0,29	0,17	0,32	0,26	0,21
P (Wilcoxon)	0,555		<0,0001		0,197	

Dopo 60 giorni di trattamento, come è mostrato nelle **Figure 11** e **12**, nel gruppo TSP non si sono osservate sostanziali variazioni verso il basale. Analogο è stato il comportamento del gruppo trattato con HA dove, dopo 60 giorni, si è avuto un miglioramento di 0,5 punti, pari al -4,7% rispetto al valore basale (NS).

Circa 10 volte maggiore e statisticamente altamente significativo è stato invece il miglioramento osservato nel gruppo trattato con TSP+HA con -4,5 punti, pari al 39,3% rispetto al valore basale, che al test di Wilcoxon risultava altamente significativo.

Anche per lo score composito, per l'analisi statistica si è applicato il test di Kruskal-Wallis sui valori assoluti delle differenze tra le osservazioni basali e finali che sono risultate altamente significative ($p<0,0001$).

Sicurezza e tollerabilità.

Per nessuno dei trattamenti utilizzati nello studio pilota descritto

sono stati segnalati problemi legati alla tollerabilità oppure alla sicurezza locale o sistemica, fatta eccezione per sporadiche segnalazioni di una transitoria visione offuscata associata all'instillazione dei prodotti e che tendeva a risolversi nel giro di alcuni minuti. Tali effetti, noti anche per altri sostituti lacrimali, non hanno mostrato differenze nei tre gruppi.

Conclusioni

In base ai risultati dello studio, è possibile concludere che esistono sufficienti evidenze cliniche, supportate da valutazioni effettuate con la microscopia elettronica a scansione, in base alle quali l'associazione di TSP e acido ialuronico nello stesso prodotto oftalmico produce un effetto sinergico con risultati non ottenibili con i due prodotti somministrati singolarmente.

Tali evidenze microscopiche indicano infatti come alla base di tale effetto sinergico vi sia un rapido miglioramento delle condizioni dell'epitelio congiuntivale che, esposto all'HA e al TSP in associazione, si manifesta con una rigenerazione dei microvilli. A loro volta gli effetti sull'epitelio congiuntivale si traducono in un miglioramento dei sintomi soggettivi e oggettivi che caratterizzano la sindrome da occhio secco.

La presente invenzione è stata descritta con riferimento ad alcune sue forme di realizzazione specifiche, ma è da intendersi che variazioni o modifiche potranno essere ad essa apportate dagli esperti nel ramo senza per questo uscire dal relativo ambito di protezione.

RIVENDICAZIONI

1. Preparato oftalmico per l'uso come sostituto lacrimale contenente, in associazione, dallo 0,05 al 2% in peso di polisaccaride del seme di tamarindo e dallo 0,05 all'1% in peso di acido ialuronico in soluzione acquosa.

2. Preparato oftalmico secondo la rivendicazione 1, comprendente dallo 0,1 all'1% in peso di polisaccaride del seme di tamarindo e dallo 0,1 allo 0,5% in peso di acido ialuronico.

3. Preparato oftalmico secondo le rivendicazioni 1 o 2, in cui detto polisaccaride del seme di tamarindo ha peso molecolare compreso tra 450.000 Da e 750.000 Da.

4. Preparato oftalmico secondo ognuna delle rivendicazioni 1-3, in cui detto acido ialuronico ha peso molecolare compreso tra 600.000 Da e 1.000.000 Da.

5. Preparato oftalmico secondo la rivendicazione 1, contenente in soluzione acquosa lo 0,2% in peso di polisaccaride del seme di tamarindo e lo 0,4% in peso di acido ialuronico.

6. Preparato oftalmico secondo ognuna delle rivendicazioni 1-5, contenente inoltre uno o più agenti regolatori della tonicità.

7. Preparato oftalmico secondo ognuna delle rivendicazioni 1-6, contenente inoltre uno o più acidi o basi oftalmicamente accettabili, come correttori di pH.

8. Preparato oftalmico secondo ognuna delle rivendicazioni 1-7, contenente inoltre uno o più tamponi.

9. Preparato oftalmico secondo ognuna delle rivendicazioni 1-8,

contenente inoltre uno o più agenti conservanti.

10. Preparato oftalmico secondo ognuna delle rivendicazioni 1-9, contenente inoltre uno o più agenti chelanti.

11. Uso di un'associazione di polisaccaride del seme di tamarindo e di acido ialuronico in soluzione acquosa per la produzione di un sostituto lacrimale.

12. Uso di un'associazione di polisaccaride del seme di tamarindo e di acido ialuronico in soluzione acquosa per la produzione di un preparato per il trattamento della sindrome dell'occhio secco.

13. Uso secondo le rivendicazione 11 o 12, in cui detto preparato comprende dallo 0,05 al 2% in peso di polisaccaride del seme di tamarindo e dallo 0,05 all'1% in peso di acido ialuronico.

14. Uso secondo la rivendicazione 13, in cui detto preparato comprende dallo 0,1 all'1% in peso di polisaccaride del seme di tamarindo e dallo 0,1 allo 0,5% in peso di acido ialuronico.

15. Uso secondo ognuna delle rivendicazioni 11-14, in cui detto polisaccaride del seme di tamarindo ha peso molecolare compreso tra 450.000 Da e 750.000 Da.

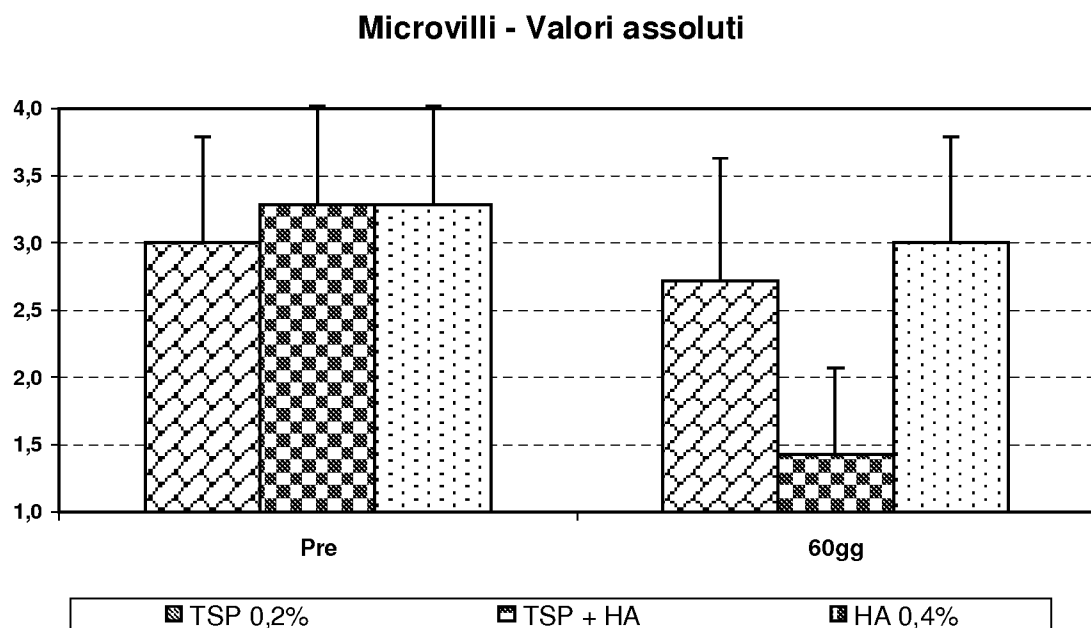
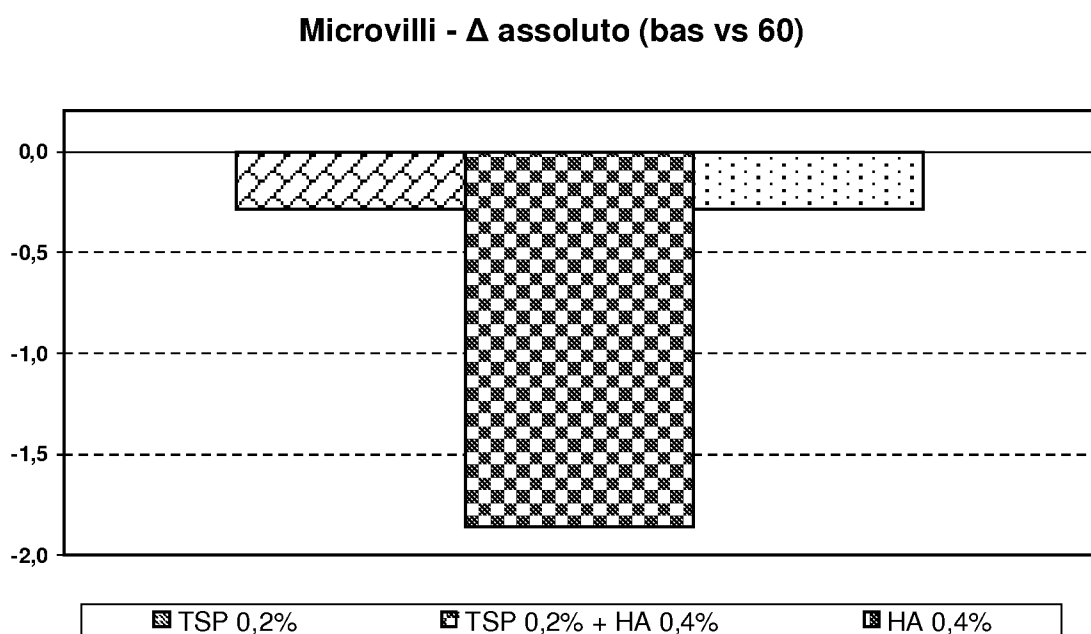
16. Uso secondo ognuna delle rivendicazioni 11-15, in cui detto acido ialuronico ha peso molecolare compreso tra 600.000 Da e 1.000.000 Da.

Roma, 2 Ottobre 2007

p.p.: RMFA Trading S.A.

BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

MB

**FIG. 1****FIG. 2**

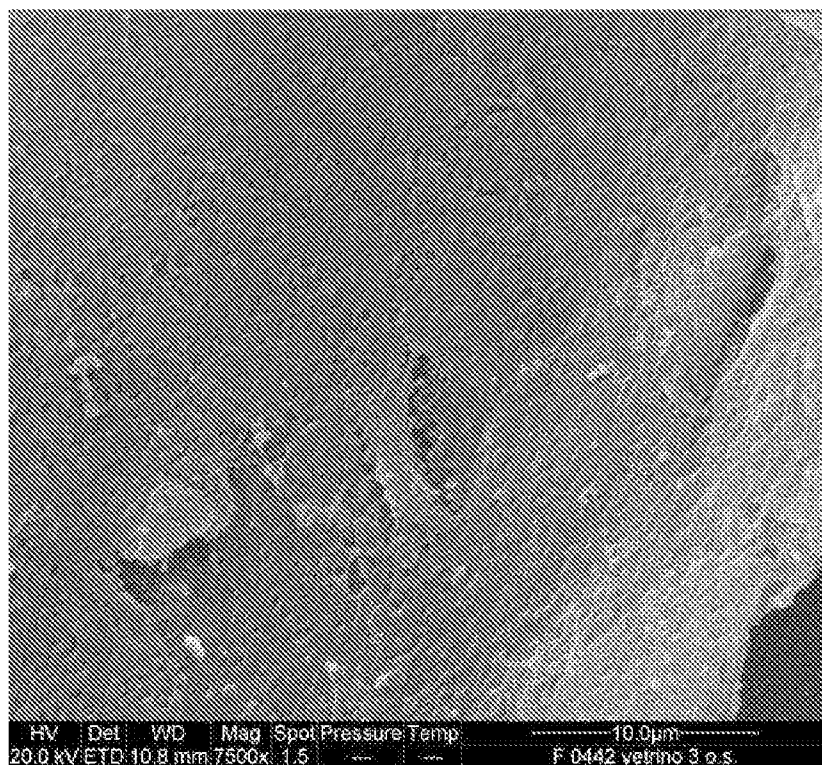


FIG. 3

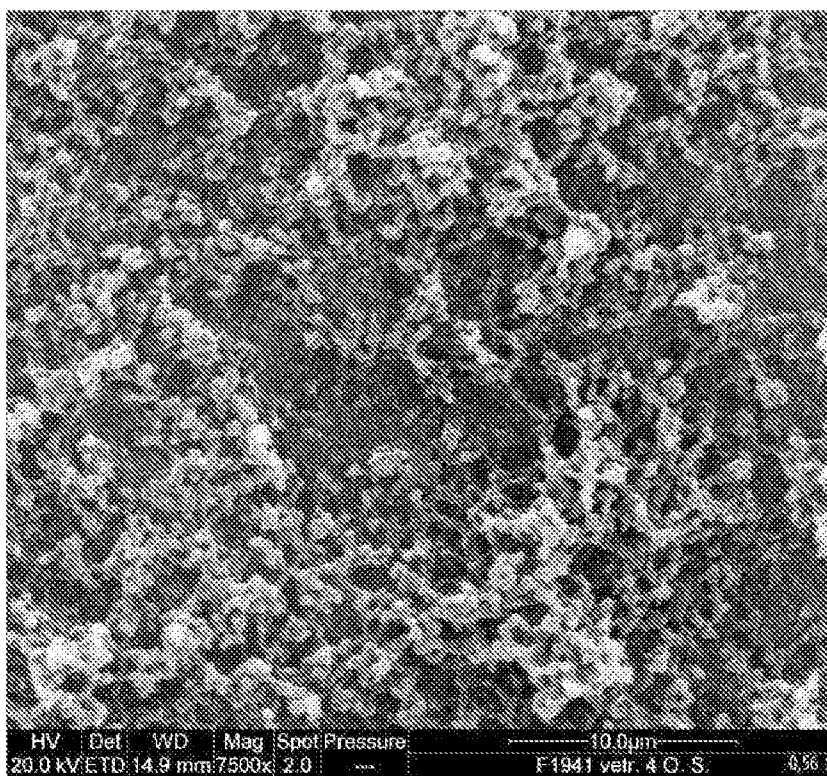
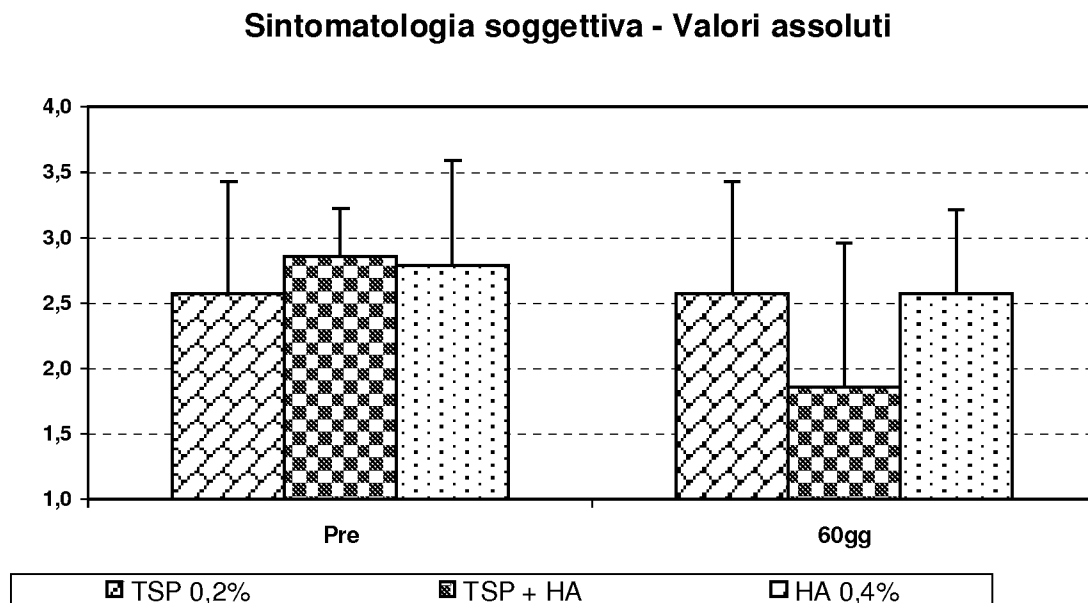
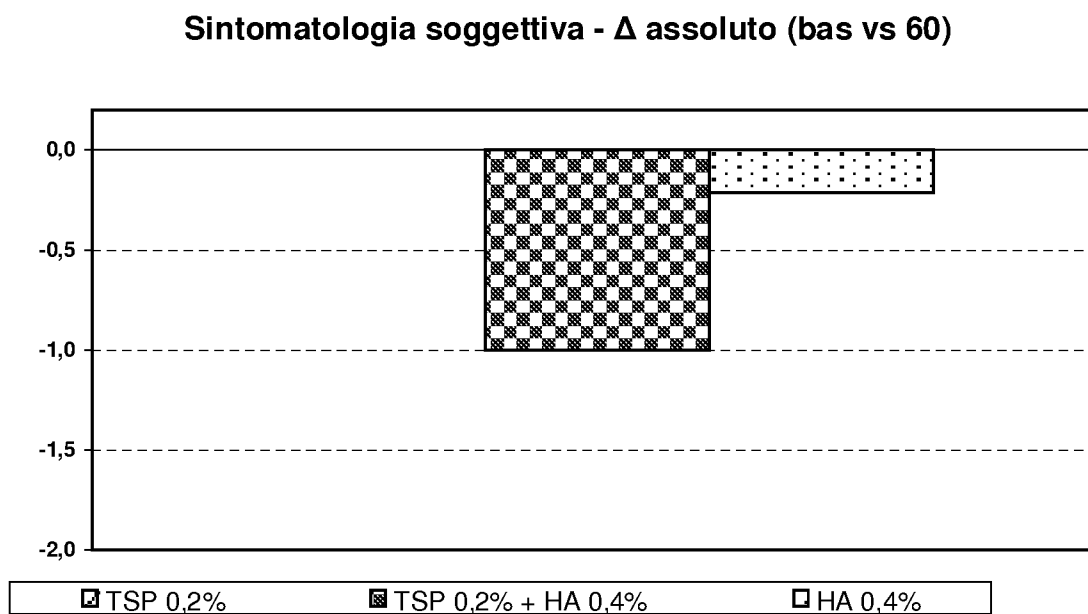
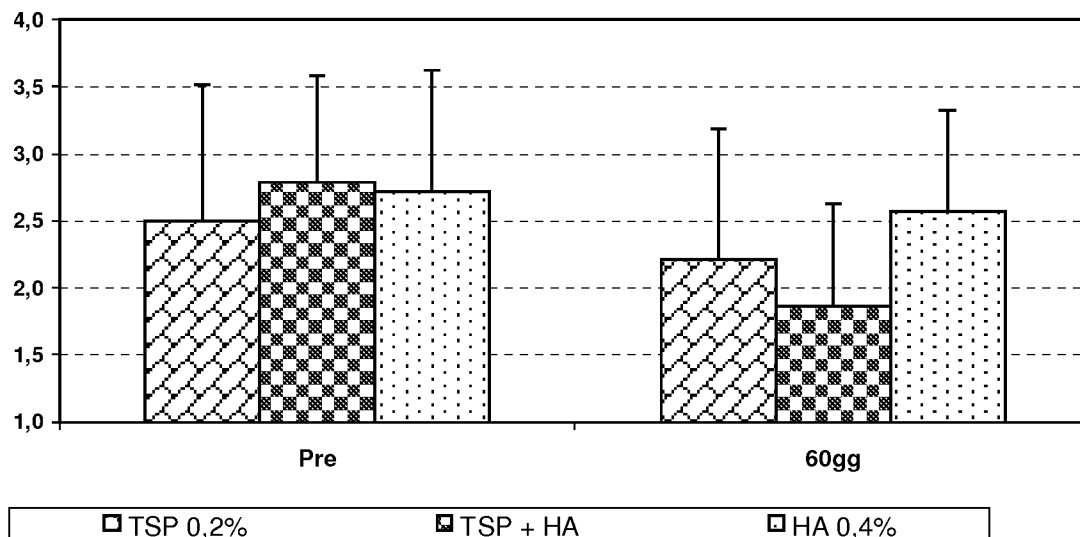
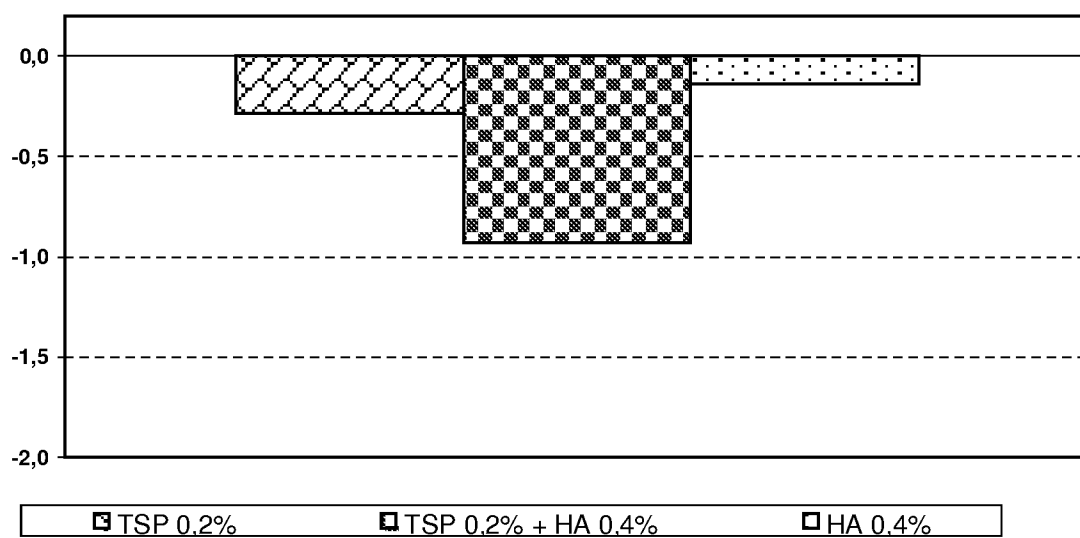


FIG. 4

**FIG. 5****FIG. 6**

Sintomatologia oggettiva - Valori assoluti**FIG. 7****Sintomatologia oggettiva - Δ assoluto (bas vs 60)****FIG. 8**

Citologia - Valori assoluti

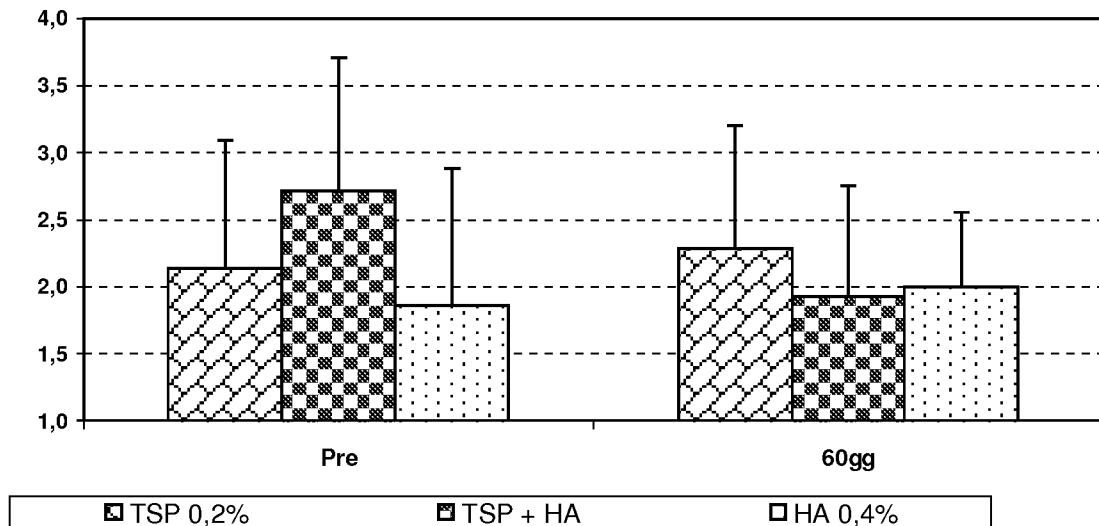


FIG. 9

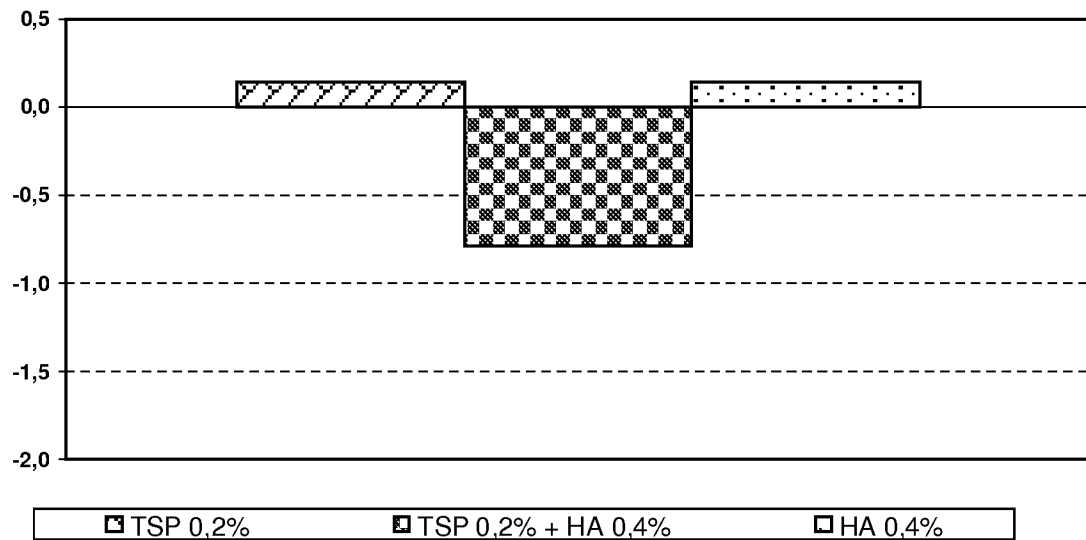
Citologia - Δ assoluto (bas vs 60)

FIG. 10

Score totale - Valori assoluti

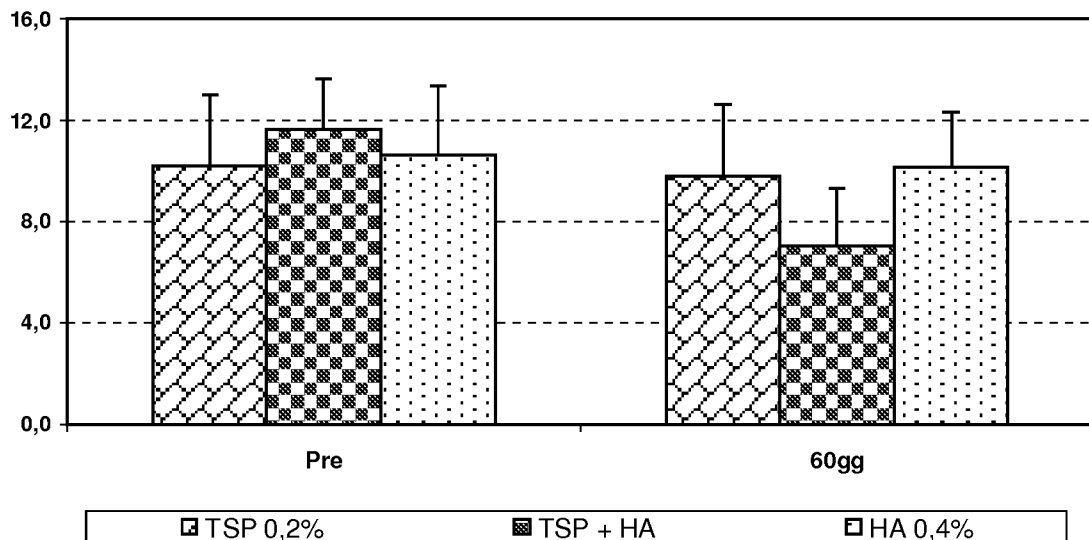


FIG. 11

Score totale - Variazioni assolute

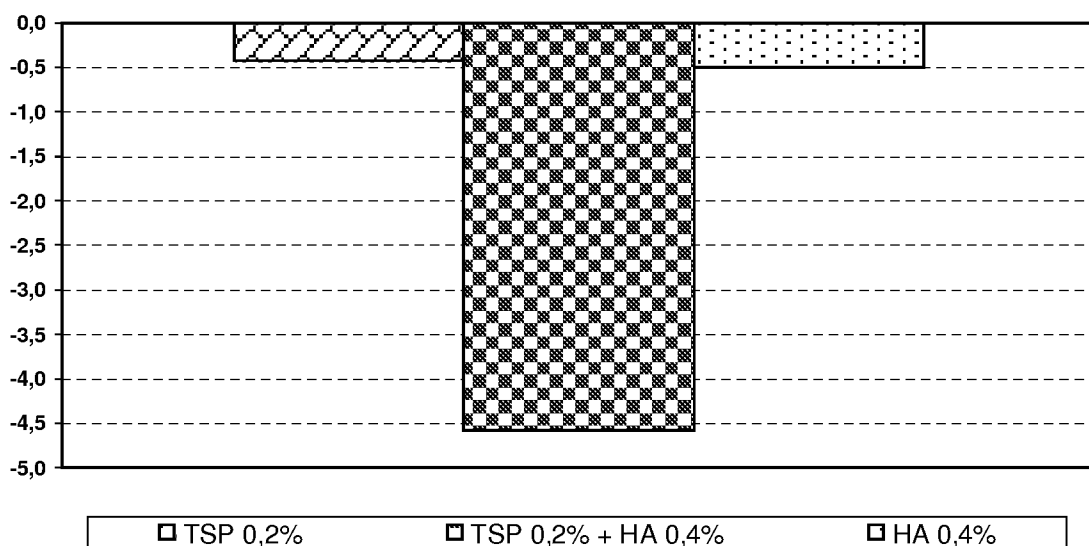


FIG. 12