

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102012902086364A1

Publication Date

20140325

Applicant

BETA PHARMA S.A.

Title

CONIUGATO TRA FRAMMENTO DI PARETE CELLULARE BATTERICA ED
UN VEICOLO MUCOPOLISACCARIDICO E SUOI USI IN AMBITO MEDICO

Domanda di brevetto per invenzione industriale dal titolo:

“Coniugato tra frammento di parete cellulare batterica ed un veicolo mucopolisaccaridico e suoi usi in ambito medico.”

CAMPO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione concerne un coniugato tra frammento di parete cellulare batterica ed un veicolo mucopolisaccaridico e suoi usi in ambito medico.

La presente invenzione origina nel settore dei prodotti ad uso medico in particolare destinati all'applicazione topica.

STATO DELLA TECNICA

I sistemi naturali di difesa del corpo umano proteggono l'organismo dalle aggressioni dall'ambiente esterno.

Notoriamente la prima barriera alle aggressioni esterne quali quelle di tipo microbico, tossico o ambientale, incontrano infatti un primo ostacolo nella pelle che agisce come una barriera fisica.

Quando questa barriera viene superata, come nei casi di infezioni batteriche o virali particolarmente virulente oppure quando siamo in presenza di una lesione dell'epidermide, intervengono in soccorso gli agenti dell'immunità naturale non specifica che costituiscono la prima linea di difesa immunitaria, collocata a livello sottocutaneo-sottomucoso. Questi agenti sono rappresentati principalmente dai macrofagi e da alcuni fattori sanguigni, quali i componenti del sistema immunitario. I macrofagi, cellule polinucleate, hanno per funzione quella di ingerire e uccidere l'aggressore, solitamente costituito da batteri, funghi e virus.

Il più delle volte questa prima linea di difesa è in grado di eliminare l'agente aggressore, tuttavia quando questo agente è troppo virulento viene attivata la seconda linea di difesa, l'immunità adattiva specifica, sia di tipo umorale a mediazione anticorpale, che cellulo-mediata, la quale mette in circolo cellule citotossiche.

L'induzione dell'immunità specifica è il risultato del “processo” attuato dai macrofagi sugli antigeni degli aggressori e la presentazione di determinanti antigeni alle cellule coinvolte nelle risposte umorali o cellulo-mediate.

Nell'epidermide i macrofagi sono rappresentati dalle cellule di Langerhans e cheratinociti in grado di "processare" gli antigeni, inoltre queste cellule rilasciano citochine che attraggono linfociti verso il sito di aggressione con lo sviluppo di una reazione infiammatoria di difesa.

Tuttavia, se lo status immunitario dell'organismo è compromesso, a causa ad esempio di protracti trattamenti antibiotici, infezioni, forme tumorali in atto oppure se l'agente aggressore è particolarmente virulento, i macrofagi non sono più in grado di opporsi all'aggressione e si instaurerà uno stato di malattia.

Il macrofago non può, in condizioni di normale funzionalità, assicurare la sua funzione quando l'agente invasore è rappresentato da una popolazione di microrganismi troppo numerosa, o quando si tratta di un microrganismo a sviluppo intracellulare quale ad esempio un batterio (*L. Monocytogenes*), un fungo (*C. Albicans*), o un virus come il virus erpetico; i quali, tra l'altro, svolgono anche un'azione di immunosoppressione.

Per ripristinare le funzionalità del macrofago quando è debilitato, o potenziare le sue attività quando è coinvolto in una aggressione particolarmente severa, si può ricorrere alla somministrazione di sostanze chiamate immunomodulatori. Generalmente si tratta di microrganismi inattivati che sono in grado di stimolare il sistema immunitario, come ad esempio, *Myc. Tuberculosis* e i suoi derivati che hanno trovato impiego come componenti dell'adiuvante di Freund, nella preparazione di vaccini parenterali ed altri prodotti che stimolando il sistema reticolo-endoteliale rafforzando le difese immunitarie.

L'alterazione del sistema immunodifensivo costituisce uno degli aspetti più rilevanti coinvolti nelle patologie cutaneo-mucose quali, ad esempio, malattie infettive, infiammatorie, allergiche, vascolari, in cui sono coinvolti una molteplicità di meccanismi.

Allo stato attuale si sente l'esigenza di disporre di preparati ad azione immunostimolanti che applicati per via locale attivino una risposta immunocorpale in risposta alle infezioni di diversa origine come quelle batteriche, virali, fungine.

Uno degli scopi generali della presente invenzione consiste nel fornire un prodotto che applicato per via topica superi gli strati esterni dell'epidermide pervenendo

negli strati più profondi in cui può promuovere una adeguata risposta dell'immunità naturale aspecifica e/o anche dell'immunità adattiva specifica.

SOMMARIO

Gli inventori della presente hanno individuato, in accordo ad un aspetto dell'invenzione, la possibilità di attivare e/o promuovere alcuni meccanismi endogeni aspecifici della difesa immunitaria applicando per via locale un prodotto in cui frazioni di parete cellulari di un batterio sono coniugati con specifici carrier che consentono di attraversare la barriera epidermica e pervenire nelle zone in cui sono localizzate le cellule immunocompetenti.

In vista degli scopi precedentemente esposti, la presente invenzione concerne, in un primo aspetto, un coniugato tra un frammento di parete cellulare di un batterio che appartiene al genere *Corynebacterium* ed un veicolo fisiologicamente accettabile in cui detto veicolo comprende un mucopolisaccaride o una frazione mucopolisaccaridica.

Secondo alcune forme di realizzazioni preferite dell'invenzione il frammento di parete cellulare proviene da *Corynebacterium granulosum*.

In accordo ad un secondo aspetto la presente invenzione concerne un coniugato tra un frammento di parete cellulare di un batterio appartenente al genere *Corynebacterium* ed un veicolo fisiologicamente accettabile comprendente un mucopolisaccaride o una frazione mucopolisaccaridica per l'uso come medicamento.

In accordo ad un terzo aspetto la presente invenzione riguarda un coniugato tra un frammento di parete cellulare di un batterio appartenente al genere *Corynebacterium* ed un veicolo fisiologicamente accettabile comprendente un mucopolisaccaride o una frazione mucopolisaccaridica per l'uso topico nel trattamento di infezioni batteriche, virali o fungine.

In accordo ad un quarto aspetto la presente invenzione riguarda un coniugato tra un frammento di parete cellulare di un batterio appartenente al genere *Corynebacterium* ed un veicolo fisiologicamente accettabile comprendente un mucopolisaccaride o una frazione mucopolisaccaridica per l'uso topico nel trattamento di affezioni o patologie dermatologiche.

In accordo ad un quinto aspetto la presente invenzione riguarda un coniugato tra un frammento di parete cellulare di un batterio appartenente al genere *Corynebacterium* ed un veicolo fisiologicamente accettabile comprendente un mucopolisaccaride o una frazione mucopolisaccaridica per l'uso topico nel trattamento di malattie o affezioni della pelle su base allergica.

In accordo ad un sesto aspetto la presente invenzione riguarda una composizione farmaceutica comprendente un coniugato di un frammento di parete cellulare di un batterio appartenente al genere *Corynebacterium* ed un veicolo fisiologicamente accettabile comprendente un mucopolisaccaride o una frazione mucopolisaccaridica ed un eccipiente farmaceuticamente accettabile.

In accordo ad alcune forme di realizzazione la composizione dell'invenzione è idonea all'applicazione topica.

In accordo ad un ulteriore aspetto la presente invenzione concerne un coniugato tra un frammento di parete cellulare di un batterio che appartiene al genere *Corynebacterium*, in particolare *Corynebacterium granulosum* (P40), ed un veicolo fisiologicamente accettabile a base di collagene ed i suoi usi in campo medico, con particolare riferimento alle applicazioni descritte qui di seguito.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

La richiedente ha trovato, in accordo a certi aspetti dell'invenzione, che coniugando un frammento o lisato di parete cellulare di un batterio appartenente al genere *Corynebacterium* con un mucopolisaccaride o una frazione mucopolisaccaridica è possibile veicolare il lisato batterico negli strati profondi della pelle e prolungare il contatto con questi strati in maniera da stimolare l'attività macrofagica delle cellule del Langherans e dei cheratinociti e le risposte dell'immunità aspecifica e dell'immunità adattiva specifica.

In accordo ad un primo aspetto la presente invenzione fornisce un coniugato di un frammento di parete cellulare di un batterio che appartiene al genere *Corynebacterium* con un veicolo fisiologicamente accettabile a base di un mucopolisaccaride o una frazione mucopolisaccaridica.

In accordo ad alcune forme di realizzazione, il batterio che appartiene al genere *Corynebacterium* è *Corynebacterium granulosum*.

Nell'ambito dell'invenzione con il termine di frammento di parete cellulare si intende una porzione della parete cellulare di un batterio o di un lisato di batterio. Un idoneo frammento di parete cellulare di batterio può essere ottenuto da un lisato di batterio appartenente al genere *Corynebacterium*, in particolare della specie *Corynebacterium granulosum*.

Con il termine di P40 si intende designare i frammenti o frazioni particellari di parete di *Corynebacterium granulosum*.

In certe forme di realizzazione il frammento di parete cellulare di batterio presente nel coniugato dell'invenzione è delipidata, ovvero è stata trattata in maniera da rimuovere o ridurre considerevolmente la componente lipidica della parete cellulare del batterio mediante tecniche microbiologiche.

Tipicamente il batterio, in particolare *Corynebacterium granulosum*, viene delipidato prima della sua lisi per produrre i frammenti di parete cellulare, come nel caso della frazione P40.

Tipicamente, i frammenti delipidati di parete cellulare comprendono glucidi e catene peptidiche, tipicamente legati tra di loro in glucopeptidi che formano una rete a maglie strette. Tipici glucidi della parete cellulare comprendono l'acido N-acetil-muramico e la N-acetil-glucosamina.

In accordo ad alcune forme di realizzazione il frammento di parete cellulare di *Corynebacterium granulosum* è denominata P40 ed è ottenuta secondo il metodo descritto nella pubblicazione a nome B. Bizzini, B. Maro e P. Lallouette: Isolement et caractérisation d'une fraction, dite fraction P40 à partir de *Corynebacterium granulosum*. Med. et Mal.infect;, 1978,408-414.

Si è osservato che i frammenti o lisati da pareti da *C. granulosum* stimolano l'attività macrofagica delle cellule di Langerhans e dei cheratinociti che sono coinvolte nelle risposte dell'immunità naturale aspecifica e secondariamente in quelle dell'immunità adattiva specifica.

Un vantaggio dell'impiego di frammenti o lisati da pareti da *C. granulosum* (P40) è rappresentato dall'assenza di assorbimento quando il coniugato viene somministrato per via topica; in questa maniera si limitano considerevolmente i rischi d'insorgenza di effetti collaterali indesiderati o di tossicità sistemica.

Il frammenti di parete cellulare P40 si è dimostrato in grado di sviluppare una vasta serie di effetti farmacologici quali, ad esempio:

- l'inibizione dello sviluppo del tumore L1210 nel topo (E.H. Relyveld, b. Bizzini, R. Ophir e S. Ben-Efraim; Synergy between low-dose chemotherapy and immunotherapy in mouse 1210leukemia. *Cancer Treatment Report*, 1987,71, 241-246), effetti adiuvanti (E.Henocq, J.C. Bazin,B. Bizzini e J. Reynier: *Adjuvant P40 et réactions cutanées à l'antigène. Med.Mal. infect.* ,1978,8, 415_421), effetti immunomodulatori (B. Bizzini, E. Henocq, J. Reynier e E.H. Relyveld : Experimental and clinical results with the *Corynebacterium granulosum*-derived immunomodulator P40. *Asian Pacific J. Allergy ANG immunol.* , 984, 2, 144-155). Effetti sulla fagocitosi (L. Jacques, B. Bizzini e D. Mathieu : Variation des activités complémentaires et phagocytaires chez les rats brûlés. *Effet d'une immunostimulation par *Corynebacterium granulosum*. Med. Mal. Infect.* 1978,8,515-518), e P. Mastroeni, B. Bizzini, L. Bonina, D. Iannello, et al. The restoration of impaired macrophage functions using an immunomodulator the *Corynebacterium granulosum*-derid P40fraction. *Immunopharmacology*, 1985, 10, 27-34;
- Effetti sulle infezioni batteriche: B. Bizzini and M. Fattal-German. Potentiation by nonspecific immunostimulation of the efficacy of antibiotics in the treatment of experimental bacterial infections. *Biomed. Pharmacother.*, 1989, 43, 753-762; Effetti sulle infezioni virali: M. Fattal-German and B. Bizzini: The *Corynebacterium granulosum*-derived P40 immunomodulator exerts a synergistic effect on the activity of antiviral drugs in the treatment of experimental viral infections? *Biomed. Pharmacother.*, 1988, 42, 217-220. Induzione di citochine: Induction of various cytokines in mice and activation of the complement system in rats as a part of the mechanism of action of the *Corynebacterium granulosum*-derived P40 immunomodulator. B. Bizzini, M. Carlotti, M. Fattal-German. *FEMS Microbiol. Immunol.*,1992, 105, 171-180. Effetti sulle infezioni da *E.coli*: *E. Coli* infections of the lower urinary tract and their treatment by

immunomodulation or combined immunomodulation and antigen therapy.
Mathieu, D., Jacques, L., Auer, J. And B. Bizzini. Biomed. Pharmacother., 1988, 42, 271-278.

La frazione P40 è stata ampiamente sperimentata anche sul piano clinico nelle infezioni ricorrenti dell'apparato respiratorio: M.R. Ickovic, E. Henocq, E.H. Relyveld and B. Bizzini: Effect of immunomodulation with the *Corynebacterium granulosum*-derived Immunomodulator P40 on patients with recurring respiratory infections. J. Asthma, 1984, 21, 29-33. and E. Henocq, R. Veronesi, E.H. Relyveld and B. Bizzini: Treatment of relapsing chronic infection of the respiratory tract. A comparative study of the effectiveness of non specific immunotherapy with the immunoadjuvant P40 and vaccinotherapy. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 1984, 26, 105-109; e del tratto genito-urinario: E. Henocq, G. Arvis, M.C. Delsaux and B. Bizzini: Traitement des infections urogénitales récidivantes par immunomodulation. Ann. Urol., 1985, 19, 371-375. e sui disordini allergici: E. Henocq, A. Prouvost-Danon e B. Bizzini: Preliminary experimental and clinical results with inactivated allergens conjugated to the *Corynebacterium granulosum*-derived immunomodulator P40. Boll. Ist. Sieroter. Milan., 1987, 66, 70-77; e nel cancro della mammella: J. Reynier, B. Bizzini, J.C. Bazin and R. Villet: Immunocompetence, immunostimulation: Experimental facts and clinical perspectives. Advances in Immunomodulation Eds. B. Bizzini and E. Bonmassar. Pythagora Press: Roma-Milan, 1988, pp. 345-362. and Reynier, J., Villet, R., Bazin, J.C., Bizzini, B., Gandrielle, C. et al. Immunological investigation and immunotherapy in patients operated on for breast carcinoma. Int. Surgery, 1982, 67, 17-24.

Nel coniugato dell'invenzione il veicolo fisiologicamente accettabile comprende almeno un mucopolisaccaride o una frazione mucopolisaccaridica.

Tipicamente, i mucopolisaccaridi o glicosaminoglicani solfati (GAG), del coniugato dell'invenzione comprendono catene polisaccardiche non ramificate comprendenti ripetute unità disaccardiche. Tipicamente le unità che si ripetono sono a base di un esoso o di un acido exuronico legato a una esosamina.

Essendo idrofili, i mucopolisaccaridi del coniugato dell'invenzione si possono legare facilmente con l'acqua e penetrare gli strati più profondi della pelle.

I mucopolisaccaridi svolgono la funzione di veicolo per la frazione della parete batterica e svolgono un ruolo attivo nella funzionalità cellulare, in primo luogo nell'adesione, perché sono associati ai tessuti della membrana basale, i quali sono in contatto con le cellule.

Conseguenzialmente, la coniugazione del frammento di parete batterica in particolare di P40, al veicolo mucopolisaccaridico assolve la funzione di facilitare e di prolungare il contatto del frammento di parete batterica con la pelle e di consentire al lisato batterico di svolgere pienamente i suoi effetti di stimolazione sulle cellule di Langerhans e sui cheratinociti.

In accordo ad alcune forme di realizzazione, i mucopolisaccaridi o le frazioni mucopolisaccardiche contenute nel coniugato dell'invenzione sono scelti dal gruppo comprendente acido ialuronico (HA), condroitin-4-solfato (C4SA), condroitin-6-solfato (C6SC), dermatan sulfato (DS-condroitin-solfato B), eparan sulfato (HS), eparina (HP) e cheratan sulfato (KS).

Quelli maggiormente presenti nel derma umano sono l-HA e il DS, mentre in quantità minori si riscontrano il C6SC ed il C4SA HS ed HP che sono maggiormente presenti nei vasi sanguigni e nel tessuto nervoso (R. Fleischmajer e coll Dermal specificity, J. Invest.Dermatol., 1970, 54, 472;K. Meyer e coll.?, The acid mucopolysaccharides of connective tissue, Biochim. Biophys. Acta, 1956, 21, 506).

Un idoneo mucopolisaccaride è l'acido ialuronico, una sostanza presente nella cute sia in forma singola che come proteoglicano. Tipicamente, il peso molecolare può variare a seconda del tessuto da cui viene estratto ed è compreso tra $7,7 \times 10^6$ alla quarta e 6×10^6 alla sesta (T.C. Laurent e coll. Fractionation of hyaluronic acid. The polydispersity of hyaluronic acid from the bovine vitreous body. Biochim. Biophys Acta, 1960, 42, 476). E' largamente distribuito negli organi e tessuti, in particolare nel liquido sinoviale (Scher, I. E coll. Biochem. J. 1972, 126, 1073), corpo vitreo dell'occhio e tessuto connettivo (H. Schubert e coll. A primer on connective tissue biochemistry, 968, Lea and Febiger, Philadelphia). Tra le funzioni descritte per questo polisaccaride, annoveriamo la capacità di interferire con il movimento intra/extracellulare dell'acqua (J.H.Fessler, A structural function of mucopolysaccharides in connective tissue. Biochem. J., 1960, 76, 124) e del

soluto (T.C. Laurent e coll. Interaction between polysaccharides and the macromolecules. The transport of glomerular particles through hyaluronic acid solutions, *Biochim. Biophys. Acta*, &c., 78,351) e di stimolare la riparazione fisiologica ed il rimodellamento tissutale (B.P. Toole e coll. Morphogenic recognition, Ed. S.H. Barondes, 1976, 275, Plenum Press, NY).

Un altro idoneo mucopolisaccaride è il condroitin solfato. Questa sostanza rientra tra un gruppo eterogeneo di polisaccaridi sia strutturalmente che per quanto attiene la sulfatazione, può essere non sulfato o contenere un sulfato in posizione 4 della galattosamina(CSA) o in posizione 6 (CSC) o in entrambe le posizioni.

A titolo di esempio, il peso molecolare di CSA e CSC può essere compreso tra 5000 e 50.000 (W.D. Comper e coll., Physiological function of connective tissue polysaccharides. *Physiol. Rev.*, 1978, 58, 255). Il condroitin solfato ha un'alta carica polianionica e questo spiega la sua interazione con la migrazione intracellulare dei composti alla base dei biomeccanismi coinvolti a detto livello. E' presente in particolare nel tessuto cartilagineo (R. Amado e coll. *FEBS Lett.*, 1974, 39, 49).

Un idoneo mucopolisaccaride è il Keratan solfato.

Esistono due principali tipi di keratan solfato (KS) (K. Meyer e coll. *Biochim. Biophys. Acta*, 1956, 21, 506) uno localizzato esclusivamente nella cornea e l'altro tipo presente in numerosi tessuti scheletrici (nucleo polposo, cartilagine, osso).

La maggiore differenza tra i due tipi sta nel loro legame alle proteine, mentre il keratano corneale(KS I) è legato alle proteine mediante due tipi di legame, il keratano scheletrico (KS II) contiene tre tipi di legame (J.R. Baker e coll. *Connect. Tissue*, 1975, 3, 149).

L'N-acetilgalattosamina è il componente che si ritrova comunemente nelle unità disaccaridiche ripetitive del keratan solfato.

Un altro mucopolisaccaride che può essere presente nel coniugato dell'invenzione è il dermatan solfato. Questa sostanza è stata isolata la prima volta dalla pelle del suino (K. Meyer e coll. *J. Biol. Chem.*, 1941, 138, 491) ; essendo i polisaccaridi simili a quelli del condroitin solfato cartilagineo, il dermatan solfato fu in un primo tempo denominato condroitin solfato B (K. Meyer e coll. *Biochim. Biophys. Acta* 1956, 21, 506).

Successivamente, poiché fu isolato anche dagli estratti di polmone impiegati per la produzione di eparina, fu denominato anche beta-eparina (R. Marbet e coll. *Helv. Chim. Acta*, 1951, 34, 2311).

Il dermatan solfato è stato successivamente isolato da molti altri tessuti quali la mucosa gastrica 'H. Smith e coll. *Biochem. J.*, 1953, 53, 666), le valvole cardiache (Meyer, 1956), il cordone ombelicale (I. Danishefsky e coll. *J. Biol. Chem.*, 1966, 241, 143).

Tra le proprietà farmacologiche del dermatan solfato vengono descritte l'attività anticoagulante (I. Volpato e coll. *Susstantially pure dermatan sulfate and heparan sulfate glycosaminoglycans and their pharmaceutical use EP 97625/2004*) e la capacità di rigenerare il tessuto nervoso saggiata con il test del feocromocitoma indotto nel ratto dopo distruzione del NGF (nerve growth factor) (B. Bizzini and I. Volpato, ricerche non pubblicate).

L'eparan solfato è anche un idoneo veicolo del conougato dell'invenzione. Tipicamente ha un basso grado di solfatazione e di iduronazione (S.I. Lamberg e coll. *Glycosaminoglycans. A biochemical and clinical review. J. Invest. Dermatol.*, 1974, 63, 433).

L'eparan solfato si differenzia sostanzialmente dall'eparina in quanto costituisce un componente ubiquitario della superficie cellulare di molte o tutti i tipi di cellule ed è presente in forma di proteoglicano, mentre l'eparina è stoccatata nei granuli dei mastociti dai quali può essere rilasciata in risposta a certi stimoli e dove svolge importanti funzioni intracellulari (P.M. Kraemer, *Biochemistry*, 1971, 1437).

E' stato visto che la produzione cellulare di questo polisaccaride a livello dermico aumenta con l'invecchiamento al contrario di quella di acido ialuronico che, invece, si riduce (G. Sluke e coll., *Humandiploid fibroblast. Mech. Ageing Dev.*, 1981, 16, 19).

I glicosaminoglicani solfati del tipo HS, DS, C6S-C, C4S-A ks Eha sono in grado di influenzare i meccanismi di funzionalità cellulare quali l'adesione (H.K. Kleinman e coll., *Cell BIOL* ;1981, 88, 473), la migrazione (B.P. Toole in *Cell Biology of extracellular Matrix*. E.D. Hay, Ed., 1981, 275, Plenum Press NY), la priliferazione C. Grobstein e coll. *In extracellular Matrix influences gene expression*, H.G. Slavkin e R.C. Grenlich, Eds., 1975, pp. 9-16 e 804-814 Academic Press, NY) e la

differenziazione (A.Vaheri e coll., in *Cellular Control in Differentiation*. C.W. Loyd e D.A.Rees, Eds, 1981, 29, Academic Press, NY) e sono direttamente associati con la superficie cellulare^{5p;m}; Kraemer, *Biochemistry*, 1971, 10, 1437) o con i tessuti della membrana basale che sono in contatto con le cellule (Y.S. Kanwar e coll. *Proc; Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, 76, 1303).

In accordo ad alcune forme di realizzazione il coniugato dell'invenzione contiene un quantitativo di frammento di parete di *Corynebacterium*, in particolare *Corynebacterium granulosum*, compreso tra 10 e 200 µg per grammo di mucopolisaccaride o sua frazione.

In accordo ad alcune forme di realizzazione, la coniugazione del mucopolisaccaride con il veicolo a base di frammenti di capsula batterica, in particolare frammenti di pareti di *Corynebacterium granulosum* (P40), comprende una reazione di ossidazione dei gruppi ossidrilici (-OH) presenti nei mucopolisaccaridi per formare aldeidi (-CHO) che si legano ai gruppi amminici (-NH₂) delle catene peptidiche presenti nei frammenti di parete batterica di *Corynebacterium*, in particolare P40.

La reazione di ossidazione dei gruppi OH dei mucopolisaccaridi può essere realizzata utilizzando un idoneo blando ossidante utilizzato nelle tecniche biologiche come ad esempio monoiodacetato di sodio.

In accordo ad alcune forme di realizzazione, la reazione di ossidazione del mucopolisaccaride comprende aggiungere il mucopolisaccaride ad una soluzione acquosa tamponata con un pH lievemente acido ad esempio compreso tra pH 5 e 6, preferibilmente prossimo a 5,5 per dare una soluzione contenente il mucopolisaccaride a cui viene aggiunto un agente ossidante a blanda azione ossidante come il monoiodacetato di sodio per ossidare i gruppi amminici ed optionalmente il bloccaggio della reazione di ossidazione, tipicamente aggiungendo una sostanza contenente gruppi OH, ad esempio un glicole ad esempio glicerolo.

Alla soluzione risultante è poi possibile aggiungere i frammenti di parete cellulare batterica come ad esempio P40 per realizzare la coniugazione con i mucopolisaccaridi ossidati o parzialmente ossidati.

Per ottenere la coniugazione tra i frammenti di parete batterica e i mucopolisaccaridi è possibile utilizzare tecniche idonee a formare legami tra i gruppi amminici presenti nei frammenti di parete batterica, in particolare P40 ed i gruppi -OH dei mucopolisaccaridi.

In accordo ad un aspetto dell'invenzione la composizione dell'invenzione trova applicazione nel campo medico, in particolare in dermatologia.

I coniugati tra mucopolisaccaridi e frammenti cellulari ad azione immunomodulante dell'invenzione sono idonei per l'applicazione topico-mucosa. Questi coniugati svolgono, senza essere assorbiti a livello sistematico, effetti sinergici in grado di : prevenire e curare, ad esempio, manifestazioni cutanee allergiche e disfunzionali (adipe, rughe, invecchiamento cutaneo, ecc.) (HA-P40, C6S-P40, KS-P40), curare malattie cutanee a matrice infettiva, flogogena e immunitaria (eczemi, psoriasi, acne, eritemi, ustioni, ulcere diabetiche, ecc.) (DS_P40, HS-P40 , ecc.) prevenire e curare malattie a matrice vascolare (varici, flebiti, tromboflebiti, trombosi vascolari periferiche, ecc.) (HS-P40, FMHP_P40, ecc.).

Il sinergismo d'azione deriva dal fatto che i mucopolisaccaridi, in forma coniugata, applicati nel sito lesivo, oltre che svolgere le loro normali funzioni terapeutiche, agiscono come trasportatori dei frammenti cellulari particellari insolubili ad azione immunomodulante consentendone l'intimo contatto con il tessuto cutaneo.

Questo contatto è sufficiente per promuovere l'attivazione delle cellule immunocompetenti sottocutanee-sottomucose con conseguente promozione dei meccanismi endogeni aspecifici immunodifesa.

In accordo ad un altro aspetto la presente invenzione concerne una composizione farmaceutica comprendente un coniugato di un frammento di parete cellulare di un batterio appartenente al genere *Corynebacterium*, in particolare P40, con un veicolo fisiologicamente accettabile comprendente un mucopolisaccaride o una frazione mucopolisaccaridica ed un eccipiente farmaceuticamente accettabile.

La composizione farmaceutica secondo questo aspetto dell'invenzione è particolarmente idonea per l'applicazione topica e conseguentemente può essere in una qualsiasi forma idonea all'applicazione topica.

Tipicamente la composizione farmaceutica dell'invenzione può essere in forma solida, liquida o semisolida.

La forma solida comprende formulazioni in crema, pasta, polvere, unguento, pomata.

La forma liquida comprende formulazioni in forma di soluzione, sospensione, dispersione olio in acqua o acqua in olio.

La forma semisolida comprende fluidi, geli, sieri dermatologici.

Nella composizione dell'invenzione possono essere presenti uno o più eccipienti utilizzati nelle tecniche di formulazioni dei preparati ad uso topico come ad esempio disperdenti, aggreganti, tensioattivi, detergenti, agenti sospendenti, agenti formanti massa agenti per la protezione dai raggi UV, etc.

In accordo ad alcune forme di realizzazione la composizione dell'invenzione può contenere altre sostanze biologicamente attive come ad esempio estratti da piante, vitamine, Sali minerali.

In accordo ad alcune forme di realizzazione la composizione dell'invenzione può comprendere una o più sostanze farmacologicamente attive come ad esempio antibiotici, antivirali, antifungini, antinfiammatori FANS o steroidei, ormoni etc.

In accordo ad un altro aspetto la presente invenzione riguarda un coniugato tra un frammento di parete cellulare di un batterio appartenente al genere *Corynebacterium*, in particolare P40 ed un veicolo fisiologicamente accettabile comprendente un mucopolisaccaride o una frazione mucopolisaccaridica per l'uso nel trattamento di infezioni dermatologiche di origine batterica, virale o fungina.

In accordo ad un quarto aspetto la presente invenzione riguarda un coniugato tra un frammento di parete cellulare di un batterio appartenente al genere *Corynebacterium* in particolare P 40 ed un veicolo fisiologicamente accettabile comprendente un mucopolisaccaride o una frazione mucopolisaccaridica per l'uso nel trattamento di affezioni o patologie dermatologiche.

A titolo di esempio la composizione dell'invenzione trova applicazione nel trattamento delle affezioni che interessano la mucosa vaginale come le infezioni fungine, virali o batteriche.

In accordo ad un quinto aspetto la presente invenzione riguarda un coniugato tra un frammento di parete cellulare di un batterio appartenente al genere *Corynebacterium* in particolare P 40 ed un veicolo fisiologicamente accettabile

comprendente un mucopolisaccaride o una frazione mucopolisaccaridica per l'uso topico nel trattamento di malattie o affezioni della pelle base allergica.

A titolo di esempio la composizione dell'invenzione trova applicazione nel trattamento di orticaria, eczema, prurito o eritema.

In accordo a certe forma di realizzazione la composizione dell'invenzione trova applicazione per ritardare i processi di invecchiamento della pelle.

La presente invenzione verrà ora descritta facendo riferimento ai seguenti esempi che vengono forniti a meri fini illustrativi e non devono essere intesi in senso limitativo della presente invenzione.

ESEMPIO 1

Ottenimento della frazione particellare di parete cellulare di *Corynebacterium Granulosum* (PV40).

Viene ottenuta in accordo al metodo descritto da B. Bizzini e coll. (Med. Mal. Inf., 1978, 8, 408) per coltura di *C. granulosum* su nutrient broth arrichito in glucosio, in anaerobiosi a 37°C per 36 ore.. I batteri sono uccisi per riscaldamento della coltura per 30 minuti a 60°C E La massa microrganica viene allora raccolta per centrifugazione a 5000xg, per 30 minuti. I batteri vengono risospesi in acqua e sedimentati di nuovo. Questo lavaggio dei batteri viene ripetuto una seconda volta. La massa microrganica lavata viene essicata in stufa a 50°C. I batteri vengono allora delipidati per estrazione in un Soxhlet successivamente per ciclo di 8 ore con: 1)una miscela etanolo:etere 1;1; 2) cloroformio; 3)una miscela metanolo:cloroformio 2:1. I batteri delipidati sono rimessi in sospensione in acqua e frantumati per mezzo di un Waring Blender. E i batteri non rotti eliminati per centrifugazione a 1000 x g per 5 minuti. Dal supernatante contenente i batteri frantumati si precipita una frazione per aggiunta di una soluzione di solfato di ammonio fino a 40%di saturazione. Si lascia il precipitato decantare overnight a 4°C e questo viene raccolto per centrifugazione a 10.000 x g per 15 minuti. Il sedimento viene ripreso in acqua e dializzato contro acqua fino all'eliminazione di ogni traccia di solfato di ammonio. Esso viene liofilizzato.

Resa: 10-20%.

L'attività reticolostimolante della frazione P40 viene determinata per il test della splenomegalia in topi riceventi per via endovenosa 5àà ug di P40. I topi sono

sacrificati 7-8 giorni dopo l'iniezione e il peso della loro milza è paragonato a quello di un gruppo di topi controllo riceventi fisiologica. L'indice di attività K (animali stimolati)/K0 (animali controlli) deve essere superiore a 2.

ESEMPIO 2

Coniugazione di acido ialuronico alla frazione P40.

Ottenimento di HA-P40

5 g di ialuronato di sodio vengono sciolti in 200 ml di tampone acetato 0,05 M, pH 5,5 sotto agitazione al fine di ottenere una soluzione non troppo viscosa. A questa soluzione si aggiungono allora 210mg di monoiodacetato di sodio e al riparo della luce si lascia la reazione di ossidazione avvenire a T° ambiente per 30 minuti. La reazione viene allora bloccata per aggiunta di 1 ml di glicerolo 1 M

Dopo 15 minuti, si aggiungono 500 ug (10 unità stimolanti) di P40 e si lascia la coniugazione avvenire alla T° del laboratorio e i gruppi aldeidici possibilmente ancora liberi vengono bloccati per aggiunta di 1 ml di lisina 1 M.

La soluzione del coniugato viene concentrato ad un piccolo volume, sotto vuoto, in un evaporatore rotante; prima di essere liofilizzata.

ESEMPIO 3.

Coniugazione di dermatan solfato alla frazione P40 (DS-P40)

5g di dermatan solfato vengono sciolti in 40 ml ditampone acetato 0,05 M, pH 5,5. A questa soluzione vengono aggiunti 210 mg di monoiodacetato di sodio e si lascia avvenire la reazione al riparo della luce, sotto agitazione, a T° ambiente per 30minuti, dopodiché l'eccesso di MIA viene inattivato per aggiunta di 1 ml di glicerolo 1 M. Alla soluzione di dermatan solfato ossidato si aggiungono 1 mg dy P40 (20 unità di attività stimolante) e la coniugazione è lasciata avvenire overnight a T° ambiente, al riparo della luce , sotto agitazione.I gruppi che non reagiscono vengono bloccati per aggiunta di 1 ml di lisina 1 M. Si ottiene in questo modo una preparazione contenente 4unità di attività stimolante per grammo. Il prodotto viene liofilizzato.

ESEMPIO 4.

Coniugazione di eparan solfato alla frazione P40 (HS-P40)

5g di eparan solfato vengono sciolti in 30ml di tampone acetato, pH 5,5. A questa soluzione si aggiungono 160 mg di monoiodacetato di sodio (MIA) e al riparo della luce, sotto agitazione, si lascia la reazione di ossidazione avvenire per 30 minuti a T° del laboratorio, dopodiché si blocca la reazione per aggiunta di 1 ml di glicerolo 1 M. Dopo 15 minuti si aggiungono 2 mg (40 unità stimolanti) di frazione P40 e la coniugazione viene protratta a T° ambiente per 24 ore sotto agitazione. I gruppi aldeidici non occupati vengono bloccati per aggiunta di 1 ml di una soluzione di lisina 1 M. Dopo dialisi contro acqua, la soluzione viene liofilizzata. Il coniugato contiene 8 unità di attività stimolante di P40 per grammo.

ESEMPIO 5.

Coniugazione di eparina « fast moving” alla frazione P40 (FMHP-P40).

5 g di eparina “fast moving” a basso peso molecolare (< 5000 Da) vengono sciolti in 30ml di tampone acetato 0,05 M, Ph 5,5 e si aggiungono 80 mg di monoiodacetato di sodio (MIA) e si lascia la reazione avvenire per 30minuti alla T° ambiente,al riparo della luce, sotto agitazione, dopodiché la reazione viene bloccata per aggiunta di 0,5 ml di glicerolo 1 M. Dopo 15 minuti si aggiungono alla soluzione di HPMF ossidato 3 mg di frazione P40. Dopo 24 ore a reazione avvenuta sotto agitazione a T° del laboratorio si aggiungono alla soluzione 0,5 ml di lisina 1M per bloccare i gruppi aldeidici ancora liberi. La soluzione viene dializzata contro acque e liofilizzata. Il coniugato contiene 12unità di attività stimolanti di P40 per grammo.

ESEMPIO 6

Coniugazione di condroitin-6-solfato AC alla frazione P40 (C.6SC-P40) o (C4SA-P40)

5g di C6SC o di C4SA vengono sciolti in 30 ml di tampone acetato 0,05 M, pH 5,5, e a questa soluzione si aggiungono 120 mg di monoiodacetato di sodio (MIA) e al riparo della luce, sotto agitazione, si lascia la reazione avvenire per 30minuti a

4°C. Si blocca allora la reazione per aggiunta di 0,75 ml di glicerolo 1 M. Dopo 15 minuti si aggiungono 4 mg di frazione P40 (80 unità di attività stimolanti) e si lascia la coniugazione avvenire a T° ambiente per 24 ore a quel tempo si blocca i gruppi aldeidici non reagiti per aggiunta di 0,75 ml di lisina 1 M. la soluzione viene dializzata contro acqua e liofilizzata. Il coniugato contiene 16 unità di attività stimolanti di P40 per grammo.

ESEMPIO 7

Verifica della composizione dei coniugati tra mucopolisaccaridi e la frazione particellare della parete cellulare di C. granulosum P40

La composizione dei coniugati tra GAGs et P40 viene stabilita per ELISA dopo marcatura dei coniugati con biotina. L'ELISA da sviluppare comprende le tappe seguenti :

- 1) sensibilizzazione della piastra con AVIDINA ;
- 2) fissazione del coniugato da testare attraverso la sua marcatura con biotina ;
- 3) rivelazione, da una parte, della frazione P40 per mezzo di anticorpi anti-P40 marcati con un enzima e, dall'altra parte del GAG utilizzato come carrier per mezzo dell'anticorpo corrispondente marcato con un enzima.

7.1 Verifica dell'attività preventiva e curativa dei coniugati GAG-P40

L'attività terapeutica di stimolazione dei coniugati viene determinata per misura dell'effetto di applicazioni della confezione contenente il coniugato da testare per via intra-nasale

Verso una infezione da *S. Pyogenes A* (strain 56-1) provocata per via intra-nasale nelle condizioni standardizzate stabilite da B. Bizzini e M. Fattal-German :Standardized infection models as a way of evaluating the potency of anti-infectious agents. Develop. Biol. Standard. 1992, 77, 137-142 (Karger, Basel).

7.2 Caratterizzazione dei GAGs con impiego di anticorpi policlonali anti-GAGs

La caratterizzazione della struttura dei GAGs e di eventuali alterazioni strutturali in

conseguenza di coniugazione a P40 viene fatta valutando il grado di reattività dei vari polisaccaridi nei confronti dell'anticorpo polyclonale specifico.

Gli anticorpi per i vari GAGs sono stati prodotti nel coniglio impiegando come immunogeno il derivato GAG-KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin)

Gli animali sono stati sensibilizzati al tempo 0 per somministrazione sotto-cutanea dell'immunogeno (1 mg), in 20 punti sulla pelle depilata del dorso, sotto il volume di 0,05 ml ognuno in Adiuvante completo di Freund. Richiami di 0,5 mg sono stati somministrati ogni mese in Adiuvante incompleto di Freund per via intramuscolare. La produzione degli anticorpi è stata seguita per doppia diffusione in gel di diluizioni crescenti del siero. Raggiunto un titolo abbastanza elevato, i sieri sono stati prelevati per puntura cardiaca e la frazione IgG precipitata a 40% di saturazione con solfato di ammonio. La marcatura degli anticorpi purificati con enzima è stata effettuata per reazione con glutaraldeide.

Nella Tabella successiva si riportano i rapporti : reattività dei coniugati/reattività dei GAGs corrispondenti

| Coniugato | GAG | Rapporto Coniugato/GAG |
|-----------|------|------------------------|
| HA-P40 | HA | 0,95 |
| DS-P40 | DS | 0,87 |
| HS-P40 | HS | 0,91 |
| HPFM6P40 | HPFM | 0,77 |
| C6SC-P40 | C6SC | 0,82 |
| C4SA_P40 | C4SA | 0,76 |

ESEMPIO 8.

Analisi dell'efficacia sull'eritema da UV nel ratto

Ratti Wistar del peso di circa 200g vengono opportunamente depilati nella zona dorsale. Sotto anestesia eterea vengono esposti ai raggi UV per 2 ore, tempo utile per l'induzione di un evidente eritema cutaneo.

Successivamente gli animali vengono trattati nella zona eritematosa con una pomata a base di vari coniugati in concentrazione corrispondente a quella

prevista di P40 per l'uso terapeutico (50 ug per applicazione).

L'applicazione viene ripetuta giornalmente (una/die) fino a remissione totale dell'edema. L'esperimento è stato condotto a confronto con animali cui è stata applicata una pomata placebo (controlli) e con animali cui è stata applicata una pomata a base di mucopolisaccaridi singoli, non coniugati.

E' stata valutata la riduzione dell'area dell'eritema nei 7 giorni successivi all'applicazione dei diversi coniugati.

Nella Tabella successiva viene riportata la riduzione percentuale nel tempo, fatta 100 l'estensione dell'eritema indotta dagli UV (tempo zero).

Riduzione % dell'eritema da UV indotto nel dorso del ratto

| Gruppo | trattamento | Riduzione% dell'edema ai gg. | | | | | | |
|--------|---------------------|------------------------------|------|-------|-------|-------|-------|------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 1 | Placebo (controlli) | zero | zero | zero | 5.0 | 10.0 | 10.0 | 18.0 |
| 2 | P40 | 30.0 | 38.0 | 50.0 | 70.0 | 100.0 | | |
| 3 | HA | 10.0 | 20.0 | 25.0 | 30.0 | 40.0 | 50.0 | 70.0 |
| 4 | DS | 35.0 | 45.0 | 60.0 | 75.0 | 90.0 | 100.0 | |
| 5 | HS | 35.0 | 40.0 | 60.0 | 70.0 | 85.0 | 100.0 | |
| 6 | HPFM | 20.0 | 45.0 | 55.0 | 60.0 | 80.0 | 100.0 | |
| 7 | C6SC | 15.0 | 20.0 | 35.0 | 45.0 | 60.0 | 70.0 | 85.0 |
| 8 | HA-P40 | 30.0 | 50.0 | 80.0 | 100.0 | | | |
| 9 | DS-P40 | 50.0 | 85.0 | 100.0 | | | | |
| 10 | HS_P40 | 50.0 | 65.0 | 100.0 | | | | |
| 11 | HPFM-P40 | 45.0 | 70.0 | 80.0 | 100.0 | | | |
| 12 | C6SC-P40 | 60.0 | 65.0 | 80.0 | 100.0 | | | |

A diversi livelli di efficacia, i vari mucopolisaccaridi (HA, DS, HA, C6SC, HPFM) sono in grado di accelerare la risoluzione dell'eritema grazie ai loro effetti farmacologici antiflogogeni, di normalizzazione del microcircolo sanguigno, di attivazione della funzionalità della membrana basale e riproduzione cellulare.

Questo effetto viene significativamente incrementato dalla coniugazione con la frazione particellare ad azione immunomodulante aspecifica P40.

Il sinergismo è imputabile all'attivazione dei biomeccanismi alla base della funzionalità e ricambio cellulare conseguenti alla stimolazione macrofagica e del sistema del complemento imputabili alla sudetta frazione.

ESEMPIO 9

Analisi dell'efficacia sull'infezione indotta nel topo con S.pyogenes inoculato per via intranasale

E' stato utilizzato il metodo descritto da B. Bizzini e coll. (FEMS Microbiol. Immunol. 1990, 64, 155).

I prodotti sono stati applicati, ad una dose corrispondente a 100 ug di P40/kg di peso corporeo, nelle narici del topo per 3 giorni prima e lo stesso giorno dell'infezione con S. Pyogenes (2 x 10 alla sesta batteri) inoculato per via intranasale.

Sono stati utilizzati lotti di 10 topi mettendo a confronto, rispetto ad un gruppo non trattato (controlli) P40 e i diversi GAGs ed i relativi coniugati con P40.

E' stata controllata la sopravvivenza percentuale nei 7 gg. Successivi al trattamento.

% di sopravvivenza alla infezione intranasale di S. pyogenes

| Gruppo | Trattamento | Dose ug o mg/kg | Sopravvivenza % ai gg. | | | |
|--------|-------------|--------------------|------------------------|-----|------|----|
| | | | 1° | 3° | 5° | 7° |
| 1 | controlli | ----- | 90 | 20 | zero | |
| 2 | P40 | 100 ug | 100 | 100 | 100 | 80 |
| 3 | HA | 75 mg | 100 | 40 | zero | |
| 4 | DS | 50 mg | 100 | 50 | zero | |
| 5 | HS | 50 mg | 100 | 50 | zero | |
| 6 | C6SC | 75 mg | 90 | 40 | zero | |
| 7 | HPFM | 50 mg | 90 | 30 | zero | |
| 8 | HA-P40 | (100 ug P40) | 100 | 90 | 90 | |
| 9 | DS-P40 | (100 ug P40) | 100 | 100 | 100 | |
| 10 | HS-P40 | (100 ug P40) | 100 | 100 | 100 | |
| 11 | HPFM-P40 | (100 ug P40) | 100 | 100 | 100 | |
| 12 | C6SC-P40 | (100 ug P40) | 100 | 100 | 90 | |

Le proprietà di P40 di inibire l'insorgenza delle infezioni non viene alterata dalla coniugazione con i GAGs.

Questi ultimi non evidenziano alcuna interazione con l'infezione da *S. pyogenes*.

ESEMPIO 10

Analisi dell'efficacia sull'infezione da HSV indotta nella mucosa del ratto

E' stata indotta un'infezione vaginale nel ratto da HSV-1 di tipo moderato seguendo le indicazioni di M. Fattal-German e B. Bizzini (Develop. Biol. Standard., 1992, 77, 115).

Gli animali sono stati suddivisi in gruppi di 10 unità cadasuno.

Si è atteso 3 giorni fino a comparsa della sintomatologia dell'infezione sulla totalità degli animali. A questo punto si è iniziato il trattamento per applicazione giornaliera a livello della mucosa di un gel contenente i vari composti allo studio ad una concentrazione corrispondente a 50 ug di P40/applicazione/die.

Si è controllato il tempo utile per la totale remissione della sintomatologia negli animali trattati, di controllo e di riferimento.

Tempo di remissione/numero di animali della sintomatologia infettiva da HSV-1 a livello mucosale

| Gruppo | Trattamento | dose Ugo mg/die | n° ratti co remissione sintomatologia ai gg. | | | | |
|--------|-------------|--------------------|--|------|-------|-------|-------|
| | | | 1° | 3° | 5° | 7° | 10° |
| 1 | Controlli | ----- | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 |
| 2 | P40 | 50 ug | | 1/10 | 3/10 | 8/10 | 10/10 |
| 3 | HA | 25 mg | | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 |
| 4 | DS | 25 mg | | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 1/10 |
| 5 | HS | 25 mg | | 0/10 | 0/10 | 1/10 | 2/10 |
| 6 | HPFM | 25 mg | | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 1/10 |
| 7 | C6SC | 25 mg | | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 |
| 8 | HA-P40 | 50 ug P40 | | 2/10 | 5/10 | 10/10 | |
| 9 | DS-P40 | 50 ug P40 | | 4/10 | 10/10 | | |
| 10 | HS-P40 | 50 ug P40 | | 8/10 | 10/10 | | |
| 11 | HPFM-P40 | 50 ug P40 | | 5/10 | 10/10 | | |
| 12 | C6SC-P40 | 50 ug P40 | | 4/10 | 8/10 | 10/10 | |

L'immunomodulatore P40 è in grado di risolvere in pochi giorni la sintomatologia derivante dall'applicazione mucosale del virus erpetico.

Questa proprietà viene potenziata ed accelerata per effetto della coniugazione dell'immunomodulatore ai GAGs in grado di consentirne un ottimo contatto con la mucosa.

Il fatto che tra i coniugati di P40 con i diversi GAGs alcuni di questi, quali DS-P40, HS-P40 e FMHP-P40, risultino maggiormente attivi, depone per un influenza sinergica tra attività immunomodulante aspecifica del P40 e proprietà dei mucopolisaccaridi sulla vitalità e riproduzione cellulare.

ESEMPIO 11

Analisi dell'efficacia nella trombosi di sodio morruato nell'orecchio del coniglio.

Il trombo viene indotto nella vena marginale dell'orecchio previamente depilato del coniglio, isolata per un tratto di circa 3 cm con l'ausilio di pinze emostatiche, iniettando sul sito isolato 0,2 ml di una soluzione al 5% di sodio morruato.

Dopo 10 minuti, a trombo consolidato, si rimuovono le pinze emostatiche.

Si applicano giornalmente nella zona interessata 200 mg di gel contenenti 10 mg di coniugati allo studio.

Giornalmente, per 10 giorni si controlla l'entità percentuale di remissione del trombo.

Nella Tabella vengono riportate le % medie di riduzione ai vari giorni in confronto tra animali trattati con i prodotti oggetto del brevetto, animali di controllo (non trattati) e animali trattati con i vari intermedi di coniugazione.

| Gruppo | trattamento | dose mg/die | % riduzione del trombo sperimentale ai gg. | | | | |
|--------|-------------|----------------|--|-----|----|-----|-----|
| | | | 2° | 4° | 6° | 8° | 10° |
| 1 | controlli | ----- | | | | | |
| 2 | HA | 25 | --- | --- | 5 | 15 | 35 |
| 3 | DS | 25 | --- | 15 | 25 | 50 | 75 |
| 4 | HS | 25 | 10 | 35 | 70 | 100 | |
| 5 | HPFM | 25 | --- | 25 | 60 | 90 | 100 |
| 6 | C6SC | 25 | --- | 5 | 15 | 35 | 60 |
| 7 | HA-P40 | 25 | --- | 10 | 25 | 35 | 50 |
| 8 | DS-P40 | 25 | --- | 25 | 40 | 7° | 100 |
| 9 | HS-P40 | 25 | 25 | 50 | 90 | 100 | |
| 10 | HPFM-P40 | 25 | 10 | 35 | 75 | 100 | |
| 11 | C6SC-P40 | 25 | --- | 15 | 35 | 60 | 90 |

P mucopolisaccaridi, del tipo HS, FMHP, e DS, sono in grado di risolvere il trombo sperimentale indotto nella vena dell'animale.

Questo effetto risulta potenziato dopo la loro coniugazione al P40, struttura particellare ad azione reticolostimolante.

Il potenziamento è verosimilmente imputabile ad una accelerazione della distruzione delle cellule necrotiche presenti nel trombo dovuta alla stimolazione delle cellule macrofagiche.

ESEMPIO 12:

Studio di non assorbimento transdermico dei coniugati P40 per applicazione topica.

Con lo scopo di dimostrare che l'azione reticolostimolante svolta dai coniugati di P40 con diversi GAGS non è dovuta al loro passaggio transdermico, in tal senso è stato svolto uno studio specifico volto a dimostrare l'assenza di tale passaggio.

Per questo studio sono stati utilizzati dei coniugati preparati con la frazione P40 marcata con biotina come molecola tracciante. Il modello sperimentale utilizzato è

basato sulla misura spettrofotometrica della biotina attraverso un espianto di pelle umana ex vivo, l'esprianto è costituito da stati dermici ed epidermici. In questo modello la biotina serve da controllo poiché l'esprianto di pelle è impermeabile a questa molecola.

La valutazione in vitro dell'azione filmogena intesa come capacità delle sostanze di legarsi alle strutture cutanee superficiali senza modificarne la funzione barriera e la permeabilità delle stesse è stata effettuata presso il laboratorio Vitroscreen Via Mosè Bianchi 103 20149 Milano.

Lo studio non ha evidenziato alcun passaggio transdermico ne dei tre coniugati utilizzati (HA-P40-biotina , HS-P40-biotina, DS-P40-biotina) ne della sulfo-NHS-LS Biotina utilizzata come controllo.

Visti i risultati dello studio si può concludere che l'azione dei diversi coniugati di P40 con i GAGs avviene in assenza di un passaggio transdermico.

ESEMPIO 13

Analisi degli effetti sulle infezioni topico-mucose

Sono stati selezionati soggetti affetti da :

- erpetite labiale
- candidosi vaginale

I diversi coniugati, in forma farmaceutica di gel al 3% di principio attivo sono stati applicati sul sito infetto giornalmente, una volta/die.

Il trattamento è stato protratto per 7 giorni, tempo medio di remissione completa della patologia da parte dei coniugati GAGs-P40.

Per il successivo periodo di 6 mesi è stata controllata la presenza di eventuali ricadute.

I risultati sono riportati nella Tabella successiva

| Gruppo | Prodotto | Trattamento | Appl./die | Patologia | Remissione | % ricadute Ai gg. | % ricadute A 6 mesi |
|--------|----------|-------------|-----------|----------------|------------|----------------------|------------------------|
| 1° | P40 | gel topico | una | erpes labiale | 2 o 3 | zero | |
| 2° | HA | " | " | " | > 10 | 70 | |
| 3° | DS | " | " | " | " | 50 | |
| 4° | HS | " | " | " | " | 70 | |
| 5° | HPFM | " | " | " | " | 90 | |
| 6° | C6SC | " | " | " | " | 90 | |
| 7° | HA-P40 | " | " | " | 1 o 2 | zero | |
| 8° | HS-P40 | " | " | " | 1 o 2 | zero | |
| 9° | HPFM-P40 | " | " | " | 1 a 3 | 10 | |
| 10° | C6SC-P40 | " | " | " | 2 o 3 | 20 | |
| 1° | P40 | " | due | candid. vagin. | 1 a 4 | 20 | |
| 2° | HA | " | " | " | > 10 | 90 | |
| 3° | HS | " | " | " | " | 100 | |
| 4° | HA-P40 | " | " | " | 1 o 2 | 10 | |
| 5° | DS-P40 | " | " | " | " | 10 | |

Risulta da questa sperimentazione che la frazione particellare P40 esplicante un'attività immunomodulante è stata in grado di combattere efficacemente l'erpetite labiale e la candidosi vaginale, mentre i GAGs da soli si sono dimostrati inefficaci. Però, la coniugazione del P40 ai GAGs si è tradotta per un potenziamento del suo effetto, probabilmente poichè il contatto dei coniugati con la mucosa è più intimo e più protracto rispetto a quello del solo P40.

ESEMPIO 14.

Effetto dei coniugati GAGs-P40 sull'acne

L'acne è una malattia infiammatoria la cui patogenesi è complessa, caratterizzata dalla formazione di comedoni composti di sebo, cheratina e microrganismi.

Un gruppo di giovani soggetti volontari, affetti da acne superficiale sono stati trattati con P40, o i coniugati HA-P40, oDS-P40, oHS-P40, in forma farmaceutica di gel non grasso contenente per ogni applicazione topica l'equivalente di 50 ug de P40. E' stata effettuata un applicazione/DIE di gel, la sera, prima di coricarsi, per 10 giorni, dopo un lavaggio accurato del viso con detergenti neutri.

Tutti i prodotti si sono dimostrati in grado di migliorare significativamente le lesioni acneiche, con la scomparsa del prurito già dopo pochi giorni di trattamento.. Dopo 10 giorni di trattamento, la maggior parte dei comedoni sono stati risolti con l'utilizzo del prodotto a base di frazione immunomodulante P40 da sola o con i coniugati di GAGs-P40 più precocemente.

ESEMPIO 15

Effetto dei coniugati GAGs-P40 su psoriasi

Un gruppo di soggetti volontari, affetti da psoriasi non invasiva sono stati trattati per applicazione topica o di P40, o di coniugati GAGs-P40 quali HA-P40, oDS_P40, o HS_P40, in forma farmaceutica di gel non grasso al 3% di principio attivo, 2 volte al giorno per 10 giorni.

Una risposta positiva al trattamento che consiste nella scomparsa delle lesioni e del prurito è stata osservata nella maggior parte dei soggetti a partire dal 5° giorno di trattamento, mentre un gruppo minore di soggetti non ha risposto al trattamento. Il miglioramento è stato più ovvio quando sono stati applicati i coniugati di GAGs-P40.

ESEMPIO 16

Effetto dei coniugati GAGs-P40 sull'orticaria

L'orticaria è il risultato di una reazione anafilattica strettamente limitata alla pelle ed ai tessuti sottocutanei.

Soggetti volontari affetti di orticaria acuta sono stati trattati con la frazione immunomodulante P40 o con coniugati di GAGs-P40, quali HA-P40, DS-P40, HS-P40, in forma farmaceutica di un gel al 3% di principio attivo.

Applicazioni topiche 2 volte al giorno per 6 giorni.

Già, dopo le prime applicazioni, il prurito si è significativamente ridotto o fortemente indebolito. Le lesioni da orticaria sono prevalentemente svanite dopo 1 o 2 giorni di trattamento, in particolare con applicazione di coniugati GAGs-P40.

RIVENDICAZIONI

1. Coniugato di un frammento di parete cellulare di un batterio che appartiene al genere *Corynebacterium* ed un veicolo fisiologicamente accettabile caratterizzato dal fatto che il veicolo fisiologicamente accettabile comprende un mucopolisaccaride o una frazione mucopolisaccaridica.
2. Coniugato secondo la rivendicazione 1 in cui il frammento di parete cellulare è di *Corynebacterium granulosum*.
3. Coniugato secondo la rivendicazione 1 o 2 in cui il veicolo fisiologicamente accettabile è un mucopolisaccaride scelto tra acido ialuronico, condroitin-4-solfato, condroitin-6-solfato, dermatan sulfato, eparan sulfato, eparina, cheratan sulfato e loro miscele.
4. Coniugato secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-3 in cui la parete cellulare di batterio è delipidata.
5. Coniugato secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-4 per l'uso come medicamento.
6. Coniugato secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-5 per l'uso nel trattamento topico di infezioni batteriche, virali o fungine.
7. Coniugato secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-5 per l'uso nel trattamento topico di affezioni o patologie dermatologiche.
8. Coniugato secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-5 per l'uso nel trattamento di malattie o affezioni della pelle base allergica.
9. Coniugato secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-5 per l'uso nel trattamento di malattie o affezioni della mucosa vaginale.
10. Composizione farmaceutica comprendente un coniugato secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-4 ed un eccipiente farmaceuticamente accettabile.

1. A conjugate of a fragment of a cellular wall of a bacterium belonging to the genus *Corynebacterium* and a physiologically acceptable carrier characterized in that the physiologically acceptable carrier comprises a mucopolysaccharides or a mucopolysaccharidic fraction.
2. Conjugate according to claim 1 wherein the fragment of the cellular wall belongs to *Corynebacterium granulosum*.
3. Conjugate according to claim 1 or 2 wherein the physiologically acceptable carrier is a mucopolysaccharides selected from hyaluronic acid, chondroitin-4-sulfate, chondroitin-6-sulfate, dermatan sulfate, heparan sulfate, heparin, keratan-sulfate and mixtures thereof.
4. Conjugate according to anyone of claims 1-3 wherein the cellular wall of the bacterium is free of lipids.
5. Conjugate according to anyone of claims 1-4 for use as a medicament.
6. Conjugate according to anyone of claims 1-5 for use in the topical treatment of bacterial, viral or fungal infections.
7. Conjugate according to anyone of claims 1-5 for use in the topical treatment of dermatological affections or disorders.
8. Conjugate according to anyone of claims 1-5 for use in the treatment of allergic skin disorders or affections.
9. Conjugate according to anyone of claims 1-5 for use in the treatment of vaginal mucosae disorders or affections.

10. A pharmaceutical composition comprising a conjugate according to anyone of claims 1-4 and a pharmaceutically acceptable carrier.