

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102021000021134
Data Deposito	04/08/2021
Data Pubblicazione	04/02/2023

Classifiche IPC

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	31	16

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	31	164

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	31	198

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	31	7004

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	35	747

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	P	13	02

Titolo

COMPOSIZIONE PER IL TRATTAMENTO DELLE INFEZIONI URINARIE

Deposito della domanda di brevetto per invenzione industriale dal titolo:

“COMPOSIZIONE PER IL TRATTAMENTO DELLE INFEZIONI URINARIE”

DESCRIZIONE

CAMPO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione riguarda una composizione per il trattamento delle infezioni urinarie e dei disturbi ad esse associati, in particolare infiammazioni delle vie urinarie, quali ad esempio cistiti, ed uretriti, e relativa sintomatologia.

STATO DELLA TECNICA

Le infezioni del tratto urinario, o infezioni urinarie, sono molto diffuse, soprattutto tra le donne. I sintomi comuni delle infezioni del tratto urinario sono: minzione urgente e frequente, disuria e dolore al basso ventre. Le infezioni del tratto urinario limitano le attività del paziente, che talvolta deve addirittura essere ricoverato in ospedale.

Le infezioni urinarie sono causate da patogeni, in gran parte del tipo *E. coli*, pertanto sono generalmente trattate con la somministrazione di antibiotici. Tuttavia, gli effetti collaterali degli antibiotici sono noti. Inoltre, sempre più batteri si mostrano resistenti agli antibiotici, sicché quando l'eliminazione dei batteri non è completa, i batteri rimanenti restano nascosti nell'epitelio della vescica e, una volta che ci sono condizioni adatte, proliferano, causando ripetuti attacchi di infezioni del tratto urinario.

Pertanto, si rende sempre più necessario fornire nuovi rimedi che siano efficaci e con minori effetti collaterali ed opzionalmente in grado di amplificare l'efficacia dei rimedi noti nell'arte per il trattamento delle infezioni urinarie.

RIASSUNTO DELL'INVENZIONE

Detto scopo è stato raggiunto mediante una composizione comprendente mannosio, almeno un endocannabinoide e N-acetilcisteina (NAC), come riportato nella rivendicazione 1.

Sotto un altro aspetto, la presente invenzione concerne l'uso di tale composizione per il trattamento delle infezioni urinarie e dei disordini ad esse associati, opzionalmente in combinazione con un trattamento antibiotico.

Le caratteristiche ed i vantaggi della presente invenzione risulteranno evidenti dalla seguente descrizione dettagliata e dalle forme realizzative fornite a titolo di esempi illustrativi e non limitativi.

BREVE DESCRIZIONE DELLE FIGURE

Figura 1: Risultati dei test dell'esempio 10 (MIC): 1 = Comp.1; 2 = fosfomicina; 3 = ceftriaxone; 4 = D-mannosio; 5 = terreno (TBS/TSYEM) + Comp.1; 6 = terreno (TBS/TSYEM); 7 = controllo; A = *E. coli*; B = *E. faecium*; C = *K. pneumoniae*.

Figura 2: Risultati dei test dell'esempio 11 (MBIC) con la composizione (Comp. 1) secondo aspetti preferiti dell'invenzione – Osservazione allo stereomicroscopio del biofilm dei vari microrganismi: A = *E. Coli*; B = *E. faecium*; C = *K. pneumoniae*.

Figura 3: Risultati dei test dell'esempio 11 (MBIC) con *Enterococcus faecium* – Osservazione al microscopio ottico ingrandimento 400x: 1 = Comp.1; 2 = fosfomicina.

Figura 4: Risultati dei test dell'esempio 11 (MBIC) con *E. coli* – Osservazione al microscopio ottico ingrandimento 400x: 1 = Comp.1; 2 = fosfomicina

Figura 5: Risultati dei test dell'esempio 11 (MBIC) con *Klebsiella pneumoniae* – Osservazione al microscopio ottico ingrandimento 400x: 1 = Comp.1; 2 = fosfomicina

Figura 6: Risultati dei test dell'esempio 11 (MBIC) con controlli non trattati – Osservazione al microscopio ottico ingrandimento 400x: A = *E. coli*; B = *E. faecium*; C = *K. pneumoniae*

Figura 7: Risultati dei test dell'esempio 12 (MBEC) con *Enterococcus faecium* - Osservazione al microscopio ottico ingrandimento 400x: 1 = Comp.1; 2 = fosfomicina

Figura 8: Risultati dei test dell'esempio 12 (MBEC) con *E. coli* - Osservazione al microscopio ottico ingrandimento 400x: 1 = Comp.1; 2 = fosfomicina

Figura 9: Risultati dei test dell'esempio 12 (MBEC) con *Klebsiella pneumoniae* - Osservazione al microscopio ottico ingrandimento 400x: 1 = Comp.1; 2 = fosfomicina

Figura 10: Risultati del saggio di vitalità cellulare dell'esempio 13; i valori di vitalità sono espressi come percentuale dell'assorbanza delle cellule non trattate.

Figura 11: Risultati del trattamento con diverse quantità di TNF- α dell'esempio 14.

Figura 12: Risultati del test di attività antiinfiammatoria del prodotto Comp. 1 dell'esempio 14.

Figura 13: Risultati dei test dell'esempio 15 (MBIC) con *E. coli* - Osservazione al microscopio ottico ingrandimento 400x: 1 = Comp.1; 2 = D-Mannosio

Figura 14: Risultati dei test dell'esempio 15 (MBIC) con *E. faecium* - Osservazione al microscopio ottico ingrandimento 400x: 1 = Comp.1; 2 = D-Mannosio

Figura 15: Risultati dei test dell'esempio 15 (MBIC) con *K. pneumoniae* - Osservazione

al microscopio ottico ingrandimento 400x: 1= Comp.1; 2 = D-Mannosio

Figura 16: Risultati dei test di sinergia dell'esempio 16 (MBIC) *con E. coli* - Osservazione al microscopio ottico ingrandimento 400x: A: Comp. 1 + fosfomicina; B: Comp. 1 da solo; 1 = concentrazioni fosfomicina; 2 = concentrazioni Comp.1.

Figura 17: rappresentazione schematica del “metodo della scacchiera” per valutare la sinergia nel test MBIC *con Escherichia coli*; a = concentrazioni fosfomicina; b = concentrazioni Comp.1. La crescita del biofilm è mostrata in scala di grigi (bianco= no biofilm); le caselle 1 e 2 indicano i pozzetti nei quali si è evidenziato un effetto sinergico di inibizione della crescita del biofilm. FIC index 1 = 0,75; FIC Index 2 = 0,56

Figura 18: Risultati dei test di sinergia dell'esempio 16 (MBIC) *con E. faecium* - Osservazione al microscopio ottico ingrandimento 400x: A: Comp. 1 + fosfomicina; B: Comp. 1 da solo; 1 = concentrazioni fosfomicina; 2 = concentrazioni Comp.1.

Figura 19: rappresentazione schematica del “metodo della scacchiera” per valutare la sinergia nel test MBIC *con E. faecium*; a = concentrazioni fosfomicina; b = concentrazioni Comp.1. La crescita del biofilm è mostrata in scala di grigi (bianco= no biofilm); le caselle 1, 2 e 3 indicano i pozzetti nei quali si è evidenziato un effetto sinergico di inibizione della crescita del biofilm. FIC Index 1 = 0,31; FIC Index 2 = 0,38; FIC Index 3 = 0,38.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

L'invenzione riguarda pertanto una composizione comprendente mannosio, N-acetilcisteina, ed almeno un endocannabinoide.

Gli endocannabinoidi hanno natura lipidica e derivano da un acido grasso polinsaturo, l'acido arachidonico. Essi vengono prodotti a partire da precursori biosintetici di tipo fosfolipidico e attivano i recettori dei cannabinoidi di tipo 1 (CB1), molto abbondanti nel cervello ma anche in tessuti periferici, e di tipo 2 (CB2), espressi invece principalmente in cellule del sistema immunitario, ma espressi anche dalle cellule della glia a livello del sistema nervoso centrale.

Per gli scopi della presente invenzione, con il termine “almeno un endocannabinoide”, si intende anandamide (o arachidonoiletanolammide, AEA), docosatetraenoiletanolammide (DEA), omo-linoleniletanolammide (HEA), 2-arachidonoilglicerolo (2-AG), 2-arachidonil-gliceril-etere (noladin etere, 2-AGE), virodamina, N-arachidonoildopamina (NADA), palmitoiletanolammide (PEA),

oleoiletanolammide (OEA), e loro miscele.

Preferibilmente, detto almeno un endocannabinoide è palmitoiletanolammide (PEA).

PEA ha come principale meccanismo d'azione l'incremento dell'espressione dei recettori CB2 attraverso un meccanismo genomico che coinvolge l'attivazione del PPAR- α . La stimolazione dei recettori CB2 promuove il rilascio di oppioidi endogeni, con effetto analgesico, e il rilascio di citochine antinfiammatorie.

N-acetilcisteina (NAC) è la cisteina N-acetilata. Essa è detta anche acido α -acetammido- β -mercaptopropanoico.

Il mannosio è costituente di numerosi polisaccaridi semplici e complessi. Costituisce, ad esempio, la molecola base dei mannani, polisaccaridi di riserva di alcune specie di vegetali (esempio la palma) oppure, associato a galattosio (mannogalattani).

L'azione antibatterica del mannosio è stata oggetto di studio negli anni recenti. Il mannosio è infatti in grado di interferire con l'adesione microbica dei microbi cosiddetti mannosio-sensibili (o di tipo 1).

Secondo la presente invenzione il mannosio è preferibilmente D-mannosio.

Preferibilmente il mannosio è D-mannosio puro (ossia un composto comprendente D-mannosio puro almeno al 95%, preferibilmente puro almeno al 99%, come misurato mediante HPLC), oppure è un composto in grado di rilasciare D-mannosio, in seguito a ingestione, per mezzo della digestione enzimatica.

In forme di realizzazione preferite dell'invenzione, detto mannosio è in rapporto in peso da 1:1 a 20:1 rispetto a detto almeno un endocannabinoide o a detta N-acetilcisteina; più preferibilmente in rapporto in peso da 1:1 a 15:1, ancor più preferibilmente da 3:1 a 10:1. Preferibilmente, detto almeno un endocannabinoide e detta N-acetilcisteina sono in rapporto in peso da 3:1 a 1:3, più preferibilmente da 2:1 a 1:2, ancor più preferibilmente circa uguale a 1:1.

Secondo forme di realizzazione preferite, la composizione dell'invenzione comprende fino a 50% in peso di mannosio, più preferibilmente fino al 40% in peso di mannosio.

Per gli scopi della presente invenzione, se non diversamente specificato, con “% in peso” si intende % in peso sul peso della composizione dell'invenzione.

Per gli scopi della presente invenzione, se non diversamente specificato, con “comprende fino al” in riferimento ad un certo ingrediente si intende che tale ingrediente è presente nella composizione, ad esempio in una concentrazione minima superiore o uguale allo

0,001% in peso.

In aspetti preferiti dell'invenzione, la composizione dell'invenzione comprende 20-40 % in peso di mannosio, più preferibilmente 30-40 % in peso di mannosio, rispetto al peso totale della composizione.

In aspetti preferiti dell'invenzione, la composizione dell'invenzione comprende 40- 70 % in peso di mannosio, rispetto al peso totale degli ingredienti attivi.

Per "ingredienti attivi" della composizione si intendono qui gli ingredienti aventi un'attività biologica, includendo le sostanze dotate di effetto terapeutico.

Secondo forme di realizzazione preferite, la composizione dell'invenzione comprende fino a 15% in peso di N-acetilcisteina, più preferibilmente fino a 10% in peso di N-acetilcisteina.

In aspetti preferiti dell'invenzione, la composizione dell'invenzione comprende 5-10 % in peso di N-acetilcisteina, rispetto al peso totale della composizione.

In aspetti preferiti dell'invenzione, la composizione dell'invenzione comprende 10-20 % in peso di N-acetilcisteina, rispetto al peso totale degli ingredienti attivi.

Secondo forme di realizzazione preferite, la composizione dell'invenzione comprende fino a 15% in peso di almeno un endocannabinoide, più preferibilmente fino a 10% in peso di almeno un endocannabinoide.

In aspetti preferiti dell'invenzione, la composizione dell'invenzione comprende 5-10 % in peso di almeno un endocannabinoide, rispetto al peso totale della composizione.

In aspetti preferiti dell'invenzione, la composizione dell'invenzione comprende 10-20% in peso di almeno un endocannabinoide, rispetto al peso totale degli ingredienti attivi.

In forme di realizzazione preferite, la composizione dell'invenzione comprende ulteriormente lattobacilli.

Lattobacilli adatti alla composizione della presente invenzione includono, preferibilmente ma non esclusivamente, lattobacilli delle specie: *L. casei*, *L. paracasei*, *L. gasseri*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. crispatus*. Opzionalmente, la composizione può comprendere una miscela di diversi Lattobacilli.

Preferibilmente, la composizione dell'invenzione comprende lattobacilli della specie *Lactobacillus rhamnosus* (*L. rhamnosus*). Particolarmente preferito è *L. rhamnosus* di ceppo LR04.

In alcune forme di realizzazione, detto almeno un *Lattobacillo* è liofilizzato. Il processo

di liofilizzazione consente di mantenere la vitalità dei batteri, i quali si riattivano in seguito alla reidratazione che avviene una volta a contatto con la superficie cutanea e/o le mucose.

In forme di realizzazione particolarmente preferite, detto almeno un *Lattobacillo* è tindalizzato. Con il termine “tindalizzato” si intende sottoposto ad un particolare trattamento termico che lo ha inattivato, quindi reso incapace di metabolizzare e riprodursi. I Lattobacilli vengono trattati insieme al loro terreno di coltura, costantemente controllato ed ottimizzato, che contiene anche le sostanze prodotte dal loro metabolismo. Il liofilizzato così ottenuto contiene quindi sia le parti cellulari probiotiche che le sostanze del normale metabolismo dei ceppi (vitamine, glicoproteine, micronutrienti), pertanto può risultare efficace quanto l’apporto degli stessi ceppi vivi.

Poiché la salute delle vie urinarie si basa, prioritariamente, su una condizione di eubiosi intestinale, senza voler restare legati alla teoria, si ritiene che probiotici, in particolar modo i lattobacilli, possono favorire l’eubiosi intestinale e così prevenire la colonizzazione dell’epitelio urinario da parte di microrganismi nocivi.

Preferibilmente, la composizione dell’invenzione comprende almeno $1-10 \times 10^7$ UFC (unità formanti colonia) di lattobacilli, più preferibilmente almeno $1-10 \times 10^8$ UFC di lattobacilli, ancor più preferibilmente almeno $1-10 \times 10^9$ UFC di *Lattobacilli*.

In forme di realizzazione preferite, la composizione dell’invenzione comprende ulteriormente ibisco. Per “ibisco” si intende preferibilmente un estratto di ibisco, ottenuto dai fiori di *Hibiscus sabdariffa*, secondo metodi noti nell’arte. Ad esempio l’estratto di ibisco può essere ottenuto mediante estrazione in acqua degli attivi dai calici o petali di *Hibiscus sabdariffa*. L’estratto ottenuto può inoltre essere concentrato o essiccato prima di essere aggiunto alla composizione dell’invenzione.

Secondo forme di realizzazione preferite della composizione dell’invenzione, detto ibisco è in rapporto in peso da 3:1 a 1:3 rispetto a detto almeno un endocannabinoide o a detta N-acetilcisteina; più preferibilmente in rapporto in peso da 2:1 a 1:2, ancor più preferibilmente da 1,5:1 a 1:1,5.

Secondo forme di realizzazione preferite, la composizione dell’invenzione comprende fino a 20% in peso di ibisco, più preferibilmente fino a 10% in peso di ibisco.

In aspetti preferiti dell’invenzione, la composizione dell’invenzione comprende da 2% a 10% in peso di ibisco, più preferibilmente 3-6 % di ibisco.

In aspetti preferiti dell'invenzione, la composizione dell'invenzione comprende 5-10% in peso di ibisco, rispetto al peso totale degli ingredienti attivi.

In forme di realizzazione preferite, la composizione dell'invenzione è in forma di dose unitaria.

Preferibilmente, tale dose unitaria comprende 100-1000 mg di detto almeno un endocannabinoide, più preferibilmente 200-800 mg, ancor più preferibilmente 300-600 mg.

Preferibilmente, tale dose unitaria comprende 100-1000 mg di N-acetilcisteina, più preferibilmente 200-800 mg, ancor più preferibilmente 300-600 mg.

Preferibilmente, tale dose unitaria comprende 500-5000 mg di mannosio, più preferibilmente 1000-4000 mg, ancor più preferibilmente 1500-3000 mg.

Preferibilmente, tale dose unitaria comprende ulteriormente 50-700 mg di ibisco, più preferibilmente 100-500 mg, ancor più preferibilmente 200-400 mg.

Preferibilmente, tale dose unitaria comprende ulteriormente $1-10 \times 10^7$ UFC di lattobacilli, più preferibilmente $1-10 \times 10^8$ UFC, ancor più preferibilmente $1-10 \times 10^9$ UFC.

Risultano ulteriormente preferite le composizioni, nonché le dosi unitarie, comprendenti:

- palmitoiletanolammide 600 mg

- N-acetilcisteina 600 mg

- D-mannosio 3000 mg

oppure

- palmitoiletanolammide 300 mg

- N-acetilcisteina 300 mg

- D-mannosio 1500 mg

oppure

- palmitoiletanolammide 600 mg

- N-acetilcisteina 600 mg

- D-mannosio 3000 mg

- ibisco 400 mg

oppure

- palmitoiletanolammide 300 mg

- N-acetilcisteina 300 mg

- D-mannosio 1500 mg

- ibisco 200 mg

oppure

- palmitoiletanolammide 600 mg

- N-acetilcisteina 600 mg

- D-mannosio 3000 mg

- *L. rhamnosus* LR04 2x 10⁹ UFC

oppure

- palmitoiletanolammide 300 mg

- N-acetilcisteina 300 mg

- D-mannosio 1500 mg

- *L. rhamnosus* LR04 1x 10⁹ UFC

oppure

- palmitoiletanolammide 600 mg

- N-acetilcisteina 600 mg

- D-mannosio 3000 mg

- ibisco 400 mg

- *L. rhamnosus* LR04 2x 10⁹ UFC

oppure

- palmitoiletanolammide 300 mg

- N-acetilcisteina 300 mg

- D-mannosio 1500 mg

- ibisco 200 mg

- *L. rhamnosus* LR04 1x 10⁹ UFC

È da intendersi che gli aspetti preferiti identificati per i singoli componenti sono da considerarsi analogamente preferiti nelle forme di realizzazione in dose unitaria sopra descritte.

La composizione dell'invenzione, anche in forma di dose unitaria, può ulteriormente comprendere eccipienti farmaceuticamente accettabili. Con il termine "eccipiente" si intende un composto o una sua miscela adatta per l'utilizzo nella formulazione della composizione. Ad esempio, un eccipiente per l'uso in una formulazione farmaceutica generalmente non deve causare una risposta avversa in un soggetto, né deve inibire in

modo significativo l'efficacia della composizione.

Adatti eccipienti sono acidificanti, correttori di acidità, anti-agglomeranti, antiossidanti, agenti di carica, agenti di resistenza, gelificanti, agenti di rivestimento, amidi modificati, sequestranti, addensanti, edulcoranti, diluenti, disaggreganti, glidanti, coloranti, leganti, lubrificanti, stabilizzanti, adsorbenti, conservanti, umettanti, aromi, sostanze filmogene, emulsionanti, bagnanti, ritardanti di rilascio e loro miscele.

Preferibilmente, detti eccipienti sono potassio sorbato, sodio benzoato, ϵ -polilisina, sucralosio, maltodestrina, acido citrico, sodio carbonato, calcio carbonato, magnesio carbonato, magnesio stearato, acido stearico, polietilenglicole, amido naturale, amido parzialmente idrolizzato, amido modificato, lattosio, fosfato di calcio, carbonato di calcio, solfato di calcio, polivinilpirrolidone, silice, silice colloidale, silice precipitata, silicati di magnesio, silicati di alluminio, sodio laurilsolfato, magnesio laurilsolfato, copolimeri metacrilati, sodio deidroacetato, gomma xantana, gomma guar, gomma di tara, gomma di semi di carruba, gomma di fieno greco, gomma arabica, acido alginico, sodio alginato, glicole propilenico alginato, sodio croscarmellosio, polivinilpolipirrolidone, gliceril beenato, titanio biossido, indigotina, cellulosa, cellulosa modificata, calcio carbossimetilcellulosa, sodio carbossimetilcellulosa, cellulosa microcristallina, etilcellulosa, gelatina, etilcellulosa, idrossietilcellulosa, idrossipropilcellulosa, polidestrosio, carragenina, metilcellulosa, saccarosio, esteri del saccarosio, sorbitolo, xilitolo, destrosio, fruttosio, maltitolo, gomma adragante, pectina, agar-agar, carbossipolimetilene, idrossipropilmetilcellulosa, tragacanth, mannitolo, biossido di silicio, o loro miscele. Eccipienti preferiti includono un acidificante, quale acido citrico, un edulcorante, quale sucralosio, un agente antiagglomerante, quale biossido di silicio.

In alcune forme di realizzazione, la composizione dell'invenzione consiste essenzialmente in: mannosio, N-acetilcisteina ed almeno un endocannabinoide, opzionalmente ibisco e lattobacilli. L'espressione "consiste essenzialmente in" significa che mannosio, N-acetilcisteina ed almeno un endocannabinoide, opzionalmente ibisco e lattobacilli, sono gli unici ingredienti attivi nella composizione, mentre eventuali ulteriori componenti o eccipienti non interferiscono con la loro azione.

In forme di realizzazione preferite, la composizione dell'invenzione consiste in mannosio, N-acetilcisteina ed almeno un endocannabinoide, opzionalmente ibisco e/o lattobacilli, e facoltativamente eccipienti farmaceuticamente accettabili.

È da intendersi che tutti gli aspetti identificati sopra come preferiti e vantaggiosi per la composizione ed i suoi componenti, sono da ritenersi analogamente preferiti e vantaggiosi anche per queste forme di realizzazione.

La composizione della presente invenzione può essere preparata mediante metodi noti nella tecnica. Infatti, per la somministrazione orale, i componenti possono, per esempio, essere miscelati tal quali, oppure con uno o più eccipienti, racchiusi in capsule soft-gel oppure in forma solida, quale compressa, mini-compressa, micro-compressa, granulo, micro-granulo, pellet, multi particolato, particolato micronizzato, polvere, oppure in forma di soluzione, emulsione, gel, fiale, gocce o spray.

Preferibilmente, la composizione dell'invenzione è in forma di granulato, più preferibilmente da assumere disciolto in acqua.

Preferibilmente, la composizione dell'invenzione è formulata in un integratore alimentare.

Sotto un altro aspetto, la presente invenzione è diretta all'uso della composizione sopra descritta per il trattamento di infezioni del tratto urinario. Preferibilmente, la presente invenzione è diretta all'uso della composizione sopra descritta per il trattamento di infezioni del tratto urinario causate da batteri mannosio-sensibili.

Ai fini della presente invenzione, con il termine "trattamento", si intende includere la somministrazione di detta composizione ad un soggetto affetto da infezione urinaria o a rischio di sviluppo di infezioni urinarie, allo scopo di migliorarne la condizione complessiva, come pure allo scopo di rallentare, alleviare, ridurre, e/o prevenire i disordini associati e qualsiasi alterazione del funzionamento dell'organismo di detto soggetto. In particolare, il trattamento delle infezioni urinarie prevede l'alleviamento e/o la prevenzione dei disordini ad esse associati, quali l'infiammazione acuta o cronica delle vie urinarie, in particolar modo le cistiti e le uretriti, e la relativa sintomatologia.

Pertanto, la presente invenzione è diretta anche all'uso della composizione sopra descritta per il trattamento dei disordini associati alle infezioni del tratto urinario.

La composizione dell'invenzione ha sorprendentemente consentito di trattare le infezioni urinarie ed i disordini ad esse associati.

Le attività della composizione dell'invenzione sono il risultato dell'azione sinergica dei suoi componenti.

In particolar modo, gli ingredienti compresi nella composizione dell'invenzione agiscono

sinergicamente:

- favorendo il completo svuotamento della vescica e quindi l'eliminazione dei batteri in essa presenti, grazie alle proprietà diuretiche e acidificanti;
- impedendo la colonizzazione dell'epitelio delle vie urinarie, grazie alla capacità di legare le fimbrie batteriche, in particolare dei batteri mannosio-sensibili, inibendo quindi l'adesione batterica;
- riducendo l'infiammazione e l'algesia associata alle infezioni urinarie;
- antagonizzando la formazione dei biofilm batterici e/o disaggregando la membrana polimerica dei biofilm batterici già formati;
- favorendo l'eubiosi intestinale, prevenendo conseguentemente la colonizzazione dell'epitelio delle vie urinarie.

In particolare, la composizione dell'invenzione è in grado di agire sinergicamente a livello di biofilm batterico, inibendone la formazione e riducendone la biomassa dei biofilm già formati.

Inoltre, la composizione dell'invenzione è in grado di potenziare l'azione degli antibiotici nel trattamento delle infezioni urinarie e dei disordini ad esse associati.

La composizione dell'invenzione è preferibilmente somministrata per via orale, buccale o sublinguale.

Più preferibilmente, la composizione dell'invenzione è somministrata almeno una volta al giorno. Per gli scopi della presente invenzione, con il termine "giorno" si intende un periodo di tempo di 24 ± 4 ore.

In forme di realizzazione preferite, la composizione dell'invenzione è somministrata da una fino a tre volte al giorno in forma di dose unitaria, come sopra descritta.

Preferibilmente il trattamento è protratto per almeno una settimana, ad esempio somministrando la composizione dell'invenzione una o due volte al giorno in forma di dose unitaria per almeno 7 giorni, quindi più preferibilmente somministrando la composizione dell'invenzione una volta al giorno in forma di dose unitaria per un periodo di mantenimento da 7 a 30 giorni.

In forme di realizzazione preferite la composizione dell'invenzione è somministrata unitamente ad uno o più antibiotici.

Preferibilmente, la presente invenzione è quindi diretta anche ad un prodotto farmaceutico comprendente la composizione dell'invenzione ed almeno un antibiotico;

inoltre la presente invenzione è ulteriormente diretta a detto prodotto farmaceutico e al suo uso per il trattamento delle infezioni urinarie e dei disordini ad esse associate.

In tal senso, detto prodotto farmaceutico può essere in forma di kit per la somministrazione simultanea, separata o sequenziale della composizione dell'invenzione e dell' almeno un antibiotico.

Preferibilmente detto almeno un antibiotico è selezionato nel gruppo comprendente:

fosfomicina, ampicillina, amoxicillina, levofloxacin, ciprofloxacina, lomefloxacina, nitrofurantoina, sulfametossazolo, trimetoprim, e loro miscele. La posologia di detto almeno un antibiotico è stabilita dal medico su base individuale per ciascun paziente.

È da intendersi che risultano descritte, e quindi analogamente preferite, anche tutte le possibili combinazioni degli aspetti preferiti dei componenti della composizione, come sopra indicati.

È inoltre da intendersi che tutti gli aspetti identificati come preferiti e vantaggiosi per la composizione ed i suoi componenti, sono da ritenersi analogamente preferiti e vantaggiosi anche per la preparazione e gli usi della composizione stessa.

Si riportano di seguito Esempi di realizzazione della presente invenzione forniti a titolo illustrativo e non limitativo.

ESEMPI

Negli esempi 1-10 che seguono, sono state preparate composizioni secondo la presente invenzione.

Gli ingredienti utilizzati nella preparazione delle composizioni sono:

- Estratto di fiori secchi di Ibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.): HiBCYN™, ottenuto da AKAY Flavours & Aromatics Pvt. Ltd, India, di seguito brevemente "Ibisco"
- *Lactobacillus rhamnosus* LR04 (DSM16605), liofilizzato microincapsulato, ottenuto da Probiotical S.p.A., Italia ($> 100 \cdot 10^9$ cells /g)
- Palmitoiletanolammide, dispersibile in acqua, ottenuto da Frau Pharma Srl, Italia
- N-acetil -L-cisteina, polvere cristallina, ottenuta da CJ Haide (Ningbo) Biotech Co., Ltd, Cina
- D-mannosio, polvere cristallina, ottenuto da Shanghai Freeman, Cina.

Esempio 1

È stata preparata la seguente composizione:

Palmitoiletanolammide	600 mg
N-acetil -L-cisteina	600 mg
D-mannosio	3000 mg

Esempio 2

È stata preparata la seguente composizione:

Palmitoiletanolammide	300 mg
N-acetil -L-cisteina	300 mg
D-mannosio	1500 mg

Esempio 3

È stata preparata la seguente composizione:

Palmitoiletanolammide	600 mg
N-acetil -L-cisteina	600 mg
D-mannosio	3000 mg
Ibisco	400 mg

Esempio 4

È stata preparata la seguente composizione:

Palmitoiletanolammide	300 mg
N-acetil -L-cisteina	300 mg
D-mannosio	1500 mg
Ibisco	200 mg

Esempio 5

È stata preparata la seguente composizione:

Palmitoiletanolammide	600 mg
N-acetil -L-cisteina	600 mg
D-mannosio	3000 mg
<i>L. rhamnosus</i> LR04	2 x 10 ⁹ UFC

Esempio 6

È stata preparata la seguente composizione:

Palmitoiletanolammide	300 mg
N-acetil -L-cisteina	300 mg
D-mannosio	1500 mg
<i>L. rhamnosus</i> LR04	1 x 10 ⁹ UFC

Esempio 7

È stata preparata la seguente composizione:

Palmitoiletanolammide	600 mg
N-acetil -L-cisteina	600 mg
D-mannosio	3000 mg
Ibisco	400 mg
<i>L. rhamnosus</i> LR04	2 x 10 ⁹ UFC

Esempio 8

È stata preparata la seguente composizione:

Palmitoiletanolammide	300 mg
N-acetil -L-cisteina	300 mg
D-mannosio	1500 mg

Ibisco	200 mg
<i>L. rhamnosus</i> LR04	1 x 10 ⁹ UFC

Esempio 9

È stata preparata la seguente composizione:

Ingredienti	Percentuale in formula (%)
D-mannosio	36,5854
Maltodestrine	33,4146
N-acetilcisteina	7,439
Palmitoiletanolammide	7,3171
Aroma	7,3171
Ibisco (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.) fiori e.s	4,878
<i>L. rhamnosus</i> LR04 (DSM 16605) microincapsulato	1,2195
Acido citrico	1,2195
Sucralosio	0,3659
Biossido di silicio	0,2439

Esempio 10

È stato preparato un integratore alimentare (Comp. 1), comprendente:

Palmitoiletanolammide	300 mg
N-acetil -L-cisteina	300 mg
D-mannosio	1500 mg
Ibisco	200 mg

Il prodotto è stato sciolto in TSB / TSYEM medium sterile e quindi utilizzato per l'esecuzione dei test che seguono.

Esempio 11 – Attività antimicrobica (MIC)

L'attività antimicrobica del prodotto Comp. 1 dell'esempio 10 è stata testata *in vitro* secondo il metodo CLSI M07 “Methods for dilution Antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically”.

A questo scopo sono stati determinati i valori di MIC (Minima Concentrazione Inibente) rispetto ai principali microorganismi responsabili di infezioni alle vie urinarie.

Nello specifico i microorganismi utilizzati sono: *Escherichia coli* (DSM 1576), *Klebsiella pneumoniae* (DSM 30104) ed *Enterococcus faecalis* (DSM 20477).

I batteri sopraelencati sono stati rivitalizzati a partire da una banca cellulare conservata a -80°C per ogni esperimento eseguito. La seguente tabella 1 riporta le condizioni di crescita dei microorganismi.

Tabella 1

	Inoculo UFC/mL	Medium	Condizioni di crescita	Tempo di incubazione
<i>Escherichia coli</i>	4,38x10 ⁵	TSB	37 °C aerobiche	24 h
<i>Enterococcus faecium</i>	5,00x10 ⁵	TSYEM	37 °C aerobiche	24 h
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6,50x10 ⁵	TSYEM	37 °C aerobiche	24 h

Il saggio per la determinazione della MIC è stato effettuato in *multiwell* da 96 pozzetti testando 12 concentrazioni (diluizioni seriali) di ciascun campione. Un volume di 200 µL di campione preparato a una concentrazione 2x rispetto alla massima concentrazione in test è stato dispensato nel primo pozzetto e 100 µL di terreno aggiunto nei successivi pozzetti eseguendo diluzioni seriali 1:2 fino al 12° pozzetto. Infine, 100 µL di ciascun microorganismo a una concentrazione di 10⁵ sono stati inoculati in ogni pozzetto.

Come controlli sono stati utilizzati due antibiotici: Fosfomicina (Sigma) e Ceftriaxone (Sigma) a diverse concentrazioni finali in base al microorganismo utilizzato; entrambi gli antibiotici sono stati sciolti in acqua sterile e filtrati con filtri 0,22 µm.

È stato eseguito un controllo di crescita e uno di sterilità del terreno e del prodotto. È stata

valutata inoltre l'attività antimicrobica del D-mannosio singolarmente. Le piastre così preparate sono state incubate a 37°C per 24h e quindi osservati i risultati (Figura 1).

Le concentrazioni finali testate per ogni prodotto analizzato sono riportate in Tabella 2.

Tabella 2

	Comp. 1 g/L	Fosfomicina µg/mL	Ceftriaxone µg/mL	D-mannosio g/L
<i>Escherichia coli</i>	100-0,05	10000-4,8	5,12-0,0025	65-0,03
<i>Enterococcus faecium</i>	100-0,05	10000-4,8	512-0,25	65-0,03
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	100-0,05	20000-9,7	5,12-0,0025	65-0,03

Per la fosfomicina sono stati determinati i valori di MIC, per ogni microorganismo. *E. Coli* risulta il microorganismo più sensibile a questo tipo di antibiotico, il valore MIC è di 19,53 µg/mL. *Klebsiella* al contrario risulta essere il microorganismo più resistente, avendo un valore di MIC a 5000 µg/mL. Per *E. Faecium* il valore MIC per la fosfomicina è 78,13 µg/mL.

L'attività antimicrobica è stata valutata anche con D-mannosio. Come per il prodotto Comp. 1 anche il D-mannosio da solo nel range di concentrazioni testate non presenta un'attività antimicrobica in quanto la crescita cellulare è visibile in tutti i pozzetti.

Esempio 11 - Minima concentrazione inibente del biofilm (MBIC)-confronto con fosfomicina

La capacità del prodotto Comp.1 dell'esempio 10 e della fosfomicina di inibire e di eradicare la formazione di biofilm dei tre microorganismi target è stata valutata trattando i microorganismi con 8 concentrazioni di prodotto, scelte in modo da essere inferiori al valore di MIC determinato nel test precedente. La formazione del biofilm è stata visualizzata mediante colorazione con il colorante *Crystal Violet*, che penetra nelle cellule batteriche colorandole di viola.

Per la determinazione della MBIC sono state utilizzate *multiwell* da 48 pozzetti. Un volume di 200 µL di campione preparato a una concentrazione 2x rispetto alla massima concentrazione in test è stato dispensato nel primo pozzetto e 100 µL di terreno aggiunto nei successivi pozzetti eseguendo diluzioni seriali 1:2 fino al 8° pozzetto. Infine, 100 µL

di ciascun microrganismo a una concentrazione di 10^5 sono stati inoculati in ogni pozzetto. È stata inoltre valutata l'attività di inibizione del biofilm della fosfomicina, ad una concentrazione inferiore rispetto al valore di MIC rilevato nell'esempio 10, e sono stati eseguiti i controlli di sterilità e di crescita per ogni microrganismo. Le *multiwell* sono state incubate a 37°C per 24 ore e quindi rimosso il surnatante presente insieme ai batteri in forma planctonica non adesi alla piastra.

Il biofilm è stato quindi lavato 3 volte con PBS e successivamente tramite incubazione a 60°C per 2 ore fissate le cellule prima della colorazione con *crystal violet*. La colorazione con il *crystal violet* è stata eseguita per valutare l'effetto del prodotto e della fosfomicina sulla formazione del biofilm. In ogni pozzetto sono stati dispensati 50 μL di *crystal violet* sciolto in acqua deionizzata, dopo 5 minuti di incubazione a temperatura ambiente ogni pozzetto è stato infine lavato per tre volte con PBS 1x. L'attività di inibizione del biofilm è stata visualizzata tramite osservazione microscopica allo stereomicroscopio e microscopio ottico in contrasto di fase. Le concentrazioni finali testate per ogni campione sono riportate in Tabella 3.

Tabella 3

	Comp. 1 g/L	Fosfomicina $\mu\text{g/mL}$
<i>Escherichia coli</i>	100-0,78	156,25-1,22
<i>Enterococcus faecium</i>	100-0,78	321,5-2,51
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	100-0,78	2500-19,53

Tramite osservazione dei biofilm allo stereomicroscopio (Figura 2) si è osservato che il prodotto Comp. 1 risulta avere un'attività di inibizione nella formazione di biofilm.

Come è evidente dalle colorazioni, il biofilm, alla diminuzione della concentrazione del prodotto, aumenta. Alla concentrazione di 1,56 g/L del prodotto Comp.1 è possibile apprezzare già con una visualizzazione macroscopica la riduzione del biofilm.

Successivamente sono state acquisite foto al microscopio ottico con un ingrandimento 400x per meglio valutare lo stato del biofilm (Figure 3-6).

Per tutti i microrganismi, a una concentrazione di 1,56 g/L di prodotto il biofilm è completamente inibito; solo in *E. coli* è presente un numero molto ridotto di cellule adese. Alla concentrazione di 0,78 g/L l'effetto di inibizione del biofilm è ancora molto evidente soprattutto su *E. faecium* e su *K. pneumoniae*.

Su *K. pneumoniae* e *E. coli*, la fosfomicina ha un effetto di inibizione del biofilm a concentrazioni maggiori o uguali a 78 µg/mL, mentre su *E. faecium* è necessaria una concentrazione di almeno 321 µg/mL.

Esempio 12- Minima concentrazione eradicazione del biofilm (MBEC)

Per la determinazione della minima concentrazione di eradicazione del biofilm sono state utilizzate *multiwell* da 48 pozzetti. I microorganismi sono stati incubati per 72 h a 37°C per permettere la formazione di biofilm. Una volta formati, i biofilm sono stati trattati con fosfomicina e col prodotto Comp. 1 dell'esempio 10. In particolare, dopo la formazione del biofilm, il surnatante è stato aspirato e sostituito con soluzioni a concentrazione scalare di prodotto o di fosfomicina. Le piastre così preparate sono state incubate per 24 h a 37 °C. Al termine del tempo di incubazione il surnatante presente in ogni pozzetto è stato rimosso insieme ai batteri non aderenti alla piastra e in seguito ai lavaggi le piastre incubate a 60°C per 2 ore per fissare le cellule prima della colorazione con *crystal violet*. La colorazione con il *crystal violet* è stata eseguita per valutare l'effetto del prodotto e della fosfomicina sulla rimozione del biofilm. In ogni pozzetto sono stati dispensati 50 µL di *crystal violet* dissolto in acqua deionizzata. Dopo 5 minuti di incubazione a temperatura ambiente ogni pozzetto è stato lavato per tre volte con PBS 1x. L'attività di eradicazione del biofilm è stata visualizzata tramite osservazione microscopica (Figure 7-9).

Le concentrazioni finali testate per ogni prodotto sono riportate in Tabella 4

Tabella 4

	Comp. 1 g/L	Fosfomicina µg/mL
<i>Escherichia coli</i>	50-0,39	30000-234,38
<i>Enterococcus faecium</i>	50-0,39	3000-23,44
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	50-0,39	3000-23,44

Il prodotto Comp. 1 ha un'azione sull'eradicazione del biofilm formato da *K. Pneumoniae* e *E. faecium* alla concentrazione di 0,78 g/L e su *E.coli* alla concentrazione di 6,25g/L. La fosfomicina non sembra avere un effetto di eradicazione del biofilm a nessuna delle concentrazioni testate per *E. faecium* e *E.coli* mentre ha una attività su *K. pneumoniae* a concentrazioni maggiori di 468 µg/mL. L'integratore alimentare dell'invenzione agisce quindi sia sulla inibizione che sulla eradicazione del biofilm formato dai microorganismi *K. Pneumoniae*, *E. faecium* e *E. coli*. Nei test *in vitro* l'attività del prodotto è importante già alla concentrazione di 0,78 g/L.

Esempio 13 - Attività citotossica

È stato valutato l'effetto del prodotto Comp.1 dell'esempio 10 sulla vitalità di una linea cellulare derivata da vescica umana (HT1376) sfruttando le reazioni di ossidoriduzione del composto 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT), che forma dei cristalli viola in presenza di cellule vitali.

Le cellule HT1376 a una confluenza > 90% sono state raccolte e diluite a una concentrazione di 10^5 cells/mL. Dove non specificato, le cellule sono state coltivate a 37 °C e 5% CO₂ in terreno *Eagle's Minimum Essential Medium* completo (EMEM con 1% penicillina/streptomina, 1% aminoacidi non-essenziali, 2 mM L-glutamina), integrato con il 10% di siero fetale bovino (FBS). 100 µL di questa diluizione (10^4 cellule) sono stati aliquotati in ciascun pozzetto di una piastra da 96 pozzetti sterile, la quale è stata incubata overnight a 37°C e 5% CO₂. Al termine dell'incubazione, il terreno è stato rimosso e sostituito con 100 µL di EMEM completo integrato con 1% FBS e contenente il prodotto Comp. 1 alle seguenti concentrazioni (in mg/mL): 5 - 2,5 - 1,25 - 0,625 - 0,313 - 0,156 - 0,078 - 0,039 - 0,02 - 0,01 - 0,005 - 0,0024. Come controllo positivo è stato utilizzato sodio dodecil solfato (SDS) alla concentrazione di 1 mg/mL. Le cellule sono state incubate per 24 ore a 37 °C e 5% CO₂. Al termine del trattamento, l'MTT è stato aggiunto in ciascun pozzetto alla concentrazione finale di 0,5 mg/mL, e l'incubazione è stata prolungata per altre due ore. Il terreno di coltura è stato quindi rimosso dai pozzetti, e i cristalli di MTT ridotto sono stati solubilizzati con l'aggiunta di 100 µL di dimetilsolfossido (DMSO). Dopo un'incubazione di 30 minuti a temperatura ambiente, è stata misurata l'assorbanza a 595 nm di ciascun campione, con un lettore di piastre Infinite M NANO+ (Tecan). La vitalità cellulare è espressa come percentuale dell'assorbanza a 595 nm delle cellule non trattate (NT).

Come mostrato in Figura 10, il prodotto non mostra alcun un effetto tossico sulla vitalità cellulare.

Esempio 14 - Attività anti-infiammatoria

È stata valutata la capacità del prodotto Comp. 1 dell'esempio 10 di inibire o ridurre lo stato infiammatorio indotto, nelle stesse cellule dell'esempio precedente, dalla citochina pro-infiammatoria TNF α . Questo trattamento porta alla produzione di interleuchina 8 (IL-8), la quale è responsabile del "reclutamento" dei globuli bianchi al sito dell'infiammazione. I livelli di IL-8 sono direttamente proporzionali all'intensità dell'infiammazione stessa.

Le 6 concentrazioni di prodotto utilizzate nel test anti-infiammatorio sono state scelte sulla base dei risultati del test di vitalità cellulare. In particolare, sono state utilizzate sei concentrazioni decrescenti di prodotto a partire da 0,625 mg/mL, in quanto a concentrazioni superiori a 0,625 mg/mL i dati dell'esempio 13 mostravano un aumento della vitalità cellulare. Questo poiché il prodotto in sé porta alla riduzione, e quindi la colorazione, dell'MTT.

Si è dapprima determinata la quantità ottimale di TNF α per lo svolgimento del test. Le cellule HT1376 a una confluenza > 90% sono state raccolte e diluite a una concentrazione di 10^4 cells/mL. 1 mL di questa diluizione (10^4 cellule) è stato aliquotato in ciascun pozzetto di una piastra da 48 pozzetti sterile, la quale è stata incubata a 37 °C e 5% CO₂ per 48h. Al termine dell'incubazione, il terreno è stato rimosso e sostituito con 1 mL di EMEM completo senza FBS, contenente TNF α alle seguenti concentrazioni (in μ g/mL): 0,2 – 0,1 – 0,05 – 0,025. Il trattamento è stato effettuato a 37 °C e 5% CO₂ per un totale di 6 ore; aliquote di 200 μ L del terreno di coltura sono state prelevate all'inizio del trattamento (T0) e dopo 1, 2, 4 e 6 ore, e quindi analizzate tramite test ELISA. Per il test della attività anti-infiammatoria, le cellule HT1376 a una confluenza > 90% sono state raccolte e diluite a una concentrazione di 10^4 cells/mL. 1 mL di questa diluizione (10^4 cellule) è stato aliquotato in ciascun pozzetto di una piastra da 48 pozzetti sterile, la quale è stata incubata a 37 °C e 5% CO₂ per 48h. Al termine dell'incubazione, il terreno è stato rimosso e sostituito con 500 μ L di EMEM completo senza FBS, contenente 0,2 μ g/mL di TNF α da solo o con il prodotto Comp. 1 alle seguenti concentrazioni (in mg/mL): 0,625 – 0,313 – 0,156 – 0,078 – 0,039 – 0,02.

Come controllo positivo è stato utilizzato il farmaco anti-infiammatorio desametasone

(dex), alla concentrazione di 0,1 mg/mL. Il trattamento è stato effettuato per 6 ore, al termine delle quali sono state prelevate aliquote di 200 µL del terreno di coltura, e quindi analizzate tramite test ELISA.

La rilevazione di IL-8 è stata effettuata su 100 µL di ciascuna aliquota conservata, usando il kit “Human IL-8 Uncoated ELISA Kit” (Invitrogen), secondo il protocollo fornito dal produttore. La quantificazione è stata effettuata allestendo una retta di taratura con diverse concentrazioni di una soluzione standard di IL-8, fornita con il kit.

L’effetto anti-infiammatorio è espresso come variazione percentuale nella concentrazione di IL-8 rispetto alle cellule trattate con il solo TNF α .

Come si può osservare (Figura 11), il trattamento con una qualsiasi quantità di TNF α causa una sovraespressione di IL-8, rispetto alle cellule non trattate (NT). In generale sembra che siano necessarie almeno 4 ore di trattamento per osservare delle differenze apprezzabili nella produzione di IL-8, ma l’effetto maggiore si osserva dopo 6 ore. Il trattamento con 0,025 – 0,05 o 0,1 µg/mL di TNF α sembra dare risultati simili, con una produzione di 40 – 45 pg/mL di IL-8 dopo 6 ore di trattamento.

Aumentando il TNF α a 0,2 µg/mL si ottiene una maggior produzione di interleuchina, con un massimo di circa 63,5 pg/mL dopo 6 ore di trattamento.

Per poter apprezzare con la maggior precisione possibile le variazioni nella produzione di IL-8 dovute al trattamento con il prodotto, sulla base di questi dati, si è quindi deciso di trattare le cellule con 0,2 µg/mL TNF α per 6 ore.

L’effetto antiinfiammatorio del prodotto è stato valutato misurando la sua abilità di ridurre la quantità di IL-8 prodotta dalle cellule HT1376 in seguito a trattamento con TNF α .

In particolare, le cellule sono state trattate con la citochina pro infiammatoria TNF α nelle condizioni precedentemente sviluppate, in assenza o in presenza del prodotto e quindi misurata la quantità di IL8 espressa. Il farmaco anti-infiammatorio desametasone alla concentrazione di 0,1 mg/mL è stato utilizzato come controllo positivo.

Come mostrato in Figura 12 e Tabella 5, il prodotto è in grado di ridurre la sovraespressione di IL-8 indotta da TNF α , in modo dose-dipendente, fino a una concentrazione di 0,04 mg/mL: a questo valore l’IL-8 prodotta è circa il 33% in meno di quella prodotta dalle cellule trattate con solo il TNF α , un effetto paragonabile a quello ottenuto con il Desametasone alla concentrazione di 0,1 mg/mL (31%).

L'effetto maggiore si ha con una concentrazione di prodotto di 0,625 mg/mL, con cui si osserva una riduzione del 45,5 % nella produzione di IL-8.

Tabella 5

Controlli		Prodotto (mg/mL)					
TNF α (0,2 μ g/mL)	100	0,625	0,313	0,156	0,078	0,039	0,02
Dex (0,1 mg/mL)	69	54,5	58,4	62,6	64,2	66,9	66,4

Sulla base dei dati ottenuti si può quindi affermare che il prodotto ha un effetto inibente sull'infiammazione mediata da TNF α .

Esempio 15 - Minima concentrazione inibente del biofilm (MBIC) -confronto con D-mannosio

Per la determinazione della MBIC col prodotto Comp. 1 dell'esempio 10 rispetto al D-mannosio sono state utilizzate *multiwell* da 48 pozzetti. Un volume di 200 μ L di prodotto Comp.1 preparato a una concentrazione 2x rispetto alla massima concentrazione in test è stato dispensato nel primo pozzetto e 200 μ L di terreno aggiunto nei successivi pozzetti eseguendo diluzioni seriali 1:2 fino al 8° pozzetto. Infine, 200 μ L di ciascun microrganismo a una concentrazione di 10^5 sono stati inoculati in ogni pozzetto. È stata inoltre valutata l'attività di inibizione del biofilm del D-mannosio alla stessa concentrazione presente nel prodotto Comp.1.

Le *multiwell* sono state incubate a 37°C per 24 ore e quindi rimosso il surnatante presente insieme ai batteri in forma planctonica non adesi alla piastra.

Il biofilm è stato quindi lavato 3 volte con PBS e successivamente tramite incubazione a 60°C per 2 ore fissate le cellule prima della colorazione con *crystal violet*. In ogni pozzetto sono stati dispensati 100 μ L di *crystal violet* sciolto in acqua deionizzata, dopo 5 minuti di incubazione a temperatura ambiente ogni pozzetto è stato infine lavato per tre volte con PBS 1x. L'attività di inibizione del biofilm è stata visualizzata tramite osservazione microscopica allo stereomicroscopio e microscopio ottico in contrasto di fase. Le concentrazioni finali testate per ogni composto sono riportate in Tabella 6.

Tabella 6

	D-mannosio (g/L)	Prodotto in toto (g/L)
--	------------------	------------------------

<i>Escherichia coli</i>	65-0,51	100-0,78
<i>Enterococcus faecium</i>	65-0,51	100-0,78
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	65-0,51	100-0,78

Come mostrano le figure 13, 14, 15 il D-mannosio risulta avere un'attività di inibizione nella formazione di biofilm.

Il D-mannosio risulta attivo su *K. pneumoniae* alla concentrazione di 8,13 g/L e su *E. coli* alla concentrazione di 32,5 g/L. Sul biofilm di *E. faecium* ha attività evidente solo alla concentrazione di 65 g/L.

Risulta evidente che il prodotto Comp.1 secondo forme di realizzazione preferite della presente invenzione risulta avere una attività maggiore rispetto al D-mannosio utilizzato singolarmente e alla stessa concentrazione contenuta nel prodotto Comp.1.

Sorprendentemente, i risultati ottenuti dal test Minima concentrazione inibente del biofilm (MBIC) dimostrano che per ottenere la stessa efficacia della presente invenzione sul biofilm di *E. coli* è necessaria una concentrazione del mannosio, utilizzato singolarmente e alla stessa concentrazione contenuta nel prodotto Comp. 1, circa 2,5 volte superiore. Sorprendentemente, i risultati ottenuti dal test MBIC dimostrano che per ottenere la stessa efficacia della presente invenzione sul biofilm di *K pneumoniae* e *E. faecium* è necessaria una concentrazione del mannosio, utilizzato singolarmente e alla stessa concentrazione contenuta nel prodotto Comp. 1, circa 10 volte superiore.

Esempio 16 - Minima concentrazione inibente del biofilm (MBIC) -attività sinergica con fosfomicina

Il test è stato eseguito secondo il protocollo definito “*broth microdilution checkerboard method*”, ovvero “metodo della scacchiera” che permette di valutare l'effetto inibente di due agenti in contemporanea, incrociando diluizioni seriali degli stessi. In particolare sono state incrociate 8 concentrazioni del prodotto Comp.1 dell'esempio 10 e 6 concentrazioni di fosfomicina. Sono state utilizzate *multiwell* da 48 pozzetti.

Un volume di 200 µL di prodotto Comp.1 preparato a una concentrazione 2x rispetto alla massima concentrazione in test, è stato dispensato nell'ottava colonna e 200 µL di terreno aggiunto nei successivi pozzetti eseguendo diluizioni seriali 1:2 fino al secondo pozzetto

di ogni riga. Successivamente, 200 μ L di fosfomicina a una concentrazione 2x rispetto al valore di MIC (differente per ogni microrganismo) è stato dispensato nella prima riga e sono state eseguite diluizioni seriali 1:2 sulle colonne fino alla penultima riga.

Infine, 200 μ L di ciascun microrganismo a una concentrazione di 10^5 sono stati inoculati in ogni pozzetto. Nelle figure 17 e 19 è rappresentata graficamente la matrice di concentrazioni eseguita per la determinazione del sinergismo anti biofilm in cui sono evidenziate le combinazioni di composti considerate per l'effetto sinergico.

Le *multiwell* sono state incubate a 37°C per 24 ore e quindi rimosso il surnatante presente insieme ai batteri in forma planctonica non adesi alla piastra. Il biofilm è stato quindi lavato 3 volte con PBS e successivamente tramite incubazione a 60°C per 2 ore fissate le cellule prima dello *staining* con *crystal violet*. La colorazione con il *crystal violet* è stata eseguita per valutare l'effetto del prodotto e del D-mannosio sulla formazione del biofilm. In ogni pozzetto sono stati dispensati 100 μ L di *crystal violet* sciolto in acqua deionizzata, dopo 5 minuti di incubazione a temperatura ambiente ogni pozzetto è stato infine lavato per tre volte con PBS 1x. L'attività di inibizione del biofilm è stata visualizzata tramite osservazione microscopica allo stereomicroscopio e microscopio ottico in contrasto di fase.

A seguito del tempo di incubazione sono stati analizzati i risultati ottenuti attraverso la colorazione con *crystal violet*. Sono state acquisite foto al microscopio ottico con un ingrandimento 400x per meglio valutare lo stato del biofilm.

Le figure 16 e 18 riportano a titolo comparativo lo stato del biofilm trattato con il prodotto da solo (B) e alla stessa concentrazione in combinazione con fosfomicina (A).

I dati raccolti mostrano che i biofilm dei microrganismi *Escherichia coli* e *Enterococcus faecium* in alcune combinazioni Comp. 1/fosfomicina risultano ridotti rispetto alla corrispettiva condizione con i prodotti da soli alla stessa concentrazione (figure 16-19).

Per tali combinazioni sono stati quindi calcolati i FIC index secondo la seguente formula:

$$\text{FIC index} = \frac{\text{MBIC fosfomicina in associazione}}{\text{MBIC fosfomicina}} + \frac{\text{MBIC prodotto in toto in associazione}}{\text{MBIC prodotto in toto}}$$

L'associazione risulta sinergica se i valori di FIC index risultano essere < 1 . Quando il FIC index assume valore $= 1$ i composti risultano non interagire tra loro, mentre se il valore risulta > 1 , l'associazione dei composti risulta antagonista.

Sia per il microrganismo *Escherichia coli* che per *Enterococcus faecium* sono state osservate combinazioni di prodotto Comp. 1 e fosfomicina con effetto sinergico sull'inibizione della formazione del biofilm.

RIVENDICAZIONI

1. Composizione comprendente mannosio, N-acetilcisteina, ed almeno un endocannabinoide.
2. La composizione di rivendicazione 1, in cui detto almeno un endocannabinoide è scelto tra anandamide, docosatetraenoiletanolammide, omo-linoleniletanolammide, 2-arachidonoilglicerolo, 2-arachidonil-gliceril-etere, virodamina, N-arachidonoil-dopamina, palmitoiletanolammide, oleoiletanolammide, e loro miscele, preferibilmente detto almeno un endocannabinoide è palmitoiletanolammide.
3. La composizione di rivendicazione 1 o 2, in cui detto mannosio è D-mannosio.
4. La composizione di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-3, in cui detto mannosio è in rapporto in peso da 1:1 a 20:1 rispetto a detto almeno un endocannabinoide o a detta N-acetilcisteina, più preferibilmente in rapporto in peso da 1:1 a 15:1, ancor più preferibilmente da 3:1 a 10:1.
5. La composizione di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-4, in cui detto almeno un endocannabinoide e detta N-acetilcisteina sono in rapporto in peso da 3:1 a 1:3, più preferibilmente in rapporto in peso da 2:1 a 1:2, ancor più preferibilmente circa uguale a 1:1.
6. La composizione di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-5, comprendente ulteriormente ibisco e/o lattobacilli, preferibilmente della specie *L. rhamnosus*.
7. La composizione di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-6, in forma di dose unitaria comprendente 100-1000 mg di detto almeno un endocannabinoide, 100-1000 mg di N-acetilcisteina, 500-5000 mg di mannosio.
8. La composizione di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-7, in forma di dose unitaria comprendente:

- palmitoiletanolammide	600 mg
- N-acetilcisteina	600 mg
- D-mannosio	3000 mg
oppure	
- palmitoiletanolammide	300 mg
- N-acetilcisteina	300 mg
- D-mannosio	1500 mg
oppure	
- palmitoiletanolammide	600 mg
- N-acetilcisteina	600 mg
- D-mannosio	3000 mg
- ibisco	400 mg
oppure	
- palmitoiletanolammide	300 mg
- N-acetilcisteina	300 mg
- D-mannosio	1500 mg
- ibisco	200 mg
oppure	
- palmitoiletanolammide	600 mg
- N-acetilcisteina	600 mg
- D-mannosio	3000 mg
- <i>L. rhamnosus</i> LR04	2x 10 ⁹ UFC
oppure	
- palmitoiletanolammide	300 mg
- N-acetilcisteina	300 mg
- D-mannosio	1500 mg
- <i>L. rhamnosus</i> LR04	1x 10 ⁹ UFC
oppure	
- palmitoiletanolammide	600 mg
- N-acetilcisteina	600 mg
- D-mannosio	3000 mg
- ibisco	400 mg

- *L. rhamnosus* LR04 2x 10⁹ UFC
- oppure
- palmitoiletanolammide 300 mg
- N-acetilcisteina 300 mg
- D-mannosio 1500 mg
- ibisco 200 mg
- *L. rhamnosus* LR04 1x 10⁹ UFC

9. Prodotto farmaceutico comprendente la composizione dell'invenzione ed almeno un antibiotico.

10. La composizione di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-8 o il prodotto farmaceutico della rivendicazione 9, per l'uso nel trattamento delle infezioni urinarie e/o dei disordini ad esse associati.

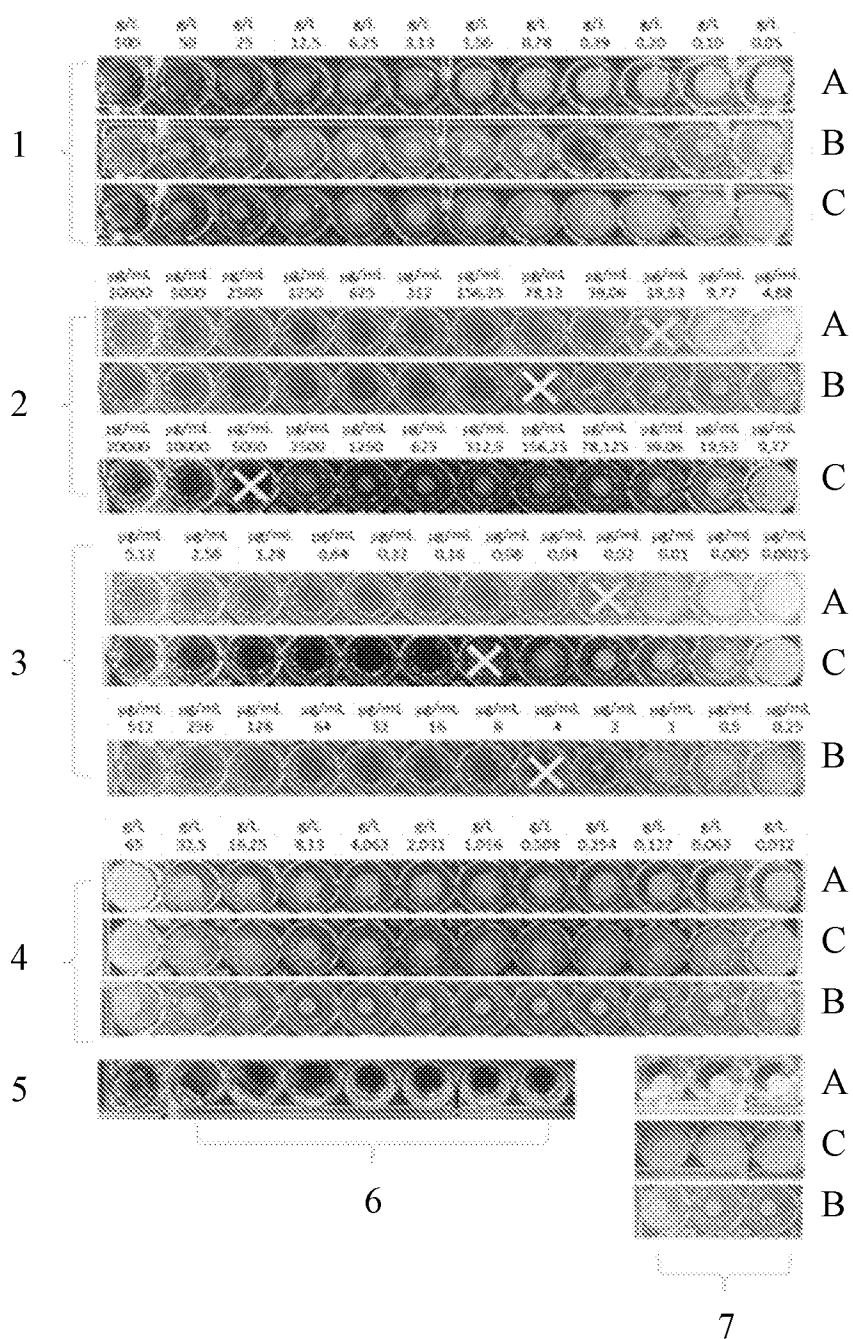


Figura 1

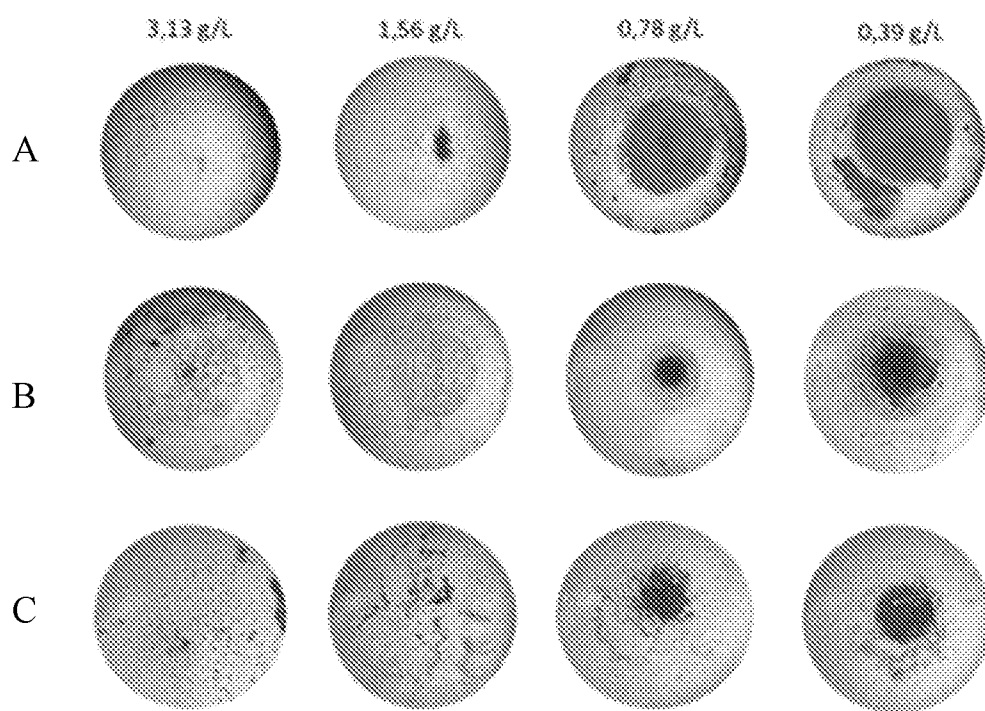


Figura 2

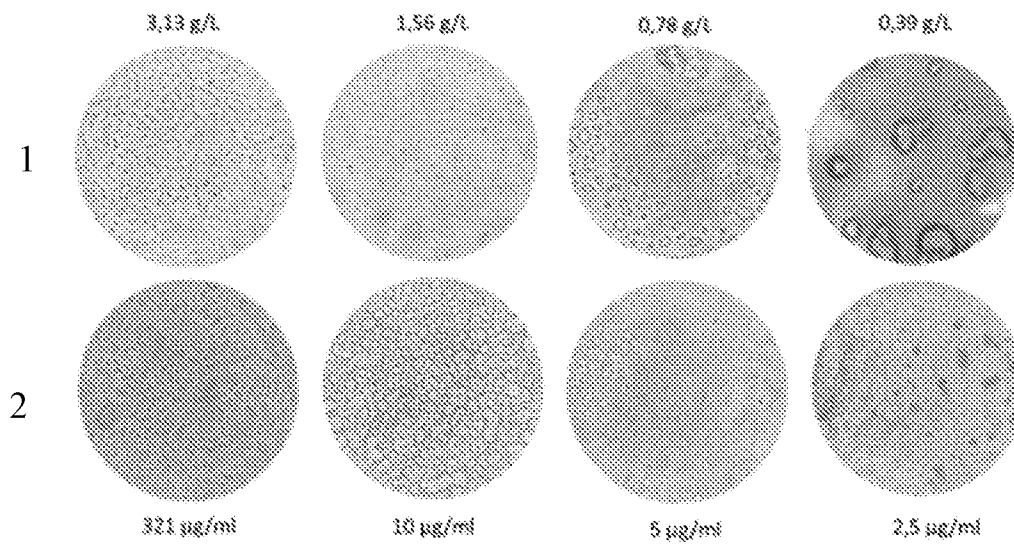


Figura 3

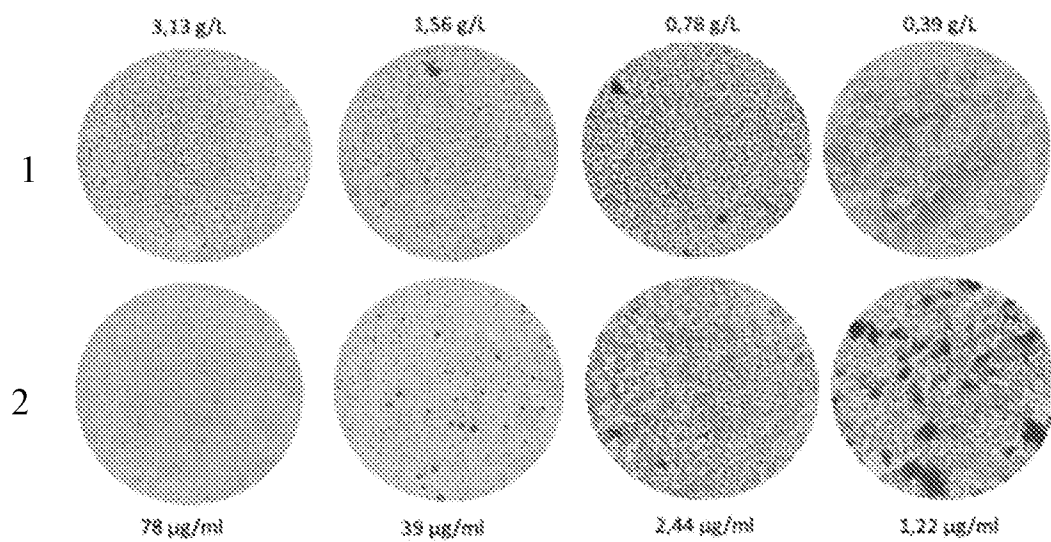


Figura 4

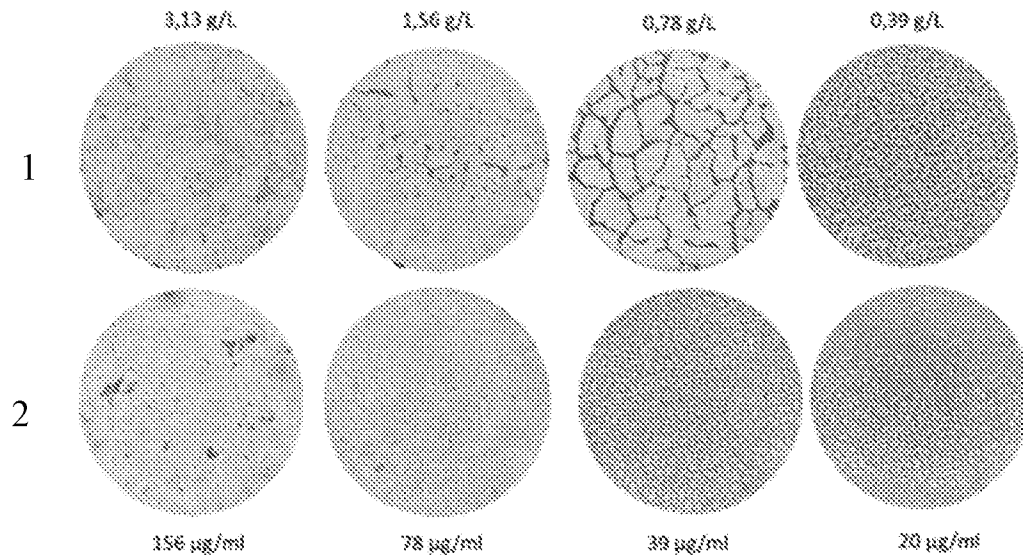


Figura 5

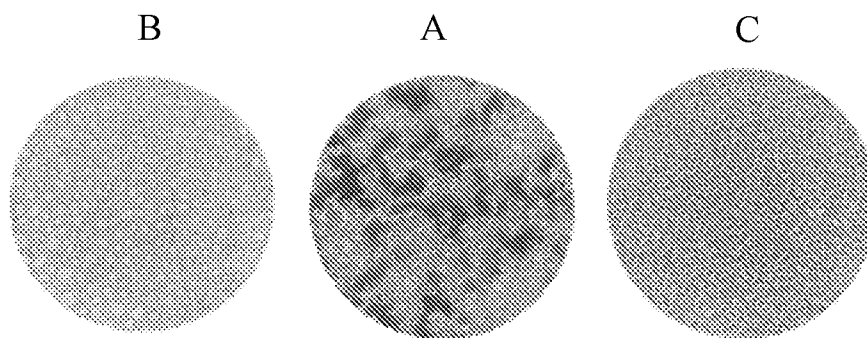


Figura 6

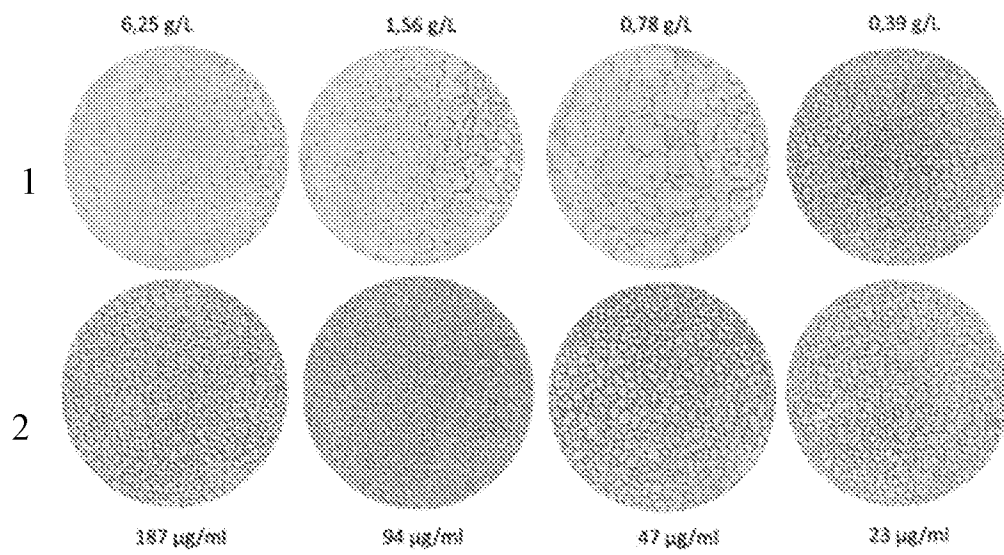


Figura 7

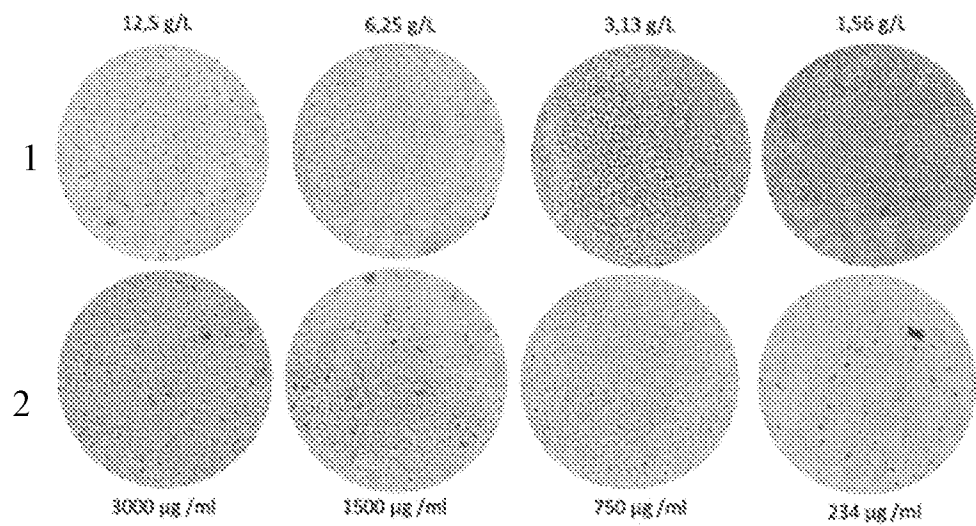


Figura 8

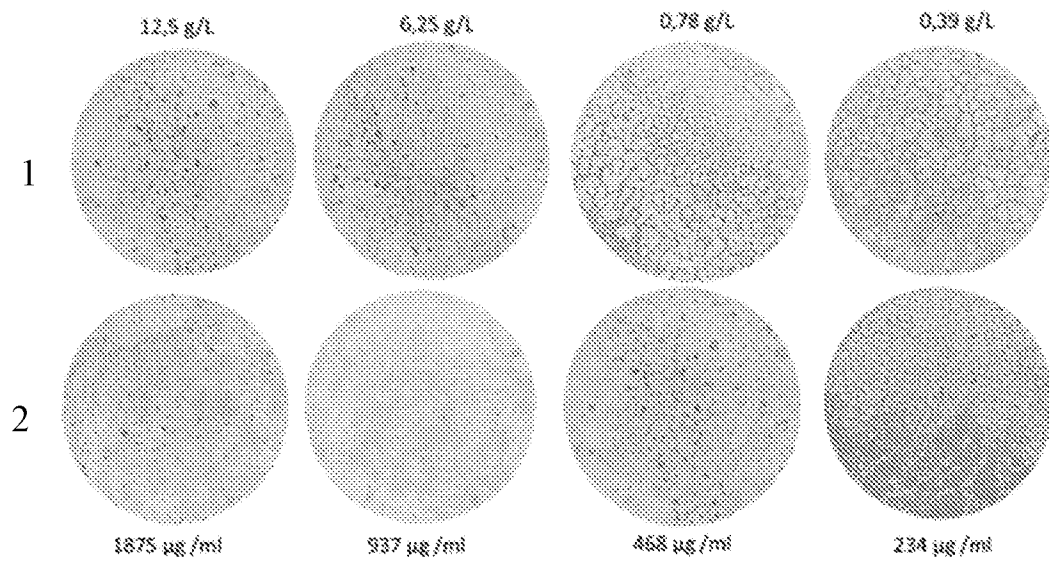


Figura 9

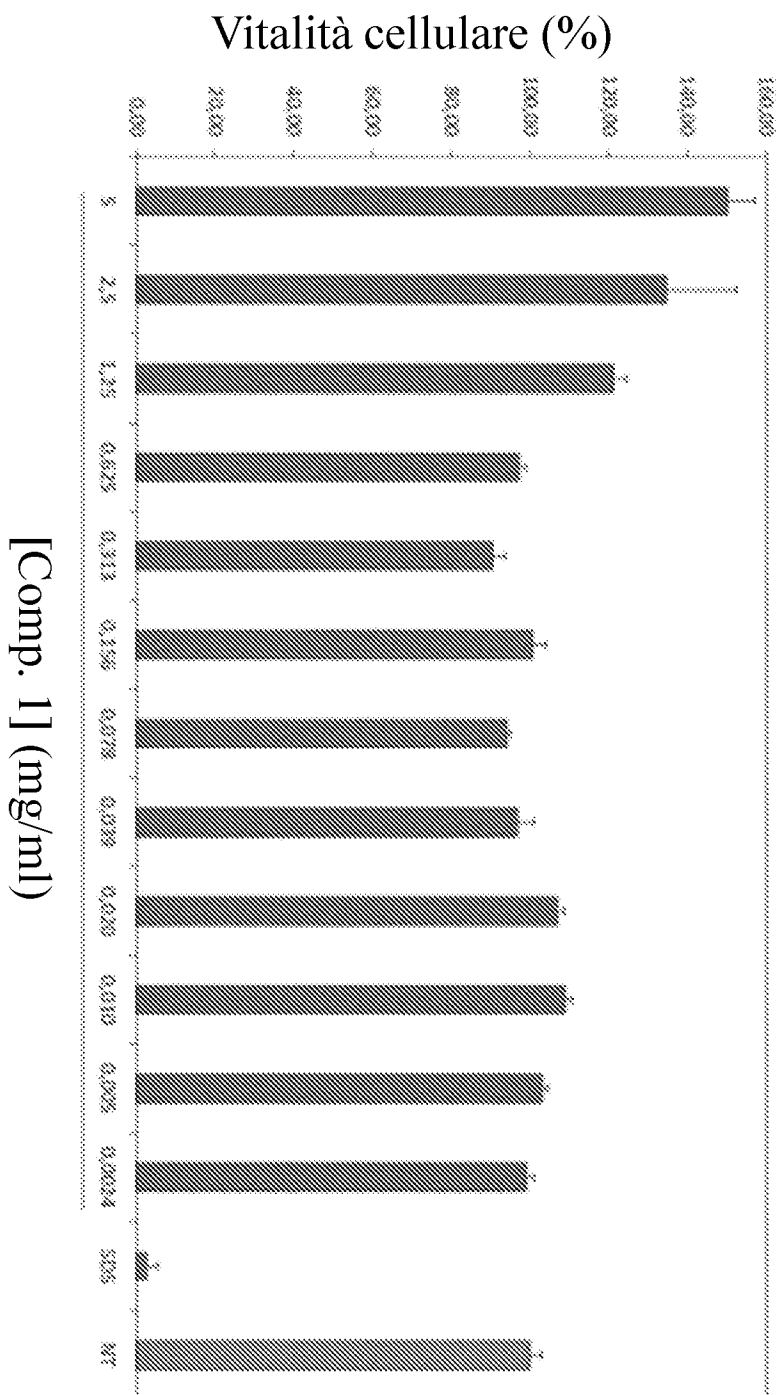


Figura 10

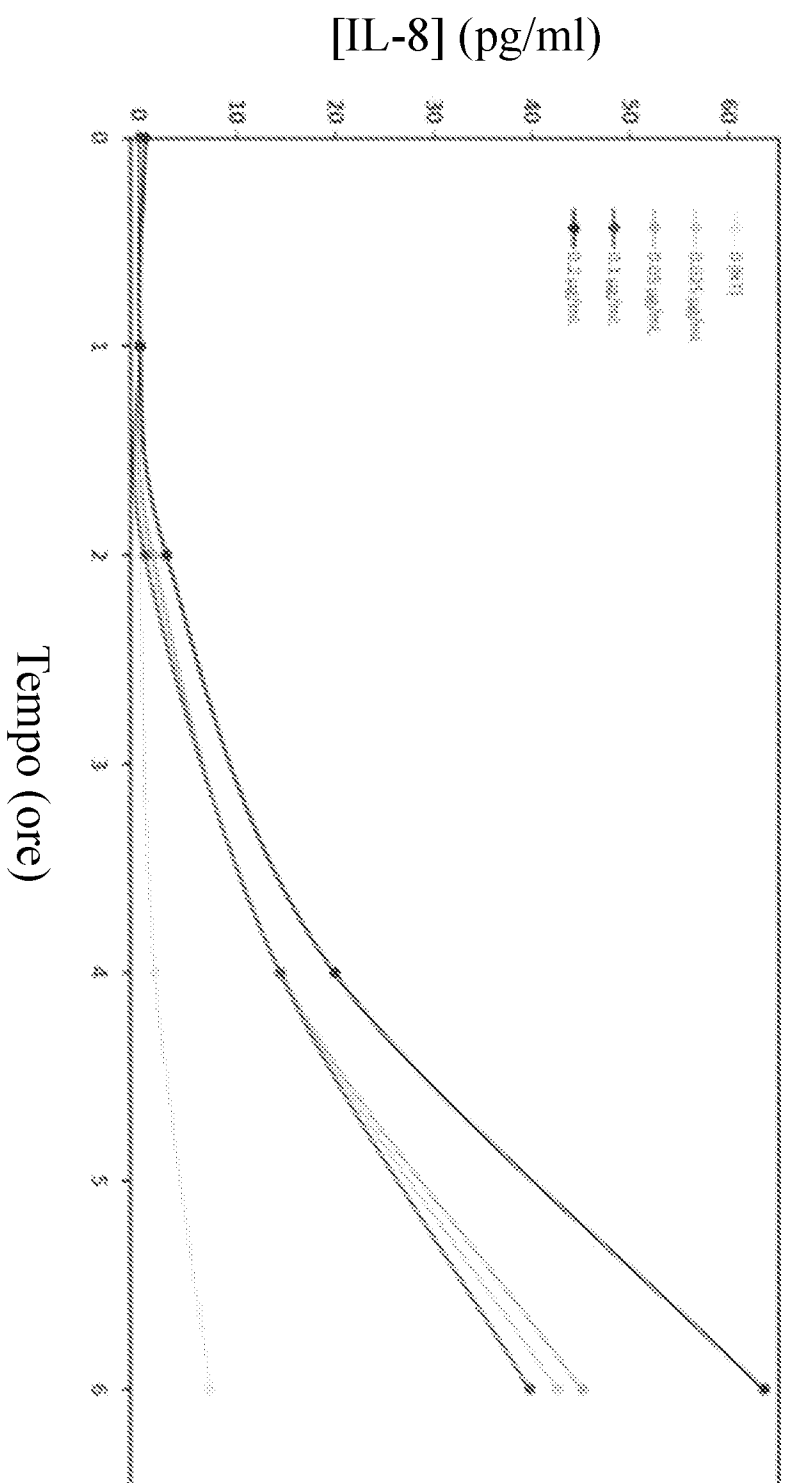


Figura 11

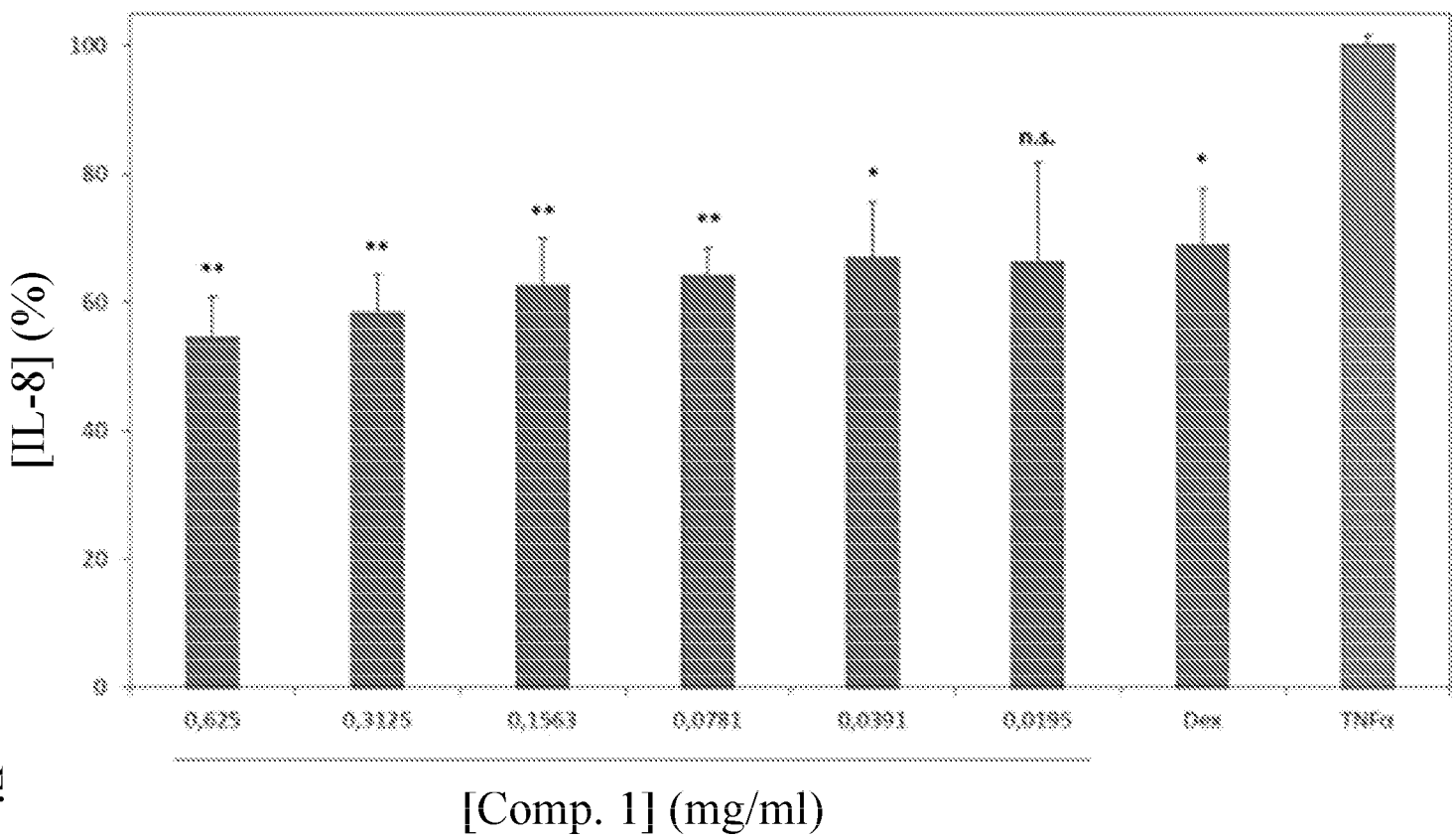


Figura 12

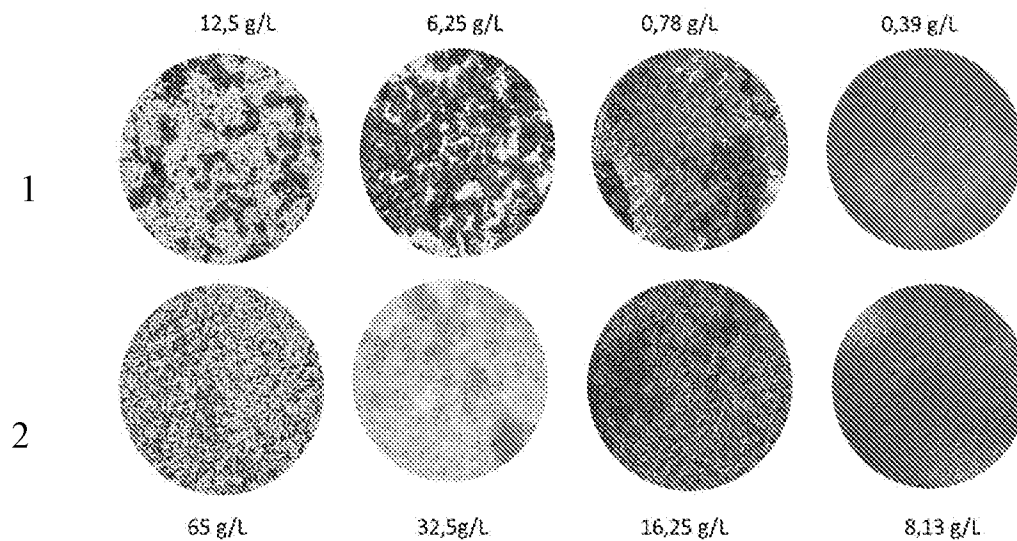


Figura 13

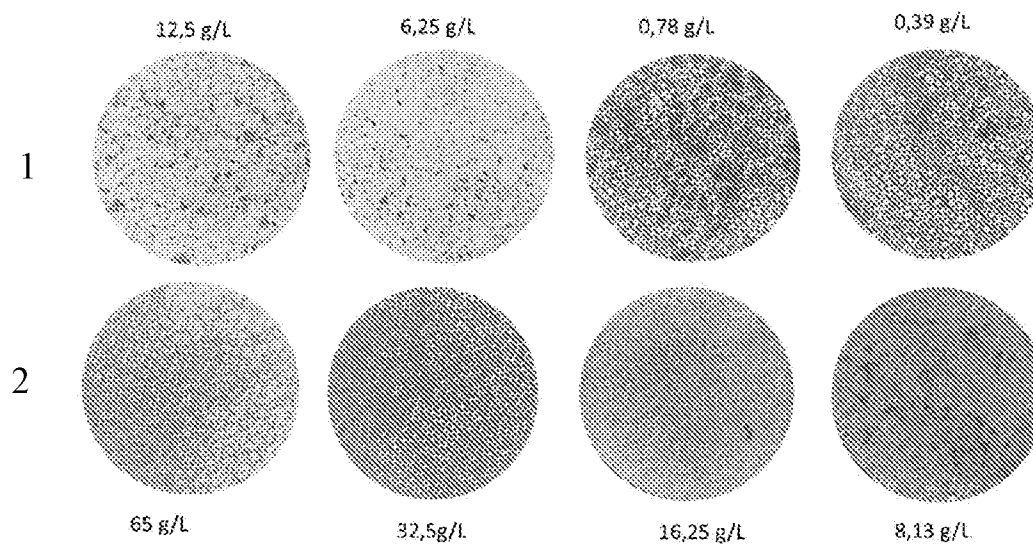


Figura 14

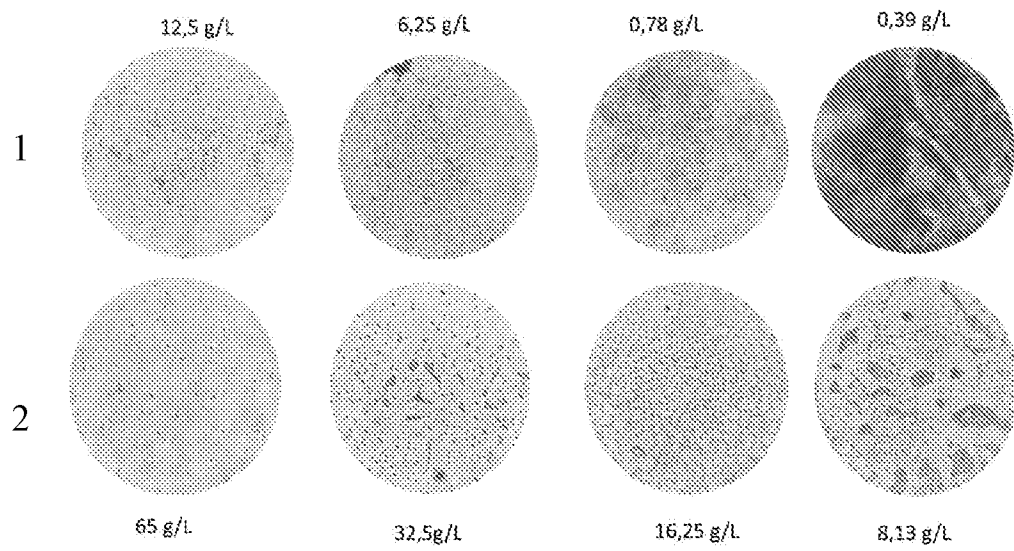


Figura 15

12/13

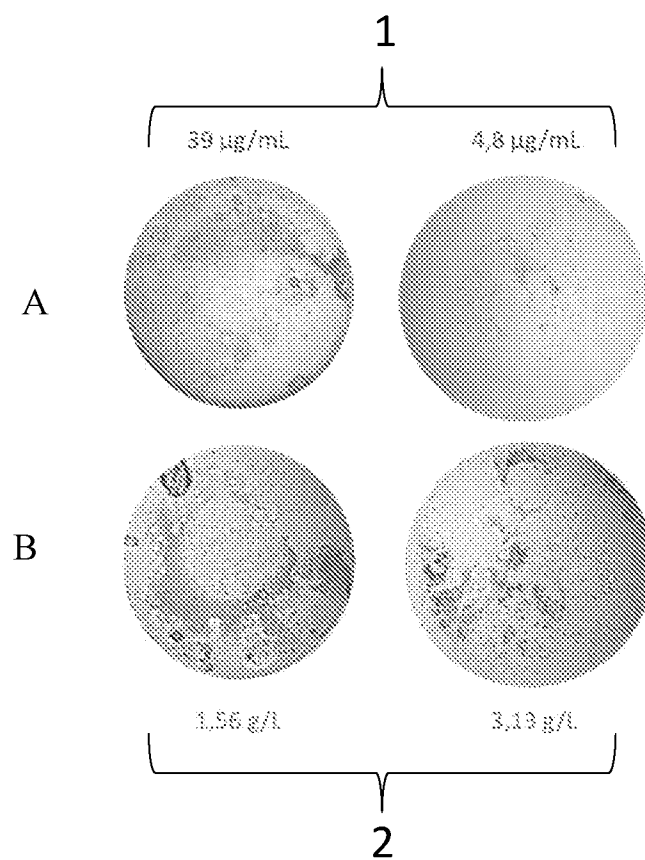


Figura 16

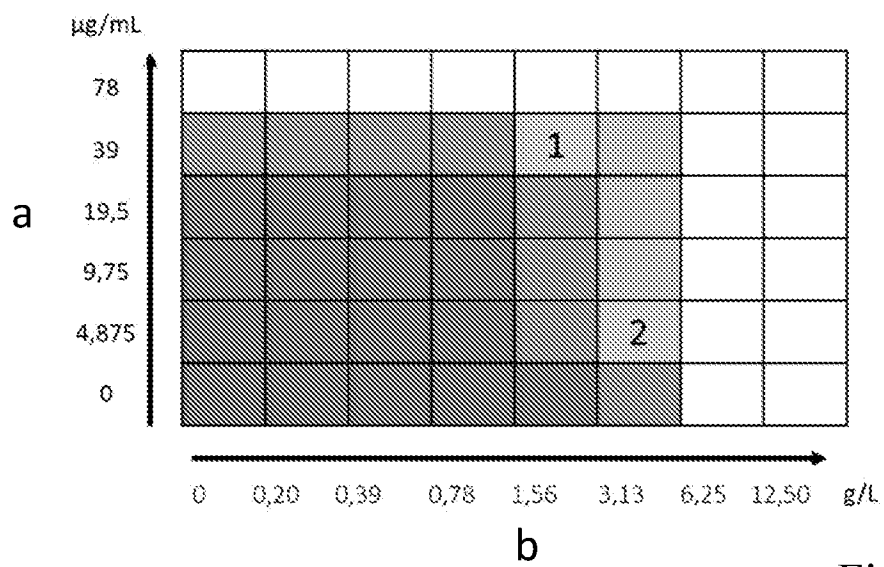
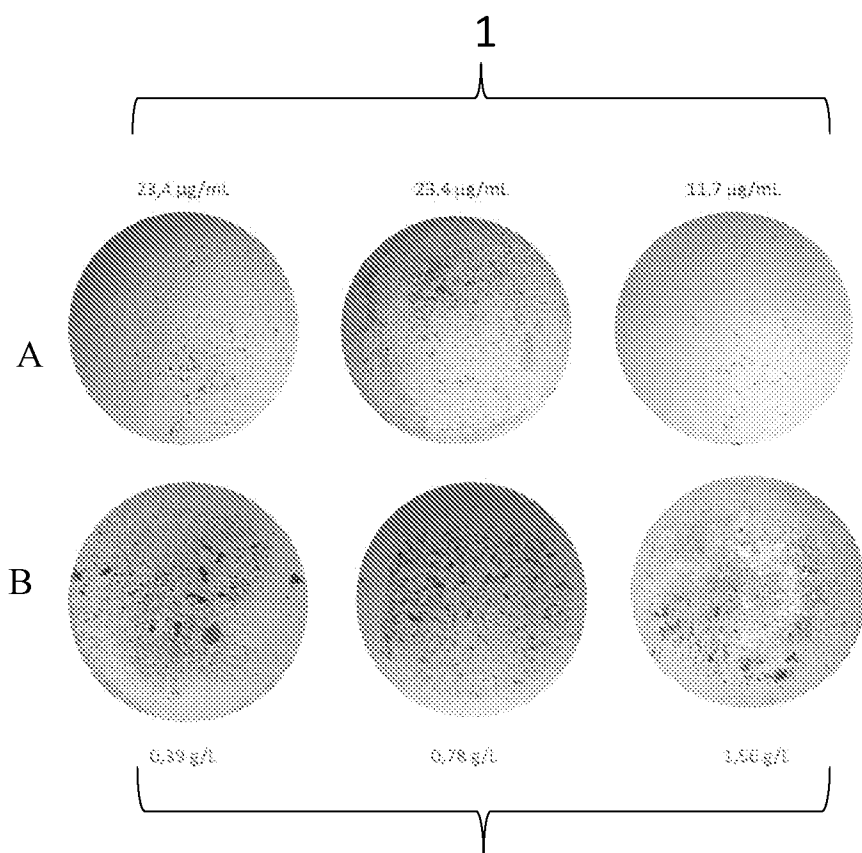


Figura 17

13/13



2

Figura 18

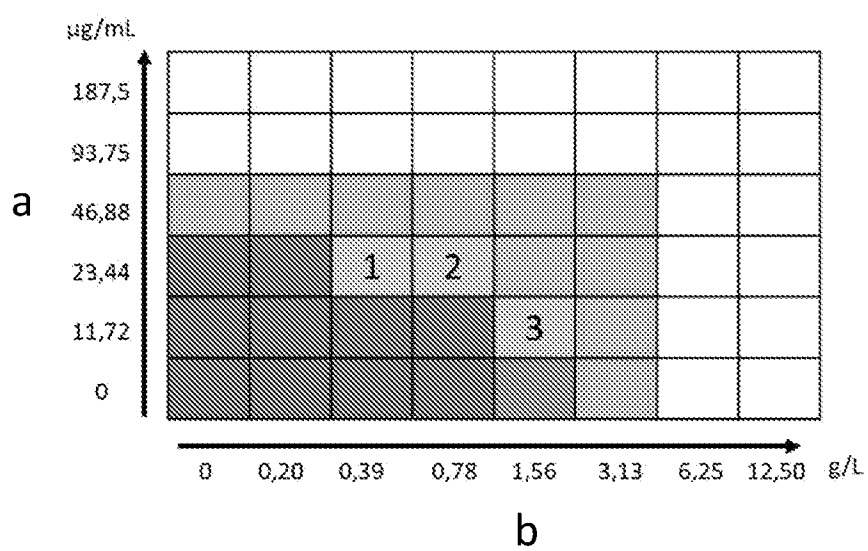


Figura 19