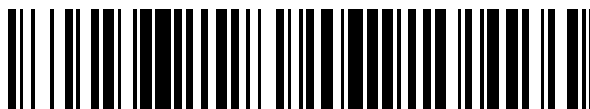


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 773 128**

51 Int. Cl.:

A61K 47/61 (2007.01)
C08B 37/00 (2006.01)
C08B 37/08 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A61P 15/00 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.09.2013** **PCT/IB2013/058842**
87 Fecha y número de publicación internacional: **03.04.2014** **WO14049532**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.09.2013** **E 13824348 (0)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2019** **EP 2900274**

54 Título: **Conjugado de un fragmento de una pared celular de una bacteria y un transporte mucopolisacárido, y usos en medicina de los mismos**

30 Prioridad:

25.09.2012 IT MI20121597

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.07.2020

73 Titular/es:

AILEENS PHARMA S.R.L. (100.0%)
Via Donatori del Sangue, 1
20834 Nova Milanese (MB) , IT

72 Inventor/es:

LONGO, SONIA y
BIZZINI, BERNARD

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 773 128 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Conjugado de un fragmento de una pared celular de una bacteria y un transporte mucopolisacárido, y usos en medicina de los mismos

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a un conjugado de un fragmento de una pared celular de una bacteria y un transporte mucopolisacárido, y usos en medicina de los mismos.

La presente invención se origina en el sector de productos para uso médico, en particular previstos para aplicación tópica.

Estado de la técnica

- 10 Los sistemas de defensa naturales del cuerpo humano protegen al organismo de agresiones desde el medio externo.
- De forma notoria, la primera barrera para agresiones externas, tales como las de tipo microbico, tóxico o ambiental, está en la piel, que actúa como una barrera física.

- 15 Los agentes de inmunidad naturales (no específicos) que constituyen el frente de defensa inmune intervienen a nivel subcutáneo-submucoso cuando esta barrera es cruzada, tal como en caso de infecciones bacterianas o víricas particularmente virulentas o en presencia de una lesión en la piel. Estos agentes son principalmente macrófagos y algunos factores sanguíneos, tales como los componentes del sistema inmune. La función de los macrófagos (células polinucleadas) es ingerir y matar a los agresores, que consisten normalmente en bacterias, hongos o virus.

- 20 La mayor parte del tiempo el frente de defensa puede eliminar el agente agresor, aunque el segundo frente de defensa (inmunidad adaptativa específica, de tipo tanto mediado por anticuerpo humoral como mediado por célula, que pone células citotóxicas en circulación) se activa cuando el agente es excesivamente virulento.

- 25 La inducción de inmunidad específica es el resultado del "proceso" implementado por los macrófagos en los antígenos de los agresores y la presentación de antígenos dados a las células implicadas en las respuestas mediadas por células o humorales. Los macrófagos epidérmicos son células de Langerhans, células dendríticas y queratinocitos capaces de "procesar" los antígenos; además, estas células liberan citoquinas, que atraen linfocitos hacia el sitio de la agresión provocando que se desarrolle una reacción de defensa inflamatoria.

Sin embargo, los macrófagos no serán capaces de contrastar la agresión y una condición de enfermedad se establecerá si el estado inmune del organismo está comprometido, p.ej., debido al uso prolongado de tratamientos antibióticos, infecciones, tumores activos, o si el agente patógeno es particularmente virulento.

- 30 En condiciones normales, los macrófagos no pueden asegurar su función cuando el agente invasor es una población excesivamente grande de microorganismos, o en el caso de un microorganismo de desarrollo intercelular, tal como por ejemplo una bacteria (*L. monocytogenes*), un hongo (*C. albicans*) o un virus, tal como el virus del herpes, que tiene una acción inmunosupresora adicional.

- 35 Las sustancias llamadas "inmunomoduladoras" pueden administrarse para restaurar la funcionalidad de macrófagos debilitados o para potenciar sus actividades implicadas en una agresión particularmente severa. Generalmente, estas son microorganismos inactivos que son capaces de estimular el sistema inmune, tal como por ejemplo, *M. tuberculosis* y derivados del mismo, que se usan como componentes adyuvantes de Freund en la preparación de vacunas parenterales, y otros productos que estimulan el sistema reticuloendotelial y fortalecen la defensa inmune.

- 40 La alteración del sistema inmune es uno de los aspectos más relevantes de las patologías cutáneas-mucosas, tal como por ejemplo trastornos infecciosos, inflamatorios, alérgicos, vasculares, en que está implicada una pluralidad de mecanismos.

La solicitud de patente internacional WO 01/68128A1 describe conjugados de una toxina de *Corynebacterium diphtheria* y un polisacárido de *Streptococcus pneumoniae* como vacuna frente a la difteria.

- 45 La solicitud de patente europea EP 2 201 961 A1, en el ejemplo 3, describe una vacuna que contiene 10 µg de polisacárido capsular de meningococo grupo C conjugado con 15 µg de proteína CRM197 de *Corynebacterium diphtheria*.

La solicitud de patente internacional WO 2009/143413A1 describe un conjugado de un polisacárido y una proteína de fusión que contiene un antígeno bacteriano, p.ej., *Corynebacteria*.

La solicitud de patente europea EP 0 497 525 A2 describe un conjugado de un polisacárido y una proteína inmunogénica para provocar la respuesta inmune al polisacárido.

La solicitud de patente europea EP 1 234 584 A1 describe la preparación de un complejo de quitosano y una fracción de partícula *Corynebacterium* deslipidada.

La solicitud de patente europea EP 1 243 256 A1 también describe la preparación de un complejo de quitosano y una fracción de partícula *Corynebacterium* deslipidada.

- 5 Morales A et al., en el artículo "838 Phase 1 study with mycobacterial cell wall extract and hyaluronic acid for the intraprostatic treatment of localized prostate cancer en los suplementos de urología europeos vol. 3, núm. 2, 838 de febrero de 2004, página 212, describe el uso médico de un extracto de *Corynebacterium granulosum* deslipidado que se llama P40.

- 10 La solicitud de patente internacional WO 2009/149155 A1 describe un extracto de *Corynebacterium granulosum* deslipidado, que se identifica como P40.

Actualmente, se siente la necesidad de preparados inmunoestimulantes, que aplicados localmente son capaces de activar una respuesta de anticuerpo en respuesta a infecciones de origen diverso, tal como infecciones bacterianas, víricas o fúngicas.

- 15 Es uno de los objetos generales de la presente invención proporcionar un producto para la aplicación tópica que cruza las capas externas de la epidermis alcanzando las capas más profundas en que pueden promover una respuesta de inmunidad no específica natural adecuada y/o una respuesta de inmunidad adaptativa específica.

Compendio

- 20 Los inventores de la presente invención han identificado, de acuerdo con un aspecto de la invención, la posibilidad de activar y/o promover algunos mecanismos de defensa inmune endógenos no específicos aplicando localmente un producto en la piel, en que fracciones de una pared celular de una bacteria se conjugan con transportes específicos que permiten cruzar la barrera de la piel y alcanzar las zonas en que están situadas las células inmunocompetentes.

En vista de los objetos mencionados anteriormente, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un conjugado para usar como se define en la reivindicación 1.

- 25 Según algunas realizaciones, se describe un conjugado de un fragmento o fracción de pared celular de *Corynebacterium granulosum* P40 y un transporte basado en mucopolisacárido fisiológicamente aceptable o una fracción mucopolisacáridica fisiológicamente aceptable.

- 30 El solicitante ha observado sorprendentemente que los conjugados de P40-fracción mucopolisacáridica covalentes cuando se aplican en mucosas o piel, determinan un efecto sinérgico para el tratamiento de afecciones dérmicas alérgicas, trastornos (tales como grasa, arrugas, envejecimiento de la piel), infecciones, inflamaciones (tales como eczemas, soriasis, acné, eritemas, quemaduras, úlceras) o afecciones de la matriz vascular (tales como venas varicosas, flebitis, tromboflebitis, trombosis vascular periférica).

- 35 La acción sinérgica se determina en parte por el hecho de que los mucopolisacáridos en forma conjugada con P40 aplicados en la piel o mucosas ponen en contacto fragmentos celulares de partículas insolubles con el tejido cutáneo/subcutáneo, promoviendo así la activación de células inmunocompetentes subcutáneas y mecanismos de inmuno-defensa y endógenos no específicos.

De acuerdo con un aspecto específico, la presente invención se refiere a un conjugado de un fragmento de una pared celular de una bacteria que pertenece al género *Corynebacterium*, en particular *Corynebacterium granulosum*, y un transporte fisiológicamente aceptable, que comprende un mucopolisacárido o una fracción mucopolisacáridica para uso externo como un medicamento para modular la respuesta inmune o de anticuerpos de la piel y/o mucosa.

- 40 De acuerdo con un tercer aspecto, un conjugado de un fragmento de una pared celular de una bacteria que pertenece al género *Corynebacterium* y un transporte fisiológicamente aceptable, que comprende un mucopolisacárido o una fracción mucopolisacáridica se describe para uso tópico en el tratamiento de infecciones bacterianas, víricas o fúngicas.

- 45 De acuerdo con un aspecto, la presente invención se refiere a un conjugado de un fragmento de una pared celular de *Corynebacterium granulosum* y un transporte fisiológicamente aceptable que comprende un mucopolisacárido o una fracción mucopolisacáridica para usar en el tratamiento tópico de afecciones o patologías dermatológicas.

- 50 De acuerdo con un aspecto, la presente descripción se refiere a un conjugado de un fragmento de una pared celular de una bacteria que pertenece al género *Corynebacterium* y un transporte fisiológicamente aceptable que comprende un mucopolisacárido o una fracción mucopolisacáridica para uso tópico en el tratamiento de trastornos o afecciones de piel alérgicas.

De acuerdo con un aspecto, la presente descripción se refiere a un conjugado de un fragmento de una pared celular de una bacteria que pertenece al género *Corynebacterium* y un transporte fisiológicamente aceptable que comprende

un mucopolisacárido o una fracción mucopolisacarídica y un excipiente farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable.

De acuerdo con algunas realizaciones, la composición de la invención se adapta para la aplicación tópica.

- 5 De acuerdo con un aspecto adicional, la presente descripción se refiere a un conjugado de un fragmento de una pared celular de una bacteria que pertenece al género *Corynebacterium*, en particular *Corynebacterium granulosum* (P40) y un transporte basado en colágeno fisiológicamente aceptable y a usos en medicina de los mismos, con referencia particular a las aplicaciones descritas en adelante.

Descripción detallada de la invención

- 10 Según aspectos dados de la invención, el solicitante encontró que conjugando una fracción insoluble aislada de la bacteria *Corynebacterium granulosum*, llamada P40, con un mucopolisacárido o una fracción mucopolisacarídica, el P40 puede llevarse a las capas profundas de la piel para estimular la actividad macrófaga de las células de Langerhans y de los queratinocitos, determinando así una respuesta de inmunidad no específica local y una respuesta de inmunidad adaptativa específica.

- 15 De acuerdo con un primer aspecto, la presente invención proporciona un conjugado de un fragmento de pared celular de *Corynebacterium granulosum* y de un transporte fisiológico aceptable en donde el fragmento de pared celular es P40 y el transporte fisiológicamente aceptable comprende un mucopolisacárido o fracción mucopolisacarídica fisiológicamente aceptable para uso externo como medicamento para modular la respuesta inmune o de anticuerpos de la piel y/o mucosa.

- 20 En el alcance de la invención, la expresión "fragmento de una pared celular" significa una parte de la pared celular de P40.

El término "P40" como se usa en la presente memoria significa una fracción insoluble o fragmento aislado a partir de la bacteria *Corynebacterium granulosum*. Como un inmunoestimulante no específico, *Corynebacterium granulosum* P40 activa el sistema reticuloendotelial, induce la producción de ciertas citoquinas, mejora la actividad de los macrófagos, y potencia una respuesta de hipersensibilidad tipo retrasada cuando se co-administra con un antígeno.

- 25 De acuerdo con algunas realizaciones, el fragmento de pared celular de *Corynebacterium granulosum* llamado P40 se obtiene según el método descrito en la publicación por B. Bizzini, B. Maro y P. Lallouette, Isolement et caractérisation d'une fraction, dite fraction P40 à partir de *Corynebacterium granulosum*, Med. et Mal. Infect., 1978, 408-414.

- 30 En algunos aspectos, la descripción se refiere a un conjugado de P40 y un mucopolisacárido fisiológicamente aceptable o una fracción mucopolisacarídica.

En algunas realizaciones, el fragmento de pared celular de una bacteria P40 presente en el conjugado de la invención se deslipida, es decir, se trata como para eliminar o reducir considerablemente el componente lipídico de la pared celular de la bacteria por medio de técnicas químicas.

- 35 Por ejemplo, la bacteria, en particular *Corynebacterium granulosum*, se deslipida antes de romperse para producir los fragmentos de pared celular, como en el caso de la fracción P40.

Típicamente, los fragmentos deslipidados de pared celular comprenden azúcares y cadenas peptídicas, típicamente unidos los unos a los otros en glucopéptidos que forman una malla apretada. Los azúcares típicos de la pared celular comprenden ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina.

- 40 Se ha observado que los fragmentos o lisatos de paredes de *C. granulosum* estimulan la actividad macrófaga de las células de Langerhans y de los queratinocitos, que están implicados en la respuesta inmune natural no específica y, de forma secundaria, en la respuesta inmune adaptada específica.

Una ventaja que se deriva del uso de fragmentos (P40) de pared de *Corynebacterium granulosum* en el conjugado se determina por la ausencia de absorción cuando el conjugado se administra tópicamente; de esta manera, los riesgos de comienzo de efectos secundarios no deseados o toxicidad sistemática están considerablemente limitados.

- 45 Los fragmentos de pared celular P40 se ha probado que son capaces de desarrollar un alto número de efectos farmacológicos, tales como, por ejemplo:

- inhibir el desarrollo del tumor L1210 en ratones (E.H. Relyveld, B. Bizzini, R. Ophir y S. Ben-Efraim, Synergy between low-dose chemotherapy and immunotherapy in mouse 1210 leukemia, Cancer Treatment Report, 1987, 71, 241-246), efectos adyuvantes (E. Henocq, J.C. Bazin, B. Bizzini y J. Reynier, Adjuvant P40 et réactions cutanées à l'antigène. Med. Mal. Infect., 1978, 8, 415-421), efectos inmunomoduladores (B. Bizzini, E. Henocq, J. Reynier y E.H. Relyveld, Experimental and clinical results with the *Corynebacterium granulosum*-derived immunomodulator P40, Asian Pacific J. Allergy ANG immunol., 1984, 2, 144-155), efectos en fagocitosis (L. Jacques, B. Bizzini y 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 y P. Mastroeni, B. Bizzini, L. Bonina, D. Iannello, et al. The restoration of impaired macrophage functions using an immunomodulator the *Corynebacterium granulosum*-derived P40 fraction, *Immunopharmacology*, 1985, 10, 27-34);

- 5 - efectos en infecciones bacterianas (B. Bizzini y 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), efectos en infecciones víricas (M. Fattal-German y B. Bizzini, the *Corynebacterium granulosum*-derived P40 immunomodulator exerts synergistic effect on the activity of antiviral drugs in the treatment of experimental viral infections, *Biomed. Pharmacother.*, 1988, 42, 217-220), inducción de citoquinas (B. Bizzini, M. Carlotti, M. Fattal-German, 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, *FEMS Microbiol. Immunol.* 1992, 105, 171-180), efectos en las infecciones de *E. coli* (Mathieu, D., Jacques, L., Auer, J. y B. Bizzini, *E. Coli* infections of the lower urinary tract and their treatment by immunomodulation o combined immunomodulation and antigenic therapy, *Biomed. Pharmacother.* 1988, 42, 271-278).
- 10 Muchos ensayos clínicos se han realizado en la fracción P40 en relación con infecciones recurrentes del sistema respiratorio (M.R. Ickovic, E. Henocq, E.H. Relyveld y B. Bizzini, Effect of immunomodulation with the *Corynebacterium granulosum*-derived Immunomodulator P40 on patients with recurring respiratory infections. *J. Asthma*, 1984, 21, 29-33, y E. Henocq, R. Veronesi, E.H. Relyveld y 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
- 20 vaccinotherapy, *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 1984, 26, 105-109), con infecciones recurrentes del tracto urinario-genital (E. Henocq, G. Arvis, M.C. Delsaux y B. Bizzini, Traitement des infections urogénitales récidivantes par immunomodulation, *Ann. Urol.*, 1985, 19, 371-375), con trastornos alérgicos (E. Henocq, A. Prouvost-Danon y B. Bizzini, Preliminary experimental and clinical results with inactivated allergens conjugated to the *Corynebacterium granulosum*-derived immunomodulatory P40, *Boll. Ist. Sieroter. Milán*, 1987, 66, 70-77) y a cáncer de mama (J. Reynier, B. Bizzini, J.C. Bazin y R. Villet, Immunocompetence, immunostimulation: Experimental facts and clinical perspectives. *Advances in Immunomodulation*, Eds. B. Bizzini y E. Bonmassar. Pythagora Press: Roma-Milán, 1988, págs. 345-362, y 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).

- 30 En el conjugado de la invención, el transporte fisiológicamente aceptable comprende al menos un mucopolisacárido o una fracción mucopolisacárida.

Típicamente, los mucopolisacáridos o glucosaminoglucanos sulfatados, también conocidos como GAGs, en el conjugado de la invención comprenden cadenas de polisacáridos no ramificados que consisten en unidades repetidas de disacáridos. Típicamente, las unidades de repetición están basadas en una hexosa o un ácido hexurónico unido a una hexosamina.

- 35 Al ser hidrófilos, los mucopolisacáridos del conjugado de la invención pueden unirse fácilmente con agua y penetrar en las capas más profundas de la piel.

Los mucopolisacáridos portan la fracción de pared bacteriana y realizan una parte activa en la funcionalidad celular, primeramente en la adhesión, porque están asociados con los tejidos de membrana basal, que están en contacto con las células.

- 40 Por consiguiente, el conjugado del fragmento de pared bacteriana P40, y del transporte mucopolisacárido realiza la función de facilitar y extender el contacto del fragmento de pared bacteriana con la piel y permitir al fragmento de pared bacteriana desarrollar totalmente sus efectos de estimulación en las células de Langerhans y en los queratinocitos.

- De acuerdo con algunas realizaciones, los mucopolisacáridos o fracciones mucopolisacáridas contenidas en el conjugado de la invención se seleccionan del grupo que comprende ácido hialurónico (HA), condroitin-4-sulfato (C4SA), condroitin-6-sulfato (C6SC), sulfato de dermatano (DS-condroitin-sulfato B), sulfato de heparina (HS), heparina (HP) y queratano-sulfato (KS).

- 45 Aquellos más presentes en la dermis humana son I-HA y DS, mientras que se encuentran menores cantidades de C6SC y C4SA HS y HP están presentes generalmente en vasos sanguíneos y tejido nervioso (R. Fleischmajer et al., *Dermal specificity*, *J. Invest. Dermatol.*, 1970, 54, 472, K. Meyer et al., *The acid mucopolysaccharides of connective tissue*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1956, 21, 506).

- 50 Un mucopolisacárido adecuado es ácido hialurónico, una sustancia presente en la piel en forma sencilla y como proteoglucano. Típicamente, el peso molecular puede variar según el tejido del que se extraiga, y está comprendido entre $7,7 \times 10^4$ a la cuarta potencia y 6×10^6 a la sexta potencia (T.C. Laurent et al., *Fractionation of hyaluronic acid. The polydispersity of hyaluronic acid from the bovine vitreous body*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1960, 42, 476). Es común en
- 55 órganos y tejidos, en particular en fluido sinovial (Scher, I., et al. *Biochem. J.* 1972, 126, 1073), el cuerpo vítreo del ojo y tejido conectivo (H. Schubert et al., *A primer on connective tissue biochemistry*, 968, Lea y Febiger, Filadelfia). Las funciones descritas para este polisacárido incluyen la capacidad de interferir con el movimiento intra/extracelular de

- agua (J.H. Fessler, A structural function of mucopolysaccharides in connective tissue. *Biochem. J.*, 1960, 76, 124) y de disolución (T.C. Laurent et al., Interaction between polysaccharides and the macromolecules. The transport of glomerular particles through hyaluronic acid solutions, *Biochim. Biophys. Acta & C.*, 78,351) y la capacidad de estimular la reparación fisiológica y remodelado tisular (B.P. Toole et al., *Morphogenic recognition*, Ed. S.H. Barondes, 1976, 275, Plenum Press, NY).
- Otro mucopolisacárido adecuado es sulfato de condroitina. Esta sustancia está incluida en un grupo de polisacáridos heterogéneos tanto en términos de estructura como de sulfatación, porque puede estar sulfatado o contener un sulfato en la posición 4 de la galactosamina (CSA) o en la posición 6 (CSC), o ambas posiciones.
- Por medio del ejemplo, el peso molecular de CSA y CSC puede estar comprendido entre 5000 y 50.000 (W.D. Comper et al., Physiological function of connective tissue polysaccharides, *Physiol. Rev.*, 1978, 58, 255). El sulfato de condroitina tiene una alta carga polianiónica, y esto explica su interacción con la migración intracelular de compuestos según los bio-mecanismos implicados en dicho nivel. Está particularmente presente en cartílago (R. Amado et al., *FEBS Lett.*, 1974, 39, 49).
- Otro mucopolisacárido adecuado es sulfato de queratano.
- Hay dos tipos principales de sulfato de queratano (KS) (K. Meyer et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1956, 21, 506), uno situado exclusivamente en la córnea y el otro presente en muchos tejidos esqueléticos (núcleo pulposo, cartílago, hueso).
- La mayor diferencia entre los dos tipos está en la unión de proteína; de hecho, mientras el queratano de la córnea (KS I) se une a la proteína por medio de dos tipos de enlaces, el queratano esquelético (KS II) contiene tres tipos de enlaces (J.R. Baker et al., *Connect. Tissue*, 1975, 3, 149).
- N-acetilgalactosamina es el componente encontrado normalmente en las unidades de repetición de disacárido de sulfato de queratano.
- Otro mucopolisacárido que puede estar presente en el conjugado para usos de la invención es sulfato de dermatano. Esta sustancia se aisló por primera vez en piel de cerdo (K. Meyer et al., *J. Biol. Chem.*, 1941, 138, 491). El sulfato de dermatano se llamó primero sulfato de condroitina B porque los polisacáridos son similares a los del sulfato de condroitina de cartílago (K. Meyer et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1956, 21, 506).
- Más tarde, se denominó también beta-heparina habiéndose aislado también en extractos de pulmón usados para la producción de heparina (R. Marbet et al., *Helv. Chim. Acta*, 1951, 34, 2311).
- El sulfato de dermatano se aisló más tarde en muchos otros tejidos, tales como mucosa gástrica (H. Smith et al., *Biochem. J.*, 1953, 53, 666), válvulas cardíacas (Meyer, 1956) y cordón umbilical (I. Danishefsky et al., *J. Biol. Chem.*, 1966, 241, 143).
- Las propiedades farmacológicas de sulfato de dermatano incluyen anti-coagulante (I. Volpato et al., Substantially pure dermatan sulfate and heparan sulfate glycosaminoglycans and their pharmaceutical use, documento EP 97625/2004) y la capacidad de regenerar el tejido nervioso muestreado usando la prueba de inducción de feocromocitoma en ratas después de la destrucción de NGF (factor de crecimiento nervioso) (B. Bizzini e I. Volpato, investigación no publicada).
- El sulfato de heparano es también un transporte adecuado del conjugado para usos de la invención. Tiene típicamente un bajo grado de sulfatación y yodación (S.I. Lamberg et al., *Glycosaminoglycans. A biochemical and clinical review*, *J. Invest. Dermatol.*, 1974, 63, 433).
- El sulfato de heparano difiere esencialmente de la heparina en que es un componente ubicuo en la superficie celular de muchos tipos de células y está presente en forma de proteoglucano, mientras la heparina se almacena en gránulos de mastocito desde donde puede liberarse en respuesta a estímulos dados y donde realiza importantes funciones intracelulares (P.M. Kraemer, *Biochemistry*, 1971, 1437).
- Se ha visto que la producción celular de este polisacárido a nivel dérmico aumenta con el envejecimiento al contrario que el ácido hialurónico, que disminuye en vez de eso (G. Sluke et al., *Humandiploid fibroblast*, *Mech. Ageing Dev.*, 1981, 16, 19).
- El sulfato de glucosaminoglucano del tipo HS, DS, C6S-C, C4S-A ks Eha son capaces de influir en los mecanismos de función celular, tal como adhesión (H.K. Kleinman et al., *Cell Biol.* 1981, 88, 473), migración (B.P. Toole en *Cell Biology of Extracellular Matrix*. E.D. Hay, Ed., 1981, 275, Plenum Press NY), proliferación (C. Grobstein et al., en *extracellular matrix influences gene expression*, H.G. Slavkin y R.C. Grenlich, Eds., 1975, págs. 9-16 y 804-814 Academic Press, NY) y diferenciación (A. Vaheri et al., en *Cellular Control in Differentiation*, C.W. Loyd y D.A. Rees, Eds, 1981, 29, Academic Press, NY) y están asociados directamente a la superficie celular (P M; Kraemer, *Biochemistry*, 1971, 10, 1437) o a los tejidos de la membrana basal que están en contacto con las células (Y.S. Kanwar et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, 76, 1303).

De acuerdo con algunas realizaciones, el conjugado para el uso de la invención contiene una cantidad de fragmento de pared de *Corynebacterium granulosum*, comprendido de 10 a 200 µg por gramo de mucopolisacárido o fracción del mismo. De acuerdo con algunas realizaciones, el conjugado del mucopolisacárido con el transporte basado en la pared bacteriana, en particular fragmentos de pared de *Corynebacterium granulosum* (P40), comprende una reacción de oxidación de los grupos hidroxilo (-OH) presentes en los mucopolisacáridos para formar aldehídos (-CHO) que se unen con los grupos amina (-NH₂) de las cadenas peptídicas presentes en la superficie de los fragmentos de pared bacteriana de *Corynebacterium* (P40).

La reacción de oxidación de los grupos OH de los mucopolisacáridos puede obtenerse usando un oxidante blando adecuado usado en técnicas biológicas, tal como por ejemplo monoyodoacetato sódico.

De acuerdo con algunas realizaciones, la reacción de oxidación de mucopolisacárido comprende añadir el mucopolisacárido a una disolución tampón acuosa con pH ligeramente ácido, p.ej. comprendido entre pH 5 y 6, preferiblemente cerca de 5,5, para obtener la disolución que contiene el mucopolisacárido al que se añade un agente oxidante que tiene una acción oxidante blanda, tal como monoyodoacetato sódico, para oxidar los grupos hidroxilo, y opcionalmente bloquear la reacción de oxidación, típicamente añadiendo una sustancia que contiene grupos OH, p.ej., un glicol, p.ej., glicerol.

Es entonces posible añadir fragmentos de la pared celular de una bacteria, tal como P40, para obtener el conjugado con los mucopolisacáridos oxidados o parcialmente oxidados a la disolución resultante.

Pueden usarse técnicas adecuadas para formar enlaces entre los grupos amino presentes en los fragmentos de pared bacteriana, en particular P40 y los grupos -OH de los mucopolisacáridos para obtener el conjugado de los fragmentos de pared bacteriana y los mucopolisacáridos.

De acuerdo con un aspecto de la invención, la composición de la invención se aplica a la medicina, en particular a la dermatología.

Los conjugados de mucopolisacáridos y fragmentos celulares con acción inmunomoduladora de la descripción son adecuados para la aplicación tópica-mucosa. Sin absorberse a nivel sistémico, estos conjugados tienen efectos sinérgicos capaces de: prevenir y curar, por ejemplo, manifestaciones de la piel alérgica y disfuncional (grasa, arrugas, envejecimiento de la piel, etc.) (HA-P40, C6S-P40, KS-P40), curar trastornos de la piel infecciosos, inflamatorios e inmunitarios, (eczemas, soriasis, acné, eritemas, quemaduras, úlceras diabéticas, etc.) (DS-P40, HS-P40, etc.), prevenir y curar enfermedades vasculares (venas varicosas, flebitis, tromboflebitis, trombosis vascular periférica, etc.) (HS-P40, FMHP-P40, etc.). El sinergismo de acción deriva del hecho de que los mucopolisacáridos en forma conjugada aplicados en el sitio de la lesión funcionan como transportes de los fragmentos celulares de partículas insolubles con acción inmunomoduladora permitiendo el contacto estrecho con el tejido dérmico además de realizar sus funciones terapéuticas normales.

Este contacto es suficiente para promover la activación de las células inmunocompetentes subcutáneas-submucosas con la posterior promoción de mecanismos de defensa inmune endógenos no específicos.

De acuerdo con otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un conjugado de un fragmento de pared celular de *Corynebacterium*, P40 y un transporte fisiológicamente aceptable que comprende un mucopolisacárido o una fracción mucopolisacáridica y un excipiente farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable para uso externo como medicamento para modular la respuesta inmune o de anticuerpo de la piel y/o la mucosa.

La composición farmacéutica según este aspecto de la presente invención se ajusta particularmente para la aplicación tópica, y por consiguiente puede ser cualquier forma adecuada para la aplicación tópica.

Típicamente, la composición farmacéutica de la invención puede estar en forma sólida, líquida o semi-sólida.

La forma sólida comprende formulaciones en crema, pasta, polvo, pomada, linimento.

La forma líquida comprende formulaciones en forma de disolución, suspensión, dispersión de aceite en agua o de agua en aceite.

La forma semi-sólida comprende fluidos, geles, sueros dermatológicos.

Uno o más excipientes pueden estar presentes en la composición de la invención usada en las técnicas de formulación de los preparados para uso tópico, tal como por ejemplo agentes dispersantes, agentes anti-coagulantes, tensioactivos, detergentes, agentes de suspensión, agentes formadores de masa, agentes de protección frente a rayos UV, etc.

De acuerdo con algunas realizaciones, la composición de la invención puede contener otras sustancias biológicamente activas, tales como, por ejemplo, extractos vegetales, vitaminas, sales minerales, aminoácidos, tal como arginina.

De acuerdo con algunas realizaciones, la composición de la invención puede comprender una o más sustancias farmacéuticamente activas, tales como, por ejemplo, antibióticos, antivirales, antifúngicos, FAN o fármacos anti-inflamatorios esteroideos, hormonas, etc.

5 De acuerdo con otro aspecto, la presente descripción se refiere a un conjugado de un fragmento de una pared celular de una bacteria que pertenece al género *Corynebacterium*, en particular P40, y un transporte fisiológicamente aceptable que comprende un mucopolisacárido o una fracción mucopolisacarídica para usar en el tratamiento de infecciones, en particular infecciones dermatológicas de origen bacteriano, vírico o fúngico.

10 De acuerdo con un aspecto, la presente invención se refiere a un conjugado de un fragmento de una pared celular de *Corynebacterium granulosum*, P40, y un transporte fisiológicamente aceptable que comprende un mucopolisacárido o una fracción mucopolisacarídica para usar en el tratamiento de afecciones o patologías dermatológicas.

Por medio del ejemplo, la composición se aplica de forma ventajosa al tratamiento de afecciones de mucosa vaginal, tal como, infecciones fúngicas, víricas o bacterianas.

15 De acuerdo con un aspecto, la presente descripción se refiere a un conjugado de un fragmento de una pared celular de una bacteria que pertenece al género *Corynebacterium*, en particular P40, y un transporte fisiológicamente aceptable que comprende un mucopolisacárido o una fracción mucopolisacarídica para uso tópico en el tratamiento de trastornos o afecciones de alergia de piel o mucosa.

Por medio del ejemplo, la composición de la invención se aplica de forma ventajosa al tratamiento de sarpullidos, eczema, picores o eritemas.

20 De acuerdo con algunas realizaciones, la composición de la descripción se aplica de forma ventajosa para retrasar los procesos de envejecimiento de la piel.

La presente invención se describirá ahora con referencia a los siguientes ejemplos que se suministran solo por medio de ilustración.

Ejemplo 1

Obtención de la fracción de partícula de pared celular de *Corynebacterium granulosum* (P40)

25 Se obtiene de acuerdo con el método descrito por B. Bizzini et al. (Med. Mal. Inf., 1978, 8, 408) mediante cultivo de *C. granulosum* en cultivo nutriente enriquecido con glucosa en condiciones anaeróbicas a 37°C durante 36 horas. Las bacterias se matan calentando el cultivo durante 30 minutos a 60°C y la masa de microorganismos se recoge después mediante centrifugación a 5000xg durante 30 minutos. Las bacterias se suspenden de nuevo en agua y se sedimentan de nuevo. Las bacterias se lavan entonces de nuevo por segunda vez. La masa microbiótica lavada se seca en horno 30 a 50°C. Las bacterias se deslipidan después mediante extracción en un Soxhlet posteriormente durante un ciclo de 8 horas con: 1) una mezcla 1:1 de etanol y éter; 2) cloroformo; 3) una mezcla 2:1 de metanol y cloroformo. Las bacterias deslipidadas se devuelven a una suspensión acuosa y se rompen en un Waring Blendor. Las bacterias que no se rompen se eliminan mediante centrifugación a 1000xg durante 5 minutos. Se precipita una fracción añadiendo una disolución de sulfato de amonio a 40% de saturación desde el subnadrante que contiene las bacterias fragmentadas. 35 El precipitado se deja decantar toda la noche a 4°C y se recoge por centrifugación a 10.000xg durante 15 minutos. El sedimento se rehidrata y se dializa frente a agua para eliminar todas las trazas de sulfato de amonio. Se liofiliza.

Rendimiento: 10-20%.

40 La actividad retículo-estimulante de la fracción P40 se determina por medio de la prueba de esplenomegalia en ratones receptores mediante administración intravenosa de 50 µg de P40. Los ratones se sacrificaron 7-8 días después de la inyección y el peso de su bazo se comparó con el de un grupo de ratones de control que había recibido solución salina fisiológica. El índice de actividad K (animales simulados)/K0 (animales de control) debe ser mayor que 2.

Ejemplo 2

Conjugado de ácido hialurónico y fracción P40

Obtención de HA-P40

45 Se disolvieron 5 g de hialuronato sódico en 100 ml de tampón acetato 0,05 M, pH 5,5 con agitación para obtener una disolución que no es excesivamente viscosa. Se añadieron entonces 856 mg de monoyodoacetato sódico a la disolución y la reacción de oxidación se deja a temperatura ambiente lejos de la luz durante 30 minutos. La reacción se bloquea entonces añadiendo 1 ml de glicerol 5 M. Después de 15 minutos de reacción, el pH se ajusta a aproximadamente 9 añadiendo carbonato sódico en forma de polvo, después de lo cual se añaden 5 g de P40 a la disolución (100 unidades de estimulación) y se deja que ocurra la conjugación a temperatura ambiente durante varias 50 horas con agitación y toda la noche a 4°C sin agitación. Los grupos aldehídicos que aún están libres pueden

bloquearse añadiendo 5 ml de una disolución de 1M de un aminoácido, tal como arginina. La disolución de conjugado se dializa en agua y se liofiliza después de 30 minutos.

Ejemplo 3

Conjugado de sulfato de dermatano y P40 (DS-P40)

- 5 Se disuelven 5 g de sulfato de dermatano en 40 ml de tampón acetato 0,05 M pH 5,5. Se añaden 856 mg de monoyodoacetato sódico a la disolución y se dejan reaccionar lejos de la luz con agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos, después de lo cual el exceso de MIA se desactiva añadiendo 1 ml de glicerol 5 M. El pH de la disolución de sulfato de dermatano oxidado se ajusta a aproximadamente 9 y 5 mg de P40 se añaden (100 unidades de estimulación) y se permite la conjugación durante unas pocas horas a temperatura ambiente y toda la noche a 4°C
- 10 sin agitación. Los grupos aldehídicos que no reaccionan pueden bloquearse añadiendo 1 ml de una disolución de un aminoácido, tal como arginina. La disolución conjugada se dializa con agua y se liofiliza después de media hora.

Ejemplo 4

Conjugado de sulfato de heparano y P40 (HS-P40)

- 15 Se disuelven 5 g de sulfato de heparano en 30 ml de tampón acetato 0,05 M pH 5,5. Se añaden 428 mg de monoyodoacetato sódico (MIA) a la disolución y se dejan reaccionar lejos de la luz con agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos, después de lo cual la reacción se bloquea añadiendo 0,5 de glicerol 5 M. Se añade carbonato sódico en polvo para ajustar el pH a aproximadamente 9 después de 30 minutos. Se añaden 5 mg de P40 y la conjugación se deja que ocurra con agitación a temperatura ambiente durante 1 M, preferiblemente tal como arginina, toda la noche a 4°C, sin agitación. Los grupos aldehídicos que aún están libres se bloquean añadiendo 2,5
- 20 ml de una disolución de un aminoácido 1 M y después de 30 minutos la disolución conjugada se dializa frente a agua y se liofiliza.

Ejemplo 5

Conjugado de heparina (de movimiento rápido) y P40 (FMHP-P40)

- 25 Se disuelven 5 g de heparina de movimiento rápido de bajo peso molecular (<5 KDa) en 30 ml de tampón acetato 0,05 M, pH 5,5 y se añaden 428 mg de monoyodoacetato sódico (MIA) a esta disolución lejos de la luz con agitación y se permite la reacción durante 30 minutos a temperatura ambiente durante 30 minutos después de lo cual la reacción se bloquea añadiendo 0,5 ml de glicerol 5 M. El pH de la disolución se ajusta a aproximadamente 9 añadiendo carbonato sódico en polvo. Después se añaden 5 mg (100 unidades de simulación) de P40. Después de 24 horas al final de la reacción a temperatura de laboratorio, se añaden 2,5 ml de disolución de una disolución de aminoácido 1 M, tal como arginina, para bloquear los grupos aldehídicos que aún están libres. La disolución de conjugado se dializa frente a
- 30 agua y se liofiliza después de 30 minutos.

Ejemplo 6

Conjugado de condroitin-6-sulfato AC y fracción P40 (C-6SC-P40) o (C4SA-P40)

- 35 Se disuelven 5 g de C6SC o C4SA en 30 de tampón acetato 0,05 M, pH 5,5, se añaden 856 mg de monoyodoacetato sódico (MIA) a esta disolución y la reacción se permite durante 30 minutos a temperatura ambiente lejos de la luz con agitación. La reacción se bloquea entonces añadiendo 1 ml de glicerol 5 M. El pH de la disolución se ajusta a aproximadamente 9 añadiendo carbonato sódico en polvo. Después se añaden 5 mg de fracción P40 (100 unidades de estimulación) a esta disolución y la reacción se permite lejos de la luz con agitación durante unas pocas horas a temperatura de laboratorio y después toda la noche a 4°C sin agitación. Los grupos aldehídicos que aún están libres
- 40 se bloquean añadiendo 1 ml de una disolución de un aminoácido 5 M, tal como arginina, después de lo cual la disolución de conjugado se dializa frente a agua y se liofiliza.

Ejemplo 7

Prueba de la composición de los conjugados de mucopolisacáridos y la fracción de partícula de pared celular de *C. granulosum* P40

- 45 La composición de conjugados de GAGs y P40 se establece por ELISA después de marcar los conjugados con biotina. La ELISA a desarrollar comprende las siguientes etapas:
- 1) sensibilización de la placa con AVIDIN;
 - 2) fijado del conjugado a probar marcándolo con biotina;
 - 3) detección de la fracción P40 por medios de anticuerpos anti-P40 marcados con una enzima, por un lado, y detección del GAG usado como transporte por medio del correspondiente anticuerpo marcado con una enzima, por el otro.
- 50

7.1 Prueba de la actividad preventiva y curativa de los conjugados GAG-P40

La actividad de estimulación terapéutica de los conjugados se determina midiendo el efecto de las aplicaciones de la preparación que contiene el conjugado a probar mediante administración intranasal frente a una infección de *S. pyogenes* A (cepa 56-1) provocada por administración intranasal en las condiciones estandarizadas establecidas por B. Bizzini y 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, Basilea).

7.2 Caracterización de GAGs usando anticuerpos policlonales anti-GAGs

La estructura de GAGs y las posibles alteraciones estructurales como una consecuencia de la conjugación P40 se caracterizan evaluando el grado de reactividad de los diversos polisacáridos frente al anticuerpo policlonal específico.

Los diversos anticuerpos GAGs se produjeron en conejos usando GAG-KLH (hemocianina de lapa californiana) derivado como inmunógeno.

Los animales se sensibilizaron durante 0 tiempo para administración subcutánea del inmunógeno (1 mg) en 20 puntos en la piel afeitada de la espalda por volumen de 0,05 ml cada uno en adyuvante de Freund completo. Se administraron recuerdos de 0,5 mg de forma intramuscular cada mes en adyuvante de Freund. La producción de anticuerpos se continuó por difusión doble en gel de disoluciones crecientes de suero. Habiendo alcanzado una valoración bastante alta, los sueros se tomaron por punción cardíaca y la fracción IgG se precipitó a 40% de saturación con sulfato de amonio. El marcado de los anticuerpos purificados con enzima se realizó por reacción con glutaraldehído.

Las relaciones de reactividad de conjugado/GAGs correspondientes se muestran en la siguiente tabla:

Conjugado	GAG	Relación conjugado/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

Ejemplo 8

Análisis de la eficacia en eritema por UV en ratas

Se afeitaron de forma apropiada en el área dorsal ratas Wistar que pesaban aproximadamente 200 g. Bajo anestesia de éter se expusieron a rayos UV durante 2 horas suficiente para inducir un eritema dérmico evidente.

Los animales se trataron posteriormente en el área afectada por eritema usando una pomada basada en los diversos conjugados en la concentración correspondiente a la de P40 para uso terapéutico (50 µg por aplicación).

La aplicación se repitió diariamente (una al día) hasta la remisión total del edema. El experimento se realizó por comparación con animales a los que se aplicó una pomada placebo (controles) y animales a los que se aplicó un linimento basado en mucopolisacáridos únicos (no conjugados).

La reducción del área del eritema se evaluó durante los 7 días posteriores a la aplicación de los diversos conjugados.

La tabla posterior muestra la reducción en porcentaje con el tiempo, siendo 100 la extensión del eritema inducido por UV (tiempo cero).

Porcentaje de reducción del eritema inducido por UV de UV en la espalda de las ratas

Grupo	Tratamiento	Porcentaje de reducción del eritema después del número de días						
		1	2	3	4	5	6	7
1	Placebo (control)	Cero	Cero	Cero	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 diferentes niveles de eficacia, los diversos mucopolisacáridos (HA, DS, HA, C6SC, HPFM) son capaces de acelerar la resolución del eritema en virtud a sus efectos farmacéuticos anti-inflamatorios, efectos en la micro-circulación sanguínea, y efectos en la activación de la membrana basal y la reproducción celular.

- 5 Este efecto se aumenta significativamente mediante la conjugación con la fracción de partícula inmunomoduladora no específica de P40.

El sinergismo es debido a la activación de los bio-mecanismos en base a la funcionalidad e intercambio celular posterior a la estimulación de macrófagos y el sistema de terminación debido a la fracción dicha anteriormente.

Ejemplo 9

- 10 Análisis de la eficacia de la infección inducida en ratones por inoculación intranasal de *S. pyogenes*

Se usó el método descrito por B. Bizzini et al. (FEMS Microbiol. Immunol. 1990, 64, 155).

Los productos se aplicaron con dosis correspondiente a 100 µg de P40/kg por peso corporal en las narinas de los ratones durante 3 días antes y en el mismo día que la inoculación intranasal de infección de *S. pyogenes* (2 x 10 a la sexta potencia de bacterias). Se usaron diez lotes de ratones y se compararon con un grupo no tratado con P40 (control) y diversos GAGs y los respectivos conjugados con P40.

- 15

Se monitorizó el porcentaje de supervivencia durante los 7 días después del tratamiento.

Porcentaje de supervivencia después de la infección intranasal de <i>S. pyogenes</i>						
Grupo	Tratamiento	Dosis	Porcentaje de supervivencia después del número de días			
		µg o mg/kg	1º	3º	5º	7º
1	Controles	----	90	20	Cero	
2	P40	100 µg	100	100	100	80
3	HA	75 mg	100	40	Cero	
4	DS	50 mg	100	50	Cero	
5	HS	50 mg	100	50	Cero	
6	C6SC	75 mg	90	40	Cero	
7	HPFM	50 mg	90	30	Cero	
8	HA-P40	(100 µg de P40)	100	90	90	

9	DS-P40	(100 µg de P40)	100	100	100	
10	HS-P40	100 µg de P40)	100	100	100	
11	HPFM-P40	(100 µg de P40)	100	100	100	
12	C6SC-P40	(100 µg de P40)	100	100	90	

La propiedad de P40 de inhibición del comienzo de las infecciones no se altera por la conjugación con GAGs.

Estos no muestran ninguna interacción con la infección de *S. pyogenes*.

Ejemplo 10

5 Análisis de la eficacia en la infección de HSV inducida en la mucosa en ratas

Se indujo una infección vaginal de tipo moderado de HSV-1 en ratas después del método de M. Fattal-German y B. Bizzini (Develop. Biol. Standard., 1992, 77, 115).

Los animales se separaron en grupos de 10 unidades cada uno.

10 Se esperó durante 3 días para que los síntomas de la infección aparecieran en todos los animales. En este momento, se comenzó el tratamiento aplicando diariamente un gel que contenía los diversos compuestos estudiados en una concentración que correspondía a 50 µg de P40/aplicación/día a nivel de mucosa.

Se monitorizó el tiempo de remisión total de los síntomas de los animales tratados, de control y de referencia.

Tiempo de remisión/número de animales con síntomas infecciosos de HSV-1 a nivel de mucosa							
Grupo	Tratamiento	Dosis	Número de ratas con remisión de síntomas después del número de días				
		µg o mg/kg	1º	3º	5º	7º	10º
1	Controles	----	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
2	P40	50 µg		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 µg de P40		2/10	5/10	10/10	
9	DS-P40	50 µg de P40		4/10	10/10		
10	HS-P40	50 µg de P40		8/10	10/10		
11	HPFM-P40	50 µg de P40		5/10	10/10		
12	C6SC-P40	50 µg de P40		4/10	8/10	10/10	

15 El inmunomodulador P40 es capaz de resolver los síntomas que se derivan de la aplicación a la mucosa del virus del herpes en unos pocos días.

Esta propiedad está potenciada y acelerada por efecto de la conjugación del inmunomodulador y los GAGs capaces de permitir un contacto excelente con la mucosa.

20 El hecho de que algunos conjugados de P40 con diferentes GAGs, tales como DS-P40, HS-P40 y FMHP-P40, sean más activos indica una influencia sinérgica en la vitalidad celular y la reproducción de las actividades inmunomoduladoras no específicas de P40 y las propiedades del mucopolisacárido.

Ejemplo 11

Análisis de la eficacia en la trombosis inducida por morruato sódico en la oreja de los conejos

Se indujo el trombo en la vena marginal de la oreja previamente afeitada de conejos aislada en aproximadamente 3 cm usando grapas hemostáticas e inyectando 0,2 ml de una disolución al 5% de morruato sódico en el sitio aislado.

- 5 Las grapas hemostáticas se quitaron después de 10 minutos una vez que el trombo se consolidó.

Se aplicaron diariamente 200 mg de gel que contenía 10 mg del conjugado estudiado al área afectada. La entidad de porcentaje de remisión del trombo se monitorizó diariamente durante 10 días.

La tabla posterior muestra los porcentajes de reducción promedio durante los diversos días comparando animales tratados con los productos de la patente, animales de control (no tratados) y animales tratados con los diversos intermedios de conjugación.

10

Grupo	Tratamiento	Dosis	Porcentaje de reducción del trombo experimental después del número de días				
		mg/boquilla	2º	4º	6º	8º	10º
1	Controles	-----					
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	70	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

Los mucopolisacáridos P del tipo HS, FMHP y DS son capaces de resolver el trombo experimental inducido en la vena del animal.

Este efecto está potenciado por la conjugación con P40 (estructura de partícula de acción retículo-estimulante).

- 15 La potenciación se va a deber probablemente a una aceleración de la distribución de las células necróticas presentes en el trombo debido a la estimulación de las células macrófagas.

Ejemplo 12

Estudio de la no absorción transdérmica de conjugados de P40 mediante aplicación tópica

- 20 Se realizó un estudio específico para demostrar la ausencia de cruce y probar que la acción retículo-estimulante de los conjugados P40 con los diversos GAGs no es debida al cruce transdérmico.

Se usaron conjugados preparados con la fracción P40 marcados con biotina como molécula de rastreo para este estudio. El modelo experimental usado está basado en la medida espectrofotométrica de biotina explantando piel humana *ex vivo* (la explantación que consiste en capas dérmica y epidérmica). En este modelo, la biotina se usó como control porque la piel explantada es impermeable a esta molécula.

- 25 La evaluación *in vitro* de la acción filmogénica, que significa la capacidad de las sustancias para unirse con las estructuras cutáneas superficiales sin modificar la función de barrera y permeabilidad de las mismas, se realizó en el laboratorio Vitroscreen, Via Mosè Bianchi 103 20149 Milán, Italia.

No se encontró cruce transdérmico en el estudio de ninguno de los tres conjugados usados (HA-P40-biotina, HS-P40-biotina, DS-P40-biotina) ni del Sulfo-NHS-LS Biotina usado como control.

Dados los resultados del estudio, puede concluirse que la acción de los diversos conjugados P40 con GAGs se da sin cruce transdérmico.

5 Ejemplo 13

Análisis de los efectos en infecciones mucosas tópicas

Los individuos se seleccionaron afectados por:

- herpes labial
- candidosis vaginal

10 Los diversos conjugados en forma de gel farmacéutico que contenía 3% de principio activo se aplicaron en el sitio infectado una vez al día.

El tratamiento se continuó durante 7 días, tiempo de remisión completa promedio de la patología por los conjugados GAGs-P40.

15 La presencia de recaída se monitorizó durante el siguiente periodo de seis meses. Los resultados se muestran en la tabla posterior.

Grupo	Producto	Tratamiento	Apl./día	Patología	Remisión	% de recaída
					Después del número de días	Después de 6 meses
1º	P40	Gel tópico	Una	Herpes labial	2 o 3	Cero
2º	HA	"	"	"	>10	70
3º	DS	"	"	"	"	50
4º	HS	"	"	"	"	70
5º	HPFM	"	"	"	"	90
6º	C6SC	"	"	"	"	90
7º	HA-P40	"	"	"	1 o 2	Cero
8º	HS-P40	"	"	"	1 o 2	Cero
9º	HPFM-P40	"	"	"	1 a 3	10
10º	C6SC-P40	"	"	"	2 o 3	20
1º	P40	"	Dos	Candidosis vaginal	1 a 4	20
2º	HA	"	"	"	>10	90
3º	HS	"	"	"	"	100
4º	HA-P40	"	"	"	1 o 2	10
5º	DS-P40	"	"	"	"	10

20 El resultado de este experimento fue que la fracción de partícula de P40 realiza una actividad inmunomoduladora capaz de contrastar de forma efectiva el herpes labial y la candidosis vaginal, mientras que se encontró que los GAGs solos eran ineficaces. Sin embargo, la conjugación de P40 con GAGs se tradujo en una potenciación de su efecto, probablemente porque el contacto de los conjugados con la mucosa es más cercano y más prolongado con respecto al del P40 solo.

Ejemplo 14

Efecto de los conjugados GAGs-P40 en el acné

El acné es una enfermedad inflamatoria con una patogénesis compleja, caracterizada por la formación de espinillas que consisten en sebo, queratina y microorganismos.

- 5 Un grupo de voluntarios jóvenes afectados por acné superficial se trataron con P40 o conjugados HA-P40 o DS-P40 o HS-P40 en forma de gel farmacéutico no graso, siendo cada aplicación tópica igual a 50 µg de P40. El gel se aplicó una vez al día por la tarde antes de irse a dormir durante 10 días después de lavar cuidadosamente la cara con detergente suave.
- 10 Todos los productos se encontraron capaces de mejorar significativamente las lesiones del acné con la desaparición de la picazón unos pocos días después del tratamiento. La mayoría de los comedones habían desaparecido con el uso del producto basado en la fracción inmunomoduladora de P40 sola después de 10 días de tratamiento, o más pronto con los conjugados GAGs-P40.

Ejemplo 15

Efecto de los conjugados GAGs-P40 en la soriasis

- 15 Un grupo voluntario afectado por soriasis no invasiva se trató por aplicación tópica de P40 o conjugados GAGs-P40, tal como HA-P40 o DS-P40 o HS-P40, en forma de gel farmacéutico no graso que contenía 3% de principio activo dos veces al día durante 10 días.
- 20 Una respuesta positiva al tratamiento, que consiste en la desaparición de lesiones y picazón, se observó en la mayoría de individuos empezando a partir del quinto día de tratamiento, mientras que un grupo más pequeño de individuos no respondió al tratamiento. La mejora fue particularmente evidente cuando se aplicaron los conjugados GAGs-P40.

Ejemplo 16

Efecto de los conjugados GAGs-P40 en sarpullidos

Un sarpullido es el resultado de una reacción anafiláctica limitada estrictamente a la piel y a los tejidos subcutáneos.

- 25 Se trataron voluntarios afectados con sarpullido agudo con la fracción inmunomoduladora de P40 o con conjugados GAGs-P40, tales como HA-P40, DS-P40, HS-P40, en forma de gel farmacéutico que contenía el 3% de principio activo.

Aplicaciones tópicas dos veces al día durante 6 días.

La picazón disminuyó considerablemente o se atenuó en gran medida después de las primeras aplicaciones. Las lesiones por sarpullidos desaparecieron predominantemente después de 1 o 2 días de tratamiento, en particular con la aplicación de conjugados GAGs-P40.

30

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado de un fragmento de una pared celular de *Corynebacterium granulosum* y un transporte fisiológicamente aceptable, en donde el fragmento de pared celular es P40 y el transporte fisiológicamente aceptable comprende un mucopolisacárido o una fracción mucopolisacarídica para uso externo como medicamento para modular la respuesta inmune o de anticuerpo de la piel y/o mucosa.
2. Un conjugado de un fragmento de una pared celular de *Corynebacterium granulosum* y un transporte fisiológicamente aceptable, en donde el fragmento de pared celular es P40 y el transporte fisiológicamente aceptable comprende un mucopolisacárido o una fracción mucopolisacarídica para usar en el tratamiento tópico de afecciones o trastornos dermatológicos o afecciones de mucosa vaginal.
3. El conjugado para usar según la reivindicación 1 o 2, en donde el mucopolisacárido o fracción mucopolisacarídica fisiológicamente aceptable se selecciona de ácido hialurónico, condroitin-4-sulfato, condroitin-6-sulfato, sulfato de dermatano, sulfato de heparano, heparina, sulfato de queratano y mezclas de los mismos.
4. El conjugado para usar según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el fragmento de una pared celular de *Corynebacterium granulosum* que es P40 es una fracción insoluble aislada de una pared celular deslipidada de *Corynebacterium granulosum*.
5. El conjugado para usar según la reivindicación 1 en donde la mucosa es mucosa vaginal.
6. Una composición para uso tópico que comprende un conjugado para usar según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y un excipiente fisiológicamente aceptable.