

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102012902068595A1

Publication Date

20140113

Applicant

ABOCA S.P.A. SOCIETA AGRICOLA

Title

NUOVE COMPOSIZIONI PER IL TRATTAMENTO DEL DOLORE
NEUROPATICO.

"NUOVE COMPOSIZIONI PER IL TRATTAMENTO DEL DOLORE NEUROPATICO"

DESCRIZIONE

La presente invenzione si riferisce al campo delle composizioni per il trattamento del dolore neuropatico. Più in particolare, la presente invenzione si riferisce
5 a composizioni che comprendono composti ottenuti da estratti vegetali per il trattamento del dolore neuropatico causato da chemioterapici.

STATO DELLA TECNICA ANTERIORE

Il dolore è stato definito dall'Associazione Internazionale per lo Studio del Dolore (International Association for the Study of Pain - IASP) come *"una spiacevole
10 esperienza sensoriale ed emozionale associata ad un danno attuale o potenziale dei tessuti o descritta in termini di tale danno"*. All'interno di questa definizione sta assumendo sempre più rilievo, per la significativa e crescente prevalenza a livello mondiale, una particolare tipologia di dolore, legato ad anomalie neurologiche e denominato dolore neuropatico, recentemente ridefinito dalla IASP Gruppo di Interesse
15 Speciale per il dolore neuropatico (NeuPSIG) come un *"dolore che insorge come diretta conseguenza di una lesione o una malattia che colpisce il sistema somatosensoriale"* (Haanpää et al. 2010).

Il NeuPSIG ha proposto anche un nuovo approccio per graduare il livello di certezza diagnostica del dolore neuropatico vista l'assenza di precisi criteri "gold
20 standard". Il processo diagnostico prevede: un'ipotesi diagnostica derivata dalla storia clinica del paziente, la presenza di anomalie somato-sensoriali all'esame neurologico e almeno un test di conferma. Al termine del processo diagnostico il dolore neuropatico potrà essere graduato secondo tre livelli: possibile, probabile e definito.

In ambito clinico è comune che il dolore neuropatico venga classificato anche
25 sulla base dell'eziologia e dell'area anatomica interessata, oltre che della sua origine centrale o periferica. La differenziazione è importante perché le lesioni del sistema nervoso centrale e periferico sono distinte in termini di meccanismi fisiopatologici sottostanti, di manifestazioni cliniche e di trattamento richiesto (Haanpää et al, 2009).

Allo stato attuale non sono disponibili strumenti diagnostici che permettano di
30 definire una diagnosi inequivocabile di dolore neuropatico.

La sintomatologia caratteristica del *dolore neuropatico* permette di distinguerlo da altri tipi di dolore comunemente riportati in cui il sistema nervoso è inalterato, tra cui condizioni di cefalea, dolore alla schiena, e da altri tipi di dolore muscolo-scheletrico.

Il dolore neuropatico comprende un gruppo eterogeneo di condizioni che non
5 possono essere spiegate da un singolo meccanismo eziopatologico o da una particolare lesione anatomica.

Queste affezioni delle strutture del sistema nervoso centrale o periferico includono varie neuropatie (neuropatia diabetica, neuropatia post-erpetica, neuropatie infiammatorie, neuropatia da abuso di alcool, neuropatia associata all'infezione con
10 HIV/AIDS) e possono derivare dall'azione dannosa di varie tossine (ad esempio, neurotossine, farmaci ad azione neurotossica), da traumi acuti (compresa la chirurgia), da trauma cronici (ad esempio, ripetitivi disturbi motori) come la sindrome del tunnel carpale, da malattie del sistema nervoso centrale (come ictus, sclerosi multipla, ischemie cerebrali, morbo di Parkinson, lesioni del midollo spinale traumi cranici).

15 La diagnosi non è facile in quanto il nervo pur producendo scariche continue dolorose spesso è anatomicamente integro.

Il dolore neuropatico è presente in vari stati patologici e si presenta con una varietà di sintomi, che sono accomunati dalle seguenti caratteristiche: il dolore è percepito in assenza di un processo o di lesione tissutale permanente ed identificabile;

- 20 • sono presenti sensazioni sgradevoli, anormali o insolite (disestesie), frequentemente riferite come bruciore o scossa elettrica;
- sono presenti brevi episodi di dolore parossistico a carattere lancinante o trafittivo;
- il dolore compare in ritardo rispetto alla lesione scatenante;
- 25 • il dolore è percepito in una regione di deficit sensitivo;
- anche stimoli leggeri sono dolorosi (allodinia);
- c'è sommazione marcata ed attività persistente dopo l'applicazione di stimoli ripetuti.

Si stima che il dolore neuropatico, arrivi a colpire fino al 3% della popolazione e
30 che circa da 1 a 5 europei adulti su 100 siano soggetti a dolore cronico.

La letteratura riporta che negli Stati Uniti, il dolore neuropatico rappresenta un problema potenzialmente gravoso anche per i sistemi di assistenza nazionale, con una prevalenza dell'1,5%.

L'80% dei pazienti neoplastici in fase avanzata manifesta sintomi di dolore neuropatico. Inoltre gli agenti antineoplastici rappresentano la principale categoria di farmaci neurotossici ad avere importanti problemi clinici, sia per il loro uso diffuso, sia per la potenziale gravità della loro tossicità. Infatti, la neurotossicità periferica di farmaci antineoplastici costituisce la principale causa di sospensione o riduzione della dose del trattamento. Inoltre anche se la neurotossicità non risulta così grave da limitare la dose di trattamento, la sua insorgenza può gravemente influenzare la qualità della vita dei pazienti affetti da tumore e provocare disagio cronico.

Tra i farmaci antineoplastici, i derivati del platino (cis platino e oxaliplatino) risentono maggiormente di questo tipo di tossicità neurologica, che rappresenta un fattore limitante il loro utilizzo. La tossicità che limita la somministrazione dell'oxaliplatino è di tipo neurologico. Comprende una neuropatia sensoriale periferica caratterizzata da disestesie e/o parestesie delle estremità accompagnate o meno da crampi, spesso scatenate dal freddo. Questi sintomi si verificano fino al 95% dei pazienti trattati.

Il dolore neuropatico cronico è quindi un problema neurologico importante sia per la sua frequenza sia per la tendenza a cronicizzare e ad assumere un carattere invalidante. È inoltre un dolore che non risponde bene ai più comuni analgesici come acido acetilsalicilico, paracetamolo oppure ai più comuni farmaci antinfiammatori non steroidei.

L'obiettivo dei trattamenti farmacologici dovrebbe essere la prevenzione o la scomparsa del dolore, ma con i trattamenti attualmente disponibili in realtà si riesce ad ottenere al massimo una riduzione del dolore ad un livello tollerabile.

L'effetto dei farmaci sul dolore viene normalmente quantificato con una VAS (Visual analogic scale) o una scala numerica a 11 valori che permette la graduazione da "nessun dolore" a "massimo dolore". A questo si aggiunge spesso la valutazione della qualità della vita e del cambiamento percepito dal paziente o dal medico.

Ad oggi, nessuna classe di farmaci è stata provata come universalmente efficace per la prevenzione o la risoluzione del dolore dei pazienti con dolore neuropatico.

Si usano in genere dei farmaci “off label” appartenenti alle seguenti categorie, che però a lungo termine presentano importanti effetti collaterali:

- 5 - antidepressivi;
- anticonvulsivanti (gabapentin):
- oppioidi (metadone - oxicodone);
- tramadolo;
- lidocaina;
- 10 - antinfiammatori inibitori delle citochine.

Gli antidepressivi, in particolare i triciclici, hanno un certo effetto positivo su alcuni tipi di dolore neuropatico. La loro efficacia è stata dimostrata per il dolore neuropatico di origine diabetica e traumatica, la neuralgia post erpetica, e quello da danno al midollo spinale. Sono però gravati da importanti effetti collaterali, quali anomalie della
15 conduzione dello stimolo elettrico cardiaco, ritenzione urinaria, sedazione, vertigini, ipotensione ortostatica, secchezza delle fauci (Jensen et al. 2009).

I gabapentinoidi con indicazioni approvate per il dolore neuropatico non sono composti ad azione specifica, ma hanno un'azione generale sulla ipereccitabilità neuronale, meccanismo comune a molte condizioni di dolore cronico, inclusa la fibromialgia e la
20 Complex regional pain syndrome (CRPS). Gabapentin e pregabalin sono generalmente ben tollerati, tra i loro effetti collaterali vengono segnalati sedazione, vertigini e edemi periferici.

Gli oppioidi sembrano essere efficaci nella riduzione dell'intensità del dolore neuropatico di origine diabetica, di quello postamputazione e della neuralgia post
25 erpetica, oltre a quello da danno al midollo spinale. Questi farmaci però causano comunemente effetti negativi a carico della sfera cognitiva, costipazione e nausea, il loro utilizzo è limitato anche dal rischio di abuso del farmaco e di disfunzioni immunitarie e ormonali.

I vari farmaci anche quando risultano efficaci, ottengono una riduzione parziale del dolore: 25-40% nel 40-60% dei pazienti a fronte dei numerosi effetti collaterali indesiderati provocati dal loro impiego continuo.

E' importante sottolineare che non esiste attualmente alcun trattamento efficace per
5 prevenire o invertire questa condizione dolorosa. Gabapentin, pregabalin e acido alfa-lipoico sono quasi completamente privi di qualsiasi efficacia anti-iperalgesica. (Nanna, 2007; Bridges, 2001; Andrés J.D 2003, Fernihough J 2004; Jackson KC , 2006; Dworkin RH 2003, Taylor RS).

Da qui l'esigenza di un prodotto con funzione analgesica, ma privo di effetti collaterali
10 importanti e limitanti come gli oppioidi o gli antiepilettici.

Nella domanda di brevetto internazionale WO2009106263(A1) è descritto l'uso di estratti di iperico contenenti ipericina nel trattamento del dolore neuropatico.

Il dolore neuropatico, a causa della sua gravità, cronicità, resistenza alla terapia abituale e gravi conseguenze sulla qualità della vita, rappresenta pertanto un
15 importante necessità medica non soddisfatta.

SOMMARIO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione riguarda una nuova miscela di composti di particolare efficacia per il trattamento del dolore neuropatico.

20 L'efficacia della composizione della presente invenzione nel trattamento del dolore neuropatico è stata valutata in diversi modelli sperimentali. In particolare essa è stata analizzata in un modello *in vivo*, secondo quanto descritto in Cavalletti et al. 2001 (Cavalletti et al. "Effects of different schedules of oxaliplatin treatment on the peripheral nervous system of the rat" Eur. J. Cancer 37, 2457-2463 2001), per valutare la
25 capacità di un determinato composto di far regredire una neuropatia indotta nel ratto mediante agenti chemioterapici. Questi esperimenti hanno evidenziato che l'efficacia della composizione nel far regredire il dolore neuropatico è potenziata dalla selezione di particolari componenti, ad esempio derivanti da fitocomplessi, in determinate proporzioni.

I dati sperimentali indicano che la composizione della presente invenzione è estremamente efficace nel trattamento del dolore neuropatico in pazienti con dolori neuropatici in genere, compresi quelli che hanno dolori neuropatici causati da trattamento con chemioterapici. In particolare, è stato visto e dimostrato che la
5 composizione dell'invenzione ha il vantaggio di non inibire in alcun modo l'attività antitumorale del chemioterapico nei casi di dolore neuropatico provocato da chemioterapici. La presente descrizione riporta, nella sezione sperimentale, esperimenti *in vitro* (su linee cellulari) e *in vivo* (su topi) che hanno dimostrato che l'associazione di polifenoli (con una particolare composizione in flavonoidi e
10 quercetina) con antocianosidi totali in determinate proporzioni secondo la presente descrizione (quindi la composizione dell'invenzione), pur aumentando l'efficacia nel trattamento del dolore neuropatico, non interferisce con l'attività del chemioterapico. Questa composizione presenta quindi il fondamentale vantaggio di permettere il trattamento del dolore neuropatico senza interferire con l'attività antitumorale del
15 chemioterapico.

E' oggetto della presente invenzione una composizione per uso terapeutico comprendente:

- a) polifenoli tra il 3 ed il 9% in peso di detta composizione
di cui
20 a') flavonoidi, esclusa la quercetina, tra l'1 ed il 7% in peso di detta composizione;
a'') quercetina tra lo 0,05 e lo 0,3% in peso di detta composizione;
- b) antocianosidi totali tra lo 0,1 e l'1% in peso.

Le composizioni secondo la presente invenzione sono caratterizzate dal fatto di non inibire l'attività antitumorale di un chemioterapico.

25

BREVE DESCRIZIONE DELLE FIGURE

Fig. 1. Livelli in % di malonil dialdeide (MDA) rilevati nel saggio della lipoperossidazione. La figura mostra i valori di malonil dialdeide, saggiati su cellule trattate con le miscele riportate in Tabella 1 (ABO-), rispetto ad un controllo di cellule
30 non trattate (controllo) e rispetto ad un controllo di cellule trattate con reattivo di Fenton

in assenza di composto (ossidazione). I valori riportati, proporzionali all'entità della reazione di lipoperossidazione, sono espressi in percentuale rispetto alla condizione di controllo e riportati come valore $\pm$ s.e.m. * $p < 0.01$ rispetto al controllo; ^ $p < 0.01$ rispetto al valore di ossidazione. Controllare l'esattezza di questa didascalia.

5 Fig. 2. Livelli di NBT ossidato dall'anione superossido generato dalla reazione tra ipoxantina e xantina ossidasi. I valori di assorbanza relativi all'ossidazione di NBT sono espressi come valori di assorbanza $\pm$ s.e.m. * $p < 0.01$ rispetto al controllo; ^ $p < 0.01$ rispetto al valore di ossidazione.

Fig. 3. Livelli di anione superossido liberato nelle colture di astrociti corticali di ratto in
10 seguito a trattamento con oxaliplatino 100 μ M. Le concentrazioni di anione superossido liberato nella colture cellulari sono espressi in μ mol $\pm$ s.e.m. * $p < 0.01$ rispetto al controllo; ^ $p < 0.01$ rispetto al valore di ossidazione.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

La presente invenzione riguarda una composizione per uso terapeutico
15 comprendente:

a) polifenoli tra il 3 ed il 9% in peso di detta composizione

di cui

a') flavonoidi, esclusa la quercetina, tra l'1 ed il 7% in peso di detta composizione;

a'') quercetina tra lo 0,05 e lo 0,3% in peso di detta composizione;

20 b) antocianosidi totali tra lo 0,1 e l'1% in peso.

In una forma di realizzazione dell'invenzione, la composizione come descritta in qualsiasi parte della presente descrizione e delle rivendicazioni è una composizione per uso nel trattamento del dolore neuropatico.

I polifenoli sono composti ubiquitari nel mondo vegetale ed hanno un ruolo
25 fondamentale nella fisiologia della pianta, in quanto contribuiscono ai seguenti aspetti:

- resistenza nei confronti di microrganismi e insetti;
- pigmentazione;
- caratteristiche organolettiche.

La frutta ed i vegetali necessitano di una molteplicità di composti per preservare la loro

integrità in quanto sono continuamente esposti a tensioni ambientali, come i raggi UV e le alte temperature. Questi fattori stimolano la sintesi di composti protettivi come le antocianine; ed infatti i vegetali e la frutta dell'area mediterranea proprio per la particolare combinazione di calore e luce ne sono particolarmente ricchi.

5 Il termine polifenoli include parecchie classi di composti con una struttura chimica comune: sono derivati del benzene con uno o più gruppi idrossilici associati all'anello. Questa struttura consente a tali composti di funzionare attivamente da antiossidanti in quanto stabilizzano chimicamente i radicali liberi, fungono inoltre da chelanti di metalli pro-ossidanti e *quencher* della formazione di ossigeno singoletto. I polifenoli
10 costituiscono i principi attivi di molte piante medicinali e i meccanismi d'azione responsabili della loro attività farmacologica non sono ancora completamente conosciuti. Generalmente influenzano la qualità, l'accettabilità e la stabilità dell'alimento agendo come aromatizzanti, coloranti e antiossidanti.

Secondo la presente descrizione per polifenoli totali s'intendono tutte le molecole
15 comprendenti almeno una funzione fenolica come ad esempio fenoli semplici e flavonoidi.

I polifenoli totali della composizione della presente invenzione potranno essere ottenuti da estratti di vegetali di *Hypericum perforatum*, *Punica granatum*, *Sylibum marianum*, *Cynara scolimus*, *Vitis vinifera*, *Camelia sinensis*, *Rosmarinus officinalis*, *Malpighia*
20 *glabra* *Curcuma longa*, *Curcuma xanthorrhiza*.

Tali estratti potranno essere estratti idroalcolici, estratti idroalcolici liofilizzati, estratti secchi, estratti molli, granulati o loro miscele.

Gli estratti come sopra definiti potranno essere preparati secondo un qualsiasi metodo comunemente utilizzato dal tecnico del settore.

25 La percentuale in peso di polifenoli totali nella composizione della presente invenzione potrà variare tra il 3 ed il 9% in peso, ad esempio potrà essere circa il 3%, 3,5%, 4%, 4,5%, 5%, 5,5%, 5,7%, 6%, 6,5%, 7%, 7,5%, 8%, 8,5% e 9% in peso della composizione. E' evidente che anche tutti gli altri numeri oltre a quelli sopra indicati puntualmente, inclusi i decimali, compresi nell'intervallo tra 3 e 9 sono da intendersi
30 esplicitamente parte della presente invenzione.

La concentrazione di polifenoli totali nella composizione potrà essere espressa come contenuto di acido gallico e potrà essere determinata, ad esempio, mediante la reazione di Folin-Ciocalteu, reazione che prevede l'estrazione delle sostanze fenoliche in etanolo 45% e la reazione dell'estratto con il reattivo di folin in ambiente basico con sodio carbonato al 20%. Dopo due ore si legge l'assorbanza a 760nm.

Tale determinazione includerà tra i polifenoli totali anche i flavonoidi e quindi anche la quercetina e quegli antocianosidi che comprendono almeno un gruppo fenolico.

Pertanto, nei valori indicati come polifenoli totali, saranno compresi anche alcuni ma non tutti antocianosidi. Di conseguenza è fornita nella presente descrizione anche una misura degli antocianosidi totali che comprenda anche tutti gli antocianosidi privi di gruppo fenolico.

I flavonoidi dal punto di vista chimico sono dei difenilpropani distinti in varie classi a seconda del grado di ossidazione dell'anello eterociclico. Costituiscono una categoria di sostanze polifunzionali ad elevata bioattività, comprese nei polifenoli, che comprende più di 5000 composti.

Possiedono proprietà biochimiche d'interesse funzionale nel campo nutrizionale e terapeutico.

E' stato dimostrato che i flavonoidi hanno un ruolo importante nella cardioprotezione, dal momento che molti studi riportano che diete ricche in flavonoidi riducono il rischio di malattie cardiovascolari.

I flavonoidi favoriscono anche la neuro protezione e fungono, inoltre, da detossificanti in quanto aumentano l'attività degli enzimi della fase II, deputati all'eliminazione di metaboliti ad azione tossica per l'organismo.

I flavonoidi della composizione della presente invenzione potranno essere ottenuti da estratti di vegetali, come sopra indicati di *Hypericum perforatum*, *Punica granatum*, *Sylibum marianum*, *Cynara scolymus*, *Vitis vinifera*, *Camelia sinensis*, *Rosmarinus officinalis*.

La percentuale in peso di flavonoidi esclusa la quercetina nella composizione della presente invenzione potrà variare tra l'1 ed il 7% in peso, circa 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, 4,5%, 5%, 5,5%, 5,7%, 6%, 6,5%, 7%, in peso della composizione. E'

evidente che anche tutti gli altri numeri oltre a quelli sopra indicati puntualmente, inclusi i decimali, compresi nell'intervallo tra 1 e 7 sono da intendersi esplicitamente parte della presente invenzione.

La concentrazione di flavonoidi esclusa la quercetina nella composizione, potrà essere
5 determinata ad esempio facendo reagire una soluzione metanolica contenente i flavonoidi da analizzare con una soluzione di acido borico ed acido ossalico in acido acetico ed acido formico e leggendo l'assorbanza della soluzione contenente i flavonoidi a 425 nm.

La quercetina è un composto naturale ampiamente diffuso nel mondo vegetale e fa
10 parte del gruppo di flavonoidi classificati come flavonoli.

E' chiamata anche meletina o sofretina ed è un flavonolo con azione anti-ossidante, anti-infiammatoria, anti-virale, immunomodulatoria, anticancro, e gastroprotettiva. Si riconoscono inoltre azione anti-allergica e preventiva delle complicazioni secondarie del diabete.

15 L'alimentazione occidentale generalmente fornisce un apporto giornaliero di flavonoli compreso tra 20-50 mg e la maggior parte di questo è rappresentato da glicosidi della quercetina, del caempferolo e della miricetina. Di questi, circa 13,82 mg sono rappresentati da glicosidi della quercetina. È contenuta in diversi frutti come ad es. mela, bacche, brassicacee, pomodori, tè, cipolle, ecc. ed anche in estratti (anche
20 estratti idroalcolici) di *Hypericum perforatum*, *Camelia sinensis*, *Sylibum marianum*, *Vaccinium myrtillus*.

La percentuale in peso di quercetina nella composizione della presente invenzione potrà variare dallo 0,05% allo 0,3% in peso, ad esempio 0,05%, 0,06%, 0,07%, 0,08%,0,09%,0,1%, 0,11%, 0,13%, 0,14%, 0,15%, 0,16%, 0,17%, 0,18%, 0,19%,
25 0,2%, 0,21%, 0,22%, 0,23%, 0,24%, 0,25%, 0,26%, 0,27%, 0,28%, 0,29%, 0,3% in peso della composizione.

La concentrazione di quercetina nella composizione potrà essere determinata, ad esempio, mediante HPLC in fase mobile e misurando la lunghezza d'onda a 370 nm.

Gli antocianosidi sono una classe di pigmenti vegetali poliaromatici poliossidrilati in
30 grado di reagire con gli ossidanti quali l'ossigeno molecolare e i radicali liberi riducendo

così i danni che queste molecole possono provocare alle cellule e ai tessuti.

Si ritrovano nei fiori e frutti così come negli arbusti e nelle foglie autunnali di alcune piante. Il colore degli antocianosidi può variare dal rosso al blu e dipende dal pH del mezzo in cui si trovano e dalla formazione di sali con metalli pesanti presenti in quei
5 tessuti.

Gli antocianosidi della composizione della presente invenzione potranno essere ottenuti da estratti di vegetali, come ad esempio estratti idroalcolici, di *vitis vinifera*, *Vaccinium myrtillus*, *Hibiscus sabdariffa*.

La percentuale in peso degli antocianosidi totali (comprendente anche gli antocianosidi
10 aventi gruppi fenolici) nella composizione della presente invenzione potrà variare dallo 0,1 all'1% in peso, ad esempio 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1% in peso della composizione.

La concentrazione degli antocianosidi totali nella composizione potrà essere determinata, ad esempio, mediante un test che prevede l'estrazione del campione con
15 HCl 0,1% in MeOH al riparo dalla luce e la successiva lettura della soluzione ottenuta a 540 nm.

Per la preparazione degli estratti vegetali da utilizzare nella composizione della presente invenzione potranno essere usati i metodi convenzionali noti al tecnico del settore che quindi non necessitano di ulteriore descrizione.

20 Tali estratti potranno essere estratti idroalcolici, estratti idroalcolici liofilizzati, estratti secchi, estratti molli, granulati o loro miscele.

Qualsiasi metodo di estrazione noto al tecnico del settore può essere utilizzato per preparare l'estratto di secondo l'invenzione, ad esempio, mediante la preparazione di estratti acquosi o alcolici o di estratti ottenibili mediante solventi organici. Il termine
25 "solvente acquoso" indica qualsiasi solvente composto totalmente o parzialmente di acqua. Tale termine potrà quindi definire l'acqua stessa, soluzioni idroalcoliche in qualsiasi proporzione o solventi composti da acqua e da un composto come il propilen glicole in qualsiasi proporzione. Tra i solventi alcolici, si può citare in particolare l'etanolo. L'estratto finale potrà essere preparato ad esempio in forma di estratto secco,
30 molle, liofilizzato, granulato, secondo i metodi noti nello stato della tecnica. Estratti

vegetali liofilizzati potranno essere preparati per evaporazione (sublimazione) totale del solvente dopo concentrazione dell'estratto idroalcolico e congelamento dell'estratto così ottenuto. Detta evaporazione potrà essere realizzata a temperature inferiori a 50°C, ad esempio inferiori a 40°C in modo da non alterare i principi attivi.

- 5 Secondo la presente descrizione, quindi, sono possibili diverse forme di realizzazione della composizione dell'invenzione, ne saranno di seguito indicate alcune.

In una forma di realizzazione i polifenoli totali sono ottenuti da estratti di uno o più tra *Hypericum perforatum*, *Punica granatum*, *Sylibum marianum*, *Cynara scolimus*, *Vitis vinifera*, *Camelia sinensis*, *Rosmarinus officinalis*, in cui i flavonoidi sono ottenuti da
10 estratti di uno o più tra *Hypericum perforatum*, *Punica granatum*, *Sylibum marianum*, *Cynara scolimus*, *Vitis vinifera*, *Camelia sinensis*, *Rosmarinus officinalis*, la quercetina è ottenuta da estratti di uno o più tra *Hypericum perforatum*, *Camelia sinensis*, *Sylibum marianum*, *Vaccinium myrtillus*, gli antocianosidi sono ottenuti da estratti di uno o più tra *Vitis vinifera* e/o *Vaccinium myrtillus*.

- 15 In un'altra forma di realizzazione i polifenoli totali sono ottenuti da estratti di uno o più tra *Hypericum perforatum*, *Vitis vinifera*, *Rosmarinus officinalis*, in cui i flavonoidi sono ottenuti da estratti di uno o più tra *Hypericum perforatum*, *Vitis vinifera*, *Rosmarinus officinalis*, la quercetina è ottenuta da estratti di *Hypericum perforatum*, gli antocianosidi sono ottenuti da estratti di *Vitis vinifera*.

- 20 Secondo un'altra forma di realizzazione i polifenoli totali sono ottenuti da estratti di uno o più tra *Hypericum perforatum*, *Rosmarinus officinalis*, in cui i flavonoidi sono ottenuti da estratti di uno o più tra *Hypericum perforatum*, *Rosmarinus officinalis*, la quercetina è ottenuta da estratti di *Hypericum perforatum*, gli antocianosidi sono ottenuti da estratti di *Vitis vinifera*.

- 25 In un'altra forma di realizzazione, i polifenoli totali sono ottenuti da estratti di uno o più tra *Hypericum perforatum*, *Vitis vinifera*, in cui i flavonoidi sono ottenuti da estratti di uno o più tra *Hypericum perforatum*, *Vitis vinifera*, la quercetina è ottenuta da estratti di *Hypericum perforatum*, gli antocianosidi sono ottenuti da estratti di *Vitis vinifera*.

- In una ulteriore forma di realizzazione, i polifenoli totali sono ottenuti da estratti di
30 *Hypericum perforatum* e/o *Cynara scolymus* e/o *Rosmarinus officinalis*, in cui i

flavonoidi sono ottenuti da estratti di *Hypericum perforatum* e/o *Cynara scolymus*, la quercetina è ottenuta da estratti di *Hypericum perforatum*, gli antocianosidi sono ottenuti da estratti di *Vitis vinifera* e/o *Vaccinium myrtillus*.

In un'ulteriore forma di realizzazione detti polifenoli sono ottenuti da estratti di
5 *Hypericum perforatum* e *Rosmarinus officinalis*, in cui detti flavonoidi sono ottenuti da estratti di *Hypericum perforatum*, detta quercetina è ottenuta da estratti di *Hypericum perforatum* e detti antocianosidi sono ottenuti da estratti di *Vitis vinifera*.

L'iperico perforato (*Hypericum perforatum*), noto anche come Erba di San Giovanni, è una specie appartenente al genere *Hypericum*, contiene un gran numero di differenti
10 classi di sostanze: derivati del naftodiantrone come l'ipericina, pseudoipericina e isoipericina, e derivati del floroglucinolo come l'iperforina. Contiene anche flavonoidi come iperossido, rutina, quercetina, quercitrina e isoquercitrina, procianidine, oli essenziali e xantani.

Dagli studi effettuati dai presenti inventori risulta che estratti liofilizzati di *Hypericum*
15 *perforatum* contengono circa il 10-14 % di polifenoli espressi come % di acido gallico, in particolare tra il 6 e l'8% dell'estratto di iperico è rappresentato da flavonoidi totali, e tra l'1,2 e l'1,7% dell'estratto di iperico è rappresentato da quercetina. L'estratto non contiene antocianosidi.

Per la preparazione dell'estratto sono usate come materia prima sia le sommità fiorite
20 che l'intera pianta appartenente a detta specie. Le procedure per essiccare le piante o parti di essa sono note al tecnico del settore e non necessitano qui di ulteriore descrizione. In una forma di realizzazione, detto estratto è ottenibile in forma liquida utilizzando un idoneo solvente o miscela di solventi scelti nel gruppo comprendente etanolo, acqua, acqua distillata, esteri, eteri, acetone o una miscela idroalcolica, ad
25 esempio all'80, 75, 70, 60% di alcool in acqua.

Naturalmente, l'estratto può essere preparato da almeno una delle molte varietà appartenenti alla specie *Hypericum perforatum* (Iperico perforato). E' dunque inteso che, nella presente descrizione, il termine "*Hypericum perforatum*" o "Iperico perforato" o "Iperico" deve essere considerato come indicare una qualsiasi delle molte varietà di
30 piante appartenenti alla specie *Hypericum perforatum*.

La specie *Vitis vinifera* comprende un numero elevatissimo di vitigni diversi, alcuni di questi, per la particolare colorazione fogliare, sono definiti come "vite rossa". In una forma particolare di realizzazione dell'invenzione il termine *Vitis vinifera* è inteso essere limitato a vitigni di vite rossa. Per la preparazione dell'estratto di vite rossa secondo la
5 presente invenzione possono essere utilizzati materiali vegetali derivati dalle foglie in tutti i suoi stadi di sviluppo. L'estratto può essere preparato da almeno una delle molte varietà appartenenti alla specie *Vitis vinifera* che ricadono nella definizione di vite rossa. E' dunque inteso che, nella presente descrizione, il termine "vite rossa" o "vite" deve essere considerato come indicare una qualsiasi delle molte varietà di piante
10 appartenenti alla specie *Vitis vinifera* comunemente definite come "vite rossa".

Il *Rosmarinus officinalis* noto anche come rosmarino è una specie appartenente al genere *Rosmarinus*, contiene differenti classi di sostanze tra le quali il pinene, canfene, cineolo, eucaliptolo, canfora, borneolo, diterpeni fenolici quali carnosolo e acido carnosico, derivati idrossicinnamici quali acido rosmarinico, flavonoidi quali nepetina e
15 triterpenoidi quali acido oleanico.

Naturalmente, l'estratto può essere preparato da almeno una delle molte varietà appartenenti alla specie *Rosmarinus officinalis*. E' dunque inteso che, nella presente descrizione, il termine "*Rosmarinus officinalis*" o "rosmarino" deve essere considerato come indicare una qualsiasi delle molte varietà di piante appartenenti alla specie
20 *Rosmarinus officinalis*.

Punica granatum, comunemente noto come melograno, è un fruttifero arbusto deciduo o piccolo albero che cresce tra i cinque e gli otto metri di altezza.

Silybum marianum, comunemente noto come Cardo Mariano, è una pianta annuale o biennale della famiglia delle Asteraceae. Le parti della pianta usate per ottenere gli
25 estratti sono i semi maturi.

Cynara scolimus è una pianta appartenente alla specie *Cynara cardunculus* (var. *Scolymus*) originaria del Sud Europa. Le parti della pianta usate per ottenere gli estratti sono le foglie basali, intere o ridotte in frammenti.

Camelia sinensis è la specie di pianta le cui foglie e boccioli di foglie sono usati per la
30 produzione di tè verde. E' una pianta appartenente al genere *Camellia*.

La pianta del Mirtillo (*Vaccinium myrtillus*) cresce in Europa, Nord America e Asia. Le parti della pianta usate per ottenere gli estratti sono le bacche. Tra i composti presenti negli estratti di mirtillo ci sono i tannini, flavonoidi glicosidici, acidi fenolici, pectine, triterpeni, polifenoli quali procianidine e antocianodine

- 5 *Curcuma longa* è una pianta erbacea perenne rizomatosa della famiglia dello zenzero, Zingiberaceae. L'estratto è preparato per estrazione con solvente dal rizoma essiccato e macinato.

In una forma di realizzazione le composizioni della presente invenzione comprendono ulteriormente Vitamina B1, Vitamina B6 e/o Vitamina B12. Le vitamine del complesso B
10 sono a completamento dell'azione del prodotto, data le loro proprietà di rigenerazione del sistema nervoso. La combinazione di vitamina B1, B6 e B12 agisce in maniera sinergica nel trattamento del dolore neuropatico con gli altri composti della composizione della presente invenzione migliorando l'allodinia, l'iperalgisia e la velocità di conduzione del nervo.

- 15 In particolare, la vitamina B1 potrà essere presente in una concentrazione in peso di composizione compresa tra circa lo 0,005% e lo 0,01%; la vitamina B6 potrà essere presente in una concentrazione in peso di composizione compresa tra circa lo 0,005% e lo 0,01%.

In una forma di realizzazione le composizioni della presente invenzione comprendono
20 anche pappa reale e/o lievito di birra e/o spirulina o loro derivati. La presenza nella composizione della pappa reale presenta il vantaggio di apportare aminoacidi essenziali, l'aggiunta di lievito di birra o delle vitamine da esso derivate presenta il vantaggio di apportare vitamina B1, mentre l'aggiunta di spirulina presenta il vantaggio di apportare vitamina B12. Tali nutrienti hanno tutti effetti benefici sul corretto
25 funzionamento della trasmissione nervosa e quindi indirettamente sul trattamento del dolore neuropatico.

La pappa reale potrà essere ad esempio in una percentuale tra il 10 ed il 30% in peso della composizione. Il lievito di birra potrà essere ad esempio in una percentuale tra il 20 ed il 40% in peso della composizione. La spirulina in una percentuale in peso tra il
30 10 e il 30% in peso della composizione. L'uso di pappa reale in queste percentuali

determina un buon apporto di aminoacidi essenziali e ramificati, in grado di contrastare l'aumentato turn-over delle proteine e conseguente perdita di tono muscolare dovuto all'elevato catabolismo che si verifica nelle persone affette da tumori.

Rientrano nell'ambito di tutela della presente invenzione anche tutte le composizioni
5 comprendenti i composti a), a'), a'') e b) nei relativi rapporti ponderali sopra descritti.

Le composizioni secondo la presente invenzione sono estremamente efficaci nel trattamento, inteso anche come profilassi e terapia, del dolore neuropatico in genere. In particolare, potranno essere usate nel trattamento del dolore neuropatico causato da un trattamento con un farmaco, in particolare con un farmaco chemioterapico (ad
10 esempio un trattamento con oxaliplatino, vincristina, vinblastina, paclitaxel, cisplatino, taxano, epotiloni, bortemozide, alcaloidi della vinca), da malattie croniche, traumi, esposizione a sostanze chimiche tossiche, un'infezione in corso, un'infezione pregressa, funzione alterata di un organo, malattie vascolari, malattie metaboliche, malattie autoimmuni o quando non si conosce la causa (dolore neuropatico idiopatico).

15 Le composizioni potranno anche essere usate nel trattamento del dolore neuropatico descritto come neuropatia diabetica periferica, nevralgia erpetica postale, nevralgia del trigemino, dolore neuropatico della parte bassa della schiena, distrofia simpatica riflessa, sindrome dell'arto fantasma. Laddove tali dolori possano dipendere da cause diverse, è chiaro che la composizione della presente invenzione risulta efficace
20 indipendentemente dalle cause a monte di tali sintomatologie, indipendentemente dal fatto che siano da attribuire all'uso di chemioterapici o ad altre cause.

Il dosaggio delle composizioni potrà variare in funzione dell'età, del sesso e delle condizioni generali del paziente, della natura e della gravità della patologia o disturbo. Per la determinazione del dosaggio si dovrà quindi tener conto, della condizione da
25 trattare, della severità della condizione da trattare, dell'età, del peso e delle condizioni fisiche generali del particolare paziente così come da altre medicine che il paziente sta assumendo, com'è ben noto agli esperti del settore.

La composizione della presente invenzione potrà essere somministrata anche in associazione o in concomitanza o sequenzialmente con altri farmaci che potranno
30 essere farmaci chemioterapici come quelli sopra riportati o anche farmaci per il

trattamento di una o più delle condizioni patologiche sopra indicate.

È quindi evidente che detto quantitativo efficace può essere all'occorrenza abbassato o aumentato secondo le risposte del paziente trattato e/o secondo la valutazione del medico che prescrive le associazioni e/o le composizioni della presente invenzione.

5 La composizione potrà essere somministrata per via orale.

Tipicamente composizioni, per uso orale in forma solida, possono contenere una quantità per unità di dosaggio di polifenoli compresa tra 20 e 50 mg, ad esempio da 30 a 40 mg, una quantità di antocianosidi tra 1 e 4 mg, ad esempio da 2 a 3 mg, una quantità di flavonoidi da 10 e 25 mg, ad esempio da 15 a 20 mg, una quantità di
10 quercetina tra 0,1 e 1 mg, ad esempio da 0,3 a 0,5 mg.

Tipici regimi di dosaggio potranno essere da 2 a 8 unità di dosaggio al giorno nelle quantità sopra definite, ad esempio somministrando una o due unità di dosaggio ogni 6-8 ore.

Con il termine unità di dosaggio s'intende nella presente descrizione la formulazione unitaria per una singola somministrazione, ad esempio una compressa, capsula ecc.
15

Tali composizioni potranno essere preparate secondo le tecniche note al tecnico del settore utilizzando i composti ottenuti dagli estratti sopra descritti e uno o più veicolanti e/o diluenti e/o eccipienti, ad esempio miscelando i singoli estratti direttamente durante la preparazione della composizione o aggiungendo ai veicolanti e/o diluenti e/o
20 eccipienti una miscela dei composti precedentemente preparata.

Le composizioni potranno essere in qualsiasi formulazione preparata secondo le tecniche note all'esperto medio del settore, quale ad esempio forme solide, semisolide, liquide, granulari, capsule, compresse, pasticche, granulati, polveri, sciroppi, elisir, gelatine dura, gelatine morbide, sospensioni, emulsioni (olio in acqua o acqua in olio),
25 soluzioni, gel.

La composizione come qui descritta, in una qualsiasi delle forme di realizzazione sopra indicate potrà essere in forma di composizione farmaceutica, ovvero comprendere ingredienti di grado farmaceutico oppure potrà essere o essere inserita in un integratore alimentare, in un alimento a fini speciali.

30 Per la preparazione delle composizioni farmaceutiche la miscela dei composti sarà

formulata in idonee unità di dosaggio con uno o più eccipienti e additivi farmaceuticamente accettabili. Composizioni farmaceutiche in forma di compresse e capsule per somministrazione orale possono essere in forma a dosaggio unitario, e possono contenere eccipienti convenzionali inclusi, per esempio, agenti leganti, per
5 esempio, gomma arabica, gelatina, sorbitolo, gomma adragante, o polivinilpirrolidone; riempitivi, per esempio lattosio, zucchero, amido di mais, fosfato di calcio, sorbitolo o glicina; lubrificanti di pastigliatura, per esempio stearato di magnesio, talco, polietilenglicole o silice; disintegranti, per esempio amido di patata; e agenti bagnanti accettabili farmaceuticamente, per esempio sodio laurilsolfato. Le compresse possono
10 essere rivestite secondo metodi ben noti nella normale pratica farmaceutica.

Le composizioni potranno essere realizzate in forma d'integratore alimentare, alimento a fini medici speciali, o tal quale oppure aggiungendo ad essa uno o più eccipienti e/o ingredienti alimentari.

La presente descrizione fornisce anche un metodo per il trattamento del dolore neuropatico comprendente la somministrazione a pazienti che ne abbiano bisogno, di
15 quantitativi efficaci di una composizione come qui descritta.

Detto dolore neuropatico potrà essere dolore causato da: un trattamento con un farmaco, un trattamento con un farmaco chemioterapico, malattie croniche, traumi, esposizione a sostanze chimiche tossiche, un'infezione in corso, un'infezione
20 pregressa, funzione alterata di un organo, malattie vascolari, malattie metaboliche, malattie autoimmuni; o essere descritto come neuropatia diabetica periferica, nevralgia erpetica postale, nevralgia del trigemino, dolore neuropatico della parte bassa della schiena, distrofia simpatica riflessa, sindrome dell'arto fantasma o essere un dolore neuropatico di cui non si conosce la causa (dolore neuropatico idiopatico).

25 Nel metodo di trattamento il dosaggio esatto e la frequenza di somministrazione delle composizioni dipenderà dalla particolare severità della condizione da trattare, dall'età, dal peso e dalle condizioni fisiche generali del particolare paziente come è ben noto agli esperti del settore. Tipici regimi di dosaggio da usare nel metodo di trattamento potranno essere da 2 a 8 unità di dosaggio al giorno nelle quantità sopra definite, ad
30 esempio somministrando una o due unità di dosaggio ogni 6-8 ore.

La presente invenzione è stata fin qui descritta con riferimento ad alcune sue forme di realizzazione. È da intendersi che possono esistere altre forme di realizzazione che afferiscono al medesimo nucleo inventivo, tutte rientranti nell'ambito di protezione delle rivendicazioni qui di seguito riportate.

- 5 E' inteso che quando le quantità delle componenti indicate negli esempi di composizione sotto non raggiungono il quantitativo totale indicato, le restanti componenti potranno essere eccipienti intesi nel senso più ampio e generale del termine come utilizzato comunemente, potranno quindi comprendere eccipienti in senso stretto, conservanti, addensanti, leganti, veicolanti, ecc.

ESEMPI DI COMPOSIZIONI

Esempio 1

5

COMPOSTI NEL PRODOTTO	% nella miscela del prodotto
Polifenoli totali come acido gallico	6
antocianosidi	0,5
Vitamine totali	0,05
Vitamina B1	0,0078
Vitamina B6	0,0085
eccipienti	93,4873

* Il 6% in peso di composizione di polifenoli totali comprende, espresso in % in peso della composizione,

flavonoidi totali	4
Quercetina	0,1

Esempio 2

10

COMPOSTI NEL PRODOTTO	% nella miscela del prodotto
Polifenoli totali come acido gallico di cui % nella miscela del prodotto flavonoidi 3,9 quercetina 0,52	5,7
antocianosidi totali	0,52
Acidi organici totali	0,50
Proteine	23,15
Aminoacidi liberi totali	1,21
Polisaccaridi di cui % nella miscela del prodotto fibra alimentare solubile 2,38	34,02
Fibra alimentare insolubile	6,44
Zuccheri di cui % nella miscela del prodotto monosaccaridi 13,74 oligosaccaridi 2,39	16,13
Grassi	1,90
Vitamine totali di cui % nella miscela del prodotto Vitamina B1 0,0078 Vitamina B6 0,0085	0,05
Metalli totali	3,80

Esempio 3

COMPONENTI	per porzione giornaliera minima 3480 mg (6 op)	per porzione giornaliera massima 4640 mg (8 op)
VITAMINE		
Vitamina B ₁	0,23 mg	0,3 mg
Vitamine B ₆	0,25 mg	0,33 mg
Altri fattori nutrizionali		
Polifenoli totali espressi come acido gallico*	165 mg	220 mg
Antocianosidi totali	15 mg	20 mg
VALORE ENERGETICO	12,25 Kcal	16,33 Kcal
Proteine	0,515 g	
carboidrati	1,075 g	
grassi	0,06 g	

* I 165 mg di polifenoli totali comprendono

di cui Flavonoidi totali	113 mg	151 mg
di cui Quercetina	5,8 mg	7,7 mg

5

Esempio 4

COMPOSTI NEL PRODOTTO	mg per 6 capsule	mg per 8 capsule
Polifenoli totali come acido gallico*	210	280
Antocianosidi totali	15	20
Acidi organici totali	14,4	19,2
Proteine	671,0	894,6
Aminoacidi liberi totali	34,9	46,6
Polisaccaridi	985,9	1314,6
di cui fibra alimentare solubile 69,0 mg per 6 capsule e 92,0 mg per 8 capsule		
Fibra alimentare insolubile	186,6	248,8
Zuccheri	467,4	623,2
di cui monosaccaridi	398,2	530,9
di cui oligosaccaridi	69,2	92,3
Grassi	55,2	73,6
Vitamine totali	1,4	1,8
Vitamina B1 0,1 e Vitamina B6 0,2 per 6 capsule Vitamina B1 0,2 e Vitamina B6 0,3 per 8 capsule		
Metalli totali	109,3	145,8
Perdita all'essiccamento	180	243

* I 210 mg di polifenoli totali comprendono

flavonoidi totali	113	151
Quercetina	2,8	3,7

Esempio 5

COMPOSTI NEL PRODOTTO	% nella miscela del prodotto
Polifenoli totali come acido gallico	6
Antocianosidi totali	0,5
Vitamine totali	
di cui % nella miscela del prodotto	
Vitamina B1 0,0078	
Vitamina B6 0,0085	0,05
Lievito di birra	20,8
pappa reale	25,1
amido di riso	16,7

* Il 6% in peso di composizione di polifenoli totali comprende, espresso in % in peso

5 della composizione,

flavonoidi totali	4
Quercetina	0,1

Esempio 6

COMPOSTI NEL PRODOTTO	% nella miscela del prodotto
Polifenoli totali come acido gallico*	6
Antocianosidi totali	0,5
Vitamine totali	0,05
Lievito di birra	20
pappa reale	25
amido di riso	17
acqua	27,25

10 * Il 6% in peso di composizione di polifenoli totali comprende, espresso in % in peso

della composizione,

flavonoidi totali	4
Quercetina	0,2

Esempio 7

COMPOSTI NEL PRODOTTO	% nella miscela del prodotto
Polifenoli totali come acido gallico *	6
antocianosidi	0,5
Vitamine totali di cui % nella miscela del prodotto	
Vitamina B1 0,0078	
Vitamina B6 0,0085	
Vitamina B12 0,0080	0,05
eccipienti	90

* Il 6% in peso di composizione di polifenoli totali comprende, espresso in % in peso della composizione,

flavonoidi totali	4
Quercetina	0,2

5 Esempio 8

COMPOSTI NEL PRODOTTO	% nella miscela del prodotto
Polifenoli totali come acido gallico *	6
antocianosidi	0,5
Vitamine totali di cui % nella miscela del prodotto	
Vitamina B1 0,0078	
Vitamina B6 0,0085	0,05
spirulina	25,1
amido di riso	16,7

* Il 6% in peso di composizione di polifenoli totali comprende, espresso in % in peso della composizione,

flavonoidi totali	4
Quercetina	0,2

ESEMPI SPERIMENTALI

Negli esperimenti decritti di seguito le seguenti composizioni sono indicate con i rispettivi codici

- 5 *I valori riportati nella griglia sotto rappresentano la percentuale di ciascun componente rispetto alla miscela analizzata.*

CODICE MISCELA	PERCENTUALE IN PESO DEI COMPONENTI NELLA MISCELA				
	POLIFENOLI TOTALI espressi come acido Gallico	FLAVONOIDI TOTALI, espressi come iperoside	ANTOCIANOSIDI TOTALI, espressi come cianidina	Quercetina	Ulteriori principi attivi rilevanti presenti nella miscela
ABO -01	1,2	1	non presenti	non presente	
ABO-02	2	1,7	non presenti	non presente	
ABO-05	8	5	non presenti	0,24	
ABO-06	7,70	4,83	non presenti	non presente	Derivati caffeoilchinici espressi come acido clorogenico: 10,9
ABO-07	7	-	0,05	tracce	Procianidine totali espresse come cianidina: 25
ABO-08	2	1,4	0,17 - 0,25	0,2	Acidi totali espressi come acido idrossi citrico: 27
ABO-09	12,25	7,76	non presenti	1,52	ipericine totali: 0,284, Iperforine 0,946
ABO-10	33	-	non presenti	1	caffeina: 5, epigallo catechin gallato: 12
ABO-11	16,12	7,77	non presenti	non presente	Carnosolo: 1, acido rosmarinico: 4
ABO-12	19,90	3-7	1,39	0,5-2	
ABO-13	6,47	1,89	non presenti	0,092	CURCUMINA: 3,8
ABO -14	0,4	0,006	0,09	0,005	Vitamina C: 6
ABO-15	0,4	0,006	0,09	0,005	Vitamina C: 5
ABO-17	0,018	0,001	non presenti	non nota	apigenina
ABO-21	35,4	1,7	25,56	0,1	

1. Valutazione dell'effetto di alcune frazioni di estratti vegetali in un modello di ossidazione indotta da oxaliplatino.

1.1 Descrizione del modello di ossidazione indotta da oxaliplatino

5 L'agente chemioterapico oxaliplatino è in grado di evocare un effetto neurotossico che si estrinseca in alterazioni morfologiche e molecolari del tessuto nervoso. Tale danneggiamento è responsabile di una sintomatologia algica invalidante e cronicizzante in funzione della dose di chemioterapico.

L'oxaliplatino induce in colture di cellule neuronali così come di cellule gliali la
10 produzione di radicali dell'ossigeno. L'incubazione con oxaliplatino 30 μ M è in grado di promuovere l'ossidazione di una sonda fluorescente. Tal effetto è immediatamente successivo all'aggiunta della sostanza al mezzo di coltura suggerendo che lo stress ossidativo sia un meccanismo all'origine del danno cellulare indotto da oxaliplatino.

Analogamente in vivo (ratto), la somministrazione ripetuta quotidianamente di
15 oxaliplatino 2,4 mg/kg⁻¹ intraperitoneo (i.p.) per 21 giorni induce stress ossidativo sia a livello del sistema nervoso periferico che del centrale. Tale sbilancio ossido-riduttivo si concretizza in un danno a livello lipidico (perossidazione lipidica), proteico (carbonilazione proteica) e del DNA (incremento dei livelli di 8-OH-dG, 8-idrossi-guanosina).

20 Il modello di neuropatia da oxaliplatino indotta nel ratto mediante il protocollo di somministrazione descritto sopra promuove, contemporaneamente al danno ossidativo, una forma di dolore neuropatico caratterizzato da iperalgesia e allodinia.

1.2 Valutazione dell'effetto antiossidante

25 E' stato valutato in modo approfondito il profilo antiossidante di estratti e frazioni ricchi in composti chimici ad attività antiossidante (polifenoli, flavonoidi, procianidine, antocianosidi, catechine, derivati dell'acido carnosico, vitamine, ecc) a partire dalla concentrazione risultata non citotossica, al fine di individuare possibili agenti farmacologici impiegabili nelle problematiche del dolore neuropatico derivante dal
30 trattamento con chemioterapici.

A tale scopo il profilo antiossidante è stato studiato sia nei confronti del radicale idrossile (lipoperossidazione), dell'anione superossido generato in seguito a xantina e ipoxantina e che dell'anione che in seguito a trattamento chemioterapico con oxaliplatino.

- 5 In laboratorio è stata caratterizzata una neuropatia indotta dall'agente chemioterapico oxaliplatino che induce nell'animale da esperimento una sindrome dolorosa accompagnata da alterazioni morfologiche e molecolari del tessuto nervoso. Tra queste risultano evidenti danni ossidativi riproducibili in modelli cellulari di tossicità da oxaliplatino. In particolare, in colture primarie di astrociti corticali di ratto, oxaliplatino è
- 10 in grado di indurre un incremento della produzione di anione superossido.

I test sono stati realizzati in due differenti esperimenti: il primo è stato realizzato sui campioni da ABO-1 a ABO-17, il secondo con il campione ABO-21. I risultati sono riportati separatamente essendo diversi anche i relativi controlli.

15

Materiali e metodi

Colture cellulari

- La linea primaria di astrociti è stata ottenuta secondo il metodo descritto da *McCarthy* e *De Vellis* (1980). Gli astrociti sono stati isolati dalla corteccia di ratti neonati (P1-P3). Le
- 20 cortecce, dopo aver eliminato le meningi, sono state omogenate meccanicamente, e digerite con tripsina-EDTA (Sigma - Germania) 0,5% e DNAsi (Sigma, Germania) 1% per 30 minuti a 37°C sotto blanda agitazione. La sospensione è stata quindi filtrata (filtro da 100 µm, Millipore - Italia) e centrifugata a 1200 rpm per 10 minuti. Il pellet è stato risospeso nell'apposito medium (DMEM alto glucosio (4,5 g/l), penicillina (100
- 25 U/ml), streptomicina (100 µg/ml), sodio piruvato 1mM, glutammina 1%, 20% siero fetale bovino (FBS; Lonza – Belgio), e piastrato in fiasche precedentemente polilisinate (10 µg/mL di poli-L-isina; Sigma). Ogni 2-3 giorni il medium descritto è stato sostituito con altro terreno di coltura contenente siero fetale bovino al 10%. Una volta raggiunta la confluenza si è proceduto all'eliminazione della microglia con uno shaker a circa
- 30 200 rpm per 1 ora seguito da uno a maggior velocità protratto per una notte per

staccare gli oligodendrociti. Le cellule rimaste adese alla fiasca hanno dato luogo a una coltura astrocitaria pura al 90%. Sono state quindi incubate a 37°C in atmosfera umida e contenente il 5% di CO₂ per 21 giorni prima dell'esperimento.

5 **Lipoperossidazione**

Il FeCl₃ e l'acido ascorbico generano radicale idrossile secondo la reazione di Fenton. Tale radicale è in grado di interagire con i lipidi presenti nel tessuto cerebrale generando malonil dialdeide. A tale scopo materiale cerebrale di ratto (ratti maschi Sprague-Dawley, Harlan, Italia) è stato omogenato in PBS in modo da ottenere una
10 concentrazione finale del 10% p/v. I composti in esame alla concentrazione di 50 µg/mL, sono stati aggiunti a 100 µL dell'omogenato di tessuto nervoso e incubati per 30 minuti a 37 C° insieme a FeCl₃ (20 µM) e acido ascorbico (100 µM). Al termine dell'incubazione sono stati aggiunti alla miscela 4 mL di acido tiobarbiturico (Sigma-Aldrich, Germania) 36 Mm (sciolto in una soluzione di acido acetico al 10% e quindi
15 portato a pH 4.0 con NaOH). I campioni sono stati quindi bolliti per 1 ora e la reazione è stata bloccata ponendo le provette in ghiaccio. Dopo centrifugazione a 1600xg a 4°C per 10 minuti si è proceduto al dosaggio spettrofometrico (550 nm) dei livelli di malonil dialdeide nel surnatante.

20 **Test di ossidazione del Nitro Blue Tetrazolium (NBT)**

Gli esperimenti sono stati condotti secondo il metodo descritto da *Ciuffi et al., 1998*. Il saggio comporta la produzione di anione superossido mediante la reazione tra ipoxantina (600 mM) e xantina ossidasi (10 mU/ml). E' stato valutato il profilo antiossidante dei composti in esame monitorando la cinetica di ossidazione del nitro
25 blue tetrazolium (NBT, 10 mM) in presenza di una concentrazione 50 µg/mL dei singoli estratti. La misurazione dell'attività antiossidante è stata effettuata spettrofotometricamente alla lunghezza d'onda di 560 nm. I valori riportati sono stati registrati dopo 60 minuti di reazione e sono stati espressi come Unità Arbitrarie di assorbanza (U.A).

Risultati

Lipoperossidazione

La reazione tra il FeCl_3 e l'acido ascorbico, specifica per generare radicale idrossile, incrementa significativamente i livelli di ossidazione lipidica, innalzando il valore basale di malonildialdeide da $23,40 \pm 2,20 \mu\text{mol/mg}$ proteine (100 %) a $44,10 \pm 2,5 \mu\text{mol/mg}$ proteine ($188,50 \pm 10,89 \%$), (Figura 1). L'analisi del profilo antiossidante degli estratti vegetali ha rivelato un'ottima efficacia degli estratti arricchiti in antocianosidi **ABO-12** ($27,84 \pm 0,99 \%$), catechine **ABO-10** ($26,71 \pm 0,87 \%$) e derivati dell'acido carnosico **ABO-11** ($26,12 \pm 1,84 \%$). Queste sostanze non solo prevengono totalmente l'ossidazione dovuta al reattivo di Fenton ma sono addirittura in grado di ridurre i livelli basali al di sotto del 100%. Gli estratti ABO-13 ($56,27 \pm 1,61 \%$), ABO-05 ($88,26 \pm 0,04 \%$) e ABO-07 ($99,40 \pm 1,34 \%$) possiedono, anch'essi, spiccate proprietà antiossidanti riportando i livelli di malonil dialdeide ai livelli di controllo. Anche l'estratto ricco in polifenoli, in particolare flavonoidi e quercetina **ABO-09** contrasta in modo significativo la generazione del prodotto di ossidazione di circa il 60 % ($124,91 \pm 7,05 \%$). In misura minore rispetto al precedente, l'estratto ABO-08 limita la generazione di malonil dialdeide ($149,27 \pm 4,96 \%$). Blande proprietà antiossidanti (riduzione del 20% circa) sono state rilevate anche per l'estratto di ABO-01 ($160,01 \pm 1,12 \%$), per l'estratto ABO-06 ($158,87 \pm 1,36 \%$) e per ABO-02 ($160,01 \pm 1,12 \%$). Non è stata registrata alcuna attività antiossidante per gli estratti di ABO-03, ABO-14, ABO-17 e per ABO-15 che sono gli unici a non essere statisticamente significativi (Fig. 1).

1.3 Test di ossidazione del Nitro Blue Tetrazolium (NBT)

Il livello basale di ossidazione del Nitro Blue Tetrazolium risulta di $0,15 \pm 0,02$ U.A. In seguito alla reazione tra xantina e ipoxantina, grazie alla quale viene generato anione superossido, il valore di ossidazione del NBT risulta significativamente incrementato, $5,35 \pm 0,56$ U.A. (Fig. 2).

La valutazione del profilo antiossidante dei differenti estratti (Fig. 2) ha permesso di osservare spiccate proprietà antiossidanti per l'estratto **ABO-12** ($1,62 \pm 0,09$ U.A.), per l'estratto **ABO-10** ($0,82 \pm 0,04$ U.A.) e per l'estratto **ABO-11** ($1,70 \pm 0,07$ U.A.), i quali

riducono notevolmente l'ossidazione massima del Nitro Blue Tetrazolium riportandola quasi ai livelli di controllo. Un significativo effetto antiossidante è stato registrato anche per l'estratto ABO-05 ($1,93 \pm 0,17$ U.A.), ABO-13 ($3,17 \pm 0,03$ U.A.) e **ABO-09** ($1,81 \pm 0,03$ U.A.). Tale effetto antiossidante rispecchia i valori registrati negli esperimenti di lipoperossidazione. L'estratto ABO-09 risulta maggiormente efficace nel limitare la generazione dell'anione superossido rispetto al radicale idrossile (Fig. 2 e Fig. 3). Anche gli estratti ABO-06, ABO-08 e ABO-07 ($2,20 \pm 0,17$ U.A.) riducono significativamente i livelli di anione superossido liberato dalla reazione tra ipoxantina e xantina ossidasi (rispettivamente $2,34 \pm 0,13$ U.A. e $2,11 \pm 0,03$ U.A.). Tali dati, se confrontati con quelli ricavati dagli esperimenti di lipoperossidazione, indicano che sia ABO-06, sia ABO-08, sono in grado di ridurre selettivamente i livelli dell'anione superossido rispetto al radicale idrossile. Un effetto antiossidante è stato osservato anche per ABO-14 ($4,07 \pm 0,1$ U.A.).

Nessun effetto antiossidante significativo è stato rilevato per l'estratto di ABO-01, ABO-02, ABO-03, ABO-17. Nella seconda tranche di campioni il più potente e significativo è risultato ABO-21.

1.4 Danno ossidativo da oxaliplatino. Dosaggio dell'anione superossido in colture di astrociti corticali di ratto mediante citocromo C.

Nella coltura astrocitaria, oxaliplatino $100 \mu\text{M}$ induce, dopo 4 ore di incubazione, uno stress ossidativo misurato come incremento dei livelli di anione superossido da $154,9 \pm 13,1 \mu\text{mol O}_2^-$, valore basale, a $380,1 \pm 11,4 \mu\text{mol O}_2^-$. Anche in questo sistema complesso, le capacità antiossidanti degli estratti in esame sono risultate confrontabili con quelle delineatesi nel test biochimico dell'NBT, anch'esso relativo alla misurazione dell'anione superossido (Fig. 3). L'estratto **ABO-12** ($145,4 \pm 11,4 \mu\text{mol di O}_2^-$), l'estratto **ABO-10** ($110,3 \pm 17,8 \mu\text{mol di O}_2^-$), l'estratto **ABO-11** ($148,8 \pm 22,9 \mu\text{mol di O}_2^-$), sono in grado di prevenire l'ossidazione mantenendo al valore di controllo i livelli di anione superossido (Fig. 3). Un significativo effetto antiossidante è stato registrato anche per ABO-07 ($203,6 \pm 22,4 \mu\text{mol di O}_2^-$), ABO-05 ($198,5 \pm 25,6 \mu\text{mol di O}_2^-$), ABO-08 ($201,7 \pm 33,7 \mu\text{mol di O}_2^-$), ABO-06 ($216,8 \pm 24,2 \mu\text{mol di O}_2^-$), ABO-09 ($184,3 \pm 15,7 \mu\text{mol di O}_2^-$).

O₂⁻) e ABO-13 ($254,9 \pm 24,6$ μmol di O₂). Gli estratti ABO-01, ABO-02, ABO-03, ABO-15, ABO-14 e ABO-17 non sono in grado di ridurre i livelli di anione superossido generato in seguito al trattamento delle colture con oxaliplatino. Nella seconda tranche di campioni il più potente e significativo è risultato ABO-21.

5

1.5 Danno ossidativo da oxaliplatino. Dosaggio dell'anione superossido in colture di astrociti corticali di ratto mediante citocromo C.

Il metodo consente di rilevare l'entità del danno ossidativo, indotto dall'agente chemioterapico oxaliplatino attraverso il dosaggio dell'anione superossido generato in colture primarie di astrociti corticali di ratto. Le cellule, sono state piastrate in multiwell da 6 pozzetti ($5 \cdot 10^5$ /pozzetto). Una volta raggiunta la confluenza le cellule sono state starvate per almeno 12 ore. Per generare l'anione superossido le colture sono state quindi incubate per 4 ore a 37°C con oxaliplatino 100 μM (in un medium senza rosso fenolo contenente FBS allo 0.1%) e citocromo C (Sigma - Germania) (1mg/mL), in presenza degli estratti di origine vegetale da testare (50 $\mu\text{g/mL}$). Al termine dell'incubazione il surnatante θ stato centrifugato. La quantità di anione superossido presente nella soluzione (color porpora) viene misurata spettrofotometricamente a 550 nm. La produzione di anione superossido θ espressa come $\mu\text{mol/h/pozzetto}$ usando un coefficiente di estinzione molare di $2,1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

20

1.6 Analisi statistica

Tutti i risultati sperimentali sono espressi come $\text{media} \pm \text{S.E.M.}$. E' stata condotta un'analisi della varianza (ANOVA) one way, seguita dal test di Bonferroni per verificare la significatività tra due medie. L'analisi della varianza e il test di Bonferroni sono stati eseguiti con il programma statistico OriginPro 8.1. Sono stati considerati significativi valori di $P < 0,05$ o $P < 0,01$.

25

2 EFFETTO SULL'IPERALGESIA DA OXALIPLATINO

Sono stati condotti esperimenti di induzione di dolore neuropatico da chemioterapico (Cavalletti et al, 2001).

- 5 L'oxaliplatino nel ratto alla dose di 2,4 mg/kg⁻¹i.p. induce al giorno 21 una neuropatia caratterizzata da iperalgesia e allodinia in accordo ai dati di *Cavaletti et al.* L'esame post-mortem del midollo spinale del ratto trattato con oxaliplatino rivela una componente di danno ossidativo che si estrinseca anche a livello lipidico.

10

2.1 MATERIALE E METODI

Induzione di iperalgesia con oxaliplatino nel ratto

- La riduzione della soglia algica viene indotta dalla somministrazione di oxaliplatino 2,4 mg/kg i.p., precedentemente disciolto in soluzione glucosata al 5% per 5 giorni
15 consecutivi per un totale di 2 settimane (10 somministrazioni). La dose totale di oxaliplatino iniettata è quindi pari a 24 mg/kg i.p. Ai controlli viene somministrata soltanto la soluzione glucosata.

Test della pressione sulla zampa

- 20 Il test viene eseguito su ratti. L'apparecchio usato è un analgesimetro che esercita una forza, espressa in grammi, che viene applicata a velocità costante (32 g/s) attraverso un punzone di forma conica sulla superficie superiore della zampa posteriore dell'animale. L'entità della forza viene costantemente rilevata da un indicatore che si muove lungo una scala lineare. L'animale viene tenuto fermo nel palmo della mano e la
25 soglia nocicettiva viene espressa come quella forza a cui l'animale reagisce retraendo la zampa, o irrigidendo il corpo, o squittendo. Anche in questo caso, per poter rilevare variazioni indotte dal farmaco, viene valutata la soglia nocicettiva degli animali sia prima che dopo il trattamento. Quando la forza raggiunge il valore di 240 g l'animale viene tolto anche se non ha ancora reagito allo stimolo. *Leighton et al., Br. J.Pharmacol., 93, 553-560, 1988.*
30

Risultati

In tab. 3 sono riportati i risultati relativi all'effetto di una singola somministrazione degli estratti di: ABO-10, ABO-07, ABO-11 e ABO-12 (30-300 mg kg⁻¹p.o.) nei confronti dell'iperalgia indotta dal trattamento ripetuto con l'agente chemioterapico oxaliplatino valutato nel ratto in presenza di uno stimolo pressorio (*paw-pressure test*). Tutti gli estratti saggiati sono privi di efficacia alle dosi di 30 e 60 mg kg⁻¹p.o. Per gli estratti di ABO-12 anche la dose di 100 mg kg⁻¹p.o. è risultata priva di effetto. Al contrario la dose di 300 mg kg⁻¹p.o. per tutti gli estratti saggiati si è dimostrata capace di ridurre l'abbassamento della soglia algica indotta da oxaliplatino. Tale attività si ottiene dai 15 min. dopo la somministrazione, raggiunge il massimo effetto dopo 30 min e poi decade fino a scomparire nell'ambito di 120 min.

Solo la frazione ABO-09 ha dimostrato una significativa attività anche alle dosi di 30 e 60 mg/kg a partire da 15 minuti, risultando quindi la più potente.

Tabella 3

Effetto di alcuni estratti sull'iperalgia indotta nel ratto da oxaliplatino (test della pressione sulla zampa) (<i>Paw pressure test</i>)					
	Test della pressione sulla zampa (g)				
Trattamento mg/kg ,p.o.,	Prima del tratt	Dopo il trattamento			
CMC	62,7 ± 2,8	58,1 ± 3,3	62,7 ± 4,4	61,2 ± 3,8	63,9 ± 4,6
OXALIPLATIN	29,5 ± 2,7	33,4 ± 3,4	30,9 ± 3,6	32,3 ± 3,5	29,8 ± 3,0
OXA + ABO-10 30 mg/kg	32,4 ± 2,6	36,8 ± 3,5	38,2 ± 4,2	34,5 ± 4,1	30,7 ± 3,5
OXA + ABO-10 60 mg/kg	31,2 ± 2,5	37,2 ± 3,4	41,1 ± 3,7	36,2 ± 4,1	37,5 ± 3,9
OXA + ABO-10 100 mg/kg	33,4 ± 2,8	45,8 ± 3,1*	46,2 ± 3,3*	41,8 ± 3,0^	35,8 ± 2,5
OXA + ABO-10 300 mg/kg	30,9 ± 3,1	44,9 ± 3,9*	47,1 ± 3,1*	39,5 ± 3,6^	34,7 ± 3,1
OXA + ABO-07 30 mg/kg	31,4 ± 2,5	35,5 ± 3,3	36,2 ± 4,9	36,5 ± 3,7	31,4 ± 3,3
OXA + ABO-07 60 mg/kg	33,1 ± 2,8	38,9 ± 4,2	39,7 ± 3,1	39,8 ± 2,6	36,7 ± 4,0
OXA + ABO-07 100 mg/kg	32,2 ± 2,6	35,5 ± 3,1	39,1 ± 4,4	36,2 ± 3,1	35,9 ± 3,4
	5,2 ± 3,2				

Effetto di alcuni estratti sull'iperalgnesia indotta nel ratto da oxaliplatino (test della pressione sulla zampa) (Paw pressure test)						
Test della pressione sulla zampa (g)						
Trattamento mg/kg ,p,o,	Prima del tratt	Dopo il trattamento				
OXA + ABO-07 300 mg/kg	29,8 ± 2,2 5,2 ± 3,2	43,2 ± 3,7*	45,3 ± 2,9*	42,5 ± 3,6*	37,3 ± 3,5	
OXA + ABO-11 30 mg/kg	32,9 ± 2,9	33,4 ± 2,7	28,7 ± 2,5	31,1 ± 3,2	35,6 ± 3,1	
OXA + ABO-11 60 mg/kg	31,4 ± 3,1	37,5 ± 3,9	39,1 ± 3,4	36,3 ± 3,6	32,8 ± 4,1	
OXA + ABO-11 100 mg/kg	33,2 ± 3,0	44,2 ± 3,1*	45,2 ± 3,2*	42,6 ± 3,7*	31,5 ± 3,0	
OXA + ABO-11 300 mg/kg	29,5 ± 2,9	41,8 ± 4,0*	48,5 ± 3,4*	43,6 ± 4,1*	33,1 ± 4,7	
OXA + ABO-12 30 mg/kg	32,3 ± 2,6	31,5 ± 2,4	33,6 ± 2,8	30,6 ± 3,4	33,0 ± 2,8	
OXA + ABO-12 60 mg/kg	28,5 ± 3,1	32,5 ± 3,1	29,6 ± 3,0	33,9 ± 3,5	36,4 ± 4,5	
OXA + ABO-12 100 mg/kg	30,7 ± 3,5	35,3 ± 3,8	39,1 ± 3,4	34,5 ± 2,6	32,9 ± 3,7	
OXA + ABO-12 300 mg/kg	32,2 ± 3,4	39,5 ± 2,2^	46,7 ± 2,6*	45,1 ± 3,9*	41,5 ± 4,3^	
^P< 0,05; *P< 0,01 in vs CMC Ciascun valore rappresenta la media di 8 ratti,						

Tabella 4

Curva dose risposta dell'estratto di ABO-09 sull'iperalgnesia indotta da ossalilplatino nel test di pressione sulla zampa di ratto					
		Pressione sulla zampa nei ratti (g)			
TRATTAMENTO i.p.	TRATTAMENTO per os	Pre-test	15 min.	30 min	45 min
SALINA	CMC	57,4 ± 3,5	61,8 ± 5,4	67,4 ± 6,3	62,3 ± 5,4
OXA	CMC	22,6 ± 4,6	25,1 ± 6,1	26,9 ± 5,4	24,3 ± 6,6
OXA	ABO-09 30 mg/kg	21,7 ± 1,2	58,1 ± 3,5*	67,8 ± 2,0*	29,1 ± 2,0
OXA	ABO-09 60 mg/kg	24,5 ± 1,3	48,2 ± 4,6*	25,7 ± 2,4	21,5 ± 0,0

*Ossalilplatino 2,4 mg/kg per 5 giorni consecutivi alla settimana (15 iniezioni i.p. - dose cumulativa 36 mg/kg) ^ $P < 0,05$ * $p > 0,01$*

Il campione ABO-07 (particolarmente ricco di prociantocianosidi) viene scartato dall'analisi di successivi studi di approfondimento perché è efficace ad una sola posologia, la più alta, 300 mg/kg.

- 5 I campioni ABO-10 (ricco di polifenoli, in particolare di catechine), ABO-11 (ricco di composti antiossidanti derivati del carnosolo) alla dose di 100 e 300 mg/kg fino a 90 minuti dopo l'assunzione e ABO-12 (elevata concentrazione di antocianosidi) alla dose di 300 mg/kg, l'unica attiva, ma a tutti i tempi valutati, fino a 120 minuti dall'assunzione.
- 10 Il campione ABO-09 è in assoluto il più potente, essendo efficace anche a posologie molto basse: 30 mg/kg.

Sommario risultati ottenuti

- Riepilogando questi sono i composti selezionati mediante screening in vitro per il loro
- 15 potere antiossidante verso anione superossido generato da oxaliplatino che si sono poi rivelati efficaci anche nel modello in vivo, singolarmente con potenze più o meno paragonabili ad eccezione di ABO-09, che è risultato il più potente:

- ABO-09: estratto caratterizzato da un elevato contenuto di flavonoidi;
- ABO-10: estratto ad elevata concentrazione di catechine;
- 20 • ABO-11: estratto ad elevata concentrazione di derivati del carnosolo;
- ABO-12: estratto ad elevata concentrazione di antocianosidi;

- La sperimentazione è proseguita andando a valutare l'efficacia in vivo di composizioni ottenute da una miscela di alcuni dei campioni (ABO-10, ABO-11 alla dose fissa di 100 mg/kg e ABO-12 alla dose fissa di 300 mg/kg) con il campione ABO-09 alle dosi
- 25 variabili di 10, 30 e 60 mg/kg. I risultati sono riportati di seguito.

Tabella 5 Valutazione nel ratto dell'azione antiperalgesica nel modello di neuropatia indotta da oxaliplatino di miscele dei singoli estratti con Abo-09

Effetto di alcune miscele di singoli estratti sull'iperalgia indotta nel ratto da oxaliplatino (paw-pressure test)					
	Test della pressione sulla zampa (g)				
TRATTAMENTO mg/kg ,p.o.	Prima del tratt.	Dopo il trattamento			
		30 min	60 min	90 min	120 min
CMC	60,5 ± 3,0	59,4 ± 3,1	63,1 ± 3,5	58,8 ± 4,2	61,7 ± 4,3
OXALIPLATINO	30,4 ± 2,5	31,3 ± 3,5	32,4 ± 2,9	31,6 ± 3,4	28,8 ± 3,1
OXA + ABO-09 10 mg/kg + ABO-10 100 mg/kg	31,9 ± 2,8	44,3 ± 3,7*	45,3 ± 4,1*	40,6 ± 3,9*	34,0 ± 3,5
OXA + ABO-09 30 mg/kg + ABO-10 100 mg/kg	28,4 ± 2,6	57,1 ± 4,4*	61,1 ± 3,8*	55,2 ± 4,6*	39,6 ± 3,5^
OXA + ABO-09 60 mg/kg + ABO-10 100 mg/kg	30,5 ± 3,1	58,3 ± 4,1*	59,5 ± 3,4*	53,8 ± 3,8*	36,2 ± 4,5
OXA + ABO-09 10 mg/kg + ABO-12 300 mg/kg	31,7 ± 2,8	41,6 ± 3,5*	43,5 ± 3,9*	39,8 ± 3,2^	32,3 ± 3,9
OXA + ABO-09 30 mg/kg + ABO-12 300 mg/kg	32,5 ± 3,1	44,5 ± 4,0^	42,3 ± 4,1*	40,9 ± 3,8^	35,7 ± 3,1
OXA + ABO-09 60 mg/kg + ABO-12 300 mg/kg	29,1 ± 2,9	45,7 ± 3,1*	59,2 ± 4,2*	57,2 ± 3,3*	42,9 ± 3,5
OXA + ABO-09 10 mg/kg + ABO-11 100 mg/kg	28,4 ± 2,5	46,3 ± 3,2*	48,7 ± 3,5*	41,9 ± 3,0*	36,6 ± 3,0
OXA + ABO-09 30 mg/kg + ABO-11 100 mg/kg	32,3 ± 3,0	52,5 ± 3,8*	51,2 ± 3,9*	46,3 ± 3,6*	38,8 ± 4,4
OXA + ABO-09 60 mg/kg + ABO-11 100 mg/kg	30,1 ± 3,1	59,1 ± 3,2*	58,1 ± 4,2*	51,6 ± 3,7*	44,5 ± 3,6

Effetto di alcune miscele di singoli estratti sull'iperalgnesia indotta nel ratto da oxaliplatino (paw-pressure test)					
		Test della pressione sulla zampa (g)			
TRATTAMENTO mg/kg ,p.o.	Prima del tratt.	Dopo il trattamento			
OXA + ABO-09 10 mg/kg + ABO-21 100 mg/kg	30,5 ± 2,7	39,2 ± 2,5	37,5 ± 3,4	35,6 ± 3,5	35,1 ± 2,7
OXA + ABO-09 30 mg/kg + ABO-21 100 mg/kg	29,4 ± 3,2	41,8 ± 3,0*	43,6 ± 2,9*	38,8 ± 3,1	32,9 ± 2,5
OXA + ABO-09 60 mg/kg + ABO-21 100 mg/kg	32,8 ± 3,4	40,5 ± 3,2^	44,7 ± 3,2*	37,1 ± 2,5	30,6 ± 2,2
^P< 0,05; *P< 0,01 in vs CMC, Ciascun valore rappresenta la media di 8 ratti,					

I risultati dimostrano che le associazioni hanno prodotto risultati migliori arrivando anche a valori uguali al controllo negativo, con solo CMC.

3 Valutazione in vitro della capacità di miscele dei singoli estratti di modulare i processi apoptotici indotti da oxaliplatino

Le associazioni di estratti vegetali risultate efficaci nel far regredire, nell'animale da esperimento il dolore neuropatico indotto da oxaliplatino sono state esaminate in vitro al fine di escludere che l'azione neuroprotettiva da esse esibita nei confronti dell'agente chemioterapico in esame causasse la sopravvivenza anche delle cellule tumorali inficiando l'azione dell'oxaliplatino.

Nell'ambito di questa ricerca abbiamo focalizzato la nostra attenzione su una linea tumorale di cellule HT-29 di carcinoma di colon umano (neoplasia particolarmente sensibile all'oxaliplatino) dove abbiamo indotto il danno dal chemioterapico in esame. La vitalità delle cellule incubate con oxaliplatino è stata valutata in presenza ed in assenza delle preparazioni in esame. Inoltre sulla stessa linea cellulare è stata valutata la capacità pro-apoptotica dell'agente antitumorale anche in questo caso in presenza

ed in assenza delle associazioni di estratti vegetali. In particolare abbiamo valutato, l'effetto di esse sull'attività enzimatica di caspasi 3, effettore centrale della cascata apoptotica (*Springer, J Biochem Mol Biol*, 35: 94-105, 2002) mediante un saggio fluorescente. In pratica abbiamo misurato l'azione apoptotica dell'oxaliplatino e
5 l'abbiamo confrontata con quella esplicata dall'agente chemioterapico in presenza delle suddette associazioni. In questo modo abbiamo verificato che un eventuale effetto anti-apoptotico degli estratti non infici l'azione antineoplastica dell'oxaliplatino.

Sulla base di quanto esposto, nell'ambito della ricerca sono state testate in una linea cellulare tumorale umana di colon retto (HT 29), in presenza di oxaliplatino, le seguenti
10 quattro associazioni, estratto di ABO-09 con ABO-21, o ABO-11 o ABO-10 o ABO-12 variamente combinati, e denominati:

Associazione ABO-09 e ABO-21

ABO-09-21/ 10 (ABO-09: 9% - ABO-21: 91%)

ABO-09-21 / 30 (ABO-09: 23% -ABO-21: 77%)

15 ABO-09-21 / 60 (ABO-09: 37,5% – ABO-21: 62,5%);

Associazione ABO-09 e ABO-11

ABO-09-11 /10 (ABO-09: 9% - ABO-11: 91%)

ABO-09-11/ 30 (ABO-09: 23% - ABO-11: 77%)

ABO-09-11/ 60 (ABO-09: 37,5% - ABO-11: 62,5%)

20 **Associazione ABO-09 e ABO-10**

ABO-09-10 /10 (ABO-09: 9% - ABO-10: 91%)

ABO-09-10/ 30 (ABO-09: 23% - ABO-10: 77%)

ABO-09-10/ 60 (ABO-09: 37,5% - ABO-10: 62,5%)

Associazione ABO-09 e ABO-12

25 ABO-09-12 /10 (ABO-09: 9% - ABO-12: 91%)

ABO-09-12/ 30 (ABO-09: 23% - ABO-12: 77%)

ABO-09-12/ 60 (ABO-09: 37,5% - ABO-12: 62,5%)

Risultati:

L'associazione ABO-09-ABO-12 non interferisce con l'azione di oxaliplatino sulla linea tumorale HT-29 né in termini di vitalità cellulare né in termini di morte cellulare programmata. L'associazione ABO-09-ABO-11 riduce l'azione antitumorale oxaliplatino-dipendente solo in termini di mortalità a 48h e solo nei confronti della concentrazione più alta di oxaliplatino. Non altera il fenomeno apoptotico. Le combinazioni ABO-09-21/30 e 60 riducono la mortalità indotta da oxaliplatino dopo 48h di incubazione e la sua azione apoptotica. Le combinazioni ABO-09-10/30 e 60 riducono la mortalità indotta da oxaliplatino dopo 24h di incubazione così come la sua azione apoptotica.

Tabella 1 A: VITALITA' CELLULARE % DOPO 24H D'INCUBAZIONE CON OXALIPLATINO A CONCENTRAZIONI CRESCENTI:

ABO-09-21 (50 µg/mL)

<i>Vitalità cellulare % Trattamento con oxaliplatino</i>				
Concentrazione di oxaliplatino (µM)	Controllo	ABO-09-21/ 10	ABO-09-21/ 30	ABO-09-21/60
0	100,0 ± 2,6	100,0 ± 2,6	100,0 ± 2,6	100,0 ± 2,6
0,3	87,5 ± 7,3	89,7 ± 3,2	90,2 ± 2,6	91,1 ± 1,6
1	84,0 ± 4,5	86,6 ± 0,9	89,3 ± 1,2	89,6 ± 1,4
3	84,0 ± 2,9	85,3 ± 2,0	84,8 ± 1,7	87,5 ± 4,5
10	78,7 ± 3,5	81,8 ± 4,0	83,6 ± 2,2	82,7 ± 3,3

<i>Vitalità cellulare % Trattamento con oxaliplatino</i>				
Concentrazione di oxaliplatino (μM)	Controllo	<i>ABO-09-21/ 10</i>	<i>ABO-09-21/ 30</i>	<i>ABO-09-21/60</i>
30	73,9 $\pm$ 3,4	80,1 $\pm$ 3,3	79,8 $\pm$ 1,9	80,1 $\pm$ 2,3
100	62,4 $\pm$ 2,5	68,3 $\pm$ 4,5	69,1 $\pm$ 4,3	69,4 $\pm$ 3,4
<i>Cellule umane tumorali di colon-retto (HT-29) sono state esposte a concentrazioni crescenti di oxaliplatino (0,3 - 100 μM) in presenza o in assenza ABO-09-21 (50 μg/mL), I valori sono espressi in percentuale come media $\pm$ s.e.m di 6 esperimenti, La condizione di controllo è fissata a 100%</i>				

Tabella 1 B: Vitalita' cellulare % dopo **48h** d'incubazione con oxaliplatino a concentrazioni crescenti: effetto dell'estratto di **abo-09-21** (50 μ g/ml)

<i>Vitalità cellulare % Trattamento con oxaliplatino</i>				
Concentrazione di oxaliplatino (μM)	Controllo	<i>ABO-09-21/10</i>	<i>ABO-09-21/ 30</i>	<i>ABO-09-21/60</i>
0	100,0 $\pm$ 1,5	100,0 $\pm$ 1,5	100,0 $\pm$ 1,5	100,0 $\pm$ 1,5
0,3	89,1 $\pm$ 2,7	89,8 $\pm$ 2,8	89,2 $\pm$ 3,4	89,8 $\pm$ 3,1
1	79,2 $\pm$ 3,8	82,5 $\pm$ 2,5	84,8 $\pm$ 2,2	83,7 $\pm$ 2,3
3	76,2 $\pm$ 4,3	77,8 $\pm$ 2,3	82,4 $\pm$ 4,0	82,6 $\pm$ 1,6

Vitalità cellulare % Trattamento con oxaliplatino				
10	74,3 ± 3,2	76,5 ± 1,9	79,2 ± 2,0	79,7 ± 1,1
30	67,7 ± 4,2	65,7 ± 1,3	75,3 ± 1,7	73,6 ± 2,5 *
100	44,0 ± 1,7	47,5 ± 1,0	52,8 ± 1,6 *	54,2 ± 1,7 *
Cellule umane tumorali di colon-retto (HT-29) sono state esposte a concentrazioni crescenti di oxaliplatino (0,3 - 100 µM) in presenza o in assenza dell'estratto IPE-				

Tabella 2 A: Vitalità cellulare % dopo **24h** d'incubazione con oxaliplatino a concentrazioni crescenti: effetto dell'estratto di **Abo-09-11** (50 µg/ml)

Vitalità cellulare % Trattamento con oxaliplatino				
Concentrazione di	Controllo	ABO-09-11/ 10	ABO-09-11/ 30	ABO-09-11/ 60
0	100,0 ± 2,6	100,0 ± 2,6	100,0 ± 2,6	100,0 ± 2,6
0,3	87,5 ± 7,3	99,3 ± 4,1	90,2 ± 2,7	91,1 ± 1,6
1	84,0 ± 5,5	90,9 ± 2,4	89,3 ± 1,2	89,6 ± 1,4
3	84,0 ± 2,9	90,2 ± 3,4	84,9 ± 1,7	87,5 ± 1,3
10	78,7 ± 3,5	84,6 ± 4,3	83,6 ± 2,2	82,6 ± 3,3
30	73,9 ± 3,4	78,8 ± 3,1	79,0 ± 2,2	80,1 ± 2,9
100	62,4 ± 2,5	68,0 ± 5,3	68,3 ± 3,3	69,1 ± 4,3
Cellule umane tumorali di colon-retto (HT-29) sono state esposte a concentrazioni crescenti di oxaliplatino (0,3 - 100 µM) in presenza o in assenza di ABO-09-11 (50 µg/mL). I valori sono espressi				

Tabella 2 B: Vitalità cellulare % dopo **48h** d'incubazione con oxaliplatino a concentrazioni crescenti: effetto dell'estratto di **abo-09-11** (50 µg/ml)

Vitalità cellulare % Trattamento con oxaliplatino				
Concentrazione di oxaliplatino (µM)	Controllo	ABO-09-11/ 10	ABO-09-11/ 30	ABO-09-11/ 60
0	100,0 ± 1,5	100,0 ± 1,5	100,0 ± 1,5	100,0 ± 1,5
0,3	89,1 ± 2,7	80,4 ± 1,4	86,2 ± 2,4	88,1 ± 3,6
1	79,2 ± 3,8	77,4 ± 0,8	81,6 ± 1,2	81,2 ± 4,2
3	76,2 ± 4,3	75,1 ± 1,9	80,3 ± 2,1	77,8 ± 2,8
10	74,3 ± 3,2	70,7 ± 2,1	73,7 ± 1,6	77,7 ± 6,0
30	67,7 ± 4,2	67,0 ± 1,3	71,2 ± 1,8	73,1 ± 5,0
100	44,0 ± 1,7	49,5 ± 1,7	57,9 ± 1,5*	59,4 ± 2,1*
Cellule umane tumorali di colon-retto (HT-29) sono state esposte a concentrazioni crescenti di oxaliplatino (0,3 - 100 µM) in presenza o in assenza di ABO-09-11 (50 µg/mL). I valori sono espressi in percentuale come media ± s.e.m di 6 esperimenti. La condizione di controllo è fissata a 100%. *P <0,05 rispetto a controllo.				

Tabella 3 A: Vitalità cellulare % dopo **24h** d'incubazione con oxaliplatino a concentrazioni crescenti: effetto dell'estratto di **abo-09-10** (50 µg/ml)

Vitalità cellulare % Trattamento con oxaliplatino				
Concentrazione di	Controllo	ABO-09-10/ 10	ABO-09-10/ 30	ABO-09-10/ 60
0	100,0 ± 2,6	100,0 ± 2,6	100,0 ± 2,6	100,0 ± 2,6
0,3	87,5 ± 7,3	85,2 ± 6,1	80,6 ± 9,4	85,3 ± 5,7
1	84,0 ± 5,5	83,2 ± 8,3	81,7 ± 7,5	84,1 ± 9,5
3	84,0 ± 2,9	80,9 ± 4,0	80,7 ± 9,0	77,2 ± 3,2
10	78,7 ± 3,5	79,5 ± 2,6	80,2 ± 1,9	77,1 ± 2,3
30	73,9 ± 3,4	70,7 ± 3,0	76,9 ± 6,5	74,0 ± 3,0
100	62,4 ± 2,5	69,2 ± 4,1	72,4 ± 1,9 *	72,8 ± 1,0 *

Cellule umane tumorali di colon-retto (HT-29) sono state esposte a concentrazioni crescenti di oxaliplatino (0,3 - 100 μ M) in presenza o in assenza di ABO-09-10 (50 μ g/mL). I valori sono espressi in percentuale come media $\pm$ s.e.m di 6 esperimenti. La condizione di controllo è fissata a 100%. * $P < 0,05$ rispetto al controllo.

Tabella 3 B: Vitalità cellulare % dopo **48h** d'incubazione con oxaliplatino a concentrazioni crescenti: effetto dell'estratto di **abo-09-10** (50 μ g/ml)

Vitalità cellulare % Trattamento con oxaliplatino				
Concentrazione di	Controllo	ABO-09-10/ 10	ABO-09-10/ 30	ABO-09-10/ 60
0	100,0 $\pm$ 1,5	100,0 $\pm$ 1,5	100,0 $\pm$ 1,5	100,0 $\pm$ 1,5
0,3	89,1 $\pm$ 2,7	88,3 $\pm$ 6,6	85,6 $\pm$ 7,1	89,6 $\pm$ 2,8
1	79,2 $\pm$ 3,8	79,2 $\pm$ 3,9	72,0 $\pm$ 2,3	75,6 $\pm$ 1,6
3	76,2 $\pm$ 4,3	70,3 $\pm$ 3,4	58,2 $\pm$ 1,6	65,6 $\pm$ 6,6
10	74,3 $\pm$ 3,2	65,3 $\pm$ 2,5	57,2 $\pm$ 2,8	69,9 $\pm$ 5,2
30	67,7 $\pm$ 4,2	62,8 $\pm$ 1,1	55,6 $\pm$ 1,6	60,4 $\pm$ 3,1
100	44,0 $\pm$ 1,7	46,8 $\pm$ 2,7	46,0 $\pm$ 1,0	48,2 $\pm$ 2,7
Cellule umane tumorali di colon-retto (HT-29) sono state esposte a concentrazioni crescenti di oxaliplatino (0,3 - 100 μ M) in presenza o in assenza di ABO-09-10 (50 μ g/mL). I valori sono espressi in percentuale come media $\pm$ s.e.m di 6 esperimenti. La condizione di controllo è fissata a 100%.				

5 **Tabella 4 A:** Vitalità cellulare % dopo **24h** d'incubazione con oxaliplatino a concentrazioni crescenti: effetto dell'estratto di **abo-09-12** (50 μ g/ml)

Vitalità cellulare % Trattamento con oxaliplatino				
Concentrazione di	Controllo	ABO-09-12/10	ABO-09-12/30	ABO-09-12/60
0	100,0 $\pm$ 2,6	100,0 $\pm$ 2,6	100,0 $\pm$ 2,6	100,0 $\pm$ 2,6
0,3	87,5 $\pm$ 7,3	91,0 $\pm$ 1,6	93,6 $\pm$ 2,2	96,1 $\pm$ 2,6
1	84,0 $\pm$ 5,5	90,5 $\pm$ 2,5	89,7 $\pm$ 2,3	92,5 $\pm$ 2,3

Vitalità cellulare % Trattamento con oxaliplatino				
Concentrazione di	Controllo	ABO-09-12/10	ABO-09-12/30	ABO-09-12/60
3	84,0 ± 2,9	87,4 ± 2,2	87,0 ± 0,4	88,6 ± 5,0
10	78,7 ± 3,5	84,6 ± 0,5	85,1 ± 2,2	87,3 ± 3,5
30	73,9 ± 3,4	75,1 ± 2,0	76,9 ± 1,3	81,3 ± 1,4
100	62,4 ± 2,5	62,7 ± 1,1	63,2 ± 2,8	65,5 ± 2,6
Cellule umane tumorali di colon-retto (HT-29) sono state esposte a concentrazioni crescenti di oxaliplatino (0,3 - 100 µM) in presenza o in assenza di ABO-09-12 (50 µg/mL). I valori sono espressi in percentuale come media ± s.e.m di 6 esperimenti. La condizione di controllo è fissata a 100%.				

Tabella 4 B: Vitalità cellulare % dopo 48h di incubazione con oxaliplatino a concentrazioni crescenti: effetto dell'estratto di **abo-09-12** (50 µg/ml)

Vitalità cellulare % Trattamento con oxaliplatino				
Concentrazione di	Controllo	ABO-09-12/10	ABO-09-12/30	ABO-09-12/60
0	100,0 ± 1,5	100,0 ± 1,5	100,0 ± 1,5	100,0 ± 1,5
0,3	89,1 ± 2,7	92,1 ± 3,0	91,8 ± 4,5	94,9 ± 3,1
1	79,2 ± 3,8	89,2 ± 6,4	85,9 ± 3,6	83,3 ± 3,5
3	76,2 ± 4,3	81,9 ± 2,5	80,0 ± 3,6	80,1 ± 3,9
10	74,3 ± 3,2	80,4 ± 3,6	76,3 ± 2,0	76,9 ± 5,9
30	67,7 ± 4,2	69,0 ± 2,6	68,6 ± 3,0	71,1 ± 2,0
100	44,0 ± 1,7	43,2 ± 2,0	40,5 ± 1,2	42,3 ± 1,9
Cellule umane tumorali di colon-retto (HT-29) sono state esposte a concentrazioni crescenti di oxaliplatino (0,3 - 100 µM) in presenza o in assenza di ABO-09-12 (50 µg/mL). I valori sono espressi in percentuale come media ± s.e.m di 6 esperimenti. La condizione di controllo è fissata a 100%.				

**ATTIVITA' % DI CASPASI 3 DOPO 4H D'INCUBAZIONE CON OXALIPLATINO 100 µM:
EFFETTO DI ASSOCIAZIONI DI ESTRATTI (50 MG/ML)**

Trattamento	Controllo	Oxaliplatino 100 µM			
		Oxaliplatino 100 µM	ABO-09- 10 mg/kg	ABO-09- 30 mg/kg	ABO-09- 60 mg/kg
ABO-09 – ABO-21	100,0 ± 9,0	142,1 ± 8,1*	105,0 ± 6,4^	100,9 ± 2,4^	115,3 ± 5,5^
ABO-09- ABO-11			142,5 ± 2,7	135,8 ± 2,2	133,3 ± 10,1
ABO-09- ABO-10			100,1 ± 9,2^	117,9 ± 7,3^	118,5 ± 3,3^
ABO-09- ABO-12			138,3 ± 8,0	144,9 ± 1,6	145,3 ± 0,7

Cellule umane tumorali di colon-retto (HT-29) sono state incubate con oxaliplatino 100 µM in presenza o in assenza delle combinazioni di estratti descritte alla concentrazione di 50 µg/mL. La condizione basale, controllo, è stata fissata arbitrariamente come 100%. I valori sono espressi come media ± s.e.m di 6 esperimenti. *P<0.05 rispetto al controllo, ^P<0.05 rispetto al trattamento con oxaliplatino da solo.

I dati della interferenza con l'attività dell'oxaliplatino, hanno dato indicazioni che ABO-10 (ricco in catechine) e ABO-21 (ricco in antocianosidi) hanno ridotto in maniera significativa l'attività citotossica dell'oxaliplatino, provocando quindi interferenze di tipo farmacodinamico. Sono stati quindi esclusi da ulteriori approfondimenti.

Riepilogando, in base a tutti i risultati degli studi preclinici effettuati sono stati selezionati ABO-09 come fonte di flavonoidi e le ABO-12 come fonte di antocianosidi ma anche di vitamina B6.

A complemento dell'azione antiossidante nella formulazione è stata aggiunta una fonte di vitamina B1 (lievito di birra) e una fonte di aminoacidi essenziali (pappa reale), mentre l'apporto di vitamina B6 è garantito dall'estratto di vite rossa.

2.2 Valutazione in vitro della capacità dell'associazione di polifenoli totali (con flavonoidi e con quercetina), antocianosidi e vitamina B1, B6 e aminoacidi

essenziali (ABO-09+ ABO-21 + fonte di aa essenziali e ramificati) di modulare i processi apoptotici indotti da oxaliplatino

La formulazione a base di ABO-09, ABO-12, lievito (B1) e papa reale è stata testata in
5 3 linee cellulari (mammella MDA-MB231, polmone H1299, colon HCT116) trattate per 72h con dosi crescenti di chemioterapico, neurodol o entrambi.

2.2.1. Materiali e metodi

Condizioni di coltura cellulare: le cellule sono state coltivate in terreno DMEM/F-12
10 Glutamax (Invitrogen) al quale è stato aggiunto FBS 10% (Invitrogen) e Insulina 5µgr/ml (SIGMA), temperatura 37°C, 5% CO2 e umidità costante.

Assay di vitalità cellulare: è stato utilizzato il kit ATPlite 1step (PerkinElmer) seguendo le istruzioni consigliate dal protocollo PerkinElmer.

Reagenti: Pemetrexed (ALIMTA, Lilly), Paclitaxel (Mylan), Oxaliplatino (Eloxatin,
15 Sanofi Aventis), 5 Fluorouracile (Teva), associazione Aboca.

Le tre linee sono state trattate per 72h con dosi crescenti di chemioterapico, neurodol o entrambi.

2.2.2. Risultati

20 Linea di tumore della mammella: Vitalità cellulare della linea di mammella mda-mb-231 rilevata a 72 h dopo trattamento con dosi crescenti dell'associazione (da 150 µg/ml a 8 mg/ml) (A), Paclitaxel (0,15nM a 50 nM) (B) e associazione con dose fissa dell'associazione (50 ug/ml) e dosi crescenti di Paclitaxel (0,15 nM a 12 nM) (C).

LINEA DI LUNG: Vitalità cellulare della linea di polmone H1299 rilevata a 72 h dopo
25 trattamento con dosi crescenti dell'associazione Aboca (da 150ug/ml a 8 mg/ml) (D), Paclitaxel (0,15nM a 50 nM) (E) e associazione con dose fissa dell'associaizone Aboca (50 ug/ml) e dosi crescenti di Paclitaxel (0,15 nM a 50 nM) (F).

Anche in questo caso si esclude l'interferenza del neurodol sull'azione citotossica del paclitaxel.

Nel caso specifico si esclude l'interferenza del neurodol sull'azione citotossica del paclitaxel. LINEA DI COLON: Vitalità cellulare della linea di colon HCT116 rilevata a 72h dopo trattamento con dosi crescenti dell'associazione Aboca (da 150ug/ml a 8 mg/ml) (A), Oxaliplatino (6 uM a 400 uM) (B), associazione con dose fissa dell'associazione Aboca (50 ug/ml) e dosi crescenti di Oxaliplatino (1,5 uM a 25 uM) (C), 5 Fluoruracile (0,75 uM a 50 uM) (D) e associazione con dose fissa dell'associazione Aboca (50ug/ml) e dosi crescenti di 5 Fluoruracile (0,15 uM a 25 uM) (E).

Nell'esperimento di associazione tra il prodotto ABO-09+ABO-12 + aa essenziali e ramific + vitamina B6+vitamina B1 e oxaliplatino e 5 FU si sono utilizzate dosi più basse di chemioterapico vista l'azione molto citotossica dei composti alle dosi precedentemente usate nel trattamento singolo. Anche in questo caso è evidente che il prodotto Aboca non interferisce con l'azione citotossica dei due chemioterapici

15 **Valutazione nel ratto dell'azione antiperalgesica di associazioni di estratti vegetali nel modello di neuropatia indotta da paclitaxel**

Tabella 5

Effetto dell'associazione di estratto di abo-09, abo-12, pappa reale e lievito di birra sull'iperalgnesia indotta nel ratto da paclitaxel (paw-pressure test)					
	<i>test della pressione della zampa (g)</i>				
<i>Trattamento mg/kg</i>	Prima del tratt.	dopo il trattamento			
		30 min	60 min	90 min	120 min
CMC	57,9 ± 2,8	62,9 ± 3,0	58,2 ± 3,3	55,9 ± 3,6	62,4 ± 2,9

Effetto dell'associazione di estratto di abo-09, abo-12, pappa reale e lievito di birra sull'iperalgisia indotta nel ratto da paclitaxel (paw-pressure test)					
	test della pressione della zampa (g)				
Trattamento mg/kg	Prima del tratt.	dopo il trattamento			
PACLITAXEL	34,5 ± 2,9	33,8 ± 2,9	35,8 ± 3,4	32,3 ± 2,5	33,8 ± 3,1
PACLITAXEL + ABO-09 60 mg/kg ABO-12 300 mg/kg fonte di amminoacidi essenziali e ramificati 240 mg/kg fonte di vitamina B1 200 mg/kg	35,1 ± 2,8	51,2 ± 3,5*	48,2 ± 3,8*	41,8 ± 3,6^	38,5 ± 3,7
Trattamento: Paclitaxel 0,5 mg kg ⁻¹ è stato iniettato per 4 giorni (giorni 1, 3, 5, 8). Dose cumulativa di Paclitaxel: 2,0 mg kg ⁻¹ . Il test è stato eseguito 14-18 giorni dopo l'ultima iniezione di paclitaxel. *P< 0.01 ^ P< 0.05 in paragone al gruppo trattato con paclitaxel. Ciascun valore rappresenta la media di 8 ratti.					

Valutazione nel ratto dell'azione antiperalgesica di associazioni di estratti vegetali nel modello di neuropatia indotta da vincristina

5 **Tabella 6**

EFFETTO DELL'ASSOCIAZIONE DI ESTRATTO DI ABO-09, ABO-12, PAPPÀ REALE E LIEVITO DI BIRRA SULL'IPERALGESIA INDOTTA NEL RATTO DA VINCRISTINA (PAW-PRESSURE TEST)					
	Test della pressione della zampa (g)				
TRATTAMENTO mg/kg ,p,o,	prima del tratt.	Dopo il trattamento			
		30 min	60	90 min	120 min

EFFETTO DELL'ASSOCIAZIONE DI ESTRATTO DI ABO-09, ABO-12, PAPPÀ REALE E LIEVITO DI BIRRA SULL'IPERALGESIA INDOTTA NEL RATTO DA VINCRISTINA (PAW-PRESSURE TEST)					
	Test della pressione della zampa (g)				
CMC	58,3 ± 2,7	56,4 ± 3,5	62,6 ± 3,1	60,3 ± 3,8	63,5 ± 3,8
VINCRISTINA	35,6 ± 2,7	34,0 ± 2,7	36,7 ± 4,1	31,2 ± 3,7	35,3 ± 3,4
VINCRISTINA + ABO-09 60 mg/kg ABO-12 300 mg/kg fonte di aa ess e ramificati 240 mg/kg fonte di vitamina B1 200	33,7 ± 3,5	49,6 ± 3,0*	44,4 ± 3,5*	38,2 ± 3,3	33,6 ± 2,8
Trattamento: vincristina è stata iniettata e.v. alla dose di 150 µg kg ⁻¹ per 5 giorni ogni 2 giorni, Dose cumulativa 750 mg kg ⁻¹ e.v. Il test è stato eseguito 4 giorni dopo l'ultima somministrazione, *P< 0,01 in paragone al gruppo trattato con Vincristina. Ciascun valore rappresenta la media di 8 ratti.					

Valutazione nel ratto della farmacocinetica di oxaliplatino in presenza di estratti di ABO-09 e ABO-12

La possibile interferenza in vivo sulla biodisponibilità con il farmaco oxaliplatino da parte di possibili interferenze di vite rossa e iperico con i sistemi di metabolismo epatico (citocromo) è stata valutata in vivo nel ratto.

E' stata indagata l'eventuale alterazione delle concentrazioni plasmatiche di platino dovuta alla somministrazione endovenosa di oxaliplatino alla dose di 5 mg kg⁻¹ in conseguenza al pretrattamento con gli estratti vegetali sotto riportati. Gli estratti vegetali sono stati iniettati 30 min prima di oxaliplatino i.p. in modo da far coincidere il picco di attività degli estratti con la massima concentrazione plasmatica del chemioterapico.

La scelta della dose di oxaliplatino usata in questo studio si basa non solo sul dosaggio raccomandato nell'uomo (130 mg/m²) ma anche per avere nei campioni esaminati una concentrazione superiore a quella minima determinabile.

PROTOCOLLO SPERIMENTALE

I ratti sono stati suddivisi in 5 gruppi di 6 animali ciascuno.

Gruppo n. 1: CMC p.o. + oxaliplatino 5 mg kg⁻¹ e.v.

Gruppo n. 2: estratto di iperico 60 mg kg⁻¹ p.o. + oxaliplatino 5 mg kg⁻¹ e.v.

- 5 Gruppo n. 3: estratto costituito da: iperico 60 mg kg⁻¹ p.o e Vite rossa 300 mg kg⁻¹ p.o. +oxaliplatino 5 mg kg⁻¹ e.v.

Tabella 7

	Tempi di prelievo dei campioni (min)					
	0	5 min	15 min	30 min	60 min	90 min
CMC +OXA e.v.	38.9 ± 13.3	20.4 ± 9.5	6.6 ± 1.2	4.3 ± 1.2	2.7 ± 1.1	2.6 ± 0.9
ABO-09 + OXA e.v.	36.3 ± 12.6	22.0 ± 10.7	6.7 ± 1.4	3.9 ± 1.5	2.6 ± 0.9	2.3 ± 0.4
ABO-09 + ABO-12 + OXA E.V.	39.2 ± 14.7	19.8 ± 8.0	7.1 ± 2.5	4.4 ± 1.5	2.3 ± 0.9	2.61 ± 0.7

Tab. 7 . Concentrazione di Platino (media ± SD) nel plasma dopo somministrazione e.v. di oxaliplatino

10

Materiali e metodi

Animali

- Ratti Sprague Dawley maschi di circa 200 grammi forniti dalla ditta Harlan, Italia. Gli animali sono stati tabulati in gruppi di quattro, in gabbie delle seguenti dimensioni:
- 15 26x41cm presso con un ciclo circadiano di 12 ore con acqua e cibo “ad libitum”. I ratti sono stati alimentati con dieta standard e sono stati stabulati alla temperatura di 23±1°C. La procedura sperimentale è stata approvata dal comitato locale per il controllo della sperimentazione su animali da laboratorio. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in accordo con le direttive del Consiglio della Comunità Europea del 24
- 20 novembre 1986 (DL 116/92; 86/609/EEC) in merito alla manipolazione degli animali da esperimento e in accordo alle “National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”, avendo recepito le linee guida della “International Association

for the Study of Pain” sono state prese tutte le misure necessarie per ridurre al minimo sia il numero degli animali utilizzati che le loro sofferenze.

Somministrazione di Oxaliplatino

- 5 L'agente neoplastico è stato iniettato alla dose di 5 mg kg⁻¹ per via e.v. solubilizzato in un volume di 10 ml kg⁻¹ di soluzione glucosata al 5% analogamente a quanto è stato effettuato in tutti gli esperimenti comportamentali condotti in precedenza.

Dosaggio

- 10 I campioni sono stati diluiti 1:4 con HCl (v/v) ed analizzati per il contenuto di platino a 306,4 nm con Spectraspan III (*Applied Research Laboratories, Sunland, CA*) secondo il metodo descritto da Pestieau et al. (*J. Surgical Oncology, 2001: 76: 106-114*). La linearità nell'emissione del segnale è stata ottenuta per una curva di calibrazione del platino nell'intervallo 0-2,0 mg/L con un coefficiente di correlazione > di 99%. Tra
15 ciascun campione è stato analizzato un bianco di HCl al 10% (v/v).

Valutazione nel ratto dell'azione anti-iperalgica in modelli di neuropatia indotta da streptozotocina e da legatura del nervo sciatico

- 20 E' stato valutato nel ratto l'efficacia antiperalgica mostrata da un'associazione costituita da ABO-09 (30 mg kg⁻¹ p.o.), ABO-11 (100 mg kg⁻¹ p.o.) e ABO-12 (300 mg kg⁻¹ p.o.) in due modelli di neuropatia, quella indotta da legatura lassa del nervo sciatico e quella dovuta a streptozotocina (abbreviato STZ).

25 Iperalgesia diabetica indotta da streptozotocina

L'abbassamento della soglia algica, viene ottenuto per somministrazione i.p. di streptozotocina (50 mg/kg) Malcangio & Tomlison Pain, 76: 151-157, 1998. I ratti sviluppano iperalgesia a partire dalla quarta settimana dopo il trattamento con STZ.

30 Risultati

L'associazione reverte completamente l'iperalgesia da STZ fino a 120 minuti dopo l'iniezione

Effetto di ABO-09, ABO-11 e ABO-12 sull'iperalgesia indotta nel ratto da streptozotocina					
<i>Test della pressione sulla zampa (g)</i>					
<i>Trattamento mg/kg .p.o.</i>	<i>prima del trattamento</i>	<i>dopo il trattamento</i>			
		<i>30 min</i>	<i>60 min</i>	<i>90 min</i>	<i>120 min</i>
CMC + CMC	61,6 ± 2,1	62,8 ± 3,5	59,4 ± 3,1	63,9 ± 3,8	58,5 ± 3,5
STZ + CMC	39,3 ± 2,6	36,5 ± 2,8	38,2 ± 3,2	35,4 ± 3,0	37,7 ± 3,5
STZ + ABO-09 + ABO-11 + ABO-12	37,2 ± 2,9	65,9 ± 3,0*	63,8 ± 3,1*	66,2 ± 4,1*	59,8 ± 3,4*
^P< 0.05; *P< 0.01 in confronto con i topi trattati con STZ. Ciascun valore rappresenta la media di 8 ratti.					

5

Modello della mononeuropatia periferica nel ratto

Il dolore neuropatico è caratterizzato dallo sviluppo di un'alterata percezione del dolore che si manifesta come dolore spontaneo continuo ed iperalgesia. I ratti vengono anestetizzati e successivamente il nervo sciatico viene esposto a livello della coscia divaricando i bicipiti femorali. Prossimalmente alla triforcazione del nervo sciatico, circa 7 mm del nervo vengono liberati dalle membrane e 4 legature lasse vengono effettuate intorno al nervo, circa 1 mm l'una dall'altra. In un altro gruppo di animali viene effettuata un'incisione uguale, ma senza la legatura del nervo (sham operation). La neuropatia si sviluppa in 14 giorni. Le prove con le sostanze potenzialmente analgesiche vengono effettuate il 14° giorno dall'operazione usando il "paw pressure". (Bennett & Xie, *Pain*, 33, 87-107, 1988)

15

Risultati

L'associazione dei tre reverte completamente e in maniera statisticamente significativa l'iperalgesia da legatura del nervo sciatico fino a 120 minuti

20

Effetto d'iperico + vite rossa + rosmarino sull'iperalgesia indotta nel ratto da legatura lenta del nervo sciatico						
Trattamento mg/kg .p.o.	zampa	Test della pressione sulla zampa (g)				
		prima del trattamento	dopo il trattamento			
			30 min	60 min	90 min	120 min
CMC	sn	60,5 ± 3,0	58,6 ± 2,9	62,6 ± 3,6	61,7 ± 3,3	57,1 ± 3,4
CMC	dx	26,2 ± 2,5	28,1 ± 2,6	25,3 ± 3,0	28,4 ± 3,1	26,7 ± 2,5
ABO-09+ABO-11 +ABO-12	sn	57,3 ± 2,6	71,3 ± 3,1 [^]	68,4 ± 3,2	65,5 ± 2,9	60,3 ± 3,9
ABO-09+ABO-11 +ABO-12	dx	30,1 ± 3,1	50,3 ± 4,4 [*]	46,6 ± 3,7 [*]	44,2 ± 3,0 [*]	37,5 ± 3,3
[^] P< 0,05; [*] P< 0,01 in confronto con topi trattati con CMC. Ciascun valore rappresenta la media di 8 ratti						

BIBLIOGRAFIA

- Kingery WS. A critical review of controlled clinical trials for peripheral neuropathic pain and complex regional pain syndromes. Pain 1997;73: 123-139.
- 5 WO2009106263.
- Cavalletti et al. Effects of different schedules of oxaliplatin treatment on the peripheral nervous system of the rat Eur. J. Cancer 37, 2457-2463 2001.
- Springer, J Biochem Mol Biol, 35: 94-105, 2002.

RIVENDICAZIONI

1. Composizione per uso terapeutico comprendente:
 - a) polifenoli tra il 3 ed il 9% in peso di detta composizione di cui
 - 5 a') flavonoidi, esclusa la quercetina, tra l'1 ed il 7% in peso di detta composizione;
 - a'') quercetina tra lo 0,05 e lo 0,3% in peso di detta composizione;
 - b) antocianosidi totali tra lo 0,1 e l'1% in peso.
2. Composizione secondo la rivendicazione 1 per uso nel trattamento del dolore
10 neuropatico.
3. Composizione secondo la rivendicazione 1 o 2 in cui detti a), a'), a'') e/o b) sono ottenuti da estratti vegetali.
- 15 4. Composizione secondo la rivendicazione 3 in cui detti estratti sono estratti idroalcolici liofilizzati.
5. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 2 a 4 in cui detto dolore neuropatico è causato da: un trattamento con un farmaco, un trattamento con un
20 farmaco chemioterapico, malattie croniche, traumi, esposizione a sostanze chimiche tossiche, una infezione in corso, una infezione pregressa, funzione alterata di un organo, malattie vascolari, malattie metaboliche, malattie autoimmuni; o è descritto come neuropatia diabetica periferica, nevralgia erpetica postale, nevralgia del trigemino, dolore neuropatico della parte bassa della schiena, distrofia simpatica
25 riflessa, sindrome dell'arto fantasma o è un dolore neuropatico di cui non si conosce la causa (dolore neuropatico idiopatico).
6. Composizione secondo la rivendicazione 5 in cui detto chemioterapico è oxaliplatino, vincristina, vinblastina, paclitaxel, cisplatino, taxano, epotiloni, bortemozide, alcaloidi

della vinca.

7. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 6 in cui detti polifenoli sono ottenuti da estratti di *Hypericum perforatum*, *Rooibos tes*, *Punica granatum*, *Sylibum marianum*, *Cynara scolimus*, *Vitis vinifera*, Tè verde, *Rosmarinus officinalis*, *Malpighia glabra* *Curcuma longa*, *Curcuma xantorrhiza*.

8. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 7 in cui detti flavonoidi sono ottenuti da estratti di *Hypericum perforatum*, *Punica granatum*, *Sylibum marianum*, *Cynara scolymus*, *Vitis vinifera*, verde *Camelia sinensis*, *Rosmarinus officinalis*.

9. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 8 in cui detti antocianosidi sono ottenuti da estratti di *Vitis vinifera*, *Vaccinium myrtillus*, *Hibiscus sabdariffa*.

10. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 9 in cui detta quercetina è ottenuta da estratti di *Hypericum perforatum*, Tè verde, *Aspalathus linearis*, *Sylibum marianum*, *Vaccinium myrtillus*.

11. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 10 ulteriormente comprendente Vitamina B1, Vitamina B6 e/o Vitamina B12.

12. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 11 ulteriormente comprendente pappa reale e/o lievito di birra.

13. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 12 in cui detta composizione è in forma di capsula, compressa, pasticca, granulato, polvere, sciroppo, elisir, gelatina dura, gelatina morbida, sospensione, emulsione, soluzione, gel.

14. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 13 in cui detta composizione è compresa in o consiste in un integratore alimentare, in alimento a fini medici speciali, una composizione farmaceutica.

5 15. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 14 caratterizzata dal fatto di non inibire l'attività antitumorale di un chemioterapico.

16. Nutriceutico, integratore alimentare o alimento a fini medici speciali comprendente una composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 15.

CLAIMS

1. A composition for therapeutic use comprising:

a) polyphenols between 3 and 9% by weight of said composition

wherein

5 a') flavonoids, quercetin excluded, between 1 and 7% by weight of said composition;

a'') quercetin between 0.05 and 0.3% by weight of said composition;

b) anthocyanosides between 0.1 and 1% by weight.

2. The composition according to claim 1 for use in the treatment of neuropathic pain.

10

3. The composition according to claim 1 or 2 wherein said a), a '), a'') and/or b) are obtained from plant extracts.

4. The composition according to claim 3 wherein said extracts are hydro alcoholic
15 extracts lyophilized.

15

5. The composition according to any one of the claims 2 to 4 wherein said neuropathic pain is caused by: a treatment with a drug, a treatment with a chemotherapeutic drug, chronic diseases, trauma, exposure to toxic chemicals, a current infection, an infection
20 past, altered function of an organ, vascular diseases, metabolic diseases, autoimmune diseases; or is described as diabetic peripheral neuropathy, post herpetic neuralgia, trigeminal neuralgia, neuropathic pain of the lower back, reflex sympathetic dystrophy, phantom limb syndrome or it is a neuropathic pain of no known cause (idiopathic neuropathic pain).

25

6. The composition according to claim 5 wherein said chemotherapy is oxaliplatin, vincristine, vinblastine, paclitaxel, cisplatin, taxane, epothilones, bortezomide, vinca alkaloids.

7. The composition according to any one of claims 1 to 6 wherein said polyphenols are obtained from extracts of *Hypericum perforatum*, *Rooibos tes*, *Punica granatum*, *Sylibum marianum*, *Cynara scolimus*, *Vitis vinifera*, *Green Tea*, *Rosmarinus officinalis*, *Malpighia glabra* *Curcuma longa*, *Curcuma xantorrhiza*.

5

8. The composition according to any one of claims 1 to 7 wherein said flavonoids are obtained from extracts of *Hypericum perforatum*, *Punica granatum*, *Sylibum marianum*, *Cynara scolymus*, *Vitis vinifera*, *Camelia sinensis green*, *Rosmarinus officinalis*.

10 9. The composition according to any of claims 1 to 8 wherein said anthocyanosides are obtained from extracts of *Vitis vinifera*, *Vaccinium myrtillus*, *Hibiscus sabdariffa*.

15 10. The composition according to any of claims 1 to 9 wherein said quercetin is obtained from extracts of *Hypericum perforatum*, *Green Tea*, *Aspalathus linearis*, *Sylibum marianum*, *Vaccinium myrtillus*.

11. The composition according to any one of claims 1 to 10 further comprising Vitamin B1, Vitamin B6 and/or vitamin B12.

20 12. The composition according to any one of claims 1 to 11 further comprising royal jelly and/or brewer's yeast.

25 13. The composition according to any one of claims 1 to 12 wherein said composition is in the form of capsule, tablet, lozenge, granule, powder, syrup, elixir, hard gelatin, soft gelatin, suspension, emulsion, solution, gel.

14. The composition according to any one of claims 1 to 13 wherein said composition is comprised in or consists of a food supplement, food for special medical purposes, a pharmaceutical composition.

30

15. The composition according to any one of claims 1 to 14 characterized in that it does not inhibit the activity of an antitumor chemotherapeutic agent.
- 5 16. Nutraceutical, food supplement or food for special medical purposes comprising a composition according to any one of claims 1 to 15.

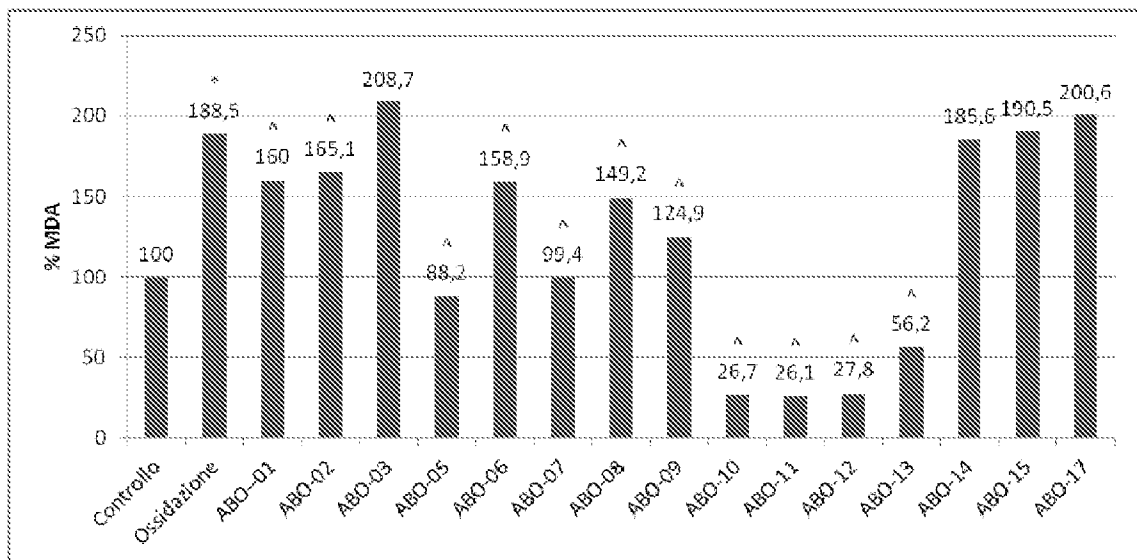


FIG.1A

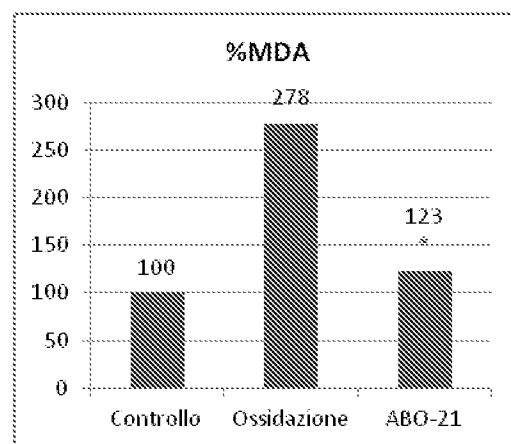


FIG.1B

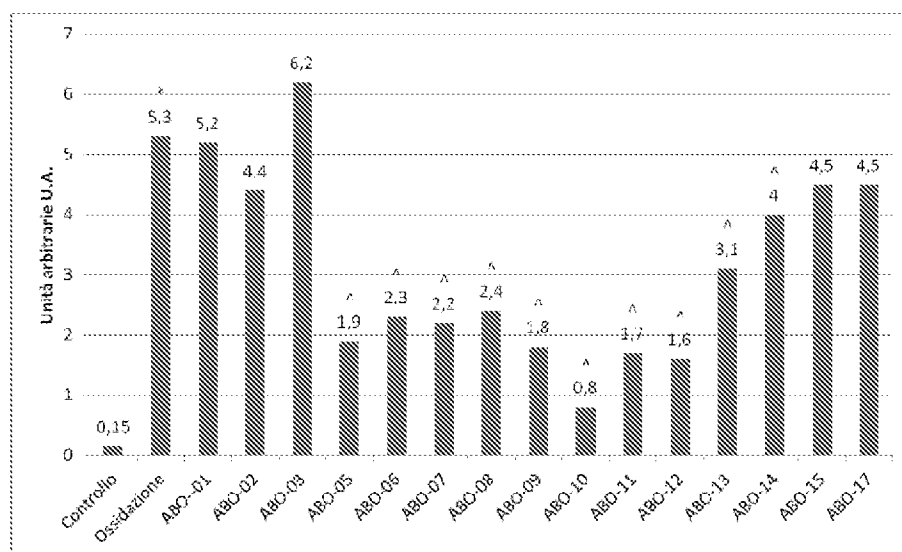


FIG.2A

5

10

15

20

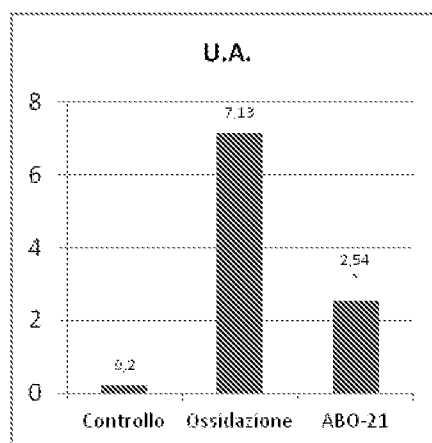


FIG.2B

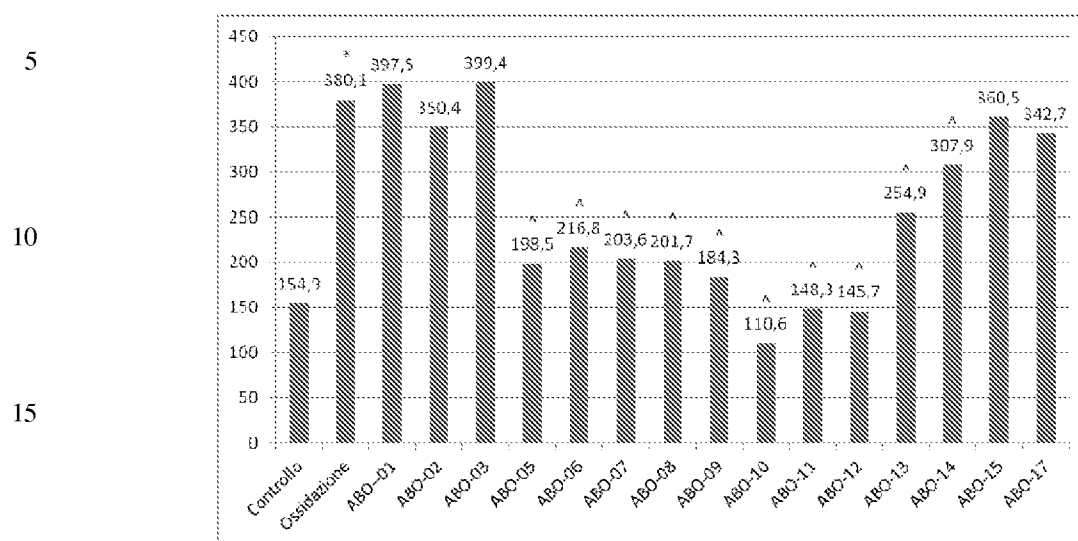


FIG.3A

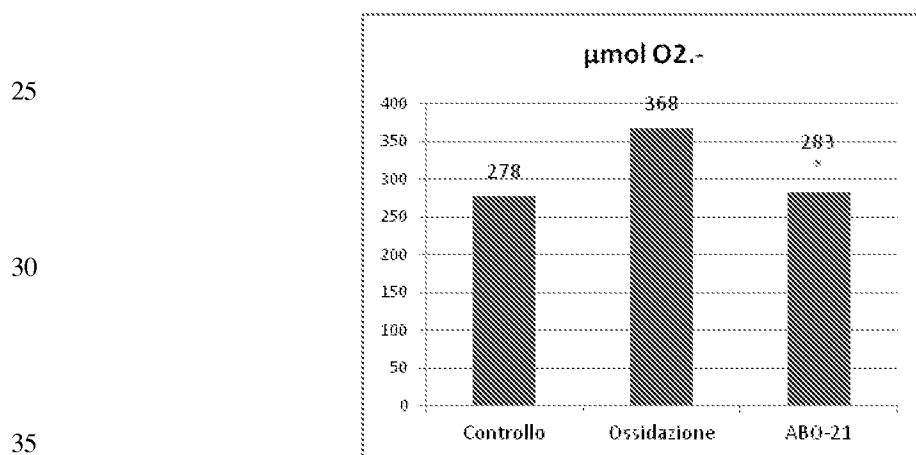


FIG.3B