

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102012902017040A1

Publication Date

20130726

Applicant

FIDIA FARMACEUTICI S.P.A.

Title

NUOVE COMPOSIZIONI FARMACEUTICHE CONTENENTI
FOSFATIDILSERINA E CURCUMINA.

PD 2012 A 000021

Fidia farmaceutici S.p.A.
Via Ponte della Fabbrica, 3/A
35031 Abano Terme (PD) - Italy

Descrizione di una domanda di brevetto per invenzione industriale dal titolo "*Nuove composizioni farmaceutiche contenenti fosfatidilserina e curcumina*" della Fidia Farmaceutici S.p.A. con sede in Via Ponte della Fabbrica, 3/A – 35031 Abano Terme (PD), nella persona del suo Amministratore Delegato e Legale Rappresentante, Dott. Antonio Germani

Inventori designati: GENNARI Giovanni

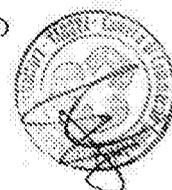
PANFILO Susi

Depositata il 26 GEN. 2012 con n° PD 2012 A 000021

CAMPO DELL'INVENZIONE

Il declino funzionale del Sistema Nervoso Centrale (SNC), che si determina durante il fisiologico processo d'invecchiamento cerebrale, spesso causa un deterioramento delle funzioni cognitive del soggetto anziano che può concretizzarsi anche in disturbi del comportamento con alterazioni della memoria temporale e spaziale. Questo calo funzionale è legato sia al determinarsi di alterazioni biochimiche e strutturali della composizione lipidica delle membrane neuronali, sia ad una diminuita attività enzimatica cerebrale che può anche condurre ad una riduzione della densità sinaptica neuronale.

La fosfatidilserina (PS) rappresenta il maggiore fosfolipide acido del cervello, per questo motivo la ricerca scientifica da tempo sta cercando un trattamento farmacologico ai disturbi cognitivi legati all'invecchiamento con terapie costituite da fosfolipidi che possano



prevenire (e/o in parte anche ricostruire) questo deficit strutturale e funzionale delle membrane neuronali invecchiate.

Studi preclinici e clinici effettuati sull'uomo hanno oramai dimostrato come la somministrazione orale di PS può, soprattutto nell'anziano, determinare un significativo aumento della sua capacità d'apprendimento e della sua memoria temporale e spaziale, anche nel caso di patologie particolarmente invalidanti come la demenza senile e l'Alzheimer (Cenacchi T. et al.; Aging Clin Exp Res; 1993; 5:123-133; Nunzi MG et al.; Adv Exp Med Biol; 1992; 318:393-8).

Il deterioramento sia fisiologico che patologico delle funzioni cognitive dell'anziano può essere spesso associato ad una diminuzione ormonale dovuta al normale calo di funzionalità endocrina (come la menopausa o l'andropausa), oppure all'improvviso blocco della produzione di determinati ormoni per asportazione chirurgica dell'organo secernente (ad esempio, per ovariectomia parziale o totale). A seguito di ciò, spesso si verifica l'instaurarsi di altre patologie come l'osteoporosi.

Con il termine osteoporosi si intende una condizione per cui lo scheletro è soggetto ad un maggiore rischio di fratture in seguito alla diminuzione di massa e alle modificazioni della microarchitettura delle ossa. La perdita ossea riscontrata per trovarsi di fronte all'osteoporosi deve essere del 30%. Si manifesta principalmente nell'osso trabecolare che è soggetto al maggior numero di fratture, e inizia con una diminuzione del tono calcico



della massa ossea (osteopenia). Le ossa più facilmente interessate dalla diminuzione del tono calcico sono le vertebre dorso-lombari, il femore e il polso. Con il progredire dell'osteopenia si può manifestare crollo vertebrale o frattura del collo femorale.

L'osteoporosi si suddivide in primaria (originale) o secondaria, ovvero conseguita per evento correlato, tuttavia la forma primaria costituisce la quasi esclusività (95% dei casi).

Osteoporosi primarie comprendono osteoporosi post-menopausale e l'osteoporosi senile (quest'ultima dovuta a varie cause, tra cui immobilizzazione, ridotto apporto di calcio, magnesio, vitamina D e altri importanti micronutrienti).

Osteoporosi secondarie sono invece classificabili come causate da immobilizzazione protratta, artrite reumatoide, neoplasie maligne, o ridotto assorbimento intestinale di nutrienti.

Fra le varie malattie ossee è la più diffusa, colpisce entrambi i sessi, maggiormente quello femminile dopo la menopausa, tale per cui negli USA la maggioranza degli adulti che hanno superato i 50 anni presenta osteoporosi o comunque una bassa densità ossea.

La causa è nella perdita dell'equilibrio fra osteoblasti e osteoclasti: la prima categoria di cellule contribuisce alla formazione ossea, la seconda contribuisce al riassorbimento osseo e se gli osteoclasti lavorano più velocemente degli osteoblasti, l'osso si deteriora. Nella menopausa si riscontra un maggiore produzione di osteoclasti, causata dalla perdita di estrogeni che porta all'innalzamento delle citochine correlato alla produzione di osteoclasti. Nella seconda



forma con l'avanzare dell'età diminuisce l'attività degli osteoblasti.

Come terapie di prevenzione e di cura, troviamo:

- l'assunzione di colecalciferolo per favorire l'assorbimento di Calcio a livello intestinale,
- l'integrazione di Calcio e Magnesio,
- la somministrazione di bifosfonati che inibiscono l'attività degli osteoclasti,
- la terapia ormonale sostitutiva con estro-progestinici per le donne in menopausa e con testosterone per gli uomini,
- l'inibizione degli osteoclasti con calcitonina,
- il clodronato per il trattamento del dolore da frattura insieme alla calcitonina sottocute.

Associata all'osteoporosi, spesso nell'anziano possiamo trovare l'osteoartrosi/osteoartrite (OA), patologia fortemente invalidante caratterizzata dalla progressiva erosione delle cartilagini articolari per la degradazione della matrice articolare e la perdita dei componenti cellulari. Infatti, il fisiologico processo di invecchiamento delle superfici articolari sembra coinvolgere i meccanismi enzimatici propri dell'OA.

È noto come lo sbilanciamento meccanico che può coinvolgere l'articolazione nella sua complessità può essere l'iniziale causa dell'insorgenza della suddetta patologia.

Quest'instabilità articolare può essere sostanzialmente causata da diversi fattori (quali il trauma, l'infiammazione del sistema articolare, l'erosione della cartilagine, una errata deambulazione o



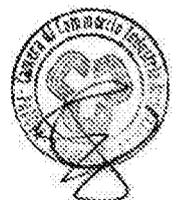
postura) e può determinare un'alterazione del delicato equilibrio esistente tra sintesi e degradazione della matrice extracellulare sintetizzata principalmente dai condrociti e dai sinoviociti.

Quando questa situazione di perfetta ma delicata omeostasi si spezza, la degradazione della matrice supera la sua sintesi e, conseguentemente, inizia un lento ma progressivo processo di degradazione male compensato dal corrispondente processo di sintesi, in seguito all'avvenuta perdita di condrociti.

Infatti, un eccessivo e/o non corretto caricamento delle articolazioni può causare una risposta condrocitaria che si esprime nella sintesi di quegli enzimi responsabili della degradazione della cartilagine stessa. Gli enzimi proteasici responsabili della degradazione della cartilagine sono chiamati Metalloproteasi (MMP) e sono sintetizzati dai condrociti quando stimolati da citochine infiammatorie, come IL-1 e TNF- α , che vengono prodotte e liberate nella cavità articolare soprattutto all'instaurarsi di una patologia infiammatoria. IL-1 stimola la sintesi di alti livelli di **ossido nitrico** (responsabile della morte per apoptosi dei condrociti) ed, inoltre, inibisce la sintesi dei proteoglicani (componenti della matrice) da parte dei condrociti stessi (Dozin B. et al., Matrix Biology, 2002, 21:449-459).

Come terapie di cura troviamo la somministrazione di farmaci steroidei e non steroidei, in associazione ad iniezioni intra-articolari di viscosupplementanti.

Attualmente in commercio come terapia di prevenzione e cura delle



patologie neurodegenerative di cui sopra e delle patologie infiammatorie in generale, possiamo trovare composizioni farmaceutiche contenenti agenti antiossidanti come la curcumina:

la curcumina (diferuloilmetano; 1,7-bis[4-idrossi-3-metossifenil]-1,6-eptadiene-3,5-dione) è una molecola liposolubile e, insieme ai suoi derivati mono- e di-metossi complessivamente detti curcuminoidi, si ottiene per estrazione con solvente dal rizoma essiccato e macinato della pianta di *Curcuma longa*. La curcuma è stata storicamente usata dalla medicina Ayurvedica indiana per trattare una grande varietà di disturbi, ma solo nel XX secolo le ricerche scientifiche identificarono nella curcumina il fattore responsabile della maggior parte delle sue attività biologiche. La curcumina è stata oggetto di moltissimi studi sia preclinici che clinici e, quindi, risulta ben documentato il suo potere anti-infiammatorio e anti-ossidante: possiede infatti la capacità di regolare l'equilibrio ossidativo delle cellule intervenendo in modo differente su moltissimi meccanismi; in particolare, inibisce una serie di fattori ad attività fortemente infiammatoria (COX 1 e 2, TNF, Lipo-ossigenasi, Interferone-gamma). Infine, è stata anche dimostrata *in vitro* la sua efficacia come anti-tumorale (Bengmark S., JPEN, 2006, 30(1):45-51).

Il suo utilizzo clinico tuttavia è limitato dalla sua scarsissima biodisponibilità dopo somministrazione orale, per il suo basso assorbimento gastrointestinale causato dalla lipofilità del suddetto principio attivo. Per questi motivi, molti sono stati i tentativi



d'aumentare la biodisponibilità della curcumina: come la sua associazione con *piperina* (comunque tossica) o con altri oli di *Curcuma longa* (US7,736,679), o la sua incapsulazione in liposomi o fitosomi costituiti da fosfolipidi/lecitina (EP1991244).

La disponibilità orale della curcumina resta comunque limitata.

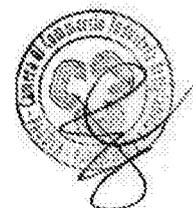
La fosfatidilserina è un fosfolipide di natura acida con tre gruppi ionizzabili (amminico, fosfato, e carbossilico) presente soprattutto nella parte interna della membrana plasmatica; moltissimi studi ne hanno dimostrato l'efficacia sia nel facilitare le attività neuronali che dipendono dalla membrana cellulare, sia nel normalizzare la densità dei recettori neuronali per ripristinare i corretti livelli di acetilcolina e dopamina.

La PS attualmente in commercio nasce da processi di produzione e purificazione (noti all'esperto del ramo) consistenti nella conversione enzimatica della fosfatidilcolina (PC) e/o fosfatidiletanolamina (PE) in PS tramite una reazione di transfosfatidilazione catalizzata dall'enzima fosfolipasi D (PLD), con successiva sua purificazione per estrazione finale con solventi organici.

La PS è prodotta come polvere ma venduta soprattutto in forma fluida, generalmente mescolata a solventi oleosi comprendenti trigliceridi per la sua formulazione in capsule molli.

Tuttavia, questo fosfolipide presenta notevoli problemi di stabilità formulativa legati fondamentalmente a tre motivazioni:

- la presenza, nella composizione finale delle capsule molli, di



PD 2012 A 000021

tracce dell'enzima PLD che determina la rapida decomposizione della PS portando alla formazione di acido fosfatidico (PA) e/o di fosfatidilglicerolo, in seguito alla sostituzione della serina con il glicerolo presente all'interno della capsula (EP1663157);

- in presenza di radicali liberi (ROS) la PS può subire un processo di perossidazione lipidica degli acidi grassi polinsaturi della molecola (Bochkov V., Antioxidants & Redox Signaling; 2010, 12(8):1009-1058);
- la PS può infine subire anche il processo ossidativo della sua testa polare, cioè della serina, che porta all'accumulo di PA (Maciel E. et al., J Am Soc Mass Spectrom, 2011, 22(10):1804-14).

Oggetto della presente invenzione è una nuova composizione farmaceutica comprendente l'associazione di PS con curcumina, poiché la Richiedente ha scoperto come essa stabilizzi il suddetto fosfolipide rallentandone e/o bloccandone i molteplici processi di degradazione e ossidazione (precedentemente descritti) permettendo così la formulazione di una associazione PS/curcumina stabile e priva di prodotti di degradazione, per la preparazione di composizioni farmaceutiche (ed integratori) in tutte le forme farmaceutiche e non, attualmente note all'esperto (capsule, barrette, soluzioni/dispersioni per la preparazione di flaconcini).



PD 2012 A 000021

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

La presente invenzione descrive e rivendica nuove composizioni a base di PS e curcumina per la preparazione di farmaci (e/o integratori alimentari) sia nella prevenzione delle patologie legate all'invecchiamento cerebrale sopra descritte, sia nella prevenzione e cura dell'osteoporosi e/o dell'osteoartrosi.

Infatti la Richiedente ha scoperto che l'associazione della curcumina con la fosfatidilserina stabilizza questo fosfolipide, in modo tale che le composizioni farmaceutiche (o altre formulazioni) che contengono la suddetta associazione non presentano PS in forma degradata/ossidata e neppure i prodotti di degradazione della PS sopra descritti, mantenendo così inalterate tutte le proprietà farmacologiche della PS. La Richiedente ha quindi di seguito descritto nuove forme farmaceutiche come capsule molli o compresse, soluzioni e/o dispersioni, barrette o altre formulazioni note all'esperto, contenenti la nuova stabile associazione costituita da PS/curcumina.

Oggetto della presente invenzione sono inoltre nuovi usi terapeutici delle nuove composizioni farmaceutiche contenenti PS/curcumina:

- trattamento terapeutico di prevenzione e cura delle patologie neurodegenerative con diminuzione degli aspetti cognitivi e alterazioni della memoria come l'Alzheimer, la demenza senile e presenile, la demenza vascolare;
- trattamento terapeutico di prevenzione e cura



dell'osteoporosi primaria e secondaria;

- trattamento terapeutico di prevenzione e cura dell'osteoartrosi (OA).

La Richiedente di seguito ha infatti dimostrato l'effetto sinergico della nuova stabile associazione PS/curcumina nella riduzione della produzione di ossido nitrico (NO).

Questi risultati sono estremamente importanti poiché l'NO risulta implicato nella patogenesi :

- del danno cellulare ossidativo che si verifica, ad esempio, nella riperfusione dopo un'ischemia;
- di malattie neurodegenerative come, ad esempio, l'Alzheimer, la demenza senile e presenile, la demenza vascolare;
- di malattie relative alla struttura ossea e alle articolazioni, come l'osteoporosi e l'osteoartrosi.

Nel SNC, agenti patogeni, condizioni di stress, età o malattie neurodegenerative possono dare inizio ad una risposta infiammatoria guidata dall'attivazione delle cellule gliali (in particolare delle cellule microgliali) che, secernendo molecole pro-infiammatorie, neurotrasmettitori e specie reattive come NO, modulano i suddetti processi infiammatori. In particolare, alte concentrazioni di NO sono state riscontrate sia nei neuroni che nella glia dove contribuisce al mantenimento e alla progressione del processo neuro-infiammatorio per la sua peculiare capacità di creare radicali liberi che compromettono l'integrità della cellula

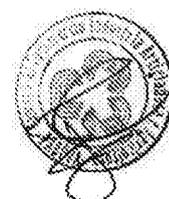


sottoponendola a stress ossidativo (Fernandez AP et al., Curr Pharm Des, 2010, 16(25):2837-50). In aggiunta a ciò, l'NO appare coinvolto anche nei processi di sviluppo dell'osso aumentando il differenziamento degli osteoclasti, compromettendo così la densità minerale dell'osso stesso (Ninomiya JT, Poster Session-Bone Cell Biology, 2001, 47th AM of Orthopaedic Research Society, California). Infine, è stata dimostrata la presenza e il ruolo attivo dell'NO nei tessuti articolari di pazienti affetti da OA, dove l'alta concentrazione inibisce l'attività mitocondriale dei condrociti e dei sinoviociti, causa la formazione di radicali liberi e quindi la morte cellulare.

Nota è il ruolo della PS nell'inibizione dell'enzima deputato alla sintesi di NO e il conseguente rallentamento del processo di osteoclastogenesi che causa la perdita di osso trabecolare (Aramaki Y, Biochem Biophys Res Commun, 2001, 280(4):982-7).

Nota è infine anche la capacità della curcumina nell'inibire la produzione di NO regolando l'enzima NO sintetasi; per le sue capacità anti-infiammatorie la curcumina risulta quindi sperimentata nelle patologie neurodegenerative, nell'OA ed anche nella prevenzione del deterioramento osseo (Kim WK, J Cell Biochem, 2011, 112(11):3159-66).

La Richiedente ha ora sorprendentemente scoperto, e di seguito dimostrato, l'effetto sinergico della nuova stabile associazione PS/curcumina nella riduzione della produzione di ossido nitrico (NO) nelle cellule della microglia dopo sollecitazione con agenti



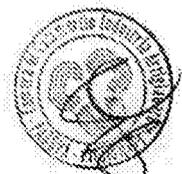
pro-infiammatori (LPS).

Questo risultato è del tutto inaspettato e, in considerazione delle note implicazioni dell'NO sopra descritte, supporta i nuovi usi terapeutici della composizione farmaceutica contenente la stabile associazione PS/curcumina, sia nelle patologie neurodegenerative che in quelle coinvolgenti l'apparato osseo.

Oggetto della presente invenzione sono quindi i nuovi usi e metodi di trattamento delle patologie sotto descritti, che consistono nella somministrazione giornaliera di 1 o più dosi farmacologicamente attive della composizione farmaceutica a base di PS/curcumina, e di seguito riportati:

- trattamento terapeutico di prevenzione e cura delle patologie neurodegenerative con diminuzione degli aspetti cognitivi e alterazioni della memoria come l'Alzheimer, la demenza senile e presenile, la demenza vascolare;
- trattamento terapeutico di prevenzione e cura dell'osteoporosi primaria e secondaria;
- trattamento terapeutico di prevenzione e cura dell'osteoartrosi (OA).

La PS utilizzabile nella descritta associazione è prodotta grazie all'enzima PLD che catalizza la transfosfatidilazione tra PC e serina, reazione che può avvenire in ambiente acquoso (EP1231213, EP1048738), oppure in un sistema bifasico acqua/solvente (EP0776976, EP1890706). È tuttavia preferibile utilizzare una PS prodotta secondo brevetto EP1890706 in cui la PS

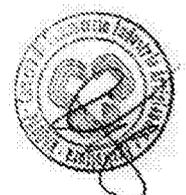


può essere prodotta in presenza di un ossido di metallo bivalente in un ambiente di reazione idroalcolico, oppure in un ambiente contenente un solvente aprotico, oppure in un sistema bifasico; è maggiormente preferibile la preparazione di PS in un sistema bifasico formato da una soluzione acquosa e da un solvente organico in presenza di ossido di calcio, poiché questo sistema permette la preparazione di una PS ad alta concentrazione e con elevato grado di purezza.

La curcumina (con i suoi derivati come, ad esempio, i suoi esteri che funzionano come pro-drug) utilizzabile nella presente invenzione può essere acquistata come tale (generalmente si trova associata a altri curcuminoidi presenti in proporzione minore come, ad esempio, Curcumin Complex), o come Biocurcumina (BCM-95®) associata ad oli e polimeri che aumentano la sua biodisponibilità (US20070148263), o formulata in associazione con piperina (Shobha et al., *Planta Med*, 1998, 64: 353-56), oppure reperita come micro o nanoemulsioni/nanodispersioni che utilizzano lecitina e/o acidi grassi e/o trigliceridi ed, eventualmente, anche tensioattivi come il Tween 80, per stabilizzare la molecola e renderla maggiormente biodisponibile.

La nuova stabile associazione oggetto della presente invenzione è costituita da:

- PS (preferibilmente come sale sodico) in concentrazione da 50 a 400mg per singola dose di composizione farmaceutica, preferenzialmente da 100 a 200mg;



- curcumina con concentrazione da 50 a 1000mg per singola dose di principio attivo, preferenzialmente da 100 a 600mg, in modo dipendente dalla iniziale composizione del principio attivo utilizzato nell'associazione con PS.

Le forme farmaceutiche (e non farmaceutiche) preferite sono in forma di capsule molli, bustine, compresse, barrette o soluzioni/dispersioni per la preparazione di flaconcini.

Le forme farmaceutiche maggiormente preferite sono le capsule molli e le bustine; l'associazione PS/curcumina può essere formulata in composizioni preparate come noto all'esperto del ramo utilizzando, ad esempio, eccipienti lipidici (come, ad esempio, acidi grassi, trigliceridi e/o fosfolipidi); tensioattivi (come, ad esempio i polisorbati); agenti adsorbenti (ad esempio, il sorbitolo e il mannitolo); agenti conservanti/antiossidanti (come, ad esempio, l'acido ascorbico); regolatori di pH (come ad esempio l'acido citrico); infine, le nuove composizioni oggetto della presente invenzione possono contenere anche agenti farmacologicamente/biologicamente attivi di origine naturale e/o di sintesi, come vitamine, sali minerali, agenti tonificanti (come ad esempio il Ginseng e il Ginkgo-biloba), antiinfiammatori, aminoacidi.

A scopo puramente descrittivo e non limitativo vengono riportati alcuni esempi di formulazione della nuova associazione PS/curcumina oggetto della presente invenzione, assieme ai risultati ottenuti dalla sperimentazione *in vitro*.



Esempio 1: preparazione di bustine 200mg PS/400mg curcumina

Componenti

PS sale sodico	200mg
Curcumina (95%)	400mg
Aspartame	10mg
Silice colloidale	20mg
Lecitina di soia	20mg
Aroma naturale limone	60mg
Mannitolo	200mg
Fruttosio q.b.a	6000mg

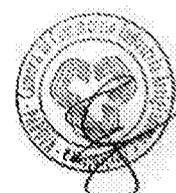
Le bustine devono contenere un granulato uniforme, scorrevole, di gradevole assunzione, stabile nel tempo.

Il silice conferisce scorrevolezza al granulato e previene la formazione di aggregati, il mannitolo e la lecitina facilitano la dispersione del principio attivo in acqua, mentre il fruttosio, con granulometria preferibilmente inferiore a 150 μ m, consente la realizzazione di una miscela uniforme di PS/curcumina con gli eccipienti.

Procedimento di preparazione: Miscelazione dei componenti

In apparecchio miscelatore a cubo è caricata la PS pre-miscelata con lecitina opportunamente setacciata e curcumina; successivamente vengono aggiunti tutti i restanti eccipienti preventivamente setacciati.

L'atmosfera è resa inerte con flusso d'azoto filtrato, la miscelazione procede per 30 minuti.



Al termine, la miscela è ripartita in bustine (sempre in flusso d'azoto) che vengono termosaldate.

Esempio 2: preparazione di capsule molli 100mg PS/200mg curcumina

Componenti

PS sale sodico	100mg
Curcumina (95%)	200mg
Lecitina	50mg
Olio vegetale	300mg

Componenti dell'involucro

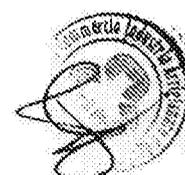
Gelatina	360mg
Glicerolo	140mg
Ferro ossido marrone E172	3mg
Ferro ossido rosso E172	1,2mg
Sodio etile p-idrossibenzoato	1,6mg
Sodio propile p-idrossibenzoato	0,9mg

Procedimento di preparazione: Miscelazione dei componenti

Per questa procedura viene utilizzato il turbo-emulsore FRYNA VME 400 in cui viene versata inizialmente la quantità descritta di olio vegetale portandolo ad una temperatura omogenea di 25°C.

A esso si aggiunge una metà della quantità totale di PS, di Curcumina e dei restanti componenti;

si chiude l'apparecchio e si crea il vuoto; la turbina viene quindi azionata per 15 minuti. Si versa la seconda metà dei componenti e si



ricrea il vuoto. La turbina è azionata per altri 40 minuti. La temperatura non deve superare i 40°C.

Successivamente è azionato anche il mulino omogeneizzatore per un tempo complessivo di 90 minuti fino ad ottenere la completa ed omogenea dispersione dei principi attivi e dei restanti componenti.

Il mulino è fermato mentre rimane in azione la turbina per altri 10 minuti.

Successivamente la miscela ottenuta è ripartita in capsule.

Esempio 3:

PS/curcumina: sinergica inibizione della produzione di NO

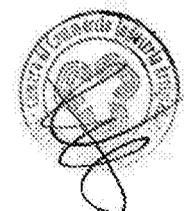
Questa sperimentazione è stata fatta per valutare la capacità della stabile associazione PS/curcumina nel modulare l'attivazione della microglia *in vitro* vs l'effetto determinato dalla sola PS e dalla sola curcumina.

Materiale e Metodi

PS (sale sodico) prodotta e purificata secondo EP1890706 (esempio 3) è stata risospesa in 2:1 cloroformio/metanolo, asciugata per evaporazione e risospesa in PBS alla concentrazione finale di 100µM. Per questo esperimento è stata utilizzata curcumina al 95% di purezza, preparata in DMSO alla concentrazione finale di principio attivo di 20mM.

Modello sperimentale

Per questa sperimentazione è stato scelto un modello di attivazione gliale *in vitro* utilizzando la linea cellulare di microglia murina BV-2:



50.000 cells/well sono state inizialmente seminate in piastre da 96 wells e mantenute in coltura in DMEM contenente il 10% di FCS, glutammina e antibiotici a 37°C. Se attivate con LPS (lipopolisaccaride, endotossina batterica dei Gram-negativi, normalmente utilizzata come stimolo pro-infiammatorio sia *in vitro* che *in vivo*), queste cellule sono in grado di rilasciare NO nel terreno di coltura, di conseguenza l'esperimento consisteva nella loro stimolazione con LPS 0,1µg/ml over-night, in presenza o in assenza di PS (10 e 30µM) oppure di curcumina (2,5 e 5µM) a diverse concentrazioni.

Infine, per valutare la sinergia tra i due principi attivi è stata testata l'associazione PS/curcumina in presenza di LPS 0,1µg/ml (come sopra scritto):

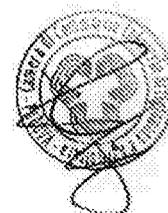
PS 10µM + curcumina 2,5µM, e

PS 10µM + curcumina 5µM.

Il contenuto finale di NO nel medium è stato misurato con il test di Griess: in breve, aliquote del medium sono state mescolate con volumi uguali del reagente di Griess (0,1% N(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride, 1% sulphanilamide e 0,4M HCL). Dopo 15 minuti di reazione, l'assorbanza è stata misurata a 570nm.

Risultati

Figura 1 evidenzia l'effetto determinato dalla PS e dalla curcumina (alle concentrazioni sopra scritte) sul rilascio di NO nel terreno di coltura da parte delle cellule di microglia murina BV-2: entrambe le



PD 2012 A 000021

molecole determinano l'inibizione del rilascio di NO nel terreno in modo dose-dipendente, quindi sia la PS che la curcumina sono in grado di diminuire la produzione di NO in cellule attivate da LPS confermando così il loro potere antiinfiammatorio descritto in letteratura e precedentemente citato.

Figura 2 dimostra in modo chiaro e inequivocabile l'effetto sinergico elicitato dalla stabile nuova associazione PS/curcumina nell'inibizione del rilascio di NO da parte della microglia attivata: infatti, PS 10 μ M in associazione con curcumina 5 μ M determina l'inibizione del 50% del rilascio di NO nel terreno di coltura, quando invece il singolo trattamento di PS 10 μ M non supera il 10% e il singolo trattamento di curcumina 5 μ M causa meno del 20% di inibizione.

L'effetto sinergico è dovuto (almeno in parte) alla stabilizzazione della PS.

In conclusione, la Richiedente con la sopra descritta sperimentazione ha dimostrato l'effetto sinergico della nuova stabile associazione PS/curcumina nella riduzione della produzione di ossido nitrico (NO) e, quindi, descrive e rivendica l'utilizzo delle composizioni farmaceutiche contenenti la suddetta associazione sia nella prevenzione delle patologie legate all'invecchiamento cerebrale sopra descritte, sia nella prevenzione e cura dell'osteoporosi e/o dell'osteoartrosi poiché, come sopra discusso, l'NO è risultato pesantemente coinvolto nella patogenesi di queste malattie.

Antonio Germani
Amministratore Delegato
Fidia farmaceutici S.p.A.



PD 2012 A 000021

Fidia farmaceutici S.p.A.
Via Ponte della Fabbrica, 3/A
35031 Abano Terme (PD) - Italy

Descrizione di una domanda di brevetto per invenzione industriale dal titolo "*Nuove composizioni farmaceutiche contenenti fosfatidilserina e curcumina*" della Fidia Farmaceutici S.p.A. con sede in Via Ponte della Fabbrica, 3/A – 35031 Abano Terme (PD), nella persona del suo Amministratore Delegato e Legale Rappresentante, Dott. Antonio Germani

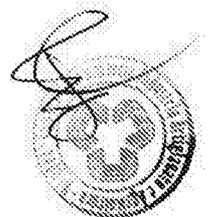
Inventori designati: GENNARI Giovanni

PANFILO Susi

Depositata il 26 GEN 2012 con n° PD 2012 A 000021

RIVENDICAZIONI

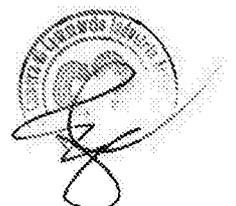
1. Stabile associazione di fosfatidilserina e curcumina per la preparazione di composizioni farmaceutiche o integratori per la prevenzione e cura delle patologie neurodegenerative con diminuzione degli aspetti cognitivi e alterazioni della memoria come l'Alzheimer, la demenza senile e presenile, la demenza vascolare.
2. Stabile associazione di fosfatidilserina e curcumina per la preparazione di composizioni farmaceutiche o integratori per la prevenzione e cura dell'osteoporosi primaria e secondaria.
3. Stabile associazione di fosfatidilserina e curcumina per la preparazione di composizioni farmaceutiche o integratori per la prevenzione e cura dell'osteoartrite.
4. Composizioni farmaceutiche o integratori secondo le rivendicazioni 1-3 in cui la fosfatidilserina è preparata in sistema bifasico formato da una soluzione acquosa e da un solvente



PD 2012 A 000021

- organico in presenza di ossido di calcio.
5. Composizioni farmaceutiche o integratori secondo la rivendicazione 4 in forma di capsule molli, bustine, compresse, barrette o soluzioni/dispersioni per la preparazione di flaconcini.
 6. Composizioni farmaceutiche o integratori secondo la rivendicazione 5 in forma di capsule molli e bustine.
 7. Composizioni farmaceutiche o integratori secondo la rivendicazione 6 in cui la PS è in forma di sale sodico con concentrazione compresa da 50 a 400mg per singola dose, preferenzialmente da 100 a 200mg, e la curcumina in concentrazione da 50 a 1000mg per singola dose, preferenzialmente da 100 a 600mg.
 8. Composizioni farmaceutiche o integratori secondo le rivendicazioni precedenti contenenti eccipienti lipidici come acidi grassi, trigliceridi e/o fosfolipidi, e/o tensioattivi, e/o agenti adsorbenti, e/o agenti conservanti/antiossidanti, e/o regolatori di pH.
 9. Composizioni farmaceutiche o integratori secondo le rivendicazioni precedenti in associazione ad agenti farmacologicamente e/o biologicamente attivi di origine naturale e/o di sintesi, come vitamine, sali minerali, agenti tonificanti, antiinfiammatori e aminoacidi.

Antonio Germani
Amministratore Delegato
Fidia farmaceutici S.p.A.



PD 2012 A 000021

Fidia farmaceutici S.p.A.
Via Ponte della Fabbrica, 3/A
35031 Abano Terme (PD) - Italy

Descrizione di una domanda di brevetto per invenzione industriale dal titolo "*Nuove composizioni farmaceutiche contenenti fosfatidilserina e curcumina*" della Fidia Farmaceutici S.p.A. con sede in Via Ponte della Fabbrica, 3/A – 35031 Abano Terme (PD), nella persona del suo Amministratore Delegato e Legale Rappresentante, Dott. Antonio Germani

Inventori designati: GENNARI Giovanni

PANFILO Susi

Depositata il **2.6. GEN. 2012** con n° **PD 2012 A 000021**

CLAIMS

1. Stable association of phosphatidylserine and curcumin for the preparation of pharmaceutical compositions or food supplements for the prevention and therapy of neurodegenerative diseases with loss of cognitive functions and memory impairment like Alzheimer's disease, senile and pre-senile dementia, vascular dementia.
2. Stable association of phosphatidylserine and curcumin for the preparation of pharmaceutical compositions or food supplements for the prevention and therapy of primary or secondary osteoporosis.
3. Stable association of phosphatidylserine and curcumin for the preparation of pharmaceutical compositions or food supplements for the prevention and therapy of osteoarthritis.
4. Pharmaceutical compositions or food supplements according to claims 1-3 wherein phosphatidylserine is prepared in a biphasic

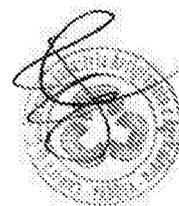


PD 2012 A 000021

system of an aqueous solution and an organic solvent in the presence of calcium oxide.

5. Pharmaceutical compositions or food supplements according to claim 4 in form of soft gel capsules, sachets, tablets, bars or solutions/dispersions for the preparation of vials.
6. Pharmaceutical compositions or food supplements according to claim 5 in form of soft-gel capsules and sachets.
7. Pharmaceutical compositions or food supplements according to claim 6 wherein phosphatidylserine is in form of sodium salt and in amounts ranging between 50 and 400 mg per unit dose, preferably between 100 and 200 mg, and curcumin is present in amounts ranging between 50 and 1000 mg per unit dose, preferably between 100 and 600 mg.
8. Pharmaceutical compositions or food supplements according to preceding claims containing lipidic excipients selected from fatty acids, tryglicerides and/or phospholipids, and/or surfactants, and/or absorbing agents, and/or preservatives/antioxidants, and/or pH regulating agents.
9. Pharmaceutical compositions or food supplements according to preceding claims in association with pharmacologically and/or biologically active agents of natural or synthetic origin, like vitamins, mineral salts, tonic agents, antiinflammatory agents and aminoacids.

Antonio Germani
Amministratore Delegato
Fidia farmaceutici S.p.A.



PD 2012 A 000021

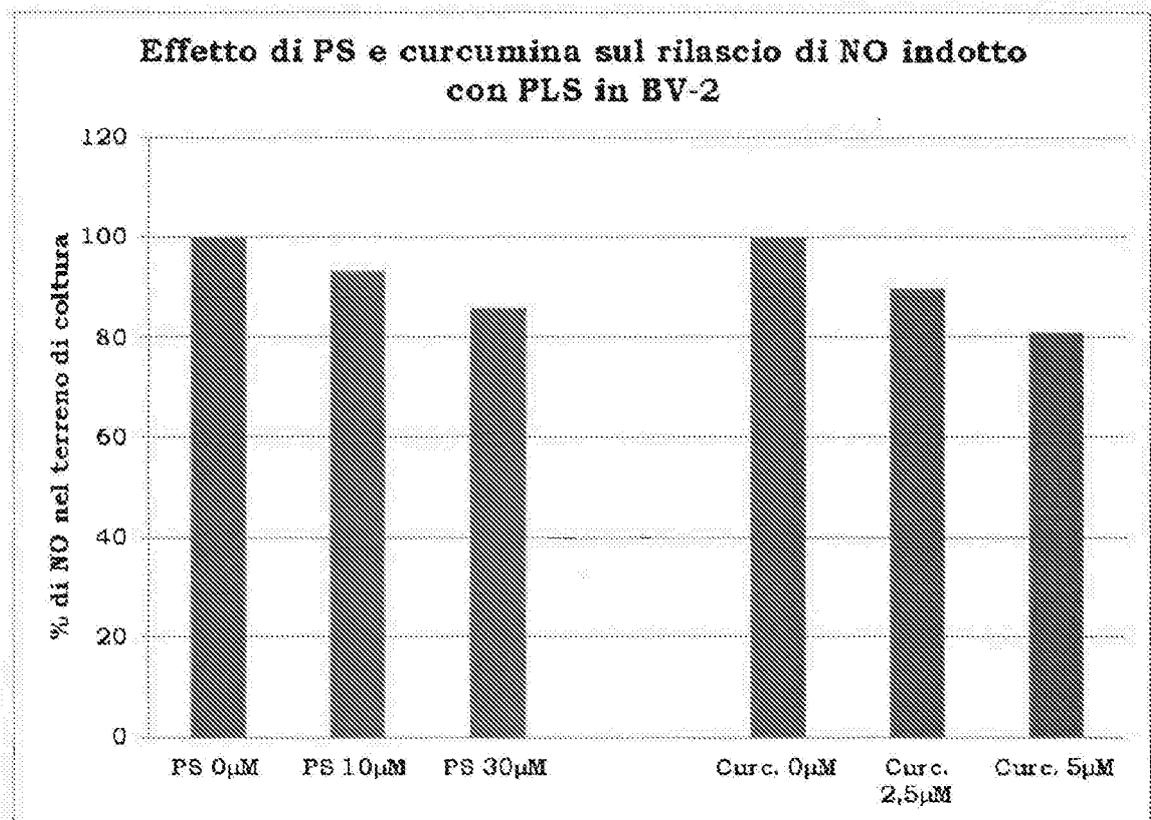


Figura 1



Antonio Germani
Antonio Germani
Amministratore Delegato
Fidia farmaceutici S.p.A.

PD 2012 A 000021

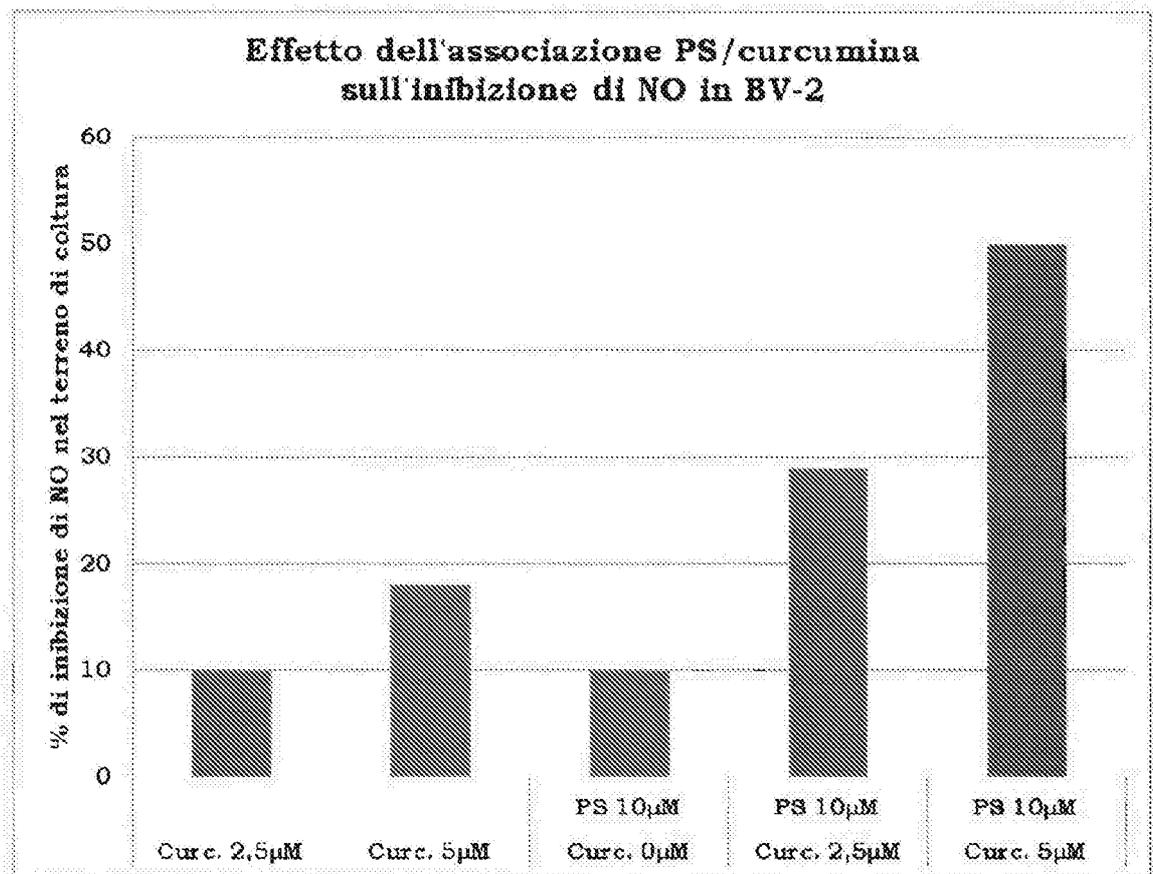
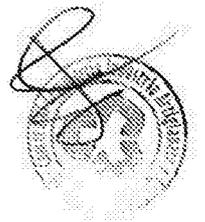


Figura 2



Antonio Germani
Amministratore Delegato
Fidia farmaceutici S.p.A.