

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102012902073325A1

Publication Date

20140130

Applicant

AMBIOTEC SAS

Title

COMPOSIZIONE IN GRADO DI AGIRE SUL REGOLATORE DEL MUSCOLO
MYOD E SULLA PROLIFERAZIONE DEGLI OSTEOLASTI

DESCRIZIONE

CAMPO DELL'INVENZIONE

L'invenzione nel campo della chimica-farmaceutica descrive una composizione per aumentare contemporaneamente il numero di molecole di RNA messaggero di geni codificanti il fattore miogenico 1 (MyoD) e contemporaneamente il numero di osteoblasti. La presente invenzione rientra nel campo dei prodotti chimici naturali che possono trovare applicazione farmaceutica, nutrizionistica e dietetica, nutraceutica e alimentare.

STATO DELL'ARTE

Negli stati di affaticamento fisico e psichico, cioè l'incapacità di mantenere lo sforzo fisico, scatta un meccanismo di difesa contro i danni a muscoli e cervello. Si possono distinguere due tipi di sforzo, una a carico del sistema periferico che coinvolge i muscoli e l'altro a livello centrale cioè cerebrale. In tutti questi casi si osserva una diminuzione della fosfocreatina muscolare, un accumulo di idrogenioni (H^+), un esaurimento di glicogeno a livello muscolare e una ipoglicemia derivante dall'aumento della frazione libera di triptofano (1).

Tutte queste attività richiedono consumo di ATP aerobico per esempio in caso di lunghe marce la richiesta può arrivare fino al 100% di consumo. Anche la senilità, la sedentarietà, le malattie vascolari e le infezioni virali hanno lo stesso risultato.

L'ipoglicemia induce il senso di stanchezza anche cerebrale per la mancanza di glucosio al cervello.

L'ipoglicemia stimola l'uso di acidi grassi aumentando la rimozione dai siti di accumulo. La rimozione anomala induce l'aumento dei livelli di triptofano cerebrale, che non si lega all'albumina e induce il senso di stanchezza fisica.

Per quanto riguarda l'attività fisica, specie di uno sportivo, occorre una dieta in grado di fornire le quantità adeguate di acqua, calorie, proteine, grassi, carboidrati, vitamine e minerali. La richiesta energetica dovrebbe essere modulata per ogni tipo di atleta e per il tipo di sforzo che egli compie.

Per quanto riguarda l'uso delle proteine, bisogna ricordare che i protidi sono sostanze ad alto

contenuto energetico che vengono trasformate in aminoacidi, alfa-chetoacidi e alla fine in $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{NH}_3 + \text{ATP} +$ sostanze varie. Allora sono importanti la qualità e la quantità dell'alimento che in generale deve contenere il 10-12% di proteine in grado di provvedere un adeguato apporto di aminoacidi essenziali. Se l'alimentazione è sbagliata il soggetto sotto sforzo fisico ne può risentire, 5 ciò è sicuramente vero per gli atleti che ne possono risentire anche in tempi brevi. Negli sforzi prolungati la richiesta di proteine è massima, per esempio negli atleti professionisti soggetti ad un intenso sforzo rapido la richiesta di proteine ammonta ad 1.2-1.7 g/kg di peso corporeo/die mentre in un atleta sottoposto a resistenza la richiesta in proteine si riduce a 1.2-1.4 g/kg di peso corporeo/die. Questa richiesta energetica può essere soddisfatta attraverso una dieta più 10 abbondante e con derivati proteici come gli aminoacidi a catena ramificata (BCAA) che contengono leucina, valina e isoleucina. Questi sono aminoacidi essenziali assorbiti bene che non subiscono modificazioni a livello epatico, da dove vengono inviati ai muscoli per essere trasformati nei corrispondenti alfa-chetoacidi. Questi ritornano al fegato per la formazione di acetilcoenzima A, molecola essenziale nella formazione di ATP (1). Il passaggio fegato-muscoli- 15 fegato coinvolge il glicogeno, che si trasforma in glucosio il quale attraverso il sangue arriva ai muscoli dove viene convertito per produrre alanina che ritorna al fegato. Nel fegato l'alanina viene in parte convertita in urea ed in altra parte ritorna al fegato sotto forma di piruvato. Quando c'è carenza di proteine sono utilizzate quelle dei muscoli con effetto di diminuirne la massa. L'aumento di un surplus di proteine con un alto contenuto di aminoacidi ramificati 20 essenziali, può comportare l'aumento delle proteine contrattili muscolari e un miglior recupero fisico in fase di inattività. In queste condizioni l'integrazione proteica può essere utile, se opportunamente bilanciata, anche in sportivi amatoriali. Il bilanciamento può essere favorito ma non sostituito dagli integratori alimentari anche quando questi rivendicano di essere completi, sicuramente quelli monocomposti, incluso gli integratori proteici, necessitano di essere razionati.



I prodotti per gli anziani suscitano grande interesse poiché i processi di sintesi proteica e le richieste energetiche sono state recentemente associate all'invecchiamento. Nell'anziano ci sono problemi legati alle diminuite capacità di assorbimento, alla malnutrizione e a fattori sociali che possono influenzarne la qualità della vita dell'anziano. Indubbiamente con il progredire dell'invecchiamento si ha una riduzione dell'esigenze caloriche giornaliere ma si ha anche una progressiva diminuzione della massa magra, soprattutto muscolare, con un ritmo di circa 0,6% / anno (2).

Tra i vari fabbisogni quello proteico non cambia in modo fondamentale con il passare dell'età ma l'apporto in proteine può variare in base a stati fisiopatologici più che all'età. In realtà con l'età si riduce l'utilizzazione dell'azoto tissutale e diminuiscono alcune albumine con il conseguente accumulo plasmatico di sostanze tossiche di origine proteica. Nell'anziano l'apporto medio proteico dovrebbe coprire il 12-15% dell'apporto calorico totale. Le osservazioni LARN stabiliscono che è necessario un apporto proteico pari ad almeno 0,6g/ kg di peso corporeo/ die che può essere aumentato fino a 1,5g/ kg di peso corporeo/ die. Da queste analisi emerge la necessità di assicurare a sportivi e anziani una dieta ricca di proteine ad elevato contenuto di aminoacidi essenziali. Le proteine vengono trasformate in aminoacidi e si è osservato che proteine differenti forniscono aminoacidi in tempi diversi (3).

Le proteine dal siero di latte costituiscono un valido aiuto nutrizionale ma non si poteva evincere dallo stato dell'arte quello che è il contenuto della presente invenzione: le proteine del latte associate a L-carnitina, argina alfa-chetoglutarato e L-carnosina hanno contemporaneamente un effetto specifico sulla trascrizione dei geni codificanti per la proteina MyoD (fattore di trascrizione miogenico) e sulla proliferazione degli osteoblasti.

Ci sono molti usi brevettati di formulazioni contenenti WP che hanno varie applicazioni nel campo della muscolatura e del controllo del peso corporeo. Per esempio il brevetto US2012178673(A1) rivendica le proprietà di una composizione a base di WP idrolizzate in modo particolare e che

hanno l'effetto di sopprimere l'accumulazione di grassi. Il brevetto NZ585619 (A) rivendica le proprietà sui neonati di una composizione a base di WP e di altre sostanze (lipidi e carboidrati).

Il brevetto WO2012081982 (A2) rivendica le proprietà di preparati a base di proteine globulari che sono utili per stimolare la sintesi proteica nei mammiferi ma indica una particolare funzione
5 come quella di aumentare la trascrizione dei geni codificanti per MyoD.

Il brevetto US2012141445 (A1) rivendica le proprietà di un preparato comprendente WP, BCAA liberi e probiotici per stimolare la forza muscolare negli anziani ma non si trattano le ossa.

Il brevetto NZ572802(A) rivendica le proprietà di un idrolizzato enzimatico di WP che ha le proprietà di aumentare il recupero dei muscoli danneggiati ma non si citano gli osteoblasti.

10 Il brevetto WO2012055371(A1) rivendica le proprietà di una bevanda a base di WP, elettroliti e frammenti idrolitici che combattono il senso di fatica e l'ipossia.

Il brevetto US2012082760(A1) rivendica le proprietà della caseina enzimaticamente idrolizzata, per controllare l'enzima mTOR e quindi il controllo del peso corporeo.

15 Il brevetto AU2009332369(A1) rivendica una composizione di un preparato a base di WP idrolizzate che è in grado di aumentare i muscoli ma non si fa riferimento alle ossa.

Nessuno dei presenti brevetti è una combinazione di WP in grado di agire sia sulla proliferazione cellulare degli osteoblasti e promuovere la sintesi del fattore di controllo MyoD. La presente composizione è inventiva e innovativa, combina le WP in una composizione che ha usi fin qui mai descritti proponendo un intervallo di dosaggio efficace e mostra invece che un sovradosaggio di
20 proteine o un'assunzione di una quantità arbitraria porterebbero inibire la crescita cellulare.

La presente invenzione permette di regolare positivamente la miogenesi e la proliferazione di osteoblasti attraverso una somministrazione predosata.

Esempio 1. La composizione e la proliferazione cellulare degli osteoblasti.

25 Le proteine di siero di latte (Whey Protein o WP) sono molto utilizzate per l'integrazione proteica in quanto sono caratterizzate da un elevato valore nutrizionale come mostrato in TAB1 (2, 4).

TAB1: contenuto medio whey proteins

sorgente	Proteine (g)	alcuni aminoacidi essenziali				BCAA %
		Leucina (g)	Lisina (g)	Isoleucina (g)	Leucina %	
WP	24,00	2,53	2,23	1,57	10,54	26,38

Assumendo che una persona ha un peso corporeo medio di 70 kg è stato eseguito uno screening di varie molecole per scegliere quelle interessanti e la dose ottimale d'uso. In accordo con l'idea di ottenere una formulazione dosabile e attiva per quei soggetti che hanno necessità di assumere proteine perché sottoposte ad un intenso sforzo muscolare oppure perché si trovano in uno stato in cui muscoli e ossa sono debilitati. Le proteine hanno sicuramente un ruolo importante e hanno un effetto proliferativo su alcune cellule ma ci sono differenze nel modo in cui le varie proteine vengono idrolizzate e quindi assorbite. C'è differenza tra proteine WP e caseina: a parità di concentrazione è stato evidenziato che esse hanno un differente effetto sul bilancio netto tra sintesi delle proteine nei muscoli (MPS) e digestione delle proteine nei muscoli (MPB). La caseina è considerata una proteina "slow" nel senso che l'assorbimento degli aminoacidi è molto lento rispetto alle WP che sono considerate "fast" (6). Le WP possono stimolare un rapido assorbimento degli aminoacidi, allora è importante avere la possibilità di prendere piccole dosi a intervalli di 1-2 ore a seconda del tipo di dieta che si segue e del risultato che si intende raggiungere. Nella composizione preferita sono state usate le proteine di siero di latte isolate (WPI) che sono quelle a più alto contenuto in proteine (in media circa il 86,6%) come mostrato nella tabella 2 e nella tabella 3.

TAB2: contenuto medio di aminoacidi essenziali ramificati

sorgente	Proteine (g)	alcuni aminoacidi essenziali <i>valore medio</i>				BCAA %
		Leucina (g)	Lisina (g)	Isoleucina (g)	Leucina %	
WP	24,00	2,53	2,23	1,57	10,54	26,38

Le WP non hanno un valore calorico diverso da altre proteine (4kcal/g) ma le WPI hanno più elevato valore nutrizionale tra le proteine e solo il 98% del peso è Furosina che può avere effetti

avversi, nella tabella 3 si vede il confronto del contenuto di Furosina tra alcune proteine WP e caseina (7).

TAB3: confronto del contenuto di Furosina tra varie sorgenti proteiche

Sorgente di Proteine	Contenuto medio in proteine (g/100g di prodotto)	Contenuto medio in Furosina (mg/100g) di proteine
WPC	13,4	588,4
WPI	86,6	97,8
caseine	82,7	29,1

5 Nella presente composizione le proteine sono state miscelate con arginina alfa-chetoglutarato, L-carnitina ed L-carnosina. L'arginina è un aminoacido semi-essenziale, interviene nel metabolismo dell'urea ed ha un effetto fisiologico sulle naturali difese dell'organismo e interviene nella produzione di ossido nitrico (8). L'arginina alfa-chetoglutarato è una forma di arginina che interviene nell'anabolismo come prodotto del ciclo di krebs. Fornire questa forma di arginina può
10 risultare utile in uno stato in cui il ciclo dell'acido citrico è rallentato in una fase immediata di recupero muscolare ma non sembra aumentare la resistenza muscolare. Tuttavia l'arginina alfa-chetoglutarato partecipa attraverso i suoi derivati metabolici alla crescita degli osteoblasti delle ossa su cui sono legati i muscoli scheletrici (9). Non ci sono particolari limiti all'uso di questa sostanza se non in quelli generali per gli aminoacidi.

15 La L-Carnitina negli integratori si può somministrare fino a 1000 mg / kg di peso corporeo/die poiché è coinvolta nel trasporto degli acidi grassi all'interno del mitocondrio dove ha un effetto fisiologico sul metabolismo dei grassi. La carnitina è stata mostrata avere un ruolo protettivo contro la eccessiva produzione di ammonio dovuto a sforzo fisico (10).

La L-Carnosina può essere usata sino a 500 mg/ kg di peso corporeo/die è un dipeptide con vari
20 effetti fisiologici tra cui quello di antiossidante in quanto l'istidina presente è in grado di strappare un elettrone a radicali dell'ossigeno e in questo senso ha anche un effetto tampone rispetto all'aumento di ioni H⁺ all'interno del muscolo e comunque essendo piuttosto abbondante nel

muscolo e nel cervello ha un importante effetto sul trofismo muscolare. La carnosina è stata indicata come fattore importante per la sua attività biologica sull'enzima mTOR che interviene nei processi di invecchiamento.

In una tipica realizzazione della presente composizione si sono scelti 4 elementi e si è fissato il totale del formulato a 1000 mg. I 4 elementi devono avere un'azione benefica sui muscoli e sulle ossa su cui sono attaccati i muscoli scheletrici. Con 4 elementi che si possono combinare tra loro fino a 1000 mg ci sono miliardi di possibili combinazioni, l'idea è quella di utilizzare un sistema per trovare quella miscela che cambia le sue proprietà al crescere del dosaggio e può servire ad uno sportivo o ad un anziano con problemi di recupero dell'apparato muscolo-scheletrico (5).

In un prodotto miscelato ad altre sostanze il contenuto medio di ciascuna sostanza si diluisce nelle altre, il contenuto di sostanza di partenza è allora importante; per questo nella realizzazione della presente composizione sono state scelte WP isolate ad elevata concentrazione. Durante il processo di purificazione delle proteine si sviluppa una reazione di Maillard (MR) per effetto dell'aumento della temperatura. Questa reazione si verifica tra gli ammino gruppi liberi della lisina e/o altri aminoacidi e i gruppi carbonilici degli zuccheri riducenti come glucosio e maltosio. La lisina è l'aminoacido più reattivo durante l'MR ed è molto importante nei cibi in cui diventa carente per effetto della sua reattività. La quantità di Furosina (ε-N-(furoylmethyl)-L-Lysina) che si forma durante l'idrolisi acida di Amadori della fructosyllysina e lactusyllysina. Quanto maggiore è la quantità di furosina tanta più degradata sarà la proteina. Da questo punto di vista la Caseina sarebbe più indicata tuttavia ci sono altri effetti metabolici che fanno propendere per l'uso delle WPI.

Negli studi eseguiti si è variato il rapporto tra le varie proteine nella concentrazione mostrando che è possibile ottenere dei risultati utili agendo nei seguenti intervalli: proteine concentrate dal siero di latte tra il 75 % e il 78%; arginina alfa-chetoglutarato tra il 7% e il 10%; L-carnitina e o suoi derivati tra il 10% e il 15%; L-carnosina tra il 3% e il 5%.

Nella presente composizione si è partiti da un dosaggio base con dosi definite e usate a varie concentrazioni per valutare l'effetto sulla proliferazione cellulare. Le cellule usate sono osteoblasti umani SAOS-2, queste cellule non sono trasformate e sono un buon modello di osteoblasti (11) e per alcuni aspetti di fibroblasti (12). Nella figura 1 si vede l'effetto di vari dosaggi della miscela scelta sulla proliferazione di osteoblasti. Tra questi dosaggi la composizione preferita è quella in cui c'è un aumento della proliferazione cellulare degli osteoblasti, che in una situazione di elevata attività osteoclastica oppure di osteopenia è particolarmente utile. Si noti che un dosaggio eccessivo della miscela è controproducente. (FIGURA 1)

Lo studio della proliferazione cellulare è stato fatto usando il metodo di esclusione del Trypan Blue. Le cellule vengono seminate e lasciate crescere per 3 giorni, poi viene aggiunta la miscela da analizzare e dopo 24 h si procede al conteggio delle cellule vive. Per il conteggio delle cellule sono usati 20 µl di Trypan blue 0,1% e 20 µl di sospensione cellulare. Al microscopio ottico vengono contate le cellule presenti nei 5 quadrati di ognuna di due camere dell'emocitometro, separando le vive (traslucide) dalle morte (blu) e facendo una media dei conteggi. Il numero medio di cellule per millilitro di soluzione è calcolato per mezzo della formula:

$$\text{Cellule per ml} = \text{conteggio medio per quadrato} \times \text{fattore di diluizione} \times 10^4$$

La vitalità delle cellule viene calcolata come:

$$\% \text{ di vitalità} = (\text{numero di cellule vive} / \text{numero totale di cellule}) \times 100$$

Questi esperimenti mostrano come tutti gli ingredienti usati nella miscela siano essenziali per la proliferazione degli osteoblasti. Inoltre giustificano la somministrazione di più boli ad intervalli distanti 1-2 ore che abbassano la tossicità e supportano l'anabolismo delle cellule.

Esempio 2. Effetto della composizione sulla trascrizione genica.

Carboidrati, lipidi e proteine sono i maggiori componenti del cibo e vengono ingeriti attraverso l'alimentazione. In tutte le diete è fondamentale l'introduzione di aminoacidi essenziali, vitamine e sostanze prodotte dall'uomo in quantità subottimale. In una dieta il bilancio tra carboidrati e

proteine è fondamentale per il bilancio tra catabolismo e anabolismo. Lo squilibrio della dieta può determinare un cambiamento metabolico il cui effetto può essere dimagrante oppure opposto (2). In alcuni stati fisiologici come quelli di uno sportivo durante un'intensa attività oppure quelli di un anziano si possono manifestare sbilanciamenti metabolici che si manifestano con un consumo di grassi ma anche con un consumo anomalo della massa magra corporea. Molti sportivi o anche anziani possono avere una riduzione della massa muscolare con un'effetto negativo sull'intero stato fisiologico per cui è necessario integrare opportunamente la dieta al fine di regolare il catabolismo cellulare. Una diminuzione di massa muscolare ha effetti negativi anche sul sistema cardiovascolare che può risultare affaticato e si può trovare in uno stato anaerobico con lo sviluppo di radicali liberi (13). Un altro effetto negativo particolarmente evidente negli anziani è associato al peggioramento dell'osteopenia e sarcopenia (14). L'esercizio e il movimento dei muscoli scheletrici sollecitano l'attività degli osteoblasti ma la diminuzione della massa muscolare incide negativamente sull'omeostasi della matrice extracellulare degli osteoblasti (cioè l'osso). Per questo non solo è importante lo sviluppo anabolico della massa muscolare ma è utile l'attivazione degli osteoblasti già ottenuta con una composizione come quella dell'esempio 1.

Stabilito un dosaggio stimolante per gli osteoblasti abbiamo ottenuto una composizione in cui tra i vari elementi studiati si è valutato l'effetto nutrigenomico della miscela alla concentrazione fissata. Per gli studi sono state utilizzate tecniche di analisi in amplificazione a catena in tempo reale (PCR-real time) utilizzando lo strumento 7300 Applied Biosystems. Per gli scopi sono state trattate cellule umane di osteoblasti SAOS-2; le cellule sono state cresciute nelle condizioni generali come descritto fino all'80% di confluenza, dopo di che sono state trattate per 24 ore con la miscela scelta ma usata alle concentrazioni di 6.5mg, 13mg e 19.5mg. E' stato scelto di valutare l'effetto sulla modulazione della trascrizione di tre differenti geni coinvolti in importanti meccanismi cellulari: IL1 β che ha un ruolo di primaria importanza nei processi infiammatori, iNOS che è l'enzima metabolicamente inducibile e coinvolto nella produzione dell'Ossido Nitrico (NO) e

IGF-I che è un fattore coinvolto nel metabolismo glucidico associato a forme di diabete e obesità. I livelli di espressione dei geni codificanti per IL1 β , iNOS e IGF-I sono stati analizzati mediante Real Time PCR per valutare una possibile modulazione. Da ciascuna campione coltivato è stato estratto l'RNA messaggero totale in accordo al metodo descritto altrove (15). Ciascun RNA messaggero, per i geni scelti, è stato analizzato utilizzando la RT-PCR e i risultati sono stati analizzati nel seguente modo: le cellule non trattate (CTL) sono usate per calibrare i risultati, la variazione del trascritto nelle CTL è assunto come valore 1.0. I valori del gene target Ct sono stati normalizzati rispetto al valore del gene codificante per la GAPDH. I dati nelle cellule trattate sono stati usando il metodo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ed espressi come la variazione rispetto al CTL secondo le seguenti espressioni:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct2 - \Delta Ct1$$

dove

$$\Delta Ct 1 = Ct_{gene\ controllo} - Ct(GAPDH)_{controllo};$$

$$\Delta Ct 2 = Ct_{gene\ trattato} - Ct(GAPDH)_{trattato}$$

I risultati sono mostrati nella figura 2. (FIGURA 2)

Per quanto riguarda IL1 β e IGF-I la miscela non ha indotto modulazione nell'espressione genica a nessuna delle concentrazioni utilizzate. In altre parole l'espressione genica dei campioni trattati era confrontabile con quella dei campioni di controllo (cellule non trattate). Per quanto riguarda iNOS, la miscela alla concentrazione più alta ha indotto un aumento leggermente significativo dei livelli di espressione di questo gene, in quanto la sua espressione era raddoppiata rispetto a quella del campione non trattato. Ciò conferma che aumentando le dosi di prodotto si possono ottenere azioni fisiologiche differenti.

Esempio 3: MyoD_Ossa è la composizione preferita.

Le WP sono molto utilizzate in vari tipi di dieta, come quella per gli atleti, al fine di favorire la formazione di massa magra muscolare o come dimagrante in associazione ad altre sostanze ma non è descritto un uso per le ossa che supportano i muscoli scheletrici. La miscela nella forma

preferita, indicata come MyoD_Ossa, è prodotta in capsule di gelatina predosate anche analizzando l'effetto con aggiunta di vitamine e micronutrienti. I risultati in figura 3A mostrano che la composizione preferita MyoD_Ossa induce un aumento della proliferazione degli osteoblasti. (FIGURA 3A)

5 In particolare il fattore miogenico 1 è stato analizzato mediante due oligonucleotidi disegnati al 5' e al 3' del DNA che codifica per il fattore miogenico 1 (MyoD Accession Number NM_002478 miogenic differentiation 1), rispettivamente identificati come:

MyoD1 FORWARD : 5' CCGCCTGAGCAAAGTAAATGAG 3'

MyoD1 REVERSE : 5' GCAACCGCTGGTTTGGATT 3'

10 Questi oligo nel tipo di esperimento, noto ad un esperto in arte della materia, non discriminano tra gli alleli MyoD. I risultati in figura 3B mostrano l'effetto sui principali geni analizzati e come si vede solo l'RNA messaggero corrispondente al gene MyoD viene significativamente aumentato.

CONCLUSIONI DEGLI STUDI

Si può dunque concludere che la composizione scelta nella sua realizzazione preferita corrisponde a quella che nella presente invenzione è il MyoD_Ossa. Questa composizione comprende una miscela a 6,5 mg per dose ed è possibile assumere fino a 10 dosi al giorno. Questa composizione ha un effetto proliferativo sugli osteoblasti e sulla trascrizione del regolatore dei mioblasti MyoD per cui può essere utile strumento per una dieta in cui ci sia sintesi di proteine e può essere utile anche nei casi di sarcopenia (16). Allora il soggetto può assumere più boli ad un dosaggio di aminoacidi con una percezione psicologica della quantità assunta che ne migliora il controllo quantitativo riducendo eventuali effetti collaterali.

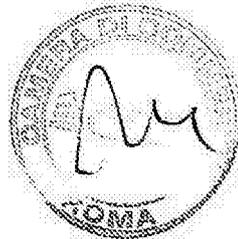
BIBLIOGRAFIA

- 1) F.Evangelisti, P. Restani. Prodotti dietetici , II ed., Piccin.
- 2) R.E. C. Wildman, Handbook of nutraceuticals and functional foods, II ed, CRC Press, 392-421.

- 3) G. I. Smith, B. W. Patterson, and B. Mittendorfer. Human muscle protein turnover—why is it so variable? *J Appl Physiol*, 110 (2011): 480–491.
- 4) C. S. Katsanos, D. L. Chinkes, D. Paddon-Jones, X.-j. Zhang, A. Aarsland, R. R. Wolfe. Whey protein ingestion in elderly persons results in greater muscle protein accrual than ingestion of its constituent essential amino acid content. *Nutr. Res.*, 28 (2008), 651–658.
- 5) S. M. Phillips, J. W. Hartman, and S. B. Wilkinson. Dietary Protein to Support Anabolism with Resistance Exercise in Young Men. *Jour. Amer. Coll. Nutr.*, 24 (2005), No. 2, 134S–139S.
- 6) Gregory L. Paul. The Rationale for Consuming Protein Blends in Sports Nutrition. *Jour. Am. Coll. Nutr.*, 28 (2009), 464S–472S.
- 10) J.A. Rufian-Henares, C. Delgado-Andrade, S. Jimenez-Perez, F. J. Morales. Assessing nutritional quality of milk-based sport supplements as determined by furosine. *Food Chemistry* 101 (2007) 573–578.
- 8) T. S. Alvares, C. A. Conte-Junior, J. T. Silva, V. M. Flosi Paschoalin. Acute L-Arginine supplementation does not increase nitric oxide production in healthy subjects. *Nutrition & Metabolism* (2012), 9:54.
- 15) Walrand S.. Ornithine alpha-ketoglutarate: could it be a new therapeutic option for sarcopenia? *J Nutr Health Aging*. 14 (2010), 570-577.
- 10) D. J. Wilkinson, N. J. Smeeton, P. W. Watt. Ammonia metabolism, the brain and fatigue; revisiting the link. *Progress in Neurobiology* 91, (2010), 200–219.
- 20) Rodan SB, Imai Y, Thiede MA, Wesolowski G, Thompson D, Bar-Shavit Z, Shull S, Mann K, Rodan GA. Characterization of a human osteosarcoma cell line (Saos-2) with osteoblastic properties. *Cancer Res*, 47 (1987), 4961–4966.

- 12) R. J. Fernandes, M. A. Harkey, M. Weis, J. W. Askew, and David R. Eyre. The Post-Translational Phenotype of Collagen Synthesized by Saos-2 Osteosarcoma Cells. *Bone*, 40 (2007): 1343–1351.
- 13) Yves Lecarpentier. Physiological role of free radicals in skeletal muscles/ *Appl Physiol* 103 (2007): 1917–1918,
- 5
- 14) Be'ery-Lipperman M, Gefen A. Contribution of muscular weakness to osteoporosis: computational and animal models. *Clin Biomech (Bristol, Avon)*. 2005 Nov;20(9):984-997.
- 15) A. Scotto d'Abusco, C. Cicione, V. Calamia, R. Negri, C. Giordano, B. Grigolo, L. Politi, R. Scandurra. Glucosamine and its N-acetyl-phenylalanine derivative prevent TNF- α -induced transcriptional activation in human chondrocytes. *Clin. Exp. Rheumatol*. 2007; 25: 847-852.
- 10
- 16) M. J. Drummond, J. J. McCarthy, C. S. Fry, K. A. Esser, and B. B. Rasmussen. Aging differentially affects human skeletal muscle microRNA expression at rest and after an anabolic stimulus of resistance exercise and essential amino acids. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 295(6), 2008, E1333–E1340.
- 15

Severo Anundi



20

25

RIVENDICAZIONI

RNR 1537

1) Una composizione farmaceutica, nutraceutica, dietetica e nutrizionale, alimentare che contemporaneamente aumenta la proliferazione degli osteoblasti e la trascrizione dei geni regolatori dei mioblasti, appartenenti alla famiglia che codifica per i fattori di trascrizione MyoD, contenente:

proteine del siero di latte, arginina alfa-chetoglutarato, L-carnitina o suoi derivati e L-carnosina.

2) Una composizione secondo la rivendicazione 1) che aumenta la trascrizione degli RNA messaggeri aventi sequenze nucleotidiche, rispettivamente al 5'-ter e 3'-ter; omologhe alle corrispondenti nel gene umano codificante per fattore di differenziazione miogenica 1.

3) Una composizione secondo le rivendicazioni 1) e 2) contenente:

tra il 73% e il 78% (P/V) di proteine del siero di latte; tra il 10 % e 15% (P/V) di L-arginina alfa-chetoglutarato; tra il 7 % e 12% (P/V) di L-carnitina o suoi derivati; tra 3% e 8 % (P/V) L-carnosina.

4) Una composizione secondo le rivendicazioni 1), 2) e 3) dove le proteine dal siero di latte "whey protein" possono essere una tra isolate, purificate, micronizzate, proteine arricchite in aminoacidi ramificati, e contenenti altre sostanze come vitamine, macro e micronutrienti, additivi alimentari, aromatizzanti, stabilizzanti, veicolanti.

5) Una composizione secondo le rivendicazioni 1, 2, 3 e 4 predosate in forma di capsule, compresse, tavolette, liquidi, gel.

6) Una composizione secondo una o più delle rivendicazioni precedenti per il trattamento di soggetti che hanno necessità simultanea di assimilare proteine, regolare la miogenesi e aumentare il numero di osteoblasti.

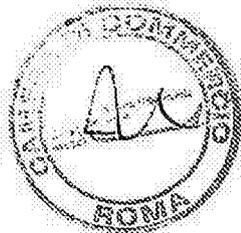


Scigno Rinaldi

CLAIMS

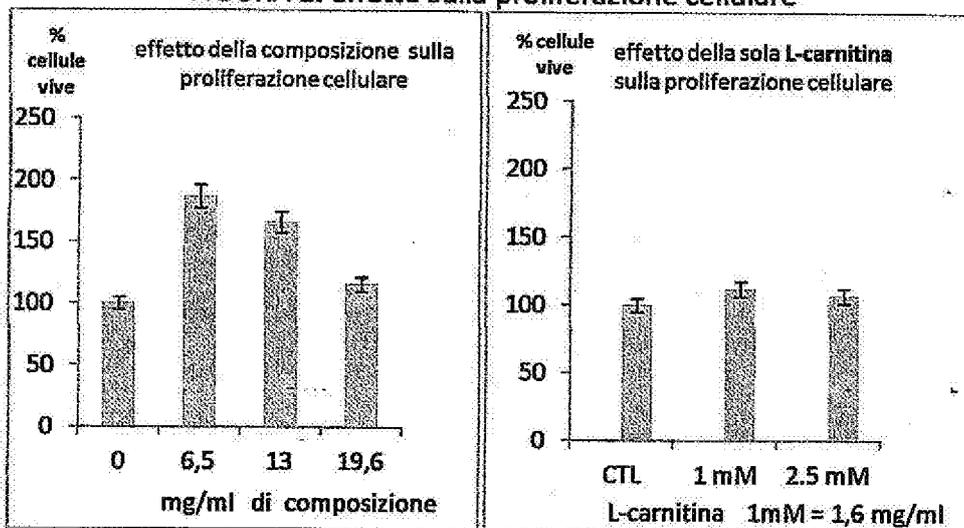
AMR 1537

- 1) A chemical composition as pharmaceutical, nutraceutical, dietary and nutritional, food supplement having the property to increase the transcription of the gene coding for the MyoD protein and at the same time promotes osteoblast proliferation, including: whey proteins, alfa-ketoglutarate arginine, L-carnitine and its derivatives, and L-carnosine.
- 2) A composition according to claim 1) that increase the transcription of RNA messengers having at the 5'-end and 3'-end of their nucleotidic sequence homologies with the corresponding in the human gene coding for the myoblast differentiation factor 1, respectively.
- 3) A composition according to claims 1) and 2) including: 73% - 75% (W/V) whey proteins; 10% - 15% (W/V) alfa-ketoglurate L-arginine; 7% - 12% L-carnitine or its derivatives; 3% - 8% (W/V) L-carnosine.
- 4) A composition according to claims 1), 2), 3) and 4) where whey proteins can be among isolated, purified, micronized, enriched of branched aminoacids and including vitamins, macro and micronutrients, food additives, flavours, stabilizers, carriers.
- 5) A composition according to claims 1), 2), 3) and 4) pre-dosed in the form of capsules, compresses, tablets, liquids, gels.
- 6) A composition according one or more of the previous claims to treat person whose need to assimilate proteins, to regulate myogenesis and to increase osteoblasts.



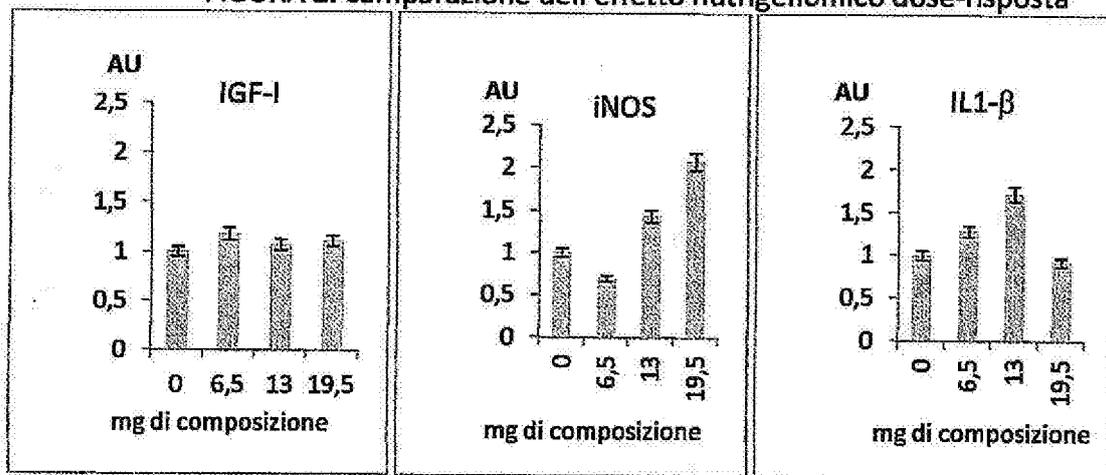
Luigi Amadio

FIGURA 1: effetto sulla proliferazione cellulare



Nell'istogramma le colonne rappresentano la percentuale di crescita rispetto al controllo che ha il valore 100%

FIGURA 2: comparazione dell'effetto nutrigenomico dose-risposta



Signature

5

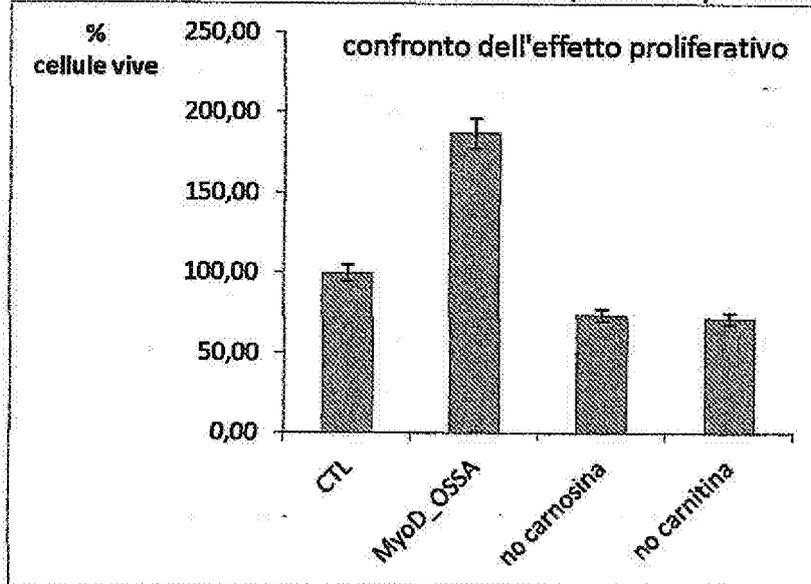
10

15

20

25

FIGURA 3A: effetto proliferativo della composizione preferita

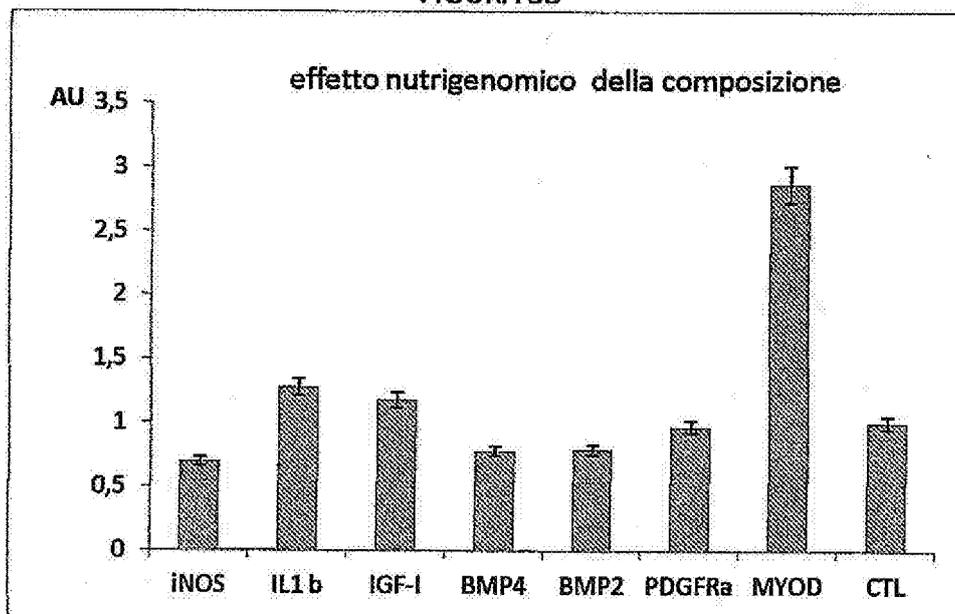


Nell'istogramma MyOD_OSSA è il nome della formulazione in capsule preferita e la sua attività sulla proliferazione degli ostoblasti è confrontata con quella di formulazioni prive di carnosina (no carnosina) e prive di carnitina (no carnitina).

5

10

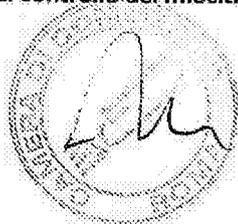
FIGURA 3B



Nell'istogramma le colonne rappresentano in AU la variazione quantitativa della trascrizione di vari geni: (iNOS= indicibile ossido nitrico sintasi; IL1b= interleuchina-1 beta; IGF-I= fattore di crescita insulina simile; BMP= fattore morfogenetico delle ossa; PDGFRa= recettore alfa del fattore di crescita delle piastrine; MyoD= fattore di controllo dei miociti; CTL= controllo)

15

20



Signature