



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102009901699028
Data Deposito	30/01/2009
Data Pubblicazione	30/07/2010

Classifiche IPC

Titolo

NUOVO USO DI UNA COMBINAZIONE DI RESVERATROLO O SUO USO ANALOGO E LA CISTEINA O SUO DERIVATO

DESCRIZIONE

Annessa a domanda di brevetto d'INVENZIONE INDUSTRIALE avente per titolo:

NUOVO USO DI UNA COMBINAZIONE DI RESVERATROLO O SUO ANALOGO

5 E CISTEINA O SUO DERIVATO

A nome: Vitrupharma Srl, Milano, Italia

Inventori designati: Silvia Finzi; Carlo Ghisalberti

Depositato il: 30-01-2009

MI 2009 A 000110

10 CAMPO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione riferisce del nuovo uso di una composizione nutraceutica comprendente come ingredienti attivi, resveratrolo o suo analogo, e la cisteina o suo derivato.

Più specificamente, l'invenzione si riferisce all'uso di detto nutraceutico per il trattamento e la prevenzione di un disordine ialuronidasi-dipendente quali la senescenza cutanea e l'artrite

15 articolare, in particolare in mammiferi comprendenti l'uomo.

Il termine "nutraceutico" come ivi utilizzato denota un'utilità applicativa sia in campo nutrizionale che farmaceutico. Pertanto, le nuove composizioni nutraceutiche possono trovare uso come integratori in cibi e bevande, integratori dietetici e formulazioni farmaceutiche per applicazione enterale e parenterale in formulazioni solide come capsule e compresse, o in

20 formulazioni liquide come sospensioni e sospensioni. E' inoltre evidente da quanto citato poco sopra che il termine composizione nutraceutica comprende inoltre cibi e bevande contenenti gli ingredienti attivi sopra menzionati.

STATO DELL'ARTE

L'acido ialuronico ("IA") si ritrova in gran parte degli organi dei vertebrati, ma è più abbondante nella matrice extracellulare dei tessuti connettivi molli, ad esempio nella pelle umana dove costituisce un'elevata frazione della matrice viscoelastica del derma

5 In condizioni fisiologiche normali, l'IA è inoltre uno dei principali componenti dei fluidi sinoviali. Il peso molecolare dell'IA nell'osteoartrite o nell'infiammazione articolare declina a causa della presenza di citochine pro-infiammatorie, di radicali liberi e di enzimi litici, con un cambiamento delle proprietà viscoelastiche dei fluidi sinoviali, con conseguente disfunzione articolare.

10 Le capacità di ritenzione dell'IA è particolarmente evidente nella cute, in quanto contribuisce alla netta differenza tra una complessione (idratata) giovane e una pelle (secca) invecchiata.

Il livello di IA può diminuire a causa della iperattività della ialuronidasi ("IASi"). L'enzima ialuronidasi depolimerizza l'IA mediante degradazione del polimero originale in oligomeri di acido D-glucuronico e N-acetil-D-glucosamina.

15 Gli inibitori di ialuronidasi possono quindi giocare un ruolo utile nel preservare funzione e struttura dell'IA nei tessuti connettivi, e quindi prevenire o trattarne i disordini collegati.

Una recente rassegna sugli inibitori di ialuronidasi di Botzki, A. "Structure-based design of inibitori di ialuronidasi", Dissertation 2004, Università di Regensburg, evidenziano la presenza di strutture differenziate (ad es. ascorbil palmitato) nell'inibizione della ialuronidasi.

20 I primi inibitori di ialuronidasi sono stati identificati tra i metalli pesanti (Fe, Cu, Zn) ed i flavonoidi vegetali (Meyer; J Biol Chem, 1951, 188, 485-490; Houck J, C. Arch Biochem, 1957, 71, 336-341).

Studi successivi hanno confermato l'azione inibitoria della ialuronidasi dei flavonoidi e, più in generale, dei polifenoli vegetali, ad es. apigenina e campferolo (Kakegawa H; Planta Med 1988, 54, 385-389); le saponine e sapogenine da *Hedera helix* (Carini M; Arch Pharm,

1995, 328, 720-724); i fenoli da *Areca catechu* (Lee KK, Int J Cosm Science, 2001, 23(6), 341-346); i polifenoli da sorgo (Bralley E, J Med Food, 2008, 11(2): 307-312), ecc.

Il resveratrolo (3,5,4'-triidrossistilbene) è una fitoalexina polifenolica prodotta dall'enzima stilbene sintasi. E' nota per le proprietà anti-infiammatorie, immunomodulatorie, chemopreventive, neuro- e cardioprotettive.

Ci sono alcuni indizi che il resveratrolo possa essere un inibitore di ialuronidasi, ma ad oggi non si aveva alcuna conferma diretta. Infatti, può essere tra le sostanze contribuenti a tale attività dell'estratto di semi e foglie di *Vitis rotundifolia* seeds (Bralley E. e coll.; J Pharm Biol, 2007, 45, 9, 667-673). La *V. rotundifolia* contiene resveratrolo nella sue varie forme (cis e trans 3,5,4'-triidrossistilbene, e suoi glicosidi) insieme con un certo numero di antocianine, proantocianidine e catechine.

La combinazione di resveratrolo e cisteina o suo derivato appare in alcuni brevetti, ad es. U.S. Pat. No. 6,964,969 di McCleary descrive una composizione nutrizionale per normalizzare le funzioni neurologiche danneggiate o deteriorate che, tra l'altro, contiene antiossidanti scelti tra: idebenone, co-enzima Q10, vitamina E, vitamina C, carnosina, tocotrienoli, flavonoidi, vinpocetina, Se, licopene, creatine, l-arginina, taurina e l-cisteina, NADH, resveratrolo, ginkgo biloba, oligomeric proantocianidine e altri antiossidanti fenolici.

Il sopra menzionato brevetto pertanto cita resveratrolo e cistina in liste di ingredienti ausiliari di un ampio ed eterogeneo gruppo di antiossidanti, utili come rinforzo ancillare e secondario della rivendicazione principale. Non si trovano specifiche combinazioni tra resveratrolo e la cisteina o suo derivato, ne si indica dosaggio e neppure l'uso nell'inibire un eccesso di attività ialuronidasica.

Da notare che mentre l'attività di inibizione della ialuronidasi del resveratrolo è uno strumento potenzialmente importante per la protezione della cute e di altri tessuti connettivi (es. giunture) dalla degradazione dell'IA, la scarsa biodisponibilità sistemica nell'uomo del

resveratrolo (Walle T, e coll. Drug Metab Dispos. 2004;32(12):1377-82) richiede un qualche meccanismo che renda effettiva tale azione nelle condizioni *in vivo* reali.

SOMMARIO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione è basata sul fatto che la combinazione di resveratrolo o suo analogo
5 e cisteina o suo derivato è efficace nell'inibizione dell'attività della ialuronidasi.

Di conseguenza, la presente invenzione fornisce una composizione adeguata all'uso
medicinale comprendente resveratrolo o suo analogo e la cisteina o suo derivato.

La composizione può prendere forma ed esercitare l'azione di un integratore dietetico o di
una vera e proprio farmaco, in funzione dal ruolo di supporto o di azione preventiva, o
10 dall'attività strettamente terapeutica che si intende affidare alla composizione in relazione al
trattamento e/o alla prevenzione dei disordini ialuronidase-dipendenti.

In un aspetto, la composizione dell'invenzione può essere somministrata ad un soggetto il
cui disordine ialuronidasi-dipendente è la senescenza cutanea.

In un altro aspetto, la composizione dell'invenzione può essere somministrata ad un
15 soggetto il cui disordine ialuronidasi-dipendente è l'artrite articolare.

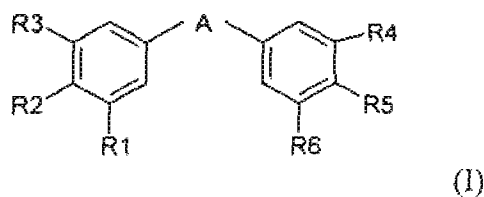
DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Si è sorprendentemente trovato che una composizione contenente una combinazione con le
seguenti componenti caratteristiche: resveratrolo o suo analogo, e la cisteina o suo derivato, o
un loro sale farmacologicamente accettabile, è estremamente efficace della prevenzione e/o
20 nel trattamento terapeutico dei disordini causati dalla iperattività della ialuronidasi, quale
risultato del potente effetto sinergico esercitato dai suoi componenti.

Pertanto, la presente invenzione rivela l'uso del resveratrolo o suo analogo, e la cisteina o
suo derivato, o un loro sale farmacologicamente accettabile, per preparare un prodotto
farmaceutico nel quale i due componenti sono mescolati insieme o confezionati separatamente
25 per la prevenzione e il trattamento di forme collegate a disordini della ialuronidasi.

I due ingredienti possono essere mescolati insieme o confezionati separatamente per "l'uso coordinato" di detti ingredienti.

Il termine "resveratrolo, o suo analogo" come utilizzato in questo contesto comprende composti descritti dalla formula (I):



dove:

A denota un legame carbonio-carbonio singolo o doppio tipo trans; e R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 e R^6 indipendentemente denotano idrogeno, o gruppi idrossi, o idrossietere o idrossi estere.

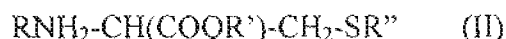
I gruppi idrossi eterificati o esterificati possono derivare da catene alchiliche non-sostituite o sostituite, lineari o ramificate di da 1 a 26 atomi di carbonio; o da acidi carbossilici alifatici, arilalifatici o aromatici non-sostituiti o sostituiti, lineari o ramificati aventi da 1 a 26 atomi di carbonio. I gruppi idrossi eterificati possono inoltre essere un gruppo glicoside e i gruppi esterificati possono inoltre essere un gruppo glucuronide o sulfato.

Esempi di composti di formula I dove A è $-\text{CH}=\text{CH}-$ sono il resveratrolo ($R^1 = R^3 = R^5 = \text{H}$; $R^2 = R^4 = R^6 = \text{OH}$); il piceatannolo ($R^3 = R^5 = \text{H}$; $R^1 = R^2 = R^4 = R^6 = \text{OH}$), e la rapontigenina ($R^5 = \text{H}$; $R^1 = R^3 = R^4 = R^6 = \text{OH}$; $R^2 = \text{OMe}$).

Esempi di composti di formula I dove A è $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ sono il diidroresveratrolo ($R^1 = R^3 = R^5 = \text{H}$; $R^2 = R^4 = R^6 = \text{OH}$), diidropiceatannolo ($R^3 = R^5 = \text{H}$; $R^1 = R^2 = R^4 = R^6 = \text{OH}$) e la tristrian ($R^3 = R^5 = \text{H}$; $R^2 = R^4 = R^6 = \text{OH}$; $R^1 = \text{OMe}$).

Il resveratrolo può essere preparato sinteticamente, o può essere estratto da prodotti naturali contenenti resveratrolo, come *Vitis vinifera*, *Vitis rotundifolia*, *Vitis lambrusca* e altre *Vitis* spp. O dalle radici del genus *Polygonum* genus, ad es. *P. cuspidatum* e *P. multiflorum*.

Il termine "cisteina o suo derivato" come utilizzato in questo contesto comprende composti descritti dalla formula (II):



dove:

5 R denota un gruppo acile $\text{C}_2\text{-C}_{22}$, opzionalmente sostituito;

R' denota un gruppo alchile $\text{C}_1\text{-C}_{22}$, opzionalmente sostituito;

R'' denota un gruppo alchile o carbossialchile $\text{C}_2\text{-C}_{22}$, opzionalmente sostituito.

Tra le sostanze di formula (II) sono preferiti la l-cisteina in forma di cloridrato e/o di idrato.

Tra i derivati amidici è preferita la N-acetil-l-cistina (NAC) ($\text{R} = \text{COCH}_3$, R' , $\text{R}'' = \text{H}$).

10 Tra i tiol-derivati è preferita la S-carbossimetil-l-cisteina ($\text{R}'' = \text{CH}_2\text{COOH}$, R , $\text{R}' = \text{H}$).

Tra i derivati è preferita la l-cisteina etil estere cloridrato ($\text{R}' = \text{CH}_2\text{CH}_3$, R , $\text{R}'' = \text{H}$).

Per gli scopi della presente invenzione, il termine sali fisiologicamente accettabili si riferisce a sali medicalmente accettabili che non contrastano con l'attività inibitoria sulla ialuronidasi. Esempi appropriati comprendono sali di addizione con acidi organici o
15 inorganici come acido acetico, acido tartarico, acido lattico, acido maleico, acido fumarico, acido citrico, acido metanesulfonico, acido solforico, acido fosforico, acido nitrico, o acido cloridrico. In aggiunta, uno o entrambi gli idrogeni carbossilici possono essere rimpiazzati da appropriati cationi, ad es. Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , NH_4^+ , o NR_4^+ (dove R è un C_{1-4} alchile).

E' inoltre inteso che cisteina e suoi derivati possono essere nella forma zwitterionica,
20 quando compatibile, ed in tutte le forme idrate così come nelle forme anidre.

La composizione nutraceutica della presente invenzione contiene resveratrolo o suo analogo in quantità sufficiente a fornire ad un uomo adulto (di peso circa 70 kg) un dosaggio da circa 0.5 mg/giorno a circa 3000 mg/giorno, preferibilmente da circa 25 mg/giorno a circa 500 mg/giorno. Pertanto, se la composizione nutraceutica è un cibo o bevanda la quantità di
25 resveratrolo è opportunamente dosata nell'intervallo da circa 1 mg a circa 500 mg per

porzione. Se la composizione nutraceutica è una formulazione medicinale tale formulazione potrà contenere da circa 0.5 mg a circa 1500 mg per unità dosata solida, ad es. per capsule o compresse, o da circa 0.5 mg per dose giornaliera a circa 3000 mg per dose giornaliera di una formulazione liquida.

5 Il rapporto peso-su-peso tra resveratrolo e cisteina o derivati può variare da 100:1 a 1:100.

Preferibilmente la composizione comprenderà trans-resveratrolo e cisteina o derivati in rapporto ponderale da 1:1 a 1:100, preferibilmente da 1:5 a 1:20.

La composizione può essere somministrata con una frequenza di varie volte al giorno fino a una volta ogni due giorni, preferibilmente quotidianamente. Il trattamento dovrebbe essere
10 continuativo. In generale per la somministrazione ad adulti, un dosaggio giornaliero appropriato è nell'intervallo da circa 5 mg a circa 500 mg, sebbene il limite superiore possa essere oltrepassato se/quando necessario. Il dosaggio giornaliero può essere somministrato in una singola dose o in dosi suddivise.

La presente composizione può essere somministrata in qualsiasi forma convenzionale,
15 preferibilmente per via orale, per esempio come compressa, compressa rivestita, pastiglia, losanga, sospensione acquosa o oleosa, soluzione liquida, polvere o granuli disperdibili, emulsioni, capsule molli o dure, o sciroppi o elisir. Le composizioni concepite per l'uso orale possono essere preparate secondo ogni metodo noto nella fabbricazione di composizioni medicinali e tali composizioni possono contenere uno o più agenti scelti nel gruppo
20 comprendente edulcoranti, aromatizzanti, coloranti e conservanti in modo da ottenere preparazioni medicinalmente eleganti e palatabili.

Le compresse contengono i principi attivi in miscela con eccipienti atossici e medicinalmente accettabili appropriati per la fabbricazione di compresse. Questi eccipienti sono ad esempio diluenti inerti, tipo calcio carbonato, sodio carbonato, lattosio, destrosio,
25 saccarosio, cellulosa, amido di mais, fecola di patate, calcio o sodio fosfato; agenti di

granulazione e disintegranti, ad esempio, amido di maisena, acido alginico, alginati o amido glicolato sodico; agenti leganti, ad esempio amido, gelatina o acacia; agenti lubrificanti, ad esempio silice, magnesio o calcio stearato, acido stearico o talco; miscele effervescenti; coloranti, edulcoranti, bagnanti come la lecitina, polisorbati o lauril solfato. Le compresse
5 possono essere non ricoperte o ricoperte con tecniche note per ritardare la disintegrazione e l'assorbimento nel tratto gastrointestinale in modo da fornire un'azione prolungata in un lungo periodo. Per esempio, possono essere impiegati materiali a ritardo quali gliceril monostearato o gliceril distearato. Tali preparazioni possono essere fabbricate con metodi noti, per esempio mediante miscelazione, granulazione, compressazione, ricopertura a
10 zucchero o processi di filmazione.

Formulazioni per uso orale possono essere presentate come capsule di gelatine dura dove l'ingrediente attivo è mescolato con un diluente solido, ad es. calcio carbonato, calcio fosfato o caolino, o come capsule di gelatina molle dove il principio attivo è presente tal quale, o mescolato con acqua o con mezzo oleoso, ad es. olio di arachidi, di oliva o paraffina liquida.

15 Le sospensioni acquose contengono i materiali attivi in miscela con eccipienti appropriati per la fabbricazione di sospensioni acquose. Tali eccipienti sono agenti sospendenti, ad es. sodio carbossimetilcellulosa, metilcellulosa, idrossipropilmetil-cellulosa, sodio alginato, polivinylpirrolidone, gomma tragacanta e gomma acacia; disperdenti o agenti bagnanti possono essere i fosfatidi naturali, ad es. lecitina, o i prodotti di condensazione di un alchilene
20 ossido con un acido grasso, ad es. polioossietilene stearato, o i prodotti di condensazione di un etilene ossido con un alcol alifatico, ad es. eptadecaetileneossietanol, o i prodotti di condensazione di etilene ossido con un estere parziale derivato da acidi grassi e exitolo come il polioossietilene sorbitol monooleato.

Dette sospensioni acquose possono contenere uno o più conservanti, ad es. etil o n-propil p-idrossibenzoato, uno o più coloranti, e/o uno o più agenti edulcoranti quali saccarosio, saccarina, glucosio, sorbitolo e mannitolo.

5 Le sospensioni oleose possono essere formulate sospendendo gli ingredienti attivi in olio vegetale, ad es. olio di arachidi, di oliva, di sesamo, di cocco, o in un olio minerale come la paraffina liquida. Le sospensioni oleose possono contenere agenti viscosizzanti, ad es. cera d'api, paraffina solida, o alcool cetilico.

10 Agenti edulcoranti, quali quelli illustrate sopra e agenti aromatizzanti possono fornire una preparazione orale palatabile. Queste composizioni possono essere conservate mediante aggiunta di un antiossidante quale l'acido ascorbico. Polveri e granulati disperdibili appropriati per la preparazione di una sospensione acquosa mediante addizione di acqua forniscono gli ingredienti attivi in miscela con un agente disperdente o bagnante, un agente sospendente e uno o più conservanti. Adeguati agenti disperdenti e bagnanti o agenti sospendenti sono esemplificati da quelli citati in precedenza.

15 Altri eccipienti come agenti edulcoranti, aromatici e coloranti possono essere presenti.

Le composizioni medicinali dell'invenzione possono essere anche in forma di emulsioni O/A. La fase oleosa può essere un olio vegetale, ad es. olio di olive o di arachidi, o un olio minerale, ad es. paraffina liquida, o miscele tra questi.

20 Adeguati agenti emulsionanti possono essere le gomme naturali, ad es. gomma acacia o gomma tragacanta, fosfolipidi naturali, ad es. lecitina di soia e esteri o esteri parziali derivati da acidi grassi e sorbitolo, ad es. sorbitan mono-oleato e prodotti di condensazione con ossido di etilene, ad es. poliossietilene sorbitan monooleato.

L'emulsione può inoltre contenere un agente edulcorante o aromatizzante. Sciroppi e elisir possono essere formulati con agenti edulcoranti, ad es. glicerina, sorbitolo o saccarosio. In



particolare uno sciroppo per diabetici potrà contenere solo prodotti come ad es. sorbitolo, che non metabolizza a glucosio o solo in limitatissime quantità.

La sospensione può essere formulate secondo tecniche note utilizzando appropriati agenti bagnanti o disperdenti come già citato in precedenza.

5 In un ambito realizzativo preferito, la composizione secondo la presente invenzione comprende anche un fitosterolo e/o fitoestrogeno purificati da fonti naturali con tecniche note.

In alternativa sono inoltre utili alla presente composizione versioni sintetiche o semi-sintetiche o derivati di fitosteroli e fitoestrogeni, dato che i metodi di sintesi o derivatizzazione sono conosciuti.

10 Utili fitosteroli comprendono campesterolo, sitosterolo, fucosterolo, stigmasterolo, stigmastanolo, o stigmastadienone. Un composto fitosterolico preferito è il β -sitosterolo, ma anche α -o γ -sitosterolo sono utili. Altri fitosteroli preferiti comprendono i loro derivati o coniugati, ad es. β -sitosterol-3-O- β -D-glucopiranoside. Nella presente composizione può anche essere impiegata una miscela di fitosteroli.

15 Utili fitoestrogeni comprendono lignani, isoflavoni, flavoni, o cumestani e loro derivati o coniugati. I fitoestrogeni comprendono sia le forme libere (non-coniugate) che le coniugate, per esempio, coniugati solfati o solfonati, o coniugati glucosidi, glucuronici, or sulfoglucuronici. Può inoltre essere utilizzata una miscela di fitoestrogeni.

20 Appropriati lignani comprendono sesamina, justiciresinolo, lariciresinolo, isolariciresinolo, secoisolariciresinolo, O-demetilsecoisolariciresinolo, didemetilsecoisolariciresinolo, demetossisecoisolariciresinolo, matairesinolo, siringaresinolo, episiringaresinolo, diasiringaresinolo, massoniresinolo, liriioresinolo, entrodiole, enterolattone, gomisin A, gomisin C, gomisin D, acido nordiidroguaiaretico, acido 3'-O-metil nordiidroguaiaretico, arctigenina, o 3'-O-demetilactigenina e loro derivati o coniugati. Tipici lignani coniugati

comprendono siringaresinol-3-D-glucoside, massoniresinolo 4'-O-D-glucopiranoside, secoisolariciresinolo diglicoside, butirrolactone lignan-disaccaride.

Appropriati isoflavoni comprendono genisteina, daidzeina, biocanin A, gliciteina, zearalenone, β -zearalenolo, formononetina, laburnetina, isoprunitina, O-desmetilangolensina, ipriflavone, fletetina, baicaleina, alpinumisoflavone, idrossialpinumisoflavone e loro derivati o coniugati. Un tipico derivato di fitoestrogeni è l'equolo, un metabolita della daidzeina. Altri utili derivati comprendono diidrodaidzeina, tetraidrodaidzeina, diidrogenisteina.

Appropriati flavoni comprendono apigenina, galangina, fisetina, morina, crisina, tectocrisina, miricetina, luteolina, 2,5-diidrossi-6,7-dimetossiflavonone e derivati o coniugati.

Sono inoltre preferiti xantumolo, isoxantumolo, desmetossixantumolo, naringenina, 6- e 8-prenilnaringenine, 6-geranilnaringenina, ottenuti dal luppolo e dalla birra. Utili flavoni coniugati comprendono i flavon glucosidi, ad es. 7-metossi-flavone-5-O-glucoside.

In un'altra forma realizzativa, il fitoestrogeno è un cumestano. Esempi comprendono cumestrololo, wedelolattone, 4'-metossicoumestrololo e plicadina, o loro derivati o coniugati.

Esempi utili di derivati di cumestani comprendono LQB16, LQB34 (PCALC36), LQB93 e LQB96 (Kaushik-Basu N. e coll., Nucleic Acids Research, 2008, 36(5):1482-1496, Identification e characterization of coumestans as novel HCV NS5B polymerase inhibitors).

Gli esempi a seguire illustrano ulteriormente la presente invenzione.

ESEMPI

Esempi 1, 2

resveratrolo	mg 25	mg 25
N-acetil-cisteina	-	mg 250
l-cisteina HCl H ₂ O	mg 125	-
S-carbossimetil-cisteina	mg 125	-
acido citrico	-	mg 30
tocoferil acetato	mg 20	mg 20
isoflavoni di soia	mg 60	mg 60
lignani da semi di lino	mg 30	mg 30
acido α -lipoico	mg 10	mg 10

Esempi 3, 4

	resveratrolo	mg 30	mg 30
	l-cisteina HCl H ₂ O	mg 125	-
	N-acetil-cisteina	-	mg 150
5	isoflavoni di soia	mg 60	mg 60
	β-sitosterolo	mg 25	-
	cumestani	mg 30	mg 30
	ascorbil palmitato	mg 100	mg 100

Esempi 5, 6

10	resveratrolo	mg 25	mg 25
	l-cisteina HCl H ₂ O	mg 100	-
	N-acetil-cisteina	-	mg 100
	fosfatidilcolina	mg 50	mg 50
	fosfatidilserina	mg 50	mg 50
15	glicero-fosforilcolina	mg 50	mg 50
	Vit.E	mg 10	
	selenio	µg 10	
	magnesium cloruro	mg 50	
	zinco orotato	mg 30	

Esempio 7

	resveratrolo	mg 20
	l-cisteina HCl H ₂ O	mg 100
	N-acetil-cisteina	mg 100
	riboflavina (Vit. B2)	mg 1
25	piridossal fosfato (Vit. B6)	mg 2
	pantetina	mg 5
	serina	mg 10
	colina	mg 10
	l-arginina HCl	mg 15
30	lisina	mg 10

Esempio 8

	resveratrolo	mg 25
	N-acetil-cisteina	mg 100
	Isoflavoni da soia	mg 60
35	lignani da semi di lino	mg 60
	eccipienti per granulazione	q.b. a 4 g

Esempio in vitro – Test di inibizione di ialuronidasi

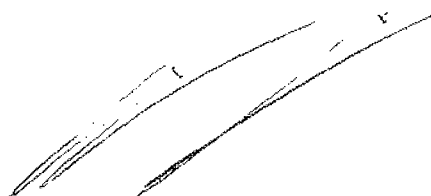
L'effetto inibitore del resveratrolo e cisteina e derivati sulla ialuronidase bovina può essere misurata con un metodo turbidimetrico (Di Ferrante N.; J. Biol. Chem., 1956, 220, 303-306).

L'attività enzimatica è quantificata mediante determinazione della turbidità causata dalla precipitazione del residuo substrato ad alto peso molecolare ($PM > 6-8$ kDa) con sale di ammonio quaternario. Tale sistema si utilizza anche per lo screening degli inibitori di ialuronidase (Tung JS, Mark GE, Hollis GF; Anal. Biochem. 1994, 223, 149-152). L'enzima (800 U/ml) e IA (0.40 mg/ml) sono incubati a 37°C per 1 h. L'attività enzimatica è misurata come % dell'IA indigesto con precipitato di cetilpiridinio cloruro con assorbenza a 415 nm (A^{415} nm) dopo la reazione enzimatica. Le seguenti formule sono state utilizzate per i calcoli:

(i) A^{415} nm valore del IA intatto indigesto, preso come riferimento 100%.

(ii) % Attività enzimatica = $(100\%) - \{A^{415}$ nm di IA + enzima/ A^{415} nm di IA $\times 100\}$

La miscela di incubazione contenente 20 μl di tampone citrato-fosfato (soluzione A: 0.1 M Na_2HPO_4 , 0.1 M NaCl, soluzione B: 0.1 M acido citrico, 0.1 M NaCl; soluzione A e B vengono mescolate in proporzioni appropriate a raggiungere pH 5,0), 30 μl di soluzione di BSA (0.2 mg/ml in acqua), 30 μl di soluzione di IA substrato (2 mg/ml in acqua), 50 μl di H_2O , 10 μl di Me_2SO , e 30 μl di soluzione di enzima (54 ng di IA da testicolo bovino in 30 μl di soluzione BSA). Per determinare le attività inibenti dei vari composti, invece di 10 μl di Me_2SO , sono state utilizzati 10 μl con varie concentrazioni. La concentrazione finale di Me_2SO era 3,8% (v/v). Dopo incubazione della miscela del test per 30 min a 37°C , 720 μl di una soluzione al 2.5% (p/v) di cetiltrimetilammonio cloruro (2.5 g in 100 ml di NaOH $\frac{1}{2}\text{M}$, pH 12.5) sono state aggiunte per precipitare il substrato residuo ad alto peso molecolare e fermare la reazione enzimatica. La miscela è incubata a 25°C per 20 min, e la turbidità di ciascun campione determinata a 415 nm con spettrofotometro Uvikon 930 UV. Gli esperimenti sono stati condotti (30 μl di soluzione di BSA usati invece di) sono stati presi come riferimento di attività enzimatica 0%.



Le sostanze delle prova inibiscono l'attività della ialuronidasi in modo dose-dipendente, come illustrato nella Tabella I.

TABELLA I – Inibizione of ialuronidasi mediante sostanze pure

	Sostanza	Concentrazione		Inib. Enzima (%)
		µg/mg	µM	
5	Resveratrolo	10	43	26
	Resveratrolo	20	88	45
	Resveratrolo	30	131	87
	Resveratrolo	40	175	93
10	I-Cisteina HCl H ₂ O	200	1139	8
	I-Cisteina HCl H ₂ O	400	2277	18
	I-Cisteina HCl H ₂ O	600	3416	22
	I-Cisteina HCl H ₂ O	800	4555	39
15	N-Acetil-I-cisteina (NAC)	200	1226	14
	N-Acetil-I-cisteina (NAC)	400	2451	21
	N-Acetil-I-cisteina (NAC)	600	3677	29
	N-Acetil-I-cisteina (NAC)	800	4902	40

Lo stesso metodo è stato applicato alla combinazioni di sostanze per verificare l'effetto sinergistico, come illustrato nella Tabella II.

20 TABELLA II – Inibizione della ialuronidasi mediante combinazione di sostanze

	Sostanza 1	Sostanza 2	Concentrazione 1 + 2	Inib. Enzima (%)
25	Resveratrolo	I-Cisteina HCl H ₂ O	20 µg/ml + 200 µg/ml	62
	Resveratrolo	I-Cisteina HCl H ₂ O	20 µg/ml + 400 µg/ml	80
	Resveratrolo	N-Acetil-I-cisteina	20 µg/ml + 200 µg/ml	71
	Resveratrolo	N-Acetil-I-cisteina	20 µg/ml + 400 µg/ml	83

RIVENDICAZIONI

1. Una composizione per la prevenzione ed il trattamento di un disordine ialuronidasi-dipendente contenente, in combinazione, una quantità effettiva di resveratrolo o suo analogo e la cisteina o suo derivato.
- 5 2. La composizione secondo la rivendicazione 1, dove detto disordine ialuronidasi-dipendente è la senescenza cutanea.
3. La composizione secondo la rivendicazione 1, dove detto disordine ialuronidasi-dipendente è l'artrite articolare.
4. La composizione secondo le rivendicazioni 1-3, dove la cisteina è in forma di l-cisteina
10 HCl H₂O.
5. La composizione secondo le rivendicazioni 1-3, dove detto derivato della cisteina è la N-acetil-l-cisteina (NAC)
6. La composizione secondo ciascuno delle rivendicazioni 1-5, formulato in una preparazione per somministrazione orale.
- 15 7. La composizione secondo la rivendicazione 6 inoltre comprendente uno o più fitoestrogeni.
8. La composizione secondo la rivendicazione 6 dove il fitoestrogeno è un lignano.
9. La composizione secondo la rivendicazione 6 dove il fitoestrogeno è un isoflavone.
10. La composizione secondo la rivendicazione 6 dove il fitoestrogeno è un flacone o un
20 cumestano.
11. La composizione secondo la rivendicazione 6 inoltre comprendente uno o più fitosteroli.
12. La composizione secondo la rivendicazione 11 dove il fitosterolo è scelto nel gruppo comprendente β -sitosterolo, campesterolo, γ -sitosterolo, fucosterolo, stigmasterolo, stigmastanolo, or stigmastadienone.

13. Uso di una combinazione in quantità efficace di resveratrolo o suo analogo e la cisteina o suo derivato per la fabbricazione di una composizione nutraceutiva per prevenire o trattare un disordine ialuronidasi-dipendente.
14. L'uso secondo la rivendicazione 13, dove la cisteina è in forma di l-cisteina HCl H₂O.
- 5 15. L'uso secondo la rivendicazione 13, dove detto derivato della cisteina è la N-acetil-l-cisteina (NAC).
16. L'uso secondo ciascuno delle rivendicazioni 13-15, dove detta composizione comprende i seguenti principi attivi nelle seguenti proporzioni: resveratrolo mg 25, l-cisteina HCl H₂O mg 100, isoflavoni da soia mg 60, lignani mg 60.
- 10 17. L'uso secondo ciascuno delle rivendicazioni 13-15, dove detta composizione comprende i seguenti principi attivi nelle seguenti proporzioni: resveratrolo mg 25, N-acetil-l-cisteina (NAC) mg 100, isoflavoni da soia mg 60, lignani mg 60.
18. L'uso secondo ciascuno delle rivendicazioni 13-17, dove detta composizione è indicata per la prevenzione e il trattamento di disordini ialuronidase-dipendente in un paziente con senescenza cutanea.
- 15 19. L'uso secondo ciascuno delle rivendicazioni 13-17, dove detta composizione è indicata per la prevenzione e il trattamento di disordini ialuronidase-dipendente in un paziente con artrite articolare.