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

DOMANDA NUMERO	**101999900752775**
Data Deposito	**16/04/1999**
Data Pubblicazione	**16/10/2000**

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Titolo

COMPOSIZIONE COMPRENDENTE UNA CARNITINA E GLUTATIONE, ATTA AD AUMENTARE L'ASSORBIMENTO DEL GLUTATIONE SINERGIZZANDONE GLI EFFETTI.

Dott. Fabio Cavattoni
Dott. Ing. Adriana Raimondi

DESCRIZIONE

RM 99 A 000230

dell'invenzione avente per titolo: "Composizione comprendente una carnitina e glutatione, atta ad aumentare l'assorbimento del glutatione sinergizzandone gli effetti"

a nome: SIGMA-TAU HEALTHSCIENCE S.p.A.

di nazionalità: italiana

con sede in: Via Treviso 4, 00040 Pomezia RM

Inventore: Claudio CAVAZZA

----000----

La presente invenzione riguarda una composizione per la prevenzione e/o il trattamento di alterazioni a carico degli organi a più elevata funzione metabolica, quali fegato, reni, sistema cardiovascolare e cervello. Più particolarmente, tale composizione è utile per prevenire o trattare epatopatie, nefropatie e danni cardiovascolari o cerebrali, ad esempio quelli provocati dall'invecchiamento, sia dovuti ad alterato metabolismo dei suddetti organi che provocati da sostanze tossiche.

Corrispondentemente, la composizione può assumere la forma e svolgere l'attività di un integratore alimentare oppure di un vero e proprio medicamento, in funzione dell'azione di supporto o preventiva oppure propriamente terapeutica che si intende che la composizione esplichi a seconda dei particolari individui cui è destinata.

Più particolarmente, la presente invenzione riguarda una composizione somministrabile per via orale, parenterale, rettale o

Dott. Fabio Cavattoni
Dott. Ing. Adriana Raimondi

transdermica comprendente in associazione quali componenti caratterizzanti:

(a) propionil L-carnitina o un suo sale farmacologicamente accettabile, eventualmente in miscela con almeno un'altra "carnitina", ove per "carnitina" si intende la L-carnitina o un'alcanoil L-carnitina scelta nel gruppo comprendente acetil L-carnitina, valeril L-carnitina e isovaleril L-carnitina, o loro sali farmacologicamente accettabili;

(b) glutatione o un lievito contenente glutatione; e

(c) un lievito non contenente glutatione se il componente (b) è costituito da glutatione.

Il glutatione (GSH), N-(N-L-L-γ-glutamil-L-cisteinil) glicina, svolge un ruolo essenziale nelle reazioni organiche di ossido-riduzione e di disintossicazione. Il glutatione viene sintetizzato nell'organismo a partire dall'acido glutammico e dalla cisteina che, in presenza di ATP, formano la γ-glutamil cisteina che, sempre in presenza di ATP, reagendo con la glicina, dà luogo alla formazione di glutatione. La presenza del glutatione nell'organismo è ubiquitaria. Tuttavia le sue maggiori concentrazioni si trovano nel fegato, nel cuore e nel cervello, in organi cioè ove sono più importanti le reazioni metaboliche, energetiche e di disintossicazione. In questi tessuti sono anche presenti la glutationeperossidasi e la glutationereduttasi, che regolano il sistema ossidoriduttivo legato al ciclo del glutatione assicurando il mantenimento di sufficienti quantità di glutatione ridotto dopo che questi è stato ossidato.

Benché da molto tempo siano note le attività biochimiche e disintossicanti del glutatione, soprattutto nei confronti dei metalli pesanti (che sono fra i più rilevanti inquinanti ambientali) o nei confronti dei farmaci epatolesivi quali il paracetamolo, solo le ricerche più recenti hanno messo in luce il ruolo predominante svolto dal glutatione fra i vari sistemi ossidoriduttivi, oltreché il suo specifico ruolo farmacologico. Un diretto coinvolgimento del glutatione nello svolgere un effetto protettivo nei confronti dell'instaurarsi della placca ateromatosa è stato osservato misurando direttamente la presenza nella placca del sistema antiossidante-proossidante legato al glutatione. Tali ricerche hanno evidenziato una scarsa concentrazione di glutatione ed una relativa scarsa attività del sistema ossidoriduttivo legato al glutatione. Soprattutto diminuita risulta la concentrazione di glutationeperossidasi mentre nel contempo si rileva l'aumentata concentrazione di fattori ossidanti. Queste alterazioni sono evidenti invece nel tessuto vascolare normale.

Anche nelle malattie del fegato il glutatione svolge un importante ruolo protettore. Inoltre, l'effetto epatoprotettivo di molti farmaci è mediato dal glutatione. È stato anche segnalato che l'aumento di glutatione può ridurre il rigetto del fegato trapiantato.

Anche a livello neurocerebrale il ruolo del glutatione si distingue da quello degli altri più noti sistemi ossidoriduttivi nel proteggere dai danni tissutali e cellulari quali si rilevano durante

l'invecchiamento, nel morbo di Parkinson o nella demenza di Alzheimer. Il glutatione a livello cerebrale può infatti svolgere diversi ruoli e in particolare quello di possibile neurotrasmettitore. Una carenza di glutatione può aumentare i livelli di sostanze citotossiche e iniziare l'apoptosi di distinte serie di cellule neuronali.

Durante l'invecchiamento si osserva un aumento dei processi ossidativi e una diminuzione delle sostanze naturali antiossidanti tra cui principalmente il glutatione, cosicché la carenza di glutatione può essere considerata una delle cause dell'invecchiamento. Il ruolo favorevole del glutatione è anche osservabile a livello intestinale ove la sua presenza condiziona la formazione di idroperossidi e di lipidoperossidi, svolgendo una importante funzione nei processi di disintossicazione intestinale e nel prevenire le patologie epatiche ed intestinali correlate.

La L-carnitina ed i suoi alcanoil derivati sono ben noti per l'importante ruolo che possono svolgere a livello metabolico, soprattutto per ciò che riguarda l'ossidazione e l'utilizzazione attraverso la β-ossidazione degli acidi grassi.

La L-carnitina infatti, sia quella assunta con la dieta, sia quella sintetizzata dall'organismo, viene concentrata dal sangue negli organi metabolicamente più attivi nell'utilizzazione degli acidi grassi, quali i muscoli scheletrici ed il cuore.

Una deficienza di L-carnitina può essere causa di miopatie, mentre la somministrazione orale di L-carnitina migliora lo stato clinico correlato a queste patologie. Anche nell'ossidazione mito-

Dott. Fabio Cavattoni
Dott. Ing. Adriana Raimondi

condriale del glucosio la L-carnitina svolge un'importante funzione nella produzione di energia, cosicché adeguati livelli di L-carnitina sono necessari per un normale metabolismo energetico a livello cardiaco e muscolare.

La sua somministrazione migliora la resistenza allo sforzo nei soggetti sofferenti di insufficienza coronarica, il flusso coronarico e gli effetti clinici dello scompenso cardiaco.

Altre proprietà biologiche della L-carnitina e dei suoi derivati, in particolare della propionil L-carnitina, sono la sua capacità di stabilizzare le membrane cellulari e di proteggerle dalle lesioni indotte dai processi ossidativi.

È stato ora sorprendentemente trovato che una composizione comprendente in associazione quali componenti caratterizzanti:

(a) propionil L-carnitina o un suo sale farmacologicamente accettabile;

(b) glutatione o un lievito contenente glutatione; e

(c) un lievito non contenente glutatione se il componente (b) è costituito da glutatione

è estremamente efficace nella prevenzione e/o nel trattamento di alterazioni a carico degli organi a più elevata funzione metabolica, quali fegato, reni, sistema cardiovascolare e cervello, a causa sia del potente effetto sinergizzante esercitato dai suoi componenti, sia del loro aumentato assorbimento tessutale, in particolare del glutatione. Tale composizione è particolarmente utile per prevenire o trattare epatopatie, nefropatie e danni cardiovascolari o cerebrali,

Dott. Fabio Cavattoni
Dott. Ing. Adriana Raimondi

ad esempio quelli provocati dall'invecchiamento, sia dovuti ad alterato metabolismo dei suddetti organi, sia provocati da sostanze tossiche.

È stato altresì trovato che, vantaggiosamente, il componente (a) può comprendere ulteriormente un'altra "carnitina", scelta nel gruppo comprendente acetil L-carnitina, valeril L-carnitina e isovaleril L-carnitina, o loro sali farmacologicamente accettabili o loro miscele.

Quando il componente (a) della composizione è costituito da una miscela di carnitine, una miscela di L-carnitina, acetil L-carnitina e propionil L-carnitina o dei loro sali farmacologicamente accettabili risulta preferita.

Quando il componente (b) è costituito da glutatione, il componente (c) è allora costituito da un lievito non contenente glutatione, scelto nel gruppo comprendente *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces fragilis*. Altri esempi di siffatti lieviti sono ben noti al comune esperto.

Quando il componente (b) è costituito da un lievito contenente glutatione, si preferisce che il lievito contenga dal 7 al 10% circa in peso di glutatione. Un esempio non limitativo di un adatto lievito al glutatione è l'estratto di lievito YH - Torula Yeast (*Candida utilis*) prodotto dalla società Kohjin, Giappone.

Il rapporto ponderale (a):(b):(c) varia da 100:1:100 a 1:10:10 e preferibilmente da 10:1:10 a 1:1:1.

Dott. Fabio Cavattoni
Dott. Ing. Adriana Raimondi

È stato inoltre provato che sia l'effetto sinergizzante, sia l'assorbimento tissutale vengono ulteriormente aumentati quando la composizione comprende inoltre:

(d) almeno uno dei precursori della sintesi biologica del glutatione, scelto nel gruppo comprendente acido glutammico, glicina, cisteina e magnesio.

Il risultato ottimale si ottiene quando nella composizione sono presenti tutti i predetti precursori.

Preferibilmente, il rapporto ponderale (a):(d) varia da 1:1 a 1:0,5.

I componenti costituenti la presente associazione mostrano un inaspettato e sorprendente effetto sinergico nel proteggere l'organismo dai danni tossici sia di origine endogena, quali quelli metabolici legati all'invecchiamento, sia di origine esogena, quali quelli provocati dagli inquinanti ambientali o provocati da altri agenti lesivi. In particolare, la nuova composizione può trovare utile impiego nella prevenzione e nel trattamento di tutte quelle alterazioni che sopravvengono con l'invecchiamento, siano queste di origine neurocerebrale che cardiovascolare, o nelle situazioni di sofferenza parenchimale di organi, quali ad esempio il fegato, che per la loro azione metabolica e disintossicante sono maggiormente esposti alle lesioni indotte da agenti tossici esterni o da metaboliti tossici.

L'efficacia della nuova composizione deriva sia dal predetto effetto sinergico, sia dall'aumento delle concentrazioni attive tessu-

tali dei suoi componenti provocato dal loro migliorato assorbimento, particolarmente del glutatione.

La composizione oggetto dell'invenzione può venir utilizzata sia quale integratore alimentare o supporto dietetico ad azione prevalentemente preventiva, sia quale farmaco per il trattamento di stati patologici già conclamati. Gli effetti metabolici svolti sia dalle carnitine e dal glutatione o dal lievito contenente glutatione sia dagli aminoacidi presenti nella composizione sono ben noti e la carenza di questi composti nell'organismo può provocare patologie anche gravi. Non era invece prevedibile che la loro associazione potesse potenziarne potentemente gli effetti e favorirne i processi di assorbimento aumentandone le concentrazioni tessutali. In particolare, possono trovare vantaggio dall'impiego di questa composizione le diverse forme di sofferenza epatica, cerebrale, le alterazioni aterosclerotiche e le intossicazioni da metalli pesanti, da chemioterapici o da altri farmaci.

Il sorprendente effetto sinergico che si realizza con l'associazione tra "carnitine" e glutatione in presenza di lievito e degli aminoacidi precursori del glutatione e il loro miglior assorbimento è stato messo in evidenza da diversi test farmacologici (alcuni dei quali vengono descritti nel seguito) scelti in modo da risultare fortemente predittivi per un impiego pratico di questa composizione sia in campo preventivo/nutrizionale sia propriamente terapeutico.

Prove tossicologiche

Prima delle diverse prove farmacologiche vennero accertati i limiti di tossicità e di tollerabilità della nuova composizione nell'animale.

Queste prove vennero eseguite sia nel ratto, sia nel topo somministrando in alte dosi in una sola volta i diversi prodotti fra loro associati oppure somministrandoli sempre nei medesimi animali continuativamente per almeno sessanta giorni. Si poté così constatare che è possibile somministrare per via orale fra loro associati sino ad 1 g/kg di propionil L-carnitina e di acetil L-carnitina unitamente a 500 mg/kg di glutatione oppure di 2 g/kg di lievito contenente il 10% di glutatione e così pure gli stessi prodotti unitamente ad acido glutammico (100 mg/kg), glicina (100 mg/kg), cisteina (100 mg/kg) e magnesio (10 mg/kg) senza la comparsa di alcun segno di intolleranza o di tossicità. Così pure risulta ben tollerata la somministrazione prolungata per sessanta giorni consecutivi di 0,5 g/kg di propionil L-carnitina o acetil L-carnitina unitamente a 100 mg/kg di glutatione o ad 1 g/kg di estratto di lievito contenente il 10% di glutatione unitamente pure ad acido glutammico (50 mg/kg), glicina (50 mg/kg) e magnesio (5 mg/kg).

A seguito di queste prove, dall'esame del sangue non si rilevarono alterazioni di sorta negli animali trattati. Anche dall'esame autoptico i test istologici condotti sui principali organi non rilevarono modificazioni di carattere patologico rispetto agli animali di controllo.

Dott. Fabio Cavattoni
Dott. Ing. Adriana Raimondi

Prove farmacologiche

Per valutare l'attività epatoprotettrice antitossica ed anti-invecchiamento della nuova composizione vennero utilizzati diversi test scelti fra quelli che non solo potessero meglio mettere in evidenza gli effetti farmacologici, ma che fossero anche affidabilmente predittivi per una sua applicazione pratica sia come composizione nutrizionale, sia come composizione farmaceutica nel campo della prevenzione e del trattamento delle patologie epatiche di origine tossica o metabolica e nelle patologie dovute all'invecchiamento.

Prove sulla tossicità indotta dall'acetaminofene (paracetamolo)

A diversi gruppi di topi maschi vennero somministrati per via orale 600 mg/kg di acetaminofene, dose sufficiente a causare la morte nelle 24 ore del 50% degli animali così trattati.

Contemporaneamente all'acetaminofene, a un primo gruppo di animali (gruppo G) venne somministrato glutatione (G); ad un secondo (gruppo LG), lievito contenente glutatione al 10% (LG); ad un terzo (gruppo PC), propionil L-carnitina (PC); ad un quarto (gruppo AA), un'associazione di acido glutammico, cisteina, glicina e magnesio (AA); ad un quinto (gruppo AC), una prima associazione secondo l'invenzione, denominata "associazione completa", AC, costituita da PC + G + AA; ad un sesto (gruppo ACL), una seconda associazione secondo l'invenzione denominata "associazione completa al lievito", ACL, costituita da PC + LG + AA.

In tutti i gruppi così trattati venne poi osservata la mortalità a 24 ore dal trattamento. I risultati del test sono riportati nella

Tabella 1.

I risultati di queste prove indicano che, mentre con la somministrazione di glutatione si ottiene una parziale riduzione della mortalità indotta dall'acetaminofene, non appare evidente una protezione da parte della propionil L-carnitina o dell'associazione di amminoacidi. Il lievito contenente glutatione dimostra una maggior attività protettiva di quella dimostrata dal glutatione da solo. Qualora venga somministrata l'associazione completa ACL, la protezione appare totale, dimostrando così l'attuarsi di un evidente sinergismo fra il glutatione, la propionil L-carnitina e gli altri componenti dell'associazione.

Questi effetti sinergici appaiono ancora più evidenti quando si somministri nel topo una dose pari a 900 mg/kg di acetaminofene, che provoca la morte del 100 % degli animali. In tal caso, solo la somministrazione dell'associazione completa ACL protegge dalla morte più del 50% degli animali trattati (si veda la Tabella 2).

La protezione nei confronti dell'acetaminofene alla dose di 900 mg/kg da parte della nuova composizione risulta ancora più evidente qualora, prima dell'agente epatotossico, gli animali in esperimenti vengano trattati quotidianamente per sette giorni consecutivi con i vari componenti dell'associazione (si veda la Tabella 3).

Questo risultato è probabilmente da mettere in relazione alle aumentate concentrazioni di glutatione e degli altri componenti dovute al maggior assorbimento legato alla presenza del lievito e

così pure alla aumentata sintesi del glutatione stesso dovuta alla maggior presenza dei suoi precursori.

Tabella 1

Protezione sulla mortalità indotta dall'acetaminofene (600 mg/kg/%)

Trattamento/gruppo di animali	mg/kg	Mortalità
C	---	6/10
PC	100	6/10
G	50	4/10
LG	500	3/10
AA	130	5/10
AC	280	2/10
ACL	780	0/10

C = Controlli
PC = Propionil L-carnitina
G = Glutatione
LG = Lievito con glutatione 10%
AA = Associazione di aminoacidi e magnesio = (acido glutammico 50 mg, cisteina 25 mg, glicina 50 mg + magnesio 5 mg)
AC = Associazione completa = (PC + G + AA)
ACL = Associazione completa al lievito = (PC + LG + AA)

Tabella 2

Protezione sulla mortalità indotta dall'acetaminofene (900 mg/kg /%)

Trattamento	mg/kg	Mortalità
C	---	10/10
PC	100	10/10
G	50	7/10
LG	500	6/10
AA	130	9/10
AC	280	5/10
ACL	780	3/10

Tabella 3

Protezione sulla mortalità indotta da acetaminofene (mg 900/kg/%) dopo somministrazione prolungata per sette giorni consecutivi della composizione o dei suoi componenti.

Trattamento	mg/kg	Mortalità
C	---	10/10
PC	100	9/10
G	50	5/10
LG	500	3/10
AA	130	9/10
AC	280	1/10
ACL	780	0/10

Prove sull'intossicazione da tetracloruro di carbonio (CCl_4) su epatociti isolati

Oltre che sull'intossicazione da acetaminofene, l'attività protettiva e sinergica esplicata dei vari componenti della composizione secondo l'invenzione si evidenzia anche a livello epatico nei confronti dell'intossicazione da CCl_4. Per queste prove vennero usati epatociti di ratto isolati dopo perfusione con collagenasi secondo il metodo descritto da Seglen F. O., Method Cell. Biol. Vhem. 264, 4747, 1989. Vennero raccolte circa 4-6 $\times 10^8$ cellule di fegato vitali calcolate per esclusione dalle non vitali per mezzo di trypanblue.

Le cellule così isolate vennero sospese in recipienti di plastica di 25 cm^2 in presenza di antibiotici ed al 10% di siero fetale di vitello inattivato. Alla sospensione di cellule così preparate venne aggiunto CCl_4 (10 $mmol.L^{-1}$), glutatione (GSH 20 mg L^{-1}), propionil L-carnitina (100 mg L^{-1}) o glutatione associato alla propionil L-carnitina. Dopo 4 ore di incubazione venne valutata la percentuale di cellule morte attraverso il rilascio di lattatodeidrogenasi, come

Dott. Fabio Cavattoni
Dott. Ing. Adriana Raimondi

descritto da (Casini A. e coll., J. Biol. Chem., 257, 6721, 1982). L'esame dell'effetto protettivo nei confronti della intossicazione da CCl_4 svolta dal glutatione, dalla propionil L-carnitina e dalla loro associazione venne valutato anche attraverso il dosaggio sul supernatante della cultura tanto dell'alaninaaminotransferasi (Ala AT) che dell'aspartatoaminotranferasi (Aspa AT) (Auto-biochemistry Assay System Bekman 700-Encore-2).

Per quanto riguarda l'esame citologico degli epatociti, questo venne eseguito sia al microscopio ottico, sia al microscopio elettronico dopo fissazione in formalina al 3% e paraffina nel primo caso o in glutaraldeide al 3% e osmio tetrossido all'1% nel secondo.

I risultati di queste analisi (si vedano le Tabelle 4, 5 e 6) dimostrano che sia il glutatione, sia la propionil L-carnitina sono in grado di diminuire gli effetti tossici del tetracloruro di carbonio.

Un effetto sorprendentemente più elevato fu però quello che si ottenne dall'associazione del glutatione con la propionil L-carnitina.

In questo caso, la percentuale di cellule morte fu pressoché ridotta a zero. Anche l'aumento della concentrazione enzimatica indicante il danno funzionale metabolico (Ala HT-Aspa AT) venne in maniera inaspettata fortemente ridotta dalla associazione di glutatione e propionil L-carnitina. La conferma dell'intenso sinergismo tra glutatione e propionil L-carnitina venne anche evidenziato dagli esami istologici che, al microscopio ottico, rivelarono la pressoché totale scomparsa di cellule necrotiche e, al microscopio

elettronico, mostrarono la conservazione delle strutture intracellulari ed in particolare di quelle mitocondriali e del numero dei ribosomi.

Tabella 4

Protezione su culture di epatociti intossicati da CCl_4

Trattamento	% di cellule morte
CCl_4	85±4
Glutatione	55±5
Propionil L-carnitine	70±7
Glutatione + Propionil L-carnitina	5±3

Tabella 5

Protezione su culture di epatociti intossicati da CCl_4. Concentrazioni nel supernatante dopo 4 ore di alaninaaminotransferasi (Ala AT $nmol.min^{-1}.L^{-1}$) e di asparatoaminotransferasi (Asp AT $nmol.\ min^{-1}.L^{-1}$)

	Ala AT	Asp AT
CCl_4	26,5±3,1	9,08±0,7
Glutatione	19,7±2,5	7,5±5,4
Propionil L-carnitina	22,4±2,8	8,9±0,9
Glutatione + Propionil L-carnitina	7,7±1,9	3,4±2,1

Prove sull'intossicazione epatica da tetracloruro di carbonio

Un altro indice della tossicità del CCl_4 sul fegato è dato dall'aumento provocato sulla concentrazione epatica di trigliceridi. Anche con questo test venne dimostrata l'attività protettiva del glutatione, della propionil L-carnitina, degli aminoacidi e del lievito sia da soli, sia associati nella composizione della presente invenzione.

Dott. Fabio Cavattoni
Dott. Ing. Adriana Raimondi

L'intossicazione con CCl_4 venne provocata iniettando per via intraperitoneale in ratti a digiuno 1 ml × kg^{-1} di una sospensione al 20% di CCl_4 in olio di oliva. Prima dell'intossicazione con CCl_4 i ratti vennero trattati per tre giorni consecutivi con glutatione (G = 50 mg/kg), oppure con propionil L-carnitina (PC = 100 mg/kg), o con lievito al 10% di glutatione (LG = 500 mg/kg), o con associazione di aminoacidi (AA= acido glutammico 50 mg, cisteina 25 mg, glicina mg 50, Mg 5 mg) oppure con l'associazione completa AC (AC = PC + G + AA) oppure con l'associazione completa al lievito (ACL = PC + LG + AA). Dopo la somministrazione del CCl_4, dagli animali decapitati venne estratto il fegato su cui si procedette alla misura della concentrazione dei trigliceridi secondo il metodo descritto da Donabedian R. K., Clin. Chem., 20, 632, 1974. Anche i risultati di queste prove evidenziarono un notevole sinergismo tra glutatione e propionil L-carnitina nel proteggere il fegato dall'intossicazione da CCl_4.

Ancora più evidente fu l'effetto protettivo dell'associazione della propionil L-carnitina con il lievito ed il complesso di aminoacidi. In questo caso infatti l'infiltrazione epatica di trigliceridi fu pressoché inesistente a dimostrazione del potente sinergismo realizzato dalla composizione secondo l'invenzione (si veda la Tabella 6).

Dott. Fabio Cavattoni
Dott. Ing. Adriana Raimondi

Tabella 6

Prove sull'aumento dei trigliceridi epatici indotto da CCl_4

CCl_4 ($ml.kg^{-1}$)	Trattamenti	Trigliceridi ($mg.g^{-1}$)
0	---	5,9±0,4
1	---	26,9±1,1
1	PC	20,2±1,9
1	G	18,7±2,1
1	LG	16,5±1,2
1	AA	20,4±2,1
1	AC	12,5±1,4
1	ACL	9,9±0,6

Protezione dalla ipertrigliceridemia sperimentale nel ratto

Per questo test venne utilizzato il metodo descritto da (Carlson L. A. V., J. Atheroscl. Res., 8, 667, 1968) e poi modificato (Atherosclerosis, 16, 349, 1972) secondo il quale la somministrazione nel ratto per via orale di 3 g/kg di fruttosio induce, dopo cinque ore dalla somministrazione, un notevole aumento dei trigliceridi sia epatici, sia ematici.

Con questo test si volle osservare se la somministrazione dei componenti della composizione secondo l'invenzione sia isolati, sia tra di loro associati, potesse portare ad una riduzione di questa alterazione che in genere è considerata alla base di gravi disfunzioni epatiche così come lo è dell'aterosclerosi.

A questo scopo, diversi gruppi di ratti vennero trattati con glutatione (G = 50 mg/kg), con propionil L-carnitina (PC = 100 mg/kg) o con lievito contenente il 10% di glutatione (LG = 500 mg/kg) oppure con gli aminoacidi associati (AA = acido glutammico

50 mg/kg, cisteina 25 mg/kg, glicina 100 mg/kg + Mg 5 mg/kg) oppure con questi diversi composti tra loro associati (alle medesime dosi senza lievito (AC) oppure con il lievito (ACL). Il trattamento venne eseguito per via orale per i tre giorni precedenti la somministrazione di fruttosio e tre ore dopo la sua somministrazione. Dopo cinque ore dalla somministrazione di fruttosio tutti gli animali vennero sacrificati e sul sangue venne eseguito il dosaggio dei trigliceridi secondo il metodo di Donahedian R. K., Clin. Chem., 20, 632, 1974. I risultati di queste prove indicano come sia il glutatione, sia la propionil L-carnitina abbiano una scarsa influenza sull'aumentato tasso dei trigliceridi ematici indotto dalla somministrazione di fruttosio che diventa invece evidente qualora questi vengano associati tra loro soprattutto in presenza di lievito. Una notevole riduzione fu infatti osservabile nel sangue dei ratti a cui era stata somministrata l'associazione completa unitamente al lievito ed agli aminoacidi, evidenziando così il potente sinergismo fra i vari componenti dell'associazione (si veda la Tabella 7).

Tabella 7

Prove sull'ipertrigliceridemia (mg/100 ml) indotta nel ratto

Controlli	190±6,7
G	180±5,9
GL	175±6,9
PC	185±7,1
GL + PC	155±8,1
AA	185±6,5
AC	140±4,3
ACL	135±6,3

Dott. Fabio Cavattoni
Dott. Ing. Adriana Raimondi

Prove sull'aterosclerosi sperimentale

Per questo test venne utilizzato il metodo di Malinow M. R., Atherosclerosis, 48, 105, 1983, secondo il quale somministrando per sei settimane consecutive in diversi gruppi di ratti Wistar maschi una dieta aterogenica consistente di olio di cotone 10%, caseina 24%, colesterolo 1%, zucchero 60%, vit. D_2 200 mUST/g di dieta si evidenziano delle pronunciate lesioni aterosclerotiche vascolari. Queste vennero determinate a livello aortico misurando con metodo morfometrico lo spessore dell'aorta addominale e l'intensità della colorazione indotta dal Sudan IV e valutando la loro gravità con un punteggio da 1 a 5.

Attraverso gli esami morfometrici e l'intensità della colorazione indotta dal Sudan IV si poté evidenziare anche in queste prove un notevole sinergismo tra glutatione (25 mg/kg) e propionil L-carnitina (100 mg/kg), ma più rilevante ancora apparve l'effetto protettivo svolto dall'associazione completa. Nel gruppo di ratti trattati con ACL apparve infatti completamente inibita la comparsa delle caratteristiche lesioni aterosclerotiche vascolari a dimostrazione anche in questo caso dell'attività sinergica dei vari componenti dell'associazione secondo l'invenzione.

Attività sulla nefropatia da glicerolo

Per questo test venne utilizzato il metodo di Young J. H. K., Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol., 13, 23, 1991 secondo il quale un'iniezione di glicerolo induce nel ratto insufficienza renale e nefropatia. Venne impiegato questo metodo per valutare l'attività

protettiva sul rene dell'associazione dell'invenzione. Furono usati ratti maschi Spague Dawley ai quali, dopo essere stati privati dell'acqua da bere per 24 ore, vennero iniettati 10 cc/kg di una soluzione al 50% p/v di glicerolo ed acqua. Dopo l'iniezione, agli animali così trattati veniva consentito di bere. Dopo 24 ore veniva estratto il sangue dagli animali sul cui plasma, dopo centrifugazione, veniva dosata la concentrazione di creatina (secondo il metodo descritto da Taussky H. H:, Clin. Chem. Acta. 1, 210, 1956) e l'urea mediante la reazione con diacetil monoxima (Henry R. Y., Cannon D. C. Eds, Clinical Chemistry, 2, Ed. Harper e Row London 1974). La somministrazione di propionil L-carnitina (100 mg/kg), di glutatione (50 mg/kg) o di lievito con glutatione (500 mg/kg), degli aminoacidi (25 mg/kg di ognuno), del lievito (500 mg/kg) e della loro associazione alle medesime dosi venne eseguita ogni giorno per i tre giorni precedenti il test. I risultati di questo test (si veda la Tabella 8) indicano come sia la propionil L-carnitina, sia il glutatione mostrano un discreto effetto protettivo nei confronti delle alterazioni renali indotte dal glicerolo, ma l'effetto maggiore è quello ottenibile attraverso la loro associazione soprattutto in presenza di lievito. Con la presenza, oltre che del lievito, anche degli aminoacidi, la protezione è pressoché completa, dimostrandosi così l'effettivo potenziamento di attività che si ottiene con la loro associazione ed il sinergismo esistente non solo tra la propionil L-carnitina ed il glutatione ma l'azione favorente su questa associazione svolta dal lievito e dagli aminoacidi.

Dott. Fabio Cavattoni
Dott. Ing. Adriana Raimondi

Tabella 8

Attività protettiva sull'insufficienza renale da glicerolo nel ratto

Trattamento	Creatinina (mg/ml)	Urea (mg/100 ml)
Controlli	56,8±7,7	22,2±1,9
Glicerolo	360,4±55,2	116,7±19,4
Propionil L-carnitina	280,5±22,5	88,5±11,5
Glutatione	240,8±20,9	79,9±9,9
Propionil L-carnitina + Glutatione	185,5±19,2	60,2±6,5
Propionil L-carnitina + Lievito (10% glutatione)	160,8±16,8	52,5±6,1
Aminoacidi	320,4±50,6	105,5±14,9
Propionil L-carnitina +Glutatione + Aminoacidi + Lievito	95,4±9,2	38,4±4,1

Attività sulla concentrazione di glutatione (GSH) nel ratto anziano

Poiché è noto che nel ratto anziano l'attività metabolica ed enzimatica del glutatione è ridotta e questa riduzione viene considerata come una delle cause dell'invecchiamento, venne valutato l'effetto della somministrazione della nuova composizione o dei suoi singoli componenti sulle concentrazioni di glutatione nel plasma e nel fegato del ratto giovane e del ratto anziano.

Per questo test vennero impiegati due diversi gruppi di ratti sia giovani (2-3 mesi), sia anziani (8-10 mesi). Su ambedue i gruppi venne calcolata la concentrazione di glutatione (GSH) secondo la tecnica di Moron M. S., Biochem Biophys. Acta, 582, 67, 1979, sia prima dell'inizio del test, sia dopo 15 giorni di somministrazione giornaliera di propionil L-carnitina (100 mg/kg) di glutatione (50 mg/kg), di propionil L-carnitina con glutatione o con lievito al 10% di glutatione (500 mg/kg), di aminoacidi (500 mg/kg) oppure della associazione secondo l'invenzione.

Dott. Fabio Cavattoni
Dott. Ing. Adriana Raimondi

Dopo 15 giorni di trattamento, dal dosaggio delle concentrazioni di glutatione presente sia nel fegato (si veda la Tabella 9), sia nel plasma (si veda la Tabella 10) risultò il potenziamento esistente tra propionil L-carnitina e glutatione nel riportare a norma le concentrazioni di glutatione nei ratti anziani. Tuttavia, il sinergismo fu ancora più evidente con la presenza di lievito e degli aminoacidi quando associati nella composizione secondo l'invenzione.

Tabella 9

Attività sulle concentrazioni di glutatione (GSH-ng/mg di proteine) nel fegato di ratti giovani e anziani

Trattamento	Ratti giovani Tempo		Ratti anziani Tempo	
	0	15 gg	0	15 gg
Controlli	11,55±0,88	12,75±0,91	8,70±0,72	8,10±0,63
Propionil L-carnitina	11,25±0,41	12,90±0,71	7,9±0,51	9,3±0,46
Glutatione	12,1±0,36	12,85±0,66	8,82±0,69	9,90±0,76
Propionil L-carnitina + Glutatione	12,70±0,64	13,05±0,55	8,10±0,71	10,50±0,40
Propionil L-carnitina + Lievito (10% glutatione)	11,73±0,49	13,75±0,62	8,75±0,41	10,80±0,71
Aminoacidi	11,25±0,68	12,68±0,41	8,90±0,57	9,15±0,68
Propionil L-carnitina + Glutatione + Aminoacidi + Lievito	11,35±0,77	12,45±0,59	8,25±0,61	11,95±0,85

Dott. Fabio Cavattoni
Dott. Ing. Adriana Raimondi

Tabella 10

Attività sulle concentrazioni di glutatione (GSH) nel plasma (GSH mg/dl) di ratti anziani e ratti giovani

Trattamento	Ratti giovani Tempo		Ratti anziani Tempo	
	0	15 gg	0	15 gg
Controlli	2,12±0,59	2,25±0,39	1,39±0,49	1,35±0,55
Propionil L-carnitina	2,22±0,29	2,39±0,50	1,40±0,22	1,75±0,20
Glutatione	2,09±0,31	2,35±0,35	1,26±0,31	1,80±0,41
Propionil L-carnitina + Glutatione	2,14±0,21	2,40±0,40	1,22±0,21	1,95±0,35
Propionil L-carnitina + Lievito (10% glutatione)	2,20±0,19	2,48±0,33	1,35±0,33	2,05±0,29
Aminoacidi	2,27±0,27	2,42±0,29	1,33±0,21	1,40±0,34
Propionil L-carnitina + Glutatione + Aminoacidi + Lievito	2,10±0,16	2,36±0,26	1,25±0,16	2,25±0,39

Attività sull'assorbimento e sulla concentrazione di glutatione nel sangue di animali depletati di glutatione

Con questo test si poté dimostrare come la composizione dell'invenzione favorisca, a causa della presenza del lievito, l'assorbimento del glutatione.

A questo scopo, ad un gruppo di ratti maschi del ceppo Sprague Dawley venne ridotto il contenuto di glutatione nel sangue mediante somministrazione di dietilmaleato (DEM), un depletore del glutatione, secondo la tecnica descritta da Plummer J., Chemical Depletion of glutathione "in vivo", Methods in Enzimology, 77, 50, 1981. Il DEM venne somministrato per via intraperitoneale ai ratti a digiuno alla dose di 1 cc/kg. Dopo mezz'ora dall'iniezione del dietilmaleato, venne somministrato per via orale il solo glutatione (50 mg/kg) o il lievito contenente glutatione 10% (500 mg/kg) oppure

50 mg/kg di glutatione unitamente a 500 mg di lievito non contenente glutatione. Un altro gruppo di ratti ricevette gli aminoacidi precursori del glutatione (acido glutammico 50 mg/kg, glicina 50 mg/kg, cisteina 50 mg/kg, magnesio 10 mg/kg) oppure l'associazione completa secondo l'invenzione alle medesime dosi prima descritte.

Dopo quattro ore si prelevò il sangue degli animali così trattati e si misurò la concentrazione di glutatione nel plasma. I risultati di queste prove (si veda la Tabella 11) indicano come l'assorbimento del glutatione venga notevolmente aumentato dalla presenza di lievito, sia che il lievito stesso contenga il glutatione oppure che venga associato al glutatione.

La presenza del lievito provocò un significativo incremento delle concentrazioni di glutatione ematico nei ratti in cui tali concentrazioni erano state diminuite dall'iniezione di DEM.

Questo effetto risultò ancora più evidente quando agli animali depletati di glutatione venne somministrata l'associazione completa secondo la presente invenzione.

Tabella 11

Attività sulle concentrazioni di glutatione (GSH) nel plasma (GSH mg/dl) in ratti depletati in glutatione dall'iniezione di dietilmaleato (DEM). Valori ritrovati dopo 4 ore dall'iniezione

	Glutatione (GSH mg/dl)
Controlli	2,70±0,41
DEM	0,61±0,74
Propionil L-carnitina	0,70±0,54
Glutatione	0,95±0,88
Lievito (10% glutatione)	1,65±0,90
Glutatione + Lievito	1,85±0,80
Aminoacidi	0,85±0,70
Glutatione + Aminoacidi	1,10±0,66
Propionil L-carnitina + Glutatione + Aminoacidi + Lievito	2,15±1,1

Dott. Fabio Cavattoni
Dott. Ing. Adriana Raimondi

Vengono forniti qui di seguito, a titolo illustrativo e non limitativo, alcuni esempi di formulazioni secondo l'invenzione.

1)	Complesso di carnitine (L-carnitina mg 50, acetil L-carnitina mg 50, propionil L-carnitina mg 50, isovaleril L-carnitina mg 50)	mg 200
	Lievito (titolato in glutatione 7-10%)	mg 200
	Acido glutammico	mg 50
	L-cisteina	mg 50
	Glicina	mg 50
	Magnesio citrato	mg 10
2)	Complesso di carnitine (L-carnitina mg 50, acetil L-carnitina mg 50, propionil L-carnitina mg 50, isovaleril L-carnitina mg 50)	mg 200
	Glutatione (GSH)	mg 50
	Acido glutammico	mg 50
	L-cisteina	mg 50
	Glicina	mg 50
	Magnesio citrato	mg 10
	Lievito (*Saccharomyces cerevisiae*)	mg 200
3)	Propionil L-carnitina	mg 200
	Lievito (titolato in glutatione 7-10%)	mg 200
	Acido glutammico	mg 50
	L-cisteina	mg 50
	Glicina	mg 50
	Magnesio citrato	mg 10
4)	Propionil L-carnitina	mg 200
	Glutatione (GSH)	mg 50
	Acido glutammico	mg 50
	L-cisteina	mg 50
	Glicina	mg 50
	Magnesio citrato	mg 10
	Lievito (*Saccharomyces cerevisiae*)	mg 200

5)	Propionil L-carnitina	mg 200
	Glutatione	mg 100
	Acido glutammico	mg 50
	L-cisteina	mg 50
	Glicina	mg 50
	Magnesio citrato	mg 10
	Lievito (*Saccharomyces cerevisiae*)	mg 200
6)	Propionil L-carnitina	mg 200
	Lievito (titolato in glutatione 7-10%)	mg 300
	Acido glutammico	mg 50
	L-cisteina	mg 50
	Glicina	mg 50
	Magnesio citrato	mg 10
7)	Propionil L-carnitina	mg 200
	Glutatione (GSH)	mg 100
	Acido glutammico	mg 50
	L-cisteina	mg 50
	Glicina	mg 50
	Magnesio citrato	mg 10
	β-carotene	mg 5
	α-carotene	mg 5
	Coenzima Q_{10}	mg 10
	Selenio metionina	µg 20
	Lievito (*Saccharomyces cerevisiae*)	mg 200
8)	Propionil L-carnitina	mg 200
	Lievito (titolato in glutatione 7-10%)	mg 300
	Acido glutammico	mg 50
	L-cisteina	mg 50
	Glicina	mg 50
	Magnesio citrato	mg 10
	β-carotene	mg 5
	α-carotene	mg 5
	Coenzima Q_{10}	mg 10
	Vit. PP	mg 25
	Vit. B_6	mg 25
	Vit. B_{12}	µg 250
	Selenio metionina	µg 20

Dott. Fabio Cavattoni
Dott. Ing. Adriana Raimondi

Per sale farmacologicamente accettabile della L-carnitina o di alcanoil L-carnitina si intende qualsiasi sale di queste con un acido che non dia origine a indesiderati effetti tossici o collaterali.

Tali acidi sono ben noti ai farmacologi ed agli esperti di tecnologia farmaceutica.

Esempi non limitativi di tali sali sono: cloruro; bromuro; ioduro; aspartato, aspartato acido; citrato, citrato acido; tartrato; fosfato, fosfato acido; fumarato, fumarato acido; glicerofosfato; glucosiofosfato; lattato; maleato, maleato acido; orotato; ossalato, ossalato acido; solfato, solfato acido; tricloroacetato; trifluoro-acetato e metansolfonato.

Un elenco di sali farmacologicamente accettabili approvati dalla FDA è riportato in Int. J. of Pharm. 33, 1986, 201-217, pubblicazione che è incorporata per riferimento nella presente descrizione.

La composizione secondo l'invenzione può comprendere ulteriormente vitamine, coenzimi, sostanze minerali e antiossidanti.

Gli opportuni eccipienti da usare per preparare le composizioni in funzione della specifica via di somministrazione risulteranno evidenti per qualsiasi esperto in farmacia e tecnica farmaceutica o dell'alimentazione.

Dott. Fabio Cavattoni
Dott. Ing. Adriana Raimondi

RM 99 A 000230

RIVENDICAZIONI

1. Composizione comprendente in associazione:

(a) propionil L-carnitina o un suo sale farmacologicamente accettabile;

(b) glutatione o un lievito contenente glutatione; e

(c) un lievito non contenente glutatione se il componente (b) è costituito da glutatione.

2. Composizione secondo la rivendicazione 1, in cui il componente (a) comprende ulteriormente un'altra "carnitina" scelta nel gruppo comprendente L-carnitina, acetil L-carnitina, valeril L-carnitina, isovaleril L-carnitina o un loro sale farmacologicamente accettabile o loro miscele.

3. Composizione secondo la rivendicazione 2, in cui il componente (a) comprende una miscela di L-carnitina, acetil L-carnitina e propionil L-carnitina o loro sali farmacologicamente accettabili.

4. Composizione secondo le rivendicazioni 1-3 in cui il lievito contenente glutatione contiene dal 7 al 10% in peso circa di glutatione.

5. Composizione secondo le rivendicazioni 1-4, in cui il rapporto ponderale (a):(b):(c) varia da 100:1:100 a 1:10:10 e preferibilmente da 10:1:10 a 1:1:1.

6. Composizione secondo le rivendicazioni 1-5, comprendente ulteriormente:

Dott. Fabio Cavattoni
Dott. Ing. Adriana Raimondi

(d) almeno uno dei precursori della sintesi biologica del glutatione, scelto nel gruppo comprendente acido glutammico, cisteina e magnesio.

7. Composizione secondo la rivendicazione 6, in cui il rapporto ponderale (a):(d) varia da 1:1 a 1:0,5.

8. Composizione secondo le rivendicazioni 1 e 6 comprendente:

(a) propionil L-carnitina o un suo sale farmacologicamente accettabile;

(b) glutatione;

(c) un lievito non contenente glutatione scelto nel gruppo comprendente *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces fragilis*;

(d) acido glutammico, glicina, cisteina e magnesio.

9. Composizione secondo le rivendicazioni 1, 4-6 comprendente:

(a) propionil L-carnitina o un suo sale farmacologicamente accettabile;

(b) un lievito contenente il 7-10% in peso di glutatione; e

(d) acido glutammico, glicina, cisteina e magnesio.

10. Composizione secondo le rivendicazioni 1, 3-6 comprendente:

(a) una miscela di L-carnitina, acetil L-carnitina, propionil L-carnitina o loro sali farmacologicamente accettabili;

(b) glutatione;

(c) un lievito non contenente glutatione scelto nel gruppo comprendente *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomices fragilis*;

Dott. Fabio Cavattoni
Dott. Ing. Adriana Raimondi

(d) acido glutammico, glicina, cisteina e magnesio.

11. Composizione secondo le rivendicazioni 1, 3-6 comprendente:

(a) una miscela di L-carnitina, acetil L-carnitina, propionil L-carnitina o loro sali farmacologicamente accettabili;

(b) un lievito contenente il 7-10% in peso di glutatione; e

(d) acido glutammico, glicina, cisteina e magnesio.

12. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti in cui il sale farmacologicamente accettabile della L-carnitina o dell'alcanoil L-carnitina è scelto nel gruppo comprendente: cloruro; bromuro; ioduro; aspartato, aspartato acido; citrato, citrato acido; tartrato; fosfato, fosfato acido; fumarato, fumarato acido; glicerofosfato; glucosiofosfato; lattato; maleato, maleato acido; orotato; ossalato, ossalato acido; solfato, solfato acido; tricloroacetato; trifluoroacetato e metansolfonato.

13. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti comprendente ulteriormente vitamine, coenzimi, sostanze minerali e antiossidanti.

14. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, somministrabile per via orale, sotto forma di integratore alimentare.

15. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, somministrabile per via orale, parenterale, rettale o transdermica sotto forma di medicamento.

16. Integratore alimentare secondo la rivendicazione 14 per la prevenzione di epatopatie, nefropatie e danni cardiovascolari o

cerebrali sia dovuti ad alterato metabolismo dei corrispondenti organi, sia provocati da sostanze tossiche.

17. Medicamento secondo la rivendicazione 15, per il trattamento di epatopatie, nefropatie e danni cardiovascolari o cerebrali sia dovuti ad alterato metabolismo dei corrispondenti organi, sia provocati da sostanze tossiche.

18. Integratore secondo la rivendicazione 16, sotto forma di compresse, tavolette, pillole, capsule, granulati o sciroppi.

19. Medicamento secondo la rivendicazione 17, sotto forma di compresse, tavolette, pillole, capsule, granulati, sciroppi, supposte, fiale o gocce.

20. Uso di una composizione comprendente in associazione:

(a) propionil L-carnitina o un suo sale farmacologicamente accettabile;

(b) glutatione o un lievito contenente glutatione; e

(c) un lievito non contenente glutatione se il componente (b) è costituito da glutatione

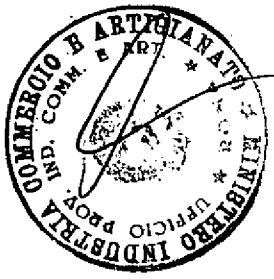
per preparare un integratore alimentare o farmaco atto ad aumentare l'assorbimento e le concentrazioni tessutali del glutatione.

21. Uso secondo la rivendicazione 20 in cui l'associazione comprende ulteriormente:

(d) almeno uno dei precursori della sintesi biologica del glutatione, scelto nel gruppo comprendente acido glutammico, glicina, cisteina e magnesio.

Dott. Fabio Cavattoni
Dott. Ing. Adriana Raimondi

22. Uso secondo le rivendicazioni 20 o 21 in cui l'integratore alimentare o farmaco è atto a prevenire/trattare epatopatie, nefropatie e danni cardiovascolari o cerebrali sia dovuti ad alterato metabolismo dei corrispondenti organi, sia provocati da sostanze tossiche.

p.i. di SIGMA-TAU HEALTHSCIENCE S.p.A.

Dott. Fabio Cavattoni