



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

DOMANDA NUMERO	101998900696380
Data Deposito	03/08/1998
Data Pubblicazione	03/02/2000

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Titolo

COMPOSIZIONE AD ATTIVITA' ANTIOSSIDANTE ED ANTIPROLIFERATIVA COMPRENDENTE
UNA CARNITINA ED UN CAROTENOIDE

RM 98 A 000516

Descrizione dell'invenzione avente per titolo:

"Composizione ad attività antiossidante ed antiproliferativa comprendente una carnitina ed un carotenoide"

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

di nazionalità: italiana

con sede in: Via Treviso 4, Pomezia RM

Inventore: Claudio CAVAZZA

---000---

La presente invenzione riguarda una composizione per la prevenzione e/o il trattamento dei danni indotti dalla presenza di radicali liberi dovuta ad inquinamento ambientale e da fenomeni di lipoperossidazione di natura aterosclerotica, vascolare, cardiaca o cerebrale; di alterazioni proliferative di tessuti comprendenti il tessuto prostatico, uterino, mammario o del colon; e delle alterazioni della vista e della retina comprendenti la cataratta e la degenerazione maculare della retina.

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 espliciti a seconda dei particolari individui cui è destinata.

Più particolarmente, la presente invenzione riguarda una composizione somministrabile per via orale, parenterale, rettale o transdermica, comprendente in associazione:

(a) propionil L-carnitina o un suo sale farmacologicamente accettabile, eventualmente in miscela con 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; e

(b) un carotenoide, preferibilmente scelto nel gruppo comprendente licopene, α -carotene, β -carotene, zeaxantina, criptoxantina, luteina o loro miscele o estratti di prodotti naturali vegetali contenenti tali carotenoidi, tipicamente gli estratti di pomodoro (*Lycopersicon esculentum*).

I carotenoidi sono un gruppo di pigmenti vegetali a lunga catena di natura terpenica (tetraterpeni) comprendenti fino a 40 atomi di carbonio con un sistema coniugato di doppi legami. I carotenoidi sono presenti nelle piante superiori, nei cloroplasti e in quei plastidi localizzati nelle regioni della pianta in cui è assente la clorofilla (alcune radici e molti fiori e frutti, per esempio pomodori, in cui aumentano notevolmente durante la maturazione); si ritrovano anche nelle alghe azzurre, in alcuni batteri fotosintetici ed in alcuni funghi. I carotenoidi svolgono un ruolo complementare alla clorofilla nella fotosintesi, assorbendo alcune radiazioni luminose e trasmettendone l'energia alla clorofilla stessa.

Benché nel mondo vegetale siano presenti più di seicento carotenoidi, solo quaranta tra questi sono presenti nella dieta umana e solo quattordici vengono assorbiti dall'intestino, i rima-

menti essendo costituiti da epossidi non assorbibili. Tra questi quattordici, i più rappresentati sono il licopene, l' α -carotene, il β -carotene, la luteina, la zeaxantina e le β -criptoxantine.

Il licopene presenta undici doppi legami coniugati linearmente (mentre il β -carotene ne presenta nove) ed è il carotenoide con la più lunga catena di doppi legami lineari coniugati.

Questa particolare struttura è stata messa anche in relazione alla sua maggiore potenza come agente antiossidante.

Benché esistano interazioni metaboliche tra il licopene e il β -carotene, il licopene non può trasformarsi nell'organismo in β -carotene, che è caratterizzato da un anello trimetilcicloesanicico ai due lati della catena carboniosa.

Il β -carotene può invece trasformarsi per riduzione della catena in *trans*-retinolo e acido retinoico e fungere da provitamina A.

Questi composti sono caratterizzati da un forte potere antiossidante, ma tra tutti il licopene è il carotenoide che presenta la più alta capacità di blocco dell'ossigeno singoletto, più che doppia ad esempio di quella del β -carotene.

Il licopene viene assorbito dall'organismo soprattutto in presenza di grasso e si ritrova nel sangue e nei tessuti nelle due sue forme isomeriche, *cis*- e *trans*-licopene.

Come tutti i carotenoidi, il licopene non può essere sintetizzato dall'organismo, ma deve essere assunto con gli alimenti.

Sono molti gli alimenti che contengono i carotenoidi, e tra questi la papaia, il pompelmo rosa, gli spinaci, le albicocche, il latte, le uova, ma sono soprattutto i pomodori a contenere la maggior quantità di licopene.

Oltre che per il suo forte potere antiossidante, l'interesse per il licopene è motivato dai risultati di alcuni studi epidemiologici che hanno posto in risalto come un carotenoide ad azione pro-vitaminica A quali il β -carotene, possa esso stesso svolgere un effetto protettivo su alcune forme di tumore, senza dover essere trasformato in retinolo. Numerose indagini prospettiche e retrospettive hanno posto infatti in evidenza un rapporto inverso tra il consumo di vegetali e frutta ricchi in carotene o alte concentrazioni plasmatiche di carotene, ed il rischio di tumore, specialmente polmonare. Tali risultati venivano attribuiti ai carotenoidi solo in quanto precursori della vitamina A. Tuttavia, recenti test clinici hanno dimostrato che l'assunzione con la dieta del solo β -carotene non porta alcun vantaggio per ciò che riguarda il rischio tumorale nei confronti di popolazioni la cui dieta è priva di questa vitamina.

Uguali risultati negativi venivano raggiunti in gruppi di individui fumatori o a rischio di asbestosi. Un'elaborazione più accurata di questi dati ha posto in evidenza che carotenoidi diversi dal β -carotene potevano contribuire all'ottenimento dell'effetto protettivo rilevato con altri test.

Ciò che caratterizza soprattutto il licopene, e che si ritiene alla base dei favorevoli effetti biologici che può produrre nell'or-

ganismo, è la sua potente azione antiossidante soprattutto nei confronti dell'ossigeno singoletto che è uno dei prodotti più altamente reattivi dell'ossigeno nel produrre radicali liberi. Oltre che nei confronti dell'ossigeno singoletto, il licopene è altresì assai attivo nel proteggere le cellule ed i tessuti da altre specie reattive dell'ossigeno quali il perossido idrogeno e il nitrossido.

Queste sue particolari attività, che pongono il licopene in primo piano tra tutti gli altri antiossidanti naturali, possono spiegare in parte i benefici effetti che l'assunzione di licopene con la dieta è in grado di svolgere a favore della salute.

È stato riscontrato infatti che soggetti colpiti da infarto miocardico, così come quelli potenzialmente a rischio per la presenza di alte concentrazioni ematiche di colesterolo o di trigliceridi, presentano una concentrazione ematica assai inferiore sia di β -carotene, sia soprattutto di licopene, rispetto ai soggetti di controllo. Che ciò possa essere messo in relazione all'effetto antilipoperossidativo svolto dal licopene risulta anche dalle ricerche che dimostrano come il licopene sia presente nelle LDL e possa prevenirne l'ossidazione.

È stato confermato che l'attività antilipoperossidativa del licopene è superiore a quella del β - e dell' α -carotene anche quando misurata su colture cellulari (cellule C3H/10T1/2) di cui impedisce pure la trasformazione tumorale. L'attività antilipoperossidativa del licopene spiega anche la sue capacità di prevenire l'aterosclerosi e i danni vascolari aterosclerotici così come, unitamente

alla sua attività inibente sull'IGF e di incremento della comunicazione intracellulare giunzionale, la proliferazione cellulare tumorale.

Il licopene è il più potente tra i carotenoidi nell'inibire lo sviluppo spontaneo di tumori mammari nel topo e la crescita delle cellule leucemiche (H1-60 promyelocytic leukemia cell line) così come *in vitro* le cellule del glioma C-6 di ratto o le trasformazioni neoplastiche indotte da agenti chimici.

Studi epidemiologici hanno dimostrato una correlazione inversa tra l'assunzione di licopene con la dieta ed il rischio di tumore alla prostata, così da individuare nel licopene uno dei mezzi preventivi di questa particolare patologia. Lo stesso vale per ciò che riguarda il rischio di tumore mammario e del polmone.

Un'altra patologia in cui il licopene, così come la luteina e la zeaxantina, può svolgere un'azione preventiva è nella degenerazione maculare della retina correlata all'invecchiamento (AMD- Age Related Macular Degeneration).

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 miopatie. Anche nell'ossidazione mitocondriale 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 od un suo sale farmacologicamente accettabile, e
- (b) un carotenoide scelto nel gruppo comprendente licopene, α -carotene, β -carotene, zeaxantina, criptoxantina, luteina o loro miscele,

è estremamente efficace nella prevenzione e/o trattamento dei danni indotti dalla presenza di radicali liberi dovuta ad inquinamento ambientale e da fenomeni di lipoperossidazione di natura aterosclerotica, vascolare, cardiaca o cerebrale; di alterazioni

proliferative di tessuti comprendenti il tessuto prostatico, uterino, mammario o del colon; e delle alterazioni della vista e della retina comprendenti la cataratta e la degenerazione maculare della retina, a causa del potente effetto sinergizzante esercitato dai suoi componenti.

È stato altresì trovato che, vantaggiosamente, il componente (a) può comprendere ulteriormente una "carnitina" scelta nel gruppo comprendente acetil L-carnitina, valeril L-carnitina e iso-valeril L-carnitina o loro sali farmacologicamente accettabili o loro miscele e che il componente (b) può essere costituito da un estratto di prodotti vegetali che lo contengono, ad esempio l'estratto di pomodoro (*Lycopersicon esculentum*, fam. Solanacee):

Il rapporto ponderale (a):(b) varia da 1:0,1 a 1:10.

Prove tossicologiche

Sia la carnitina e i suoi derivati, sia il licopene e gli altri carotenoidi quali la luteina, la zeaxantina e la criptoxantina così come il β -carotene presentano una scarsa tossicità e sono ben tollerati soprattutto se somministrati per via orale.

Queste favorevoli caratteristiche sono state confermate in prove eseguite somministrando nel ratto alte dosi sia di L-carnitina (1 g/kg), sia di propionil L-carnitina (1 g/kg), sia di L-carnitina (250 mg/kg) più propionil L-carnitina (250 mg/kg) più acetil L-carnitina (250 mg/kg) più isovaleril L-carnitina (250 mg/kg), e così pure somministrando 50 mg/kg di licopene oppure 1 g/kg di estratto naturale di pomodoro titolato al 5% di licopene.

Anche l'associazione di 1 g/kg di propionil L-carnitina con 50 mg/kg di licopene somministrati per via orale nel ratto è risultata ben tollerata e non ha evidenziato alcuna mortalità negli animali così trattati.

Lo stesso dicasi per i risultati riguardanti la somministrazione delle diverse carnitine tra loro associate (L-carnitina 250 mg/kg, più acetil L-carnitina 250 mg/kg, più propionil L-carnitina 250 mg/kg, più isovaleril L-carnitina 250 mg/kg), unitamente al licopene alla dose di 50 mg/kg.

Analoghi favorevoli risultati si sono ottenuti somministrando nel ratto per via orale per un periodo prolungato di tempo (30 giorni) ogni giorno sia della propionil L-carnitina (500 mg/kg) sia l'associazione delle diverse carnitine (L-carnitina 150 mg/kg, acetil L-carnitina 150 mg/kg, propionil L-carnitina 150 mg/kg, isovaleril L-carnitina 150 mg/kg) associate a 25 mg di licopene.

Allo scadere del trentesimo giorno i ratti così trattati non presentavano alcuna mortalità né alcun segno tossico. Anche gli esami chimicofisici, il numero dei globuli rossi e dei globuli bianchi apparivano normali negli animali trattati e così pure normale appariva l'esame istologico eseguito sui principali organi esaminati alla fine del trattamento.

Prove su epatociti isolati e intossicati con tetracloruro di carbonio.

Per valutare l'attività antiossidante e protettiva nei confronti dei radicali liberi svolta dalle composizioni della presente invenzione, si è voluto osservare il suo effetto nei confronti della

intossicazione da tetracloruro di carbonio su una coltura di epatociti isolati.

È noto che il tetracloruro di carbonio (CCl_4) induce una lipoperossidazione delle biomembrane cellulari che può portare a necrosi le cellule stesse.

In queste prove, eseguite su una coltura di epatociti di ratto, si è potuto dimostrare come l'effetto lipoperossidativo e tossico del CCl_4 legato alla liberazione di radicali liberi possa essere diminuito dalla presenza nella coltura del complesso di carnitine (100 mg L^{-1}) formato dall'associazione di L-carnitina, acetil L-carnitina, propionil L-carnitina, isovaleril L-carnitina in un rapporto in peso tra loro di 1:1) o della propionil L-carnitina (100 mg L^{-1}) soprattutto se associati al licopene (20 mg L^{-1}) o all'estratto di pomodoro titolato al 5% in licopene.

Per l'esecuzione di questa prova, gli epatociti prelevati da fegato di ratto sono stati isolati seguendo il metodo descritto da Seglen (Seglen F. O., Method Cell. Biol. Chem., 264, 4747, 1989).

Le lesioni sulla membrana cellulare indotte dal CCl_4 e l'effetto protettivo svolto dal complesso di carnitine o dalla propionil L-carnitina o dal licopene così come quello della loro associazione sono stati valutati attraverso il dosaggio sul liquido supernatante della coltura cellulare sia della alanina aminotransferasi (AlaAT), sia della aspartato aminotransferasi (AspaAT) (Auto-biochemistry Assay System Beckman 700-Encore-2).

Per valutare la protezione dall'effetto lipoperossidativo svolto dal CCl_4 è stata misurata la malonilaldeide con il metodo dell'acido tiobarbiturico (Ohkawa H. Anal. Biochem., 95, 351, 1979).

La citologia degli epatociti alla fine dei trattamenti è stata esaminata dopo loro fissazione in formalina o in glutaraldeide sia al microscopio ottico, sia a quello elettronico. L'esame dei risultati di queste prove ha messo in evidenza come vi sia un sorprendente sinergismo sia tra il complesso di carnitine e il licopene, sia tra la propionil L-carnitina e lo stesso licopene nel proteggere gli epatociti dalle lesioni della membrana e dalla lipoperossidazione indotta da CCl_4 . Sia l'aumento della concentrazione di AlaHT, sia di AspaAT provocata dal CCl_4 viene ridotto dalla somministrazione delle carnitine o di licopene, ma viene ad essere quasi del tutto inibito dalla somministrazione di questi tra loro associati.

Questo sinergismo tra carnitine, e soprattutto tra propionil L-carnitina, e licopene risulta evidente anche dalla misura della malonilaldeide, indice dell'effetto lipoperossidativo.

L'esame citologico degli epatociti conferma la diminuzione delle cellule necrotiche dopo trattamento con propionil L-carnitina e licopene; ma soprattutto all'esame ultrastrutturale, mentre nel gruppo di controllo (CCl_4) le cellule mostravano alterazioni emocromatiche, irregolari membrane nucleari, la scomparsa nei mitocondri delle creste mitocondriali e la diminuzione del numero dei ribosomi, nelle cellule che oltre al CCl_4 erano esposte anche alle carnitine ed al licopene la membrana cellulare e il nucleo appa-

rivano inaspettatamente intatti, le eterocromatine regolari così come i mitocondri ed il numero dei ribosomi.

La normalizzazione degli aspetti citologici era sorprendentemente evidente negli epatociti sottoposti all'attività combinata dal complesso di carnitine e del licopene, mentre di scarso rilievo apparivano gli effetti dei singoli composti non associati tra loro, dimostrandosi così un evidente sinergismo tra carnitine e licopene.

Tabella 1

Concentrazioni di alanina aminotransferasi (AlaAT nmol·min⁻¹) nel supernatante di colture di epatociti esposti a CCl₄ (controlli) e al complesso di carnitine o a propionil L-carnitina oppure a estratti naturali di pomodoro o licopene da soli o associati tra loro (Complesso Carnitine = C; Propionil L-carnitina = P; Estratto naturale carotenoidi di pomodoro = EP; Licopene = L)

Tempo ore	4	8	16
Controlli	24,6±2,1	26,8±2,3	30,5±4,5
C	20,6±3,2	21,9±3,3	26,4±2,8
P	19,4±2,1	22,3±3,1	25,7±3,7
EP	22,3±1,8	24,3±2,7	24,7±2,9
L	22,1±2,1	20,6±2,4	23,6±2,1
C + EP	11,9±1,9	8,6±1,1	5,1±1,7
C + L	12,2±1,8	10,5±1,5	5,4±1,9
P + L	11,5±2,1	9,9±2,4	6,2±1,5

Tabella 2

Concentrazioni di aspartato aminotransferasi (AspAT nmol·min⁻¹) nel supernatante di colture di epatociti esposti a CCl₄ (controlli) e al complesso di carnitine o a propionil L-carnitina oppure a estratto naturale carotenoidi di pomodoro o licopene da soli o associati tra loro (Complesso Carnitine = C; Propionil L-carnitina = P; Estratto naturale di pomodoro = EP; Licopene = L)

Tempo ore	4	8	16
Controlli	8,5±0,6	10,9±1,1	12,1±1,5
C	8,1±0,9	9,9±0,8	9,8±1,1
P	8,9±0,9	9,2±1,2	9,1±1,7
EP	8,2±0,8	9,1±0,9	9,0±1,2
L	8,8±1,8	8,9±0,9	9,0±1,2
C + EP	5,4±0,7	3,2±0,9	3,0±0,5
C + L	5,6±1,1	3,1±0,8	3,5±1,2
P + L	5,5±0,9	3,5±1,2	3,2±0,8

Prove sulla cataratta indotta sperimentalmente

Poiché alla base della formazione della cataratta oculare, oltre all'alterato metabolismo glucidico, viene fatto riferimento per la loro importanza patogenetica anche ai radicali liberi ed alla lipoperossidazione lipidica unitamente a disfunzioni nella irrorazione della retina, abbiamo provocato sperimentalmente nel ratto la comparsa della cataratta oculare attraverso una dieta ricca di galattosio secondo il metodo descritto da Gabbay (Gabbay K. H., N. Engl. J. Med., 288, 831, 1973).

Dopo circa otto giorni di questo trattamento, si ottiene nel ratto un opacamento della lente che, in relazione alla sua gravità, è stato classificato in ordine crescente con I, II, III stadio seguendo il metodo descritto da Sippel (Sippel T. O., Invest. Ophthalmol., 5, 568, 1966). I risultati ottenuti da queste prove dimostrano come la somministrazione per otto giorni consecutivi, unitamente al galattosio, del complesso di carnitine (400 mg/kg per via orale di una associazione formata da L-carnitina, acetil L-carnitina, propionil L-carnitina, isovaleril L-carnitina in un rapporto equponderale tra loro) o di propionil L-carnitina (400 mg/kg) o di licopene (5 mg/kg) o di estratto naturale di pomodoro contenente il 5% di licopene (100 mg/kg) o di questi prodotti tra loro associati diminuiva la gravità della lesione oculare indotta dal galattosio. Ma la comparsa dell'opacamento del cristallino veniva inibita quasi completamente quando durante il periodo di otto giorni di trattamento con galattosio venivano contemporaneamente sommi-

nistrate ai ratti in esperimento le carnitine ed il licopene tra loro associati o ugualmente tra loro associati la propionil L-carnitina ed il licopene.

Tabella 3

Prove in ratti galattosemici sull'inibizione dell'opacamento del cristallino con trattamento di complesso di carnitine, con propionil L-carnitina, con estratto naturale carotenoidi di pomodoro, con licopene e con la loro associazione (gruppi di 20 ratti)

Trattamento mg/kg	Grado di opacamento lonte oculare (Numero delle lenti esaminate)		
	I	II	III
Controlli	0	10	10
Complesso carnitine (400 mg/kg)	0	15	5
Propionil L-carnitina (400 mg/kg)	0	12	8
Estratto naturale carotenoidi di pomodoro (100 mg/kg)	8	8	4
Licopene (5 mg/kg)	6	4	10
Complesso carnitine (400 mg/kg) + Estratto naturale di pomodoro (100 mg/kg)	12	8	0
Complesso carnitine (400 mg/kg) + Licopene (5 mg/kg)	12	6	2
Propionil L-carnitina (400 mg/kg) + Estratto naturale carotenoidi di pomodoro (100 mg/kg)	14	6	0
Propionil L-carnitina (400 mg/kg) + Licopene (5 mg/kg)	15	6	0

Prove sull'aterosclerosi sperimentale nel coniglio

In queste prove è stato sperimentato l'effetto sia della associazione delle carnitine, sia della propionil L-carnitina e del licopene o dell'estratto naturale di pomodoro al 5% di licopene, da soli oppure in combinazione tra loro, sull'aterosclerosi indotta sperimentalmente nel coniglio.

Per queste prove è stato usato un gruppo di conigli New Zealand del peso medio di 2,9 kg alla cui dieta standard è stato aggiunto lo 0,5% per peso di colesterolo per trenta giorni conse-

cutivi. A questi stessi animali è stata somministrata ogni giorno attraverso la dieta arricchita in colesteroli una dose corrispondente a 400 mg/kg del complesso di carnitine (associazione formata da L-carnitina, acetil L-carnitina, propionil L-carnitina, isovaleril L-carnitina in un rapporto equiponderale tra loro) oppure di 400 mg/kg di propionil L-carnitina oppure 5 mg/kg di licopene oppure di 100 mg/kg di estratto naturale di pomodoro al 5% di licopene, oppure questi stessi prodotti associati tra loro. Allo scadere del trentesimo giorno di trattamento, è stato prelevato dall'arteria centrale dell'orecchio di ciascun animale il sangue su cui sono state dosate le lipoproteine presenti con il metodo di Hatch (Hatch F. T., Advan. Lipid. Res., 6, 1, 1968).

Gli animali sono stati quindi sacrificati e di ognuno di essi è stato prelevato il fegato di cui sono stati dosati il colesterolo totale e i trigliceridi usando rispettivamente il metodo di Dehoff e Levy [Dehoff J. L., Clin. Chem., 24, 433, 1978 - Levy A., Advances in automated analysis (Technicon Corp.) 497, Thurman, Miami 1972]. Venivano isolati anche l'aorta ed il cuore su cui veniva valutata la presenza di lesioni aterosclerotiche secondo il metodo di Klurfeld (Klurfeld D. M., J. Med., 10, 35, 1979) valutandole da I a IV secondo la loro gravità.

I risultati di queste prove indicano come sia le carnitine, sia in minor misura anche il licopene, esercitano un effetto protettivo sull'aumento del colesterolo e dei trigliceridi indotto nel coniglio dalla dieta iperlipidica, ma che solo con la loro associazione si

raggiunge un ben evidente risultato di quasi completa protezione.

Gli animali trattati con l'associazione delle carnitine e licopene dimostrano infatti un grado di protezione non prospettabile dalla sola sommazione degli effetti svolti dai singoli prodotti isolatamente. Anche in questa prova viene così dimostrato un evidente sinergismo di effetti che viene sviluppato dalle composizioni della presente invenzione.

Tabella 4

Prove su conigli ipercolesterolemici.

Concentrazione delle lipoproteine plasmatiche

	VLDL (mg/dl)	LDL (mg/dl)	HDL (mg/dl)
CI	1.119±295	455±19,9	23,1±6,5
CC	755±10,9	306±15,5	28,5±5,5
EP	880±105	295±20,7	30,1±4,2
P	805±95	280±22,5	29,5±6,2
L	715±80	260±28,5	29,3±5,5
CC + EP	290±45	155±16,5	35,5±3,9
CC + L	240±25	96±9,4	31,2±2,9
P + EP	250±30	105±15,5	36,9±3,5
P + L	220±20	90±10,5	32,1±3,1

- CI = Controlli ipercolesterolemici
 CC = Complesso carnitine
 EP = Estratto naturale carotenoidi di pomodoro
 P = Propionil L-carnitina
 L = Licopene

Tabella 5Prove su conigli ipercolesterolemiciConcentrazioni epatiche del colesterolo totale e dei trigliceridi

	Colesterolo totale (mg/100 g)	Trigliceridi (mg/g)
CI	1.885±315	180±15,5
CC	1.420±205	155±12,7
EP	1.475±195	139±11,5
P	1.250±145	142±12,8
L	1.200±180	135±13,8
CC + EP	985±85	115±11,6
CC + L	780±98	105±11,6
P + EP	750±64	110±10,7
P + L	655±90	90±8,5

- CI = Controlli ipercolesterolemici
 CC = Complesso carnitine
 EP = Estratto naturale carotenoidi di pomodoro
 P = Propionil L-carnitina
 L = Licopene

Prove sull'attività antiproliferativa con la valutazione dell'attività
ornitina decarbossilasica

Come è noto, al pari dei forbolo miristati, il teleocidin iniettato sotto cute nel ratto provoca sulla cute dell'animale così trattato delle alterazioni proliferative che possono portare fino alla formazione di processi cheratosici di tipo tumorale.

L'alterazione proliferativa si accompagna ad un aumento dell'enzima ornitina decarbossilasi e, come in genere in tutte le attivazioni proliferative patologiche, l'incremento dell'attività ornitina decarbossilasica è proporzionale alla gravità della lesione indotta. In queste prove, il teleocidin sciolto in 0,2 cm³ di soluzione acquosa è stato iniettato per via sottocutanea sul dorso depilato di

topi alla dose di 5 µg/topo. Per i sette giorni precedenti questo trattamento, agli animali in prova venivano somministrati sia per via orale il complesso di carnitine da solo (400 mg/kg) formato dall'associazione di L-carnitina, acetil L-carnitina, propionil L-carnitina, isovaleril L-carnitina in un rapporto equiponderale tra loro) o la sola propionil L-carnitina (400 mg/kg) o l'estratto naturale di carotenoidi del pomodoro (contenente mg 5% di licopene) oppure il licopene (5 mg/kg) oppure questi diversi prodotti sia le carnitine, sia gli estratti contenenti il licopene o la propionil L-carnitina ed il licopene associati fra loro. In un altro gruppo di prove, questi prodotti sono stati applicati sulla cute del topo mezz'ora prima dell'iniezione di teleocidin dopo opportuna dispersione dei prodotti prima in dimetilsolfossido e poi in lanolina fino a raggiungere una concentrazione dell'associazione delle carnitine pari a 200 mg/cm³ e pari a 100 mg/cm³ del complesso di carotenoidi contenenti licopene al 5% e a 200 mg/cm³ di propionil L-carnitina o a 5 mg/cc di licopene.

Le diverse preparazioni sono state applicate alla dose di 0,3 cm³ sulla zona di cute su cui veniva iniettato il teleocidin e la zona iniettata veniva protetta con bendaggio occlusivo.

Per il dosaggio della ornitina decarbossilasi nelle zone di cute iniettate con teleocidin, si è proceduto dopo cinque ore dalla iniezione stessa secondo il metodo O'Brien e Nakadate (O'Brien T. G., Cancer Res., 35, 1662, 1975 - Nakadate T., Cancer Res., 42, 28 41, 1982). La concentrazione in proteine dell'estratto epidermico è

stata misurata secondo il metodo di Lowry (Lowry O. H., J. Biol. Chem., 193, 265, 1951). I risultati di queste prove indicano come sia le carnitine, sia i carotenoidi presenti nel complesso di carnitine o nell'estratto naturale di pomodoro come pure la sola propionil L-carnitina od il solo licopene esercitano un modesto effetto protettivo sui fenomeni proliferativi e sull'aumento della attività ornitina decarbossilasica, ma l'effetto protettivo diventa invece sorprendentemente efficace qualora si impieghino questi prodotti tra loro associati dimostrandosi così un inaspettato e sorprendente effetto sinergico.

Tabella 6

Attività ornitina decarbossilasica

Trattamento	Attività ornitina decarbossilasica (nmol di CO ₂ /60 min/mg di proteina)	
	Somministrazione orale	Somministrazione cutanea
Controlli	0,05±0,002	0,03±0,001
Teleocidin	2,4±0,3	2,6±0,2
Complesso carnitine	1,92±0,4	1,75±0,3
Propionil L-carnitina	1,90±0,2	1,60±0,1
Estratto naturale di pomodoro	1,85±0,3	1,80±0,2
Licopene	1,70±0,1	1,65±0,1
Complesso carnitine + Estratto naturale di pomodoro	0,35±0,05	0,40±0,06
Complesso carnitine + Licopene	0,30±0,03	0,45±0,05
Propionil L-carnitina + Estratto naturale di pomodoro	0,36±0,06	0,30±0,04
Propionil L-carnitina + Licopene	0,33±0,05	0,31±0,03

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

1)	Complesso di carnitine (L-carnitina 125 mg, acetil L-carnitina 125 mg, propionil L-carnitina 125 mg, isovaleril L-carnitina 125 mg)	500 mg
	Estratto naturale di pomodoro (titolo al 5% in licopene)	100 mg
2)	Complesso di carnitine (L-carnitina 75 mg, acetil L-carnitina 75 mg, propionil L-carnitina 75 mg, isovaleril L-carnitina 75 mg)	300 mg
	Estratto naturale di pomodoro (titolo al 5% in licopene)	50 mg
3)	Propionil L-carnitina	500 mg
	Estratto naturale di pomodoro (titolo al 5% in licopene)	100 mg
4)	Propionil L-carnitina	250 mg
	Estratto naturale di pomodoro (titolo al 5% in licopene)	50 mg
5)	Propionil L-carnitina	500 mg
	Licopene	5 mg
6)	Propionil L-carnitina	250 mg
	Licopene	2,5 mg
7)	Complesso di carnitine (L-carnitina 75 mg, acetil L-carnitina 75 mg, propionil L-carnitina 75 mg, isovaleril L-carnitina 75 mg)	300 mg
	Licopene	5 mg
8)	Complesso di carnitine (L-carnitina 75 mg, acetil L-carnitina 75 mg, propionil L-carnitina 75 mg, isovaleril L-carnitina 75 mg)	300 mg
	Licopene	2,5 mg
9)	Complesso di carnitine (L-carnitina 75 mg, acetil L-carnitina 75 mg, propionil L-carnitina 75 mg, isovaleril L-carnitina 75 mg)	300 mg
	Complesso carotenoidi estratti naturali dal pomodoro, pompelmo rosa, carote, fiori d'arancio	300 mg
10)	Propionil L-carnitina	400 mg
	Licopene	2,5 mg
	β -carotene	5 mg
	α -carotene	2 mg
	Luteina	5 mg
	Zeaxantina	1 mg

11)	Propionil L-carnitina	350 mg
	Licopene	5 mg
	Estratto di palma nana (<i>Serenoa repens</i>)	50 mg
	Estratto di <i>Pygeum africanum</i>	50 mg
12)	Complesso di carnitine (L-carnitina 75 mg, acetil L-carnitina 75 mg, propionil L-carnitina 75 mg, isovaleril L-carnitina 75 mg)	300 mg
	Estratto naturale di pomodoro (titolo al 5% in licopene)	100 mg
	Estratto di palma nana (<i>Serenoa repens</i>)	50 mg
	Estratto di <i>Pygeum africanum</i>	50 mg
	Estratto di fiori di cactus (<i>Opuntia ficus indica</i>)	50 mg
	Zinco glicinato	10 mg
	Selenio (1-Selenio metionina)	50 µg
	Vitamina E	10 mg
	Coenzima Q ₁₀	10 mg
13)	Complesso di carnitine (L-carnitina 100 mg, acetil L-carnitina 100 mg, propionil L-carnitina 100 mg, isovaleril L-carnitina 100 mg)	400 mg
	Estratto naturale di pomodoro (titolo al 5% in licopene)	100 mg
	Antocianine estratte dal mirtillo	100 mg
	Polifenoli estratti dall'uva	50 mg
	Vitamina E	10 mg
	Selenio metionina	10 µg
14)	Propionil L-carnitina	300 mg
	β-carotene	5 mg
	Licopene	5 mg
	Luteina	3 mg
	Catechina	5 mg
	Acido lipoico	5 mg
	Coenzima Q ₁₀	10 mg
	Vitamina C	100 mg
	Vitamina PP	25 mg
	Vitamina B ₆	25 mg
	Vitamina B ₁₂	250 µg
	Taurina	100 mg

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; trifluoroacetato 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.

RIVENDICAZIONI

RM 98 A 000516

1. Composizione comprendente in associazione i seguenti componenti:
 - (a) propionil L-carnitina od un suo sale farmacologicamente accettabile; e
 - (b) un carotenoide.
2. Composizione secondo la rivendicazione 1, in cui il componente (a) comprende ulteriormente una "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 le rivendicazioni 1 o 2, in cui il carotenoide è scelto nel gruppo comprendente licopene, α -carotene, β -carotene, zeaxantina, criptoxantina, luteina e loro miscele.
4. Composizione secondo le rivendicazioni da 1 a 3, in cui il rapporto ponderale (a):(b) varia da 1:0,1 a 1:10.
5. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui il componente (b) è presente sotto forma di estratto di prodotti vegetali che lo contengono.
6. Composizione secondo la rivendicazione 5, in cui detto estratto è l'estratto del pomodoro (*Lycopersicon esculentum*).
7. Composizione secondo la rivendicazione 6, in cui l'estratto di pomodoro comprende dal 2 al 20% in peso circa di licopene.
8. 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.

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

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

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

12. Integratore alimentare secondo la rivendicazione 10, per la prevenzione dei danni indotti dalla presenza di radicali liberi dovuta ad inquinamento ambientale e da fenomeni di lipoperossidazione di natura aterosclerotica, vascolare, cardiaca o cerebrale; di alterazioni proliferative di tessuti comprendenti il tessuto prostatico, uterino, mammario o del colon; e delle alterazioni della vista e della retina comprendenti la cataratta e la degenerazione maculare della retina.

13. Medicamento secondo la rivendicazione 11 per il trattamento terapeutico dei danni indotti dalla presenza di radicali

liberi dovuta ad inquinamento ambientale e da fenomeni di lipoperossidazione di natura aterosclerotica, vascolare, cardiaca o cerebrale; di alterazioni proliferative di tessuti comprendenti il tessuto prostatico, uterino, mammario o del colon; e delle alterazioni della vista e della retina comprendenti la cataratta e la degenerazione maculare della retina.

14. Integratore alimentare secondo la rivendicazione 12, confezionato in forma solida, semisolida o liquida.

15. Medicamento secondo la rivendicazione 13, confezionato in forma solida, semisolida o liquida.

16. Integratore secondo la rivendicazione 14 sotto forma di compresse, tavolette, pillole, capsule, granulati o sciroppi.

17. Medicamento secondo la rivendicazione 15, sotto forma di compresse, tavolette, pillole, capsule, granulati, sciroppi, fiale o gocce.

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

Dott. Fabio Cavattoni

