

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102010901859974A1

Publication Date

20120122

Applicant

MEDESTEA INTERNAZIONALE S.P.A.

Title

POLIDESOSSIRIBONUCLEOTIDI (PDRN) PER L'IMPIEGO NEL
TRATTAMENTO DI CONDIZIONI DI ACIDOSI E COMPOSIZIONI A BASE DI
POLIDESOSSIRIBONUCLEOTIDI PER IL SUDDETTO IMPIEGO

Descrizione dell'invenzione industriale dal titolo:
"Polidesossiribonucleotidi (PDRN) per l'impiego nel
trattamento di condizioni di acidosi e composizioni
a base di polidesossiribonucleotidi per il suddetto
impiego"

Di: MEDESTEA INTERNAZIONALE S.p.A., nazionalità italiana,
via Cernaia 31, 10121 Torino, Italia.

Inventori designati: GENNERO, Luisa; MERIZZI, Gianfranco.

Depositata il: 22 Luglio 2010

* * *

DESCRIZIONE

La presente invenzione si riferisce ad una nuova applicazione terapeutica dei polidesossiribonucleotidi (nel seguito indicati come "PDRN") e a composizioni a base di polidesossiribonucleotidi idonee all'impiego nella nuova applicazione terapeutica formante oggetto dell'invenzione.

Applicazioni terapeutiche di polidesossiribonucleotidi sono descritte nella tecnica anteriore.

Ad esempio ,la domanda di brevetto internazionale WO2010/049898 descrive l'impiego di composizioni iniettabili di PDRN per il trattamento di patologie osteoarticolari.

E' noto che la respirazione cianuro-resistente

differenzia la maggior parte delle piante e dei microrganismi dai mammiferi e dagli animali superiori in genere. I composti cianogeni sono tra i veleni più frequentemente riscontrati in natura per resistere ai predatori. Le piante ed i microrganismi sono dotate di diversi elementi che conferiscono una cianuro-resistenza unitamente ad una catena respiratoria alternativa cianuro-resistente. Questa respirazione alternativa in genere si basa sulla presenza di una proteina unica, la ossidasi alternativa, detta *cyanide-insensitive Alternative OXidase (AOX)*, che veicola gli elettroni direttamente dal gruppo dei chinoni della catena respiratoria mitocondriale all'ossigeno. Attraverso AOX si supera completamente il segmento del citocromo della catena respiratoria, in modo da ridurre fortemente l'estrusione di protoni legati al substrato di ossidazione, diminuendo contemporaneamente la produzione di ATP. Il sistema alternativo AOX-dipendente è tipico delle piante e dei microrganismi, ma non dei mammiferi e degli animali superiori in genere. Per contro nei mammiferi e negli animali superiori, uno stato redox ridotto della catena respiratoria ed un elevato livello di piruvato sono le esatte condizioni derivanti dalle malattie ereditarie del metabolismo umano con mutazioni

del segmento del citocromo C nella catena respiratoria mitocondriale. Ad oggi i tentativi di esprimere AOX in cellule umane sono falliti.

Appare chiara la necessità di nuovi materiali e metodi per curare o mitigare gli effetti di una varietà di malattie e condizioni relative alle carenze legate alla catena respiratoria mitocondriale o, più in generale, alle citopatie mitocondriali genetiche o acquisite, correggendo in modo efficace tutti gli stati di acidosi, acidosi metabolica ed acidosi lattica da esse derivanti.

Uno scopo della presente invenzione è quindi quello di mettere a disposizione una composizione efficace nel trattamento terapeutico e/o come coadiuvante terapeutico di stati acidosici, quali in particolare acidosi metabolica e/o acidosi lattica, inclusi i casi di acidosi con grave compromissione vascolare complicata da eventi ischemici o trombotici per gli effetti anti-acidosico, anti-aggregante, vasculo-protettore, anti-ossidante, anti-demineralizzante osseo, riequilibrante il metabolismo cellulare del calcio e degli acidi grassi, riequilibrante il metabolismo mitocondriale e cellulare, riducente e neutralizzante l'accumulo di lattato a livello gastroenterico ed in fine anti-apoptotico,

sia *in vitro* sia *in vivo*, in ambito umano e veterinario, e che quindi sia idonea per applicazioni farmaceutiche, cosmetiche, o come integratore alimentare.

Questi ed altri scopi sono raggiunti grazie agli studi effettuati dai presenti inventori, i quali hanno trovato che composizioni a base di polidesossiribonucleotidi (PDRN) sono efficaci nel trattamento di condizioni di acidosi come sopra menzionate.

Nell'ambito della presente descrizione, con il termine polidesossiribonucleotidi (PDRN) si intende indicare una miscela di catene desossiribonucleotidiche di vario peso molecolare, ottenuta da fonti naturali e/o sintetiche, preferibilmente di origine animale o vegetale, quali placenta o sperma di pesce o piante. Lo sperma di pesce è una fonte naturale preferita. La miscela di catene desossiribonucleotidiche ha una distribuzione di pesi molecolari preferibilmente compresa fra 20 kDalton e 2500 kDalton, più preferibilmente fra 70 kDalton e 240 kDalton. In una forma di realizzazione preferita, la miscela di catene deossiribonucleotidiche ha una purezza di almeno l'85%, preferibilmente superiore al 95% e più preferibilmente superiore al 98%.

I PDRN come sopra definiti sono sostanze note e disponibili in commercio.

FR 2 676 926 descrive composizioni farmaceutiche contenenti polideossiribonucleotidi altamente polimerizzati ottenuti da sperma di pesce, le composizioni essendo utilizzate per il trattamento o la prevenzione di deficit immunitari. Sono descritte composizioni contenenti polideossiribonucleotidi in un solvente non ionico, utilizzabili per via parenterale, particolarmente per via intramuscolare e/o intravenosa.

Procedimenti per la preparazione di polideossiribonucleotidi da placenta di mammiferi sono descritti ad esempio in EP 0 226 254.

Nella tecnica anteriore sono inoltre descritte svariate attività biologiche e applicazioni mediche dei PDRN, che sono di seguito elencate.

E' noto che i PDRN innescano una stimolazione metabolica dei fibroblasti, che si traduce sia in un incremento del numero di fibroblasti stessi (35%) sia in un incremento della produzione di tutte le componenti della matrice dermica (30%), ossia proteine collageniche e non, acido ialuronico, elastina, fibronectina, ecc. Tale secrezione, PDRN-mediata, stimola i recettori purinergici o interruttori di attivazione metabolica cellulare [1].

E' altresì noto che i PDRN attivano le vie di

salvataggio degli acidi nucleici (via *salvage*), riutilizzando nucleotidi preformati per la duplicazione cellulare [2].

Il brevetto US 3829567, descrive l'utilizzo di un sale di un metallo alcalino di un polinucleotide o un oligonucleotide di acido ribonucleico (RNA) e/o acido desossiribonucleico (DNA) come un farmaco fibrinolitico.

Il brevetto US 4649134 descrive un metodo di trattamento delle insufficienze renali acute accompagnate da microangiopatia trombotica con PDRN; tali patologie includono sindrome uremica emolitica (HUS), collagenopatie (ad esempio, panarteritis e lupus), Wegner, Schoenlein-Henoch, coagulazione intravascolare disseminata (CID), in rapida evoluzione glomerulonefrite, trombocitopenia e porpora trombotica (TPP).

Il brevetto US 4693995 è finalizzato a chiarire l'uso di PDRN nel trattamento degli stati acuti di ischemia miocardica e infarto.

E' altresì noto che i PDRN aumentano la produzione e la presenza nella cute e nelle mucose di VEGF (fattore di crescita endoteliale) [3]. Questo si riflette in un aumento della vascolarizzazione locale, con conseguente incremento del flusso circo-

latorio e dell'ossigenazione distrettuale.

E' noto inoltre che i PDRN determinano un rilascio di attivatore del plasminogeno dal tessuto vascolare e riducono la concentrazione ematica degli inibitori della plasmina.

Ulteriori indagini farmacologiche hanno messo in evidenza che i PDRN agiscono sul metabolismo dell'acido arachidonico nella parete vascolare, determinando un aumento della disponibilità di prostaciclina (PGI-2). Questa sostanza prodotta dall'endotelio è il più attivo inibitore dell'aggregazione piastrinica finora conosciuto, nonché un efficace vasodilatatore. Da questi effetti farmacologici derivano le spiccate attività antitrombotiche e profibrinolitiche dei PDRN.

E' stato inoltre trovato che i PDRN hanno un'azione sinergica con, e potenziano l'effetto di, eparina [4]. Il meccanismo sinergico di PDRN ed eparina proposto è che i PDRN si leghino in modo competitivo con i recettori di eparina, promuovendo la circolazione prolungata dell'eparina endogena. Cetingli AI et al. hanno segnalato un aumento dell'attività anti-fattore Xa, sostenendo un'efficace azione antitrombotica [4].

E' stato descritto che il trattamento con PDRN

può indurre un'inibizione della produzione di superossido da parte dei neutrofili PAF-mediata (*Platelet Activating Factor*), dimostrando un effetto protettivo nei topi contro l'embolia polmonare [5].

I PDRN possono inoltre indurre la mobilitazione delle *Peripheral Blood Progenitor Cells* (PBPC) in un modello murino [6]. Alcuni PDRN in sinergia con il fattore di crescita rhG-CSF (*Recombinant Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor*) aumentano notevolmente la mobilitazione di un ampio spettro di PBPC, comprese le cellule progenitrici primitive (HSCs, *Hematopoietic Stem Cells*). Questi dati potrebbero avere implicazioni rilevanti per la terapia antitumorale in esseri umani.

La malattia epatica veno-occlusiva è la più comune delle tossicità legate al regime di accompagnamento al trapianto di cellule staminali. Nonostante le terapie aggressive, comprese la combinazione di attivatore tissutale del plasminogeno ed eparina, la malattia epatica veno-occlusiva severa è quasi uniformemente fatale. I PDRN hanno attività in numerosi disturbi vascolari e, a differenza del plasminogeno e dell'eparina, non producono alcun effetto anticoagulante sistemico [6]. La risoluzione della malattia epatica veno-occlusiva severa è stata osservata nel

42% dei sopravvissuti trattati con i PDRN, contro il 2% dei sopravvissuti non trattati con i PDRN. Il tasso di risposta osservata e l'assenza di una tossicità del trattamento in associazione con i PDRN sono persuasivi di un'efficace effetto terapeutico in caso di malattia epatica veno-occlusiva [6-7].

Tuttavia, per quanto a conoscenza dei presenti inventori, l'efficacia dei PDRN nel trattamento degli stati di acidosi acuti o cronici, semplici o complicati, non era stata finora descritta.

Un primo oggetto dell'invenzione riguarda quindi l'impiego di polidesossiribonucleotidi (PDRN) come medicamento per il trattamento di condizioni di acidosi, particolarmente l'acidosi lattica e/o metabolica, come definito nelle annesse rivendicazioni.

Un secondo oggetto dell'invenzione è una composizione comprendente la combinazione di polidesossiribonucleotidi (PDRN) e almeno una metilammide, preferibilmente carnitina, idonea all'impiego nel trattamento di condizioni di acidosi, particolarmente l'acidosi lattica e/o metabolica, come definita nelle annesse rivendicazioni.

Le annesse rivendicazioni formano parte integrante degli insegnamenti tecnici della presente descrizione.

Come sarà descritto in dettaglio nella parte sperimentale che segue, i polidesossiribonucleotidi (PDRN) e le composizioni a base di polidesossiribonucleotidi (PDRN) della presente invenzione si sono dimostrati efficaci nel contrastare i difetti di fosforilazione ossidativa mitocondriale genetici o acquisiti e nel correggere in modo efficace gli stati di acidosi, quali acidosi metabolica, acidosi lattica e apoptosi cellulare conseguente. I PDRN in combinazione con almeno una metilammide, preferibilmente carnitina, hanno inoltre mostrato un effetto sinergico.

Gli inventori hanno dimostrato che i PDRN e le composizioni dell'invenzione sono in grado di contrastare gli stati di acidosi in genere e, agendo su più livelli, di ripristinare le condizioni fisiologiche e biochimiche ottimali per proteggere la vitalità e il trofismo dei tessuti coinvolti e di preservare da stati degenerativi a carattere ischemico o trombotico.

Gli esperimenti effettuati *in vitro* hanno dimostrato che i PDRN e le composizioni dell'invenzione possiedono una notevole attività anti-aggregante, antiossidante, anti-apoptotica ed anti-lattacidemica, con conseguente effetto anti-

decalcificante ed anti-osteoporotico.

Poiché le proprietà rigenerative e riparative, rilevate *in vitro*, sono mantenute anche *in vivo*, i PDRN e le composizioni dell'invenzione si prestano a svariate applicazioni *in vivo*, quali medicinali o dispositivi medici (*medical devices*) o integratori alimentari con attività anti-acidosica, anti-ischemica, anti-aggregante ed anti-osteoporotica, particolarmente per il trattamento di patologie o condizioni mediche sia nell'uomo sia negli animali, come i difetti di fosforilazione ossidativa mitocondriale genetici o acquisiti e gli stati di acidosi in genere, come l'acidosi metabolica, l'acidosi lattica, l'ipo-calcemia acidosi-dipendente, la osteomalacia acidosi-dipendente e, più in generale, di fibrosi reattiva acidosi-dipendente e di apoptosi cellulare conseguente agli stati acidosici.

Come verrà descritto in maggiore dettaglio nel seguito, le composizioni dell'invenzione comprendono la combinazione di PDRN come definiti in precedenza ed almeno una metilammide, preferibilmente scelta nel gruppo che consiste di carnitina, un estere di carnitina, quale preferibilmente acetilcarnitina o propionilcarnitina, acilcarnitina, loro forme levogire e loro derivati semplici o complessati.

In una forma di realizzazione preferita, le composizioni dell'invenzione comprendono ulteriori ingredienti che contribuiscono all'efficacia delle composizioni; tali ulteriori ingredienti sono scelti preferibilmente dal gruppo che consiste di sali di calcio, vitamine del gruppo D o B, sali di potassio unitamente a sali di sodio, e loro combinazioni.

Fra i sali di calcio idonei per l'uso nelle composizioni dell'invenzione si citano a titolo di esempio calcio citrato, monocalcio citrato, tricalcio citrato, calcio carbonato, calcio fosfato bibasico, calcio dicitrato, calcio dicitrato di tricalcio tetraidrato, calcio cloruro, calcio gluconato, calcio fosfato, calcio nitrato.

Fra le vitamine idonee per l'uso nelle composizioni dell'invenzione si citano a titolo di esempio le vitamine del gruppo D, quale calciferolo, ergocalciferolo e lumisterolo, colecalciferolo, diidroergocalciferolo, sitocalciferolo, calci-triolo, calcifediolo; le vitamine del gruppo B, quale tiamina (vitamina B1) e/o ribloflavina (vitamina B2) e/o niacina, acido nicotinico o nicotinamide (vitamina B3) e/o adenina (vitamina B4 o fattore vitaminico) e/o acido pantotenico, pantenolo, pantetina (vitamina B5) e/o piridossamina, piridossina e piridossale

(vitamina B6); e i loro derivati.

I sali di sodio e i sali di potassio sono preferibilmente impiegati in combinazione, come ad esempio le seguenti combinazioni: sodio citrato e/o potassio citrato, monosodio citrato e/o monopotassio citrato, disodio citrato, trisodio citrato e/o tripotassio citrato, sodio carbonato e/o potassio carbonato, sodio bicarbonato e/o potassio bicarbonato, sodio solfato e/o potassio solfato, sodio bisolfato e/o potassio bisolfato, sodio cloruro e/o potassio cloruro, sodio tartrato e/o potassio tartrato, sodio fosfato e/o potassio fosfato, disodio inosinato e/o dipotassio inosinato, sodio ascorbato e/o potassio ascorbato, sodio nitrato e/o potassio nitrato.

La tossicità mitocondriale è una condizione in cui i mitocondri sono danneggiati per uno stato di tossicità cellulare o tissutale acuta o cronica, oppure subiscono una ossidazione repentina recuperabile o irreparabile, oppure subiscono un declino significativo nel numero totale di organuli cellulari, tissutali o corporei. Le cause esatte di tossicità mitocondriale non sono note. Il disordine della funzione delle cellule che accompagna la condizione di tossicità mitocondriale può causare inizialmente disturbi lievi quali debolezza muscolare e miopatia in

genere, poi disturbi quali neuropatie periferiche e pancreatite, sino a problemi gravissimi quali gli stati acidotici acuti o cronici ed in particolare l'acidosi metabolica e l'acidosi lattica. L'accumulo di acido lattico nei tessuti del corpo porta alla perdita di energia, di funzione d'organo, e infine alla morte.

I PDRN estratti da fonti naturali e/o sintetiche, e le composizioni a base di PDRN della presente invenzione, si sono dimostrati completamente efficaci nel trattamento degli stati pre-acidotici ed acidotici, in particolare degli stati di acidosi metabolica e acidosi lattica, inclusi i casi di acidosi con grave compromissione vascolare complicata da eventi ischemici o trombotici e tutto ciò grazie all'effetto anti-acidotico, anti-aggregante, vasculo-protettore, anti-apoptotico, anti-demineralizzante, anti-ossidante e di riduzione, contenimento e neutralizzazione dell'accumulo di lattato a livello gastroenterico.

I PDRN estratti da fonti naturali e/o sintetiche, e le composizioni a base di PDRN della presente invenzione, possono essere impiegati in qualsiasi idonea forma di dosaggio farmaceutica, ad esempio gel orale, soluzione orale, compresse, soluzioni per

somministrazione rettale, sostanze allo stato solido per somministrazione rettale, sostanze in forma liofilizzata di polvere o soluzioni in forma iniettiva.

Come menzionato in precedenza, i PDRN utilizzati nella presente invenzione sono ottenuti da una fonte animale o vegetale, ricca di DNA, mediante i procedimenti descritti nella letteratura sopra citata. La scelta di sperma di pesce come fonte di PDRN è preferita.

Il nuovo impiego dei PDRN che forma oggetto dell'invenzione si fonda su studi di farmacologia sperimentale condotti *in vitro* ed *in vivo* dai presenti inventori, che hanno evidenziato che i PDRN svolgono un'importante azione anti-acidosica su linee cellulari tumorali, su colture di cellulari primarie di mammifero e su biopsie tissutali di mammifero.

Le osservazioni sperimentali *in vitro* risultano essere coerenti con l'osservazione clinica *in vivo*, effettuata su mammifero.

Le osservazioni sperimentali *in vitro* ed *in vivo* sono di seguito descritte in dettaglio.

Come menzionato in precedenza, i PDRN sono impiegati come tali o in combinazione con ulteriori ingredienti attivi, che sono stati selezionati per

la loro attività potenziante e sinergica ai PDRN, in funzione della tipologia di stato acidotico da trattare e delle sue complicanze.

La combinazione con carnitina o suoi derivati, potenzia in modalità sinergica l'effetto anti-acidotico, anti-aggregante, vasculo-protettore e anti-ossidante dei PDRN, per la loro azione limitante e contrastante il danno mitocondriale in atto durante lo stato acidotico acuto o cronico. Gli effetti sinergici sono ancor più evidenti quando gli stati di acidosi metabolica o lattica sono sintomatici e, particolarmente, quando sono complicati da miopatia e miastenia grave.

I sali di calcio svolgono due funzioni sinergiche fra loro, ossia: (i) correzione della disemia (squilibrio di sali minerali nel sangue), che compare come prima risultante tissutale dello stato acidotico; (ii) attività tampone dell'osso, che si verifica generalmente dopo svariate ore dall'induzione di un'acidosi e, per quanto riguarda l'acidosi metabolica, nella fase di cronicizzazione. È noto che l'osso è composto sia da una parte organica sia da una parte inorganica. Quest'ultima, che costituisce circa i 2/3 di peso dell'osso maturo, contiene cristalli di idrossiapatite $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$. La parte

organica, definita osteoide, è costituita principalmente da collagene tipo I e da cellule, gli osteoblasti e gli osteoclasti, che contribuiscono al processo di rimodellamento. Tale rimodellamento, come è noto ad esempio da WO 2009115602 e da [8], è promosso dai PDRN. In caso di acidosi, sia essa acuta o cronica, di origine metabolica o respiratoria, si verificano modifiche nella composizione chimica dell'osso, soprattutto a carico della parte inorganica non osteoide [9]. Nonostante l'acidosi respiratoria abbia effetti meno importanti sul metabolismo osseo rispetto a quella metabolica, alcuni studi [10-11] hanno dimostrato che l'acidosi è comunque in grado di inibire l'attività osteoblastica e di stimolare quella osteoclastica *in vitro*, con una conseguente e progressiva perdita di calcio e sodio da parte dell'osso e con incremento dell'ingresso di H^+ . Si assiste, inoltre, ad una riduzione nel contenuto di carbonato che può, a lungo termine, condurre ad una grave carenza. *In vivo*, la perdita di $CaCO_3$ da parte dell'osso ha un ruolo determinante nella comparsa dell'osteomalacia sia nei pazienti in IRC che in quelli con funzione renale conservata. I PDRN, quando in combinazione con ioni calcio o sali di calcio o loro derivati, potenziano in modalità

sinergica l'effetto anti-acidosico, anti-demineralizzante ossea, ristabilendo un equilibrio fisiologico fra componente osteoblastica ed osteoclastica e soprattutto tamponando la perdita della parte inorganica non osteoide. Gli effetti sinergici sono ancor più evidenti quando gli stati di acidosi metabolica o lattica sono sintomatici e, particolarmente, quando complicati da osteomalacia vera, o da ipo-calcemia o iper-calcemia e/o ipo-calciuria o iper-calciuria correlate a stati di acidosi acuta o cronica, iper-prolattinemia secondaria ed iper-paratiroidismo secondario.

Le vitamine del gruppo D, in combinazione sinergica con i PDRN, divengono cofattori potenzianti dell'azione eu-metabolizzante durante le fasi di assorbimento calcico, con effetti osteo-rigeneranti durante il trattamento di gravi acidosi metaboliche o acidosi lattiche sintomatiche, specialmente quando complicate da osteomalacia e miastenia.

Le vitamine del gruppo B, in combinazione sinergica con i PDRN, divengono cofattori con potenziamento dell'azione endotelio-protettrice, anti-ossidanti e neuro-rigenerante durante il trattamento di gravi acidosi metaboliche o lattiche sintomatiche, specialmente quando complicate da neuropatia

periferica.

I PDRN in combinazione con un sale di sodio unitamente ad un sale di potassio, preferibilmente sodio citrato e/o potassio citrato, svolgono *in vivo* un'azione sinergica e terapeutica di riduzione, contenimento e neutralizzazione dell'accumulo di lattato a livello gastroenterico ed *in vitro* inducono un effetto anti-apoptotico/anti-citopatico, nel trattamento di stati acidotici, di acidosi metabolica, di acidosi lattica, particolarmente in corso di acidosi grave cronica o acuta e semplice o complicata.

Le composizioni dell'invenzione presentano un'attività rigenerante di cellule e tessuti tali da consentire, *in vitro*, il mantenimento di cellule primarie o di linee cellulari e di biopsie tissutali in coltura in condizioni vitali ottimali, inducendone la rigenerazione.

I risultati istologici ottenuti *in vitro* dopo trattamento con le composizioni dell'invenzione confermano l'induzione di una rigenerazione e ritrofizzazione di cellule e tessuti, che si presentano morfologicamente comparabili ai tessuti integri *in vivo* e con caratteristiche isto-funzionali ottimali (vedere Esempio 1).

Il trattamento *in vitro* di tessuto biotico com-

promesso da elevata acidità del terreno colturale con le composizioni dell'invenzione risulta in una sorprendente riparazione dei danni ed in un totale recupero del trofismo originario. Tutti i tessuti rappresentati nei campioni biotici trattati sono soggetti ad una rigenerazione completa, funzionale e morfologica, conseguente ad una possibile assenza o ridotta presenza dei processi di degenerazione.

I risultati emato-chimici (emocromo, EGA venoso, lattacidemia, calcemia, fosfasi alcalina, LDH, CPK, INR) ottenuti *in vivo* a Tempo zero versus Tempo 7 giorni, Tempo 15 giorni, Tempo 30 giorni di trattamento con le composizioni oggetto della presente invenzione e le sue formulazioni combinate (vedere la sezione relativa agli studi clinici), confermano l'induzione verso il recupero funzionale ottimale o il recupero funzionale completo, in dipendenza della gravità dello stato di acidosi ad inizio trattamento.

Le tabelle che seguono, che sono fornite a scopo puramente illustrativo e non limitativo, rappresentano forme di realizzazione specifiche delle composizioni dell'invenzione, ciascuna specificamente progettata per un particolare tipo di applicazione favorente il recupero funzionale in corso di trattamento di stati acidotici acuti o cronici.

Le composizioni fornite nelle tabelle possono essere modificate sia nelle quantità sia negli ingredienti, secondo quanto indicato nelle rivendicazioni, senza per questo uscire dalla portata dell'invenzione.

Senza volersi vincolare ad alcuna teoria specifica al riguardo, i presenti inventori ritengono che i risultati ottenuti con la presente invenzione dimostrino che lo stato di acidosi è recuperabile. L'acidosi in genere, acuta o cronica, metabolica, lattica, iniziale o complicata da gravi disfunzioni degenerative, si è dimostrata trattabile con i PDNR e le composizioni oggetto dell'invenzione.

Esempi di composizioni

1) Formulazione di PDNR per somministrazione orale

Composizione anti-acidosica con effetto vasculo-protettore, anti aggregante anti-ischemico, anti-trombotico, osteo-protettore, anti-ossidante.

Sostanza	Concentrazione
PDNR	100 mg/g
Eccipienti	q.b. per 1 g di composizione finale

1-bis) Formulazione di PDNR per colture cellulari e tissutali

Composizione anti-acidosica con effetto anti-ossidante ed anti-apoptotico

Sostanza	Concentrazione
PDNR	5 mg/500 ml
Terreno colturale completo	q.b. per 500 ml di soluzione

2) Formulazione di PDNR e una metilammide, per somministrazione orale

Composizione anti-acidosica con effetto anti-ossidante, anti-miastenico, anti-miopatico.

Sostanza	Concentrazione
PDNR	100 mg/g
L-carnitina	424 mg/g
Eccipienti	q.b. per 1 g di composizione finale

2-bis) Formulazione di PDNR e una metilammide, per colture cellulari e tissutali

Composizione anti-acidosica con effetto anti-ossidante ed eutrofizzante.

Sostanza	Concentrazione
PDNR	5 mg/500 ml
L-carnitina	25 mg/500 ml

Terreno colturale completo	q.b. per 500 ml di soluzione
----------------------------	------------------------------

3) Formulazione di PDNR, metilammide e un sale di calcio per somministrazione orale

Composizione anti-acidosica con effetto anti-demineralizzante, anti-osteomalacico.

Sostanza	Concentrazione
PDNR	100 mg/g
L-carnitina	424 mg/g
Calcio carbonato	150 mg/g
Eccipienti	q.b. per 1 g di composizione finale

3-bis) Formulazione di PDNR, metilammide e un sale di calcio, per colture cellulari e tissutali

Composizione anti-acidosica con effetto riequilibrante calcico

Sostanza	Concentrazione
PDNR	5 mg/500 ml
L-carnitina	25 mg/500 ml
Calcio carbonato	20 mg/500 ml
Terreno colturale completo	q.b. per 500 ml di soluzione

4) Formulazione di PDNR, metilammide e una vitamina del gruppo D per somministrazione orale

Composizione anti-acidosica con effetto anti-demineralizzante, anti-osteoporotico.

Sostanza	Concentrazione
PDNR	100 mg/g
L-carnitina	424 mg/g
Calcitriolo	0,5 µg/g
Eccipienti	q.b. per 1 g di composizione finale

4-bis) Formulazione di PDNR, metilammide e una vitamina del gruppo D, per colture cellulari e tissutali

Composizione anti-acidosica con effetto correttore dei malassorbimento calcici.

Sostanza	Concentrazione
PDNR	5 mg/500 ml
L-carnitina	25 mg/500 ml
Calcitriolo	0,25 µg/500 ml
Terreno colturale completo	q.b. per 500 ml di soluzione

5) Formulazione di PDNR, metilammide e una vitamina

del gruppo B per somministrazione orale.

Composizione anti-acidosica con effetto anti-ossidante, anti-neuropatico.

Sostanza	Concentrazione
PDNR	100 mg/g
L-carnitina	424 mg/g
Ribloflavina (vitamina B2)	100 mg/g
Eccipienti	q.b. per 1 g di composizione finale

5-bis) Formulazione di PDNR, metilammide e una vitamina del gruppo B, per colture cellulari e tissutali.

Composizione anti-acidosica con effetto antiossidante e pro-differenziante.

Sostanza	Concentrazione
PDNR	5 mg/500 ml
L-carnitina	25 mg/500 ml
ribloflavina (vitamina B2)	10 mg/500 ml
Terreno colturale completo	q.b. per 500 ml di soluzione

6) Formulazione di PDNR, metilammide e sale di sodio unitamente ad un sale di potassio per somministrazione orale

Composizione anti-acidosica con effetto anti-ossidante, anti-lattacidemico.

Sostanza	Concentrazione
PDNR	100 mg/g
L-carnitina	424 mg/g
sodio citrato	200 mg/g
potassio citrato	25 mg/g
Eccipienti	q.b. per 1 g di composizione finale

6-bis) Formulazione di PDNR, metilammide e sale di sodio unitamente ad un sale di potassio, per colture cellulari e tissutali.

Composizione anti-acidosica con effetto antiossidante e anti-lattacidemico.

Sostanza	Concentrazione
PDNR	5 mg/500 ml
L-carnitina	25 mg/500 ml
sodio citrato	20 mg/500 ml
potassio citrato	2,5 mg/500 ml

Terreno colturale completo	q.b. per 500 ml di soluzione
----------------------------	------------------------------

7) Formulazione di PDNR, metilammide, sale di calcio, vitamina del gruppo D, vitamina del gruppo B, sale di sodio unitamente ad un sale di potassio, somministrazione per via orale

Composizione per stati acidotico in fase acuta o cronica, con lattacidemia elevata.

Sostanza	Concentrazione
PDNR	100 mg/g
L-carnitina	424 mg/g
Calcio carbonato	150 mg/g
Calcitriolo	0,5 µg/g
riboflavina (vitamina B2)	100 mg/g
sodio citrato	200 mg/g
potassio citrato	25 mg/g
Eccipienti	q.b. per 1 g di composizione finale

7-bis) Formulazione di PDNR, metilammide, sale di calcio, vitamina del gruppo D, vitamina del gruppo B, sale di sodio unitamente ad un sale di potassio,

per colture cellulari e tissutali

Composizione per stati acidotici gravi con lattacidemia elevata.

Sostanza	Concentrazione
PDNR	5 mg/500 ml
L-carnitina	50 mg/500 ml
Calcio carbonato	20 mg/500 ml
Calcitriolo	0,25 µg/500 ml
riboflavina (vitamina B2)	10 mg/500 ml
sodio citrato	20 mg/500 ml
potassio citrato	2,5 mg/500 ml
Terreno completo colturale	q.b. per 500 ml di soluzione

Si deve comprendere che le formulazioni specificamente illustrate nelle tabelle di cui sopra costituiscono esempi non limitativi di forme di realizzazione specifiche della presente invenzione.

Nell'ambito della presente invenzione, i PDNR, opzionalmente in combinazione con una metilammide e con gli ulteriori ingredienti facoltativi precedentemente menzionati, possono essere efficacemente impiegati in un ampio intervallo di concentrazioni,

come definito nelle annesse rivendicazioni.

I PDRN e le composizioni dell'invenzione possono essere formulati in formulazioni solide o liquide, per uso *in vivo* o *in vitro*.

Per uso *in vivo* si intende l'uso come farmaco, medical device o integratore alimentare.

Le formulazioni solide per uso *in vivo* sono ad esempio compresse, pasticche, supposte, polveri, granulati, etc.; esse comprendono, oltre al principio attivo (o ai principi attivi), eccipienti fisiologicamente e/o farmaceuticamente accettabili convenzionali, la cui scelta e il cui impiego rientrano nelle capacità del tecnico medio del settore.

Le formulazioni liquide per uso *in vivo* sono ad esempio soluzioni o sospensioni da somministrarsi per via iniettiva; oltre al principio attivo (o ai principi attivi) sopra descritti, esse comprendono solventi fisiologicamente e/o farmaceuticamente accettabili convenzionali, come ad esempio soluzioni saline isotoniche.

Le formulazioni solide e liquide per uso *in vivo* sono generalmente somministrate da 1 a 5 volte al dì a seconda della gravità dello stato acidotico da trattare.

Le formulazioni per uso *in vitro* sono general-

mente liquide e sono generalmente formulate come terreni di coltura cellulare e/o tessutale; esse comprendono, oltre al mezzo liquido fisiologicamente accettabile, anche gli usuali componenti dei terreni di coltura *in vitro* di cellule eucariotiche o tessuti, quali ad esempio aminoacidi, zuccheri, sali, vitamine, etc.

Razionale di composizione

La presente invenzione si fonda sull'osservazione di una particolare azione anti-acidosica esercitata di PDRN estratti da fonti naturali e/o sintetiche, da soli o in combinazione con metilammide ed eventualmente un sale di calcio, una vitamina, preferibilmente del gruppo D o B o loro derivati, ed un sale di sodio unitamente ad un sale di potassio, preferibilmente sodio citrato e/o potassio.

I PoliDesossiRiboNucleotidi (PDRN), derivanti dalla degradazione degli acidi nucleici, sono molecole ottimamente tollerate che entrano nel fisiologico catabolismo degli acidi nucleici. E' noto che i polinucleotidi esercitano nei tessuti lesi un fisiologico stimolo alla proliferazione cellulare e alla riparazione dei tessuti. E' noto inoltre che i derivati della degradazione enzimatica delle catene po-

linucleotidiche (nucleotidi semplici, nucleosidi, basi azotate) sono fisiologicamente presenti nell'ambiente extracellulare e sono utili substrati trofici per favorire la rigenerazione e l'attività metabolica delle cellule. In vivo, i polinucleotidi ed i nucleotidi sono utilizzati a livello tissutale sia per migliorare l'attività cellulare sia per proteggere e promuovere i meccanismi di riparazione e rigenerazione fisiologici.

Le metilammidi, ed in particolare le attività più conosciute della carnitina e dei suoi sali ed esteri sono la beta-ossidazione mitocondriale degli acidi grassi a lunga catena (dal punto di vista biochimico la carnitina svolge le proprie funzioni partecipando ad un complesso meccanismo chiamato carnitina acil-CoA transferasi) e la regolazione dell'utilizzo del glucosio. La carnitina e i suoi esteri intervengono determinando la stabilizzazione delle membrane cellulari e mitocondriali, elemento essenziale ai fini dei processi di riparazione cellulare e per la funzionalità della cellula stessa. Ai processi degenerativi pro-acidosici, si sovrappongono ulteriori fattori aggravanti endogeni quali la produzione di radicali liberi dell'ossigeno. La capacità ottimale di reazione cellulare a stimoli nocivi

passa attraverso il mantenimento della produzione energetica e del bilanciamento osmotico. La carnitina è coinvolta nel metabolismo intermedio dei lipidi e dei carboidrati, essenziale per la funzione cellulare.

La metilammide è scelta nel gruppo che consiste di carnitina, L-carnitina, acetilcarnitina, L-acetilcarnitina, acil-carnitina, levocarnitina, o loro derivati.

Gli ioni calcio ed i sali di calcio contribuiscono alla normalizzazione del microambiente locale, promuovendo un ideale scambio ionico sodio-calcio e favorendo la correzione della concentrazione elettrolitica alterata a valori fisiologici: essi sostengono un ruolo ausiliario nel consolidamento dal punto di vista osmotico, di viscosità e di pH del microambiente extracellulare in cui cute e sottocute vivono. Inoltre, ripristinando un microambiente fisiologico è possibile favorire l'attivazione nell'organismo di due meccanismi riparativi: il richiamo delle cellule staminali dal torrente circolatorio ed una accelerata specializzazione delle cellule staminali residenziali nella pelle verso un rapido differenziamento in cellule mature destinate a ripristinare i tessuti danneggiati. In

corso di acidosi metabolica, si verifica una progressiva perdita di calcio e sodio da parte dell'osso con incremento dell'ingresso di H^+ con una riduzione nel contenuto di carbonato che può, a lungo termine, condurre ad una grave carenza. La perdita di $CaCO_3$ da parte dell'osso ha un ruolo determinante nella comparsa dell'osteomalacia sia nei pazienti in insufficienza renale cronica che in quelli con funzione renale conservata. Appare chiara l'importanza di ripristinare il comparto calcico fisiologico, in corso di acidosi acuta e cronica.

Il sale di calcio è scelto nel gruppo che consiste di calcio citrato, monocalcio citrato, tricalcio citrato, calcio carbonato, calcio fosfato bibasico, calcio dicitrato, calcio dicitrato di tricalcio tetraidrato, calcio cloruro, calcio gluconato, calcio fosfato, calcio nitrato, o loro derivati.

Le vitamine del gruppo D e del gruppo B potenziano una nutrizione corretta dei tessuti, portando al graduale ripristino fisiologico del microambiente fisiologico (ripristino del corretto pH e potere antiossidante, correzione dell'assorbimento elettrolitico). Inoltre, più in generale, le vitamine nell'organismo svolgono numerose funzioni biologiche relative al complesso processo del differenziamento

cellulare.

La vitamina del gruppo D è scelta nel gruppo che consiste di calciferolo, ergocalciferolo e lumisterolo, colecalciferolo, diidroergocalciferolo, sitocalciferolo, calcitriolo, calcifediolo, o loro derivati.

La vitamina del gruppo B è scelta nel gruppo che consiste di preferibilmente tiamina (vitamina B1) e/o ribloflavina (vitamina B2) e/o niacina, acido nicotinico o nicotinamide (vitamina B3) e/o adenina (vitamina B4 o fattore vitaminoide) e/o acido pantotico, pantenolo, pantetina (vitamina B5) e/o piridossamina, piridossina e piridossale (vitamina B6), o loro derivati.

La carenza nella nostra dieta di componenti basici (presenti come sali organici di potassio e magnesio nei vegetali, che venivano copiosamente consumati dai nostri antenati) e la loro sostituzione con il sale (sodio cloruro, pressoché assente nei vegetali ed usato a sproposito nell'attuale alimentazione) non permette di neutralizzare il "carico acido" prodotto dai cibi acidogeni, cioè che producono nell'organismo acidi derivanti dal metabolismo di zolfo, fosforo e cloro. Si instaura così uno stato di "acidosi metabolica cronica latente", che ten-

de ad aumentare con l'avanzare dell'età, in conseguenza del fisiologico declino della funzione renale (essenziale per il mantenimento dell'equilibrio acido-base dell'organismo). L'equilibrio acido-base è di grande importanza per la struttura e la funzione delle proteine, la permeabilità delle membrane cellulari, la distribuzione degli elettroliti. L'organismo dispone di diversi sistemi per regolare tale equilibrio, basati sul potere tampone del sangue e dei liquidi intra- ed extra-cellulari, sullo scambio di gas a livello polmonare e sulla secrezione renale. Si consideri il sangue: il suo pH oscilla tra valori molto ristretti (7,37 e 7,43); per mantenere costanti tali valori , interviene in prima linea il bicarbonato, seguito dall'emoglobina, dalle proteine plasmatiche e dal fosfato. Questo insieme di tamponi è molto efficiente e consente una rapida e costante regolazione del pH del sangue. L'eliminazione dell'anidride carbonica attraverso i polmoni permette di evitare una diminuzione del pH del sangue; eguale risultato si ha con la secrezione nell'urina di protoni (H^+) derivanti dalla degradazione di diversi metaboliti. Ai fini di una efficiente neutralizzazione dei protoni, rivestono una particolare importanza i sali organici (come il citrato) di mi-

nerali ed oligo-elementi. Questi sali si dissociano liberando anioni organici (citrato). Gli anioni - in relazione alla costante di dissociazione dei corrispondenti acidi - associano protoni, dando luogo ad acidi, che vengono successivamente trasformati in anidride carbonica ed acqua. Il catione viene, invece, riassorbito a livello renale (scambio con altri protoni), il che si traduce in una ulteriore eliminazione di acidità.

Un sale di sodio unitamente ad un sale di potassio è scelto dal gruppo che consiste di sodio citrato e/o potassio citrato, monosodio citrato e/o monopotassio citrato, disodio citrato, trisodio citrato e/o tripotassio citrato, sodio carbonato e/o potassio carbonato, sodio bicarbonato e/o potassio bicarbonato, sodio solfato e/o potassio solfato, sodio bisolfato e/o potassio bisolfato, sodio cloruro e/o potassio cloruro, sodio tartrato e/o potassio tartrato, sodio fosfato e/o potassio fosfato, disodio inosinato e/o dipotassio inosinato, sodio ascorbato e/o potassio ascorbato, sodio nitrato e/o potassio nitrato, o loro derivati.

Le composizioni cosmetiche, farmaceutiche, di integratori alimentari, del tipo medical device e terreni di coltura oggetto della presente invenzione

possono inoltre comprendere ulteriori elementi accessori quali eccipienti e veicoli, la cui scelta e il cui impiego rientrano nelle capacità del tecnico medio del settore senza che ciò richieda l'esercizio di alcuna attività inventiva.

Anche i mezzi di coltura oggetto dell'invenzione possono comprendere ulteriori ingredienti, quali ad esempio gli usuali sali inorganici, zuccheri, peptidi, aminoacidi e vitamine necessari per il mantenimento e/o la crescita in coltura di cellule di mammifero, nonché gli eventuali agenti antibiotici e/o antimicrobici necessari ad evitare contaminazioni delle colture.

Tra gli aminoacidi che possono essere presenti nelle composizioni dell'invenzione citiamo a titolo esemplificativo metionina, cistina, N-acetilcisteina, cisteina, glicina, leucina, isoleucina, prolina, glutamina, arginina, acido glutamico, istidina, istidina-HCl, lisina, lisina-HCl, fenilalanina, serina, treonina, triptofano, tirosina, tirosina-sale disodico, valina, prolina, idrossiprolina. Tali aminoacidi spesso sono utilizzati in miscele comprendenti un numero elevato di differenti aminoacidi. Oltre agli aminoacidi le composizioni dell'invenzione possono anche comprendere peptidi e

proteine, quali glutathione, collagene, elastina, estratto di frumento, e simili.

Esempi di soluzioni per coltura cellulare sono ad esempio RPMI 1640 (terreno per colture cellulari), DMEM-LG (terreno per colture cellulari), AIM-V (terreno per colture cellulari), D-MEM modificato ad alta concentrazione di glucosio (terreno per colture cellulari), EBM (terreno per colture cellulari), albumina umana, FBS (siero bovino fetale per colture cellulari), F12 (soluzione per colture cellulari contenente una fonte aminoacidica completa), soluzione di HANK (soluzione per colture cellulari contenente bicarbonato di sodio).

Infine, nella categoria degli antibiotici e antimicrobici citiamo a titolo esemplificativo gentamicina, penicillina, streptomina, ciprofloxacina, levofloxacina, metronidazolo, clorexidina; amfotericina B, fluconazolo, itraconazolo, antimicotici triazoliici, argento (ha un'attività batteriostatica).

ESEMPIO 1. Colture cellulari, Biopsie e soluzioni-prototipo

Colture cellulari in studio

I campioni biotici in studio sono elencati di seguito:

- Linea cellulare monocitoide THP-1;

- Cellule epatiche primarie canine;

Biopsie

I campioni biotici in studio sono elencati di seguito:

- biopsie epatiche canine;
- biopsie stromali ovine.

Tutti i campioni sono stati lavati tre volte con soluzione fisiologica ed antibiotici (100 unità/ml di penicillina + 100 ug/ml streptomicina + 40 mg/L gentamicina, fluconazolo 0,2 mg/ml) per 10 min a temperatura ambiente.

Le cellule sono state suddivise in nove aliquote (due controlli e sette campione da trattarsi per ciascun paziente) e sospese ciascuna ad una concentrazione di 250×10^3 cellule/ml in una soluzione di controllo (testata in doppio) o nelle soluzioni 1-bis, 2-bis, 3-bis, 4-bis, 5-bis, 6-bis e 7-bis, dentro piastre da 24 pozzetti (Lab-Tek chamber slides, Nunc, Kamstrup, Danimarca) ad un volume finale di 2 ml/pozzetto, per consentire la traspirazione fisiologica.

Le biopsie sono quindi state sezionate in nove parti (due controlli e sette campione da trattarsi per ciascun paziente) e sospese ciascuna in 4 ml di una soluzione di controllo (testata in doppio) o

nelle soluzioni 1-bis, 2-bis, 3-bis, 4-bis, 5-bis, 6-bis e 7-bis, dentro piastre (Lab-Tek chamber slides, Nunc, Kamstrup, Danimarca) di 15-cm di diametro, per consentire la traspirazione fisiologica.

1. I Campioni di controllo sono quindi stati trattati con terreno D-MEM/F12 supplementato con:

10% FBS (Celbio, Milano, Italia)

100 unità/ml di penicillina

100 ug/ml streptomicina

160 mg/L gentamicina (Schering-Plough, Milano, Italia)

0,2 mg/ml fluconazolo (Pfizer Italia S.r.l.),

2 mM L-glutamina (Life Technologies; growth medium).

Al terreno di coltura di controllo si sono addizionate le condizioni come descritte nelle tabelle 1-bis, 2-bis, 3-bis, 4-bis, 5-bis, 6-bis e 7-bis. Nessun apporto o sostituzione di terreno colturale fresco è stato effettuato durante l'incubazione sperimentale.

Tutti i campioni sono stati posti in un incubatore Heraeus termostaticamente controllato alla temperatura di 37°C con una atmosfera contenente l'8% di apporto costante di CO₂ (v/v in aria).

Ogni 48 ore per 10 giorni, si è valutata l'acidificazione dei terreni colturali sottoposti

alle diverse condizioni testate in rapporto con gli indici di vitalità cellulare e tissutale.

Protocollo di colorazione

Culture cellulari - Colorazione con Trypan Blue.

Il Trypan Blue è un colorante in grado di colorare selettivamente le cellule morte, per l'estrema selettività della membrana cellulare. Le cellule vitali, avendo la membrana intatta, non permettono la penetrazione di questo colorante nel citoplasma; al contrario, nelle cellule morte il Trypan Blue penetra facilmente, rendendole distinguibili dalle vive con una rapida analisi al microscopio. Il Trypan Blue non è in grado di rendere riconoscibili le cellule apoptotiche dalle cellule necrotiche. Le sospensioni cellulari vengono incubate con il 5% di Trypan Blue per 5 minuti a temperatura ambiente; allo scadere dell'incubazione si prelevano 10microlitri di tale soluzione cellulare colorata e si depongono in camera per conteggio cellulare (ad es. camera di Burker) e si esegue una attenta osservazione al microscopio ottico con ingrandimenti in sequenza 20X, 40X. Si procede dunque al conteggio delle cellule vive e delle cellule morte rapportato ad un ml di volume finale, ripetendo il conteggio per cinque volte ed ottenendo il valore medio risul-

tate dalle cinque determinazioni. Le cellule morte devono apparire intensamente colorate di blue, le cellule vitali non devono essere blue.

Biopsie - Colorazione con ematossilina-eosina.

È la colorazione di base nello studio microscopico dei tessuti animali e ne consente un migliore studio morfologico al microscopio ottico. Colora in blu, grazie alla ematossilina o emallume di Mayer, le componenti cellulari cariche negativamente come acidi nucleici, proteine di membrana e membrane cellulari, elastina che sono quindi detti basofili. Colora in rosso tramite la eosina, i componenti carichi positivamente (acidi) come proteine cellulari in alcune cellule (eosinofili) e fibre collagene che sono quindi detti acidofili.

Risultati

ESEMPIO 1. Microscopia ottica

In tutti i Controlli, testati a 48, 96, 192, 240, 288 ore di incubazione, senza alcuna sostituzione di terreno culturale mostravano, dopo colorazione con Trypan Blue per le colture cellulari e con ematossilina-eosina per i tessuti, si registrava un progressivo aumento dell'indice di mortalità cellulare e di degradazione tissutale, dopo 192 ore di incubazione.

I campioni mostravano un diffuso eutrofismo con una morfologia specifica e con una vitalità quantificabile fra il 70% ed il 100% per ogni tipologia cellulare testata, sino al termine dell'incubazione (ora 288) ed a tutte le condizioni colturali come descritte nelle tabelle 1-bis, 2-bis, 3-bis, 4-bis, 5-bis, 6-bis e 7-bis.

Le biopsie-Campione, sottoposte alle condizioni colturali come descritte nelle tabelle 1-bis, 2-bis, 3-bis, 4-bis, 5-bis, 6-bis e 7-bis apparivano eutrofiche e sostanzialmente con una morfologia simile al tempo zero (T zero) sino al termine dell'incubazione (ora 288).

Al Tempo zero per monitorare lo stato del terreno colturale di base si è utilizzato l'indicatore rosso fenolo. Il terreno di base appariva di colore rosso = normale: pH 7,2-7,4.

I risultati hanno evidenziato come l'uso delle condizioni colturali addizionali, come descritte nelle tabelle 1-bis, 2-bis, 3-bis, 4-bis, 5-bis, 6-bis e 7-bis, rallentava notevolmente l'acidificazione dei terreni colturali di base in tutti i campioni testati (ora 288, indicatore al rosso fenolo virava lievemente al rosa chiaro, pH 7,0-7,1).

In parallelo, l'indice di mortalità cellulare e le atipie morfologiche tissutali non subivano particolari incrementi sino al termine dell'incubazione sperimentale (ora 288: indice di vitalità cellulare del 70-72% ed indice di mortalità cellulare del 30-28%, valori mediani di tutti i campioni cellulari testati; lieve ipocromia tissutale di tutti i campioni biotici in studio con conservazione della morfologia originaria).

Per contro, tutti i controlli testati hanno evidenziato come l'uso del solo terreno colturale, privo di addizioni con effetto anti-acidosico, mostrasse una lieve acidificazione del surnatante a partire dall'ora 48 (ora 48, l'indicatore al rosso fenolo virava al rosa chiaro pH 7,0-7,1), con una diminuzione progressiva del pH (ora 288, indicatore al rosso fenolo virava lievemente al giallo limone, pH 5,08-6,0); in parallelo l'indice di mortalità cellulare e le atipie morfologiche tissutali subivano un aumento costante sino al termine dell'incubazione sperimentale (ora 288: indice di vitalità cellulare del 4-8% ed indice di mortalità cellulare del 92-96%, valori mediani di tutti i controlli cellulari testati; sfaldamento con degradazione tissutale di tutti i controlli biotici in studio).

Caratterizzazione di colture cellulari trattate con
1-bis, 2-bis, 3-bis, 4-bis, 5-bis, 6-bis e 7-bis
versus controlli non- trattati

Dal Tempo Zero al Tempo 288 ore le colture non hanno subito cambi di terreni.

I risultati relativi all'espressione di Vitalità (V) / Mortalità (M) sono stati espressi con una scala quantitativa in valore percentuale mediano (Colorazione con Trypan Blue), come segue nelle Tabelle 1 e 2.

Tabella 1

Cronogramma		Colture cellulari Linea cellulare monocitoide THP-1																	
Incubazioni		Controlli				Campioni													
Condizioni		Ctrl-1		Ctrl-2		1-bis		2-bis		3-bis		4-bis		5-bis		6-bis		7-bis	
Vitalità (V%)	Mortalità (M%)	V %	M %	V %	M %	V %	M %	V %	M %	V %	M %	V %	M %	V %	M %	V %	M %	V %	M %
Tempo Zero		99%	1%	99%	1%	99%	1%	99%	1%	99%	1%	99%	1%	99%	1%	99%	1%	99%	1%
12 ore		98%	2%	99%	1%	99%	1%	99%	1%	98%	2%	97%	3%	98%	2%	99%	1%	99%	1%
24 ore		96%	4%	97%	3%	98%	2%	98%	2%	98%	2%	98%	2%	98%	2%	98%	2%	98%	2%
48 ore		82%	18%	80%	20%	98%	2%	98%	2%	98%	2%	98%	2%	98%	2%	98%	2%	98%	2%
96 ore		70%	30%	73%	27%	90%	10%	92%	8%	89%	11%	90%	10%	90%	10%	91%	9%	92%	8%
192 ore		50%	50%	43%	57%	80%	20%	82%	18%	85%	15%	85%	15%	87%	13%	87%	13%	89%	11%
240 ore		20%	80%	13%	87%	78%	22%	78%	22%	71%	29%	77%	23%	80%	20%	84%	16%	87%	13%
288 ore		8%	92%	8%	92%	60%	40%	65%	35%	72%	28%	71%	29%	72%	28%	80%	20%	82%	18%

Legenda

Vitalità = assenza di colore blue alla Colorazione con Trypan Blue

Mortalità = presenza di colore blue alla Colorazione con Trypan Blue

zione con Trypan Blue

Vitalità % = valore mediano percentuale di cellule vive per ml

Mortalità % = valore mediano percentuale di cellule morte per ml

Tabella 2

Cronogramma		Colture cellulari																	
		Cellule epatiche primarie canine																	
Incubazioni		Controlli				Campioni													
Condizioni		Ctrl-1		Ctrl-2		1-bis		2-bis		3-bis		4-bis		5-bis		6-bis		7-bis	
Vitalità (V%)	Mortalità (M%)	V %	M %	V %	M %	V %	M %	V %	M %	V %	M %	V %	M %	V %	M %	V %	M %	V %	M %
Tempo Zero		88%	12%	88%	12%	88%	12%	88%	12%	88%	12%	88%	12%	88%	12%	88%	12%	88%	12%
12 ore		78%	22%	87%	13%	88%	12%	87%	13%	88%	12%	87%	13%	89%	11%	89%	11%	89%	11%
24 ore		75%	25%	77%	23%	90%	10%	92%	8%	89%	11%	88%	12%	91%	9%	93%	7%	92%	8%
48 ore		62%	38%	60%	40%	90%	10%	94%	6%	93%	7%	93%	7%	90%	10%	92%	8%	92%	8%
96 ore		40%	60%	53%	47%	82%	18%	85%	15%	81%	19%	82%	18%	86%	14%	90%	10%	94%	6%
192 ore		32%	68%	40%	60%	77%	23%	78%	22%	80%	20%	80%	20%	82%	22%	88%	12%	89%	11%
240 ore		18%	82%	23%	77%	72%	28%	72%	28%	74%	26%	73%	27%	77%	23%	83%	27%	83%	17%
288 ore		2%	96%	6%	96%	62%	38%	69%	31%	70%	30%	70%	30%	74%	26%	77%	23%	78%	22%

Legenda

Vitalità = assenza di colore blue alla Colorazione con Trypan Blue

Mortalità = presenza di colore blue alla Colorazione con Trypan Blue

Vitalità % = valore medio percentuale di cellule vive per ml

Mortalità % = valore medio percentuale di cellule morte per ml

ESEMPIO 2. IN VIVO

Terapia anti-acidosica di salvataggio.

Precisazioni:

L'equilibrio acido basico è regolato dal sistema respiratorio e dal rene.

Bastano pochi minuti perché il paziente possa ventilare più o meno velocemente, causando una diminuzione od un aumento della PCO_2 e, quindi, una variazione di pH, rispettivamente in basso o in alto. Il rene necessita invece di 24-48 ore per assorbire od eliminare lo ione bicarbonato, causando, anch'esso rispettivamente, un aumento o una diminuzione di pH per compensare lo stato acidotico o alcalotico. La variazione in basso del pH è detta acidotico (sotto 7,35) la variazione del pH in alto è detta alcalotico (sopra 7,45). L'acidotico e l'alcalotico sono respiratorie o metaboliche a seconda del meccanismo da cui dipendono. L'acidotico metabolico nel piccolo animale, e nei mammiferi in genere, è causata da:

una eccessiva produzione di acidi (chetoacidotico diabetico, esercizio fisico: lattacidotico);

una perdita di ioni bicarbonato (diarrea, insufficienza renale e da insufficiente riassorbimento renale di bicarbonato).

L'alimentazione del cane e del gatto è spesso

carente di enzimi, presenti negli alimenti non trattati con il calore. In mancanza di questi enzimi, i processi digestivi ed di assimilazione richiedono uno stress a carico di pancreas, fegato ed intestino ed un eccesso di scorie che sovraccaricano il rene. Il pH delle urine nei carnivori deve essere acido, con un valore di pH fra 5,5 - 6,0. Una maggiore acidità delle urine può esitare da stati febbrili, da digiuno prolungato, diabete mellito o acidosi metabolica e respiratoria. Con il tempo, gli organi sovraccarichi diventano funzionalmente insufficienti e favoriscono l'accumulo di cataboliti e di acidi, predisponendo all'insorgenza di stati acidotici gravi e delle loro conseguenze. In genere nell'animale e nei mammiferi, l'anaerobiosi (la mancanza di ossigeno) e l'acidosi tessutale costituiscono due fattori favorenti la cancerogenesi.

L'acidosi del sangue può creare una forza elettrostatica intorno alla membrana cellulare che provoca un impilamento dei globuli rossi nei capillari, impedendone la corretta circolazione. I tessuti poco irrorati non permettono il corretto intervento delle cellule immunitarie nella rimozione delle cellule degenerate.

Studio in regime compassionevole

In due casi umani è stata somministrata la terapia anti-acidosica di salvataggio. Sono stati trattati:

- due casi umani (maschi) affetti da diabete mellito insulino-dipendente (IDDM) scompensato.

Al fine valutare la tollerabilità e l'efficacia terapeutica anti-acidosica, in regime compassionevole sono stati trattati:

- ventotto animali (dodici cani e dodici gatti di razze e taglie diverse e quattro pecore) che presentavano stati acidotici gravi (acidosi metabolica, acidosi lattica e loro complicanze) ascrivibili a esiti di patologie differenti (per le pecore intossicazione alimentare da rame; per tutti: diarrea cronica, aumentata produzione di acidi fissi quali acido lattico e chetoacidi, ipoadrenocorticism, diabete scompensato, tossicità farmacologica, neoplasie, crisi convulsive, encefalopatia epatica, epatopatie, tiroiditi, malattie infettive, reazione metaboliche acute post-traumatiche, dismetabolismi del calcio, avvelenamenti da glicole etilenico o salicilati, stati di tossicità metabolica in genere, stati dismetabolici in genere, insufficienza renale cronica, squilibri elettrolitici, cardiopatie e miopatie in genere, dispnea, somministrazione di inibi-

tori anidraasi carbonica). Alla visita d'inclusione i soggetti selezionati presentavano le condizioni sopra indicate.

Monitoraggio

Esami emato-chimici: lattacidemia, emocromo + formula leucocitaria, glicemia, creatininemia, azotemia, amilasemia, LDH, CK, cloremia, potassiemia, sodiemia, magnesemia, calcemia, EGA venoso, esame urine completo. Esami strumentali: ECG, RX torace. Le visite cliniche di controllo avvenivano bi-settimanalmente sino a risoluzione della patologia.

Uomo

Acidosi metabolica ed acidosi lattica.

Iper-lattacidemia spiccata in entrambi i casi (lattacidemia valore normale < 2.5 mmol/l; caso 1, lattacidemia 5 mmol/l; caso 2: lattacidemia 9 mmol/l).

Al termine del primo ciclo terapeutico (sette giorni di somministrazione orale) tutti i parametri patologici erano rientrati negli intervalli di norma fisiologici (lattacidemia nel caso 1: 1,3 mmol/l e nel caso 2: 2,0 mmol/l; lattacidemia vn < 2.5 mmol/l).

Cani

Stati di acidosi metabolica post-convulsiva.

Al termine del primo ciclo terapeutico (sette giorni di somministrazione orale) tutti i parametri patologici erano rientrati negli intervalli di norma fisiologici.

Gatti

Stati di acidosi metabolica conseguenti ad insufficienze renali croniche.

Al termine dei primi due cicli terapeutici (quattordici giorni di somministrazione orale a concentrazioni pertinenti) tutti i parametri patologici erano rientrati negli intervalli di norma fisiologici.

Pecore

Sono state trattate pecore con intossicazione da rame. Al termine del primo ciclo terapeutico (sette giorni di somministrazione orale), unitamente alla somministrazione di zinco per chelare il rame in eccesso, tutti i parametri patologici rientravano negli intervalli di norma fisiologici.

Riferimenti

1. Muratore O et al. Evaluation of the trophic effect of human placental polydeoxyribonucleotide on human knee skin fibroblasts in primary culture. Cell Mol Life Sci. 1997 Mar; 53(3):279-85.
2. Wu S et al. Surrogate splicing for functional analysis of sesquiterpene synthase genes. Plant

Physiol. 2005 Jul; 138(3):1322-33.

3. Galeano M et al. Polydeoxyribonucleotide stimulates angiogenesis and wound healing in the genetically diabetic mouse. Wound Repair Regen. 2008 Mar-Apr; 16(2):208-17.

4. Cetingil AI et al. Heparin-like anticoagulant occurring in association with chronic nephritis. Br Med J. 1959 Jul 11; 2(5140):38-9.

5. Stella CC et al. Defibrotide in combination with granulocyte colony-stimulating factor significantly enhances the mobilization of primitive and committed peripheral blood progenitor cells in mice. Cancer Res. 2002 Nov 1; 62(21):6152-7.

6. Paul W et al. The effect of defibrotide on thromboembolism in the pulmonary vasculature of mice and rabbits and in the cerebral vasculature of rabbits. Br J Pharmacol. 1993 Dec; 110(4):1565-71.

7. Richardson PG et al. Treatment of severe veno-occlusive disease with defibrotide: compassionate use results in response without significant toxicity in a high-risk population. Blood. 1998 Aug 1; 92(3):737-44.

8. Guizzardi S et al. Polydeoxyribonucleotide (PDRN) promotes human osteoblast proliferation: a new proposal for bone tissue repair. Life Sci. 2003

Aug 29; 73(15):1973-83.

9. Coe FL et al. Evidence for secondary hyperparathyroidism in idiopathic hypercalciuria. J Clin Invest. 1973 Jan; 52(1):134-42.

10. Krieger NS et al. Acidosis inhibits osteoblastic and stimulates osteoclastic activity *in vitro*. Am J Physiol. 1992 Mar; 262(3 Pt 2):F442-8.

11. Bushinsky DA et al. Chronic acidosis-induced alteration in bone bicarbonate and phosphate. Am J Physiol Renal Physiol. 2003 Sep; 285(3):F532-9.

RIVENDICAZIONI

1. Polidesossiribonucleotidi (PDRN) per l'impiego come medicamento nel trattamento di una condizione di acidosi.
2. Polidesossiribonucleotidi (PDRN) secondo la rivendicazione 1, consistenti di una miscela di catene deossiribonucleotidiche aventi una distribuzione di pesi molecolari compresa fra 20 kDalton e 2500 kDalton, preferibilmente fra 70 kDalton e 240 kDalton.
3. Polidesossiribonucleotidi (PDRN) secondo la rivendicazione 2, in cui detta miscela di catene deossiribonucleotidiche è estratta da una fonte animale, preferibilmente sperma di pesce.
4. Polidesossiribonucleotidi (PDRN) secondo la rivendicazione 2 o 3, in cui detta miscela di catene deossiribonucleotidiche ha una purezza di almeno l'85%.
5. Polidesossiribonucleotidi (PDRN) secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 2 a 4, in cui dette catene deossiribonucleotidiche sono non codificanti.
6. Polidesossiribonucleotidi (PDRN) secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 5, in cui la condizione di acidosi è acidosi metabolica o acidosi lattica.
7. Polidesossiribonucleotidi (PDRN) secondo una

qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 6, in una formulazione idonea alla somministrazione parenterale o enterale, preferibilmente endovenosa, intramuscolare, infusione, orale, sub-linguale o rettale.

8. Impiego di polidesossiribonucleotidi (PDRN) come definiti in una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 5, per la preparazione di un medicamento per il trattamento di una condizione di acidosi preferibilmente scelta fra acidosi lattica ed acidosi metabolica, il medicamento essendo preferibilmente in una forma farmaceutica idonea per somministrazione parenterale o enterale, più preferibilmente endovenosa, intramuscolare, infusione, orale, sub-linguale o rettale.

9. Composizione comprendente polidesossiribonucleotidi (PDRN) come definiti in una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 5 ed almeno una metilammide, preferibilmente scelta nel gruppo che consiste di carnitina, un estere di carnitina, quale preferibilmente acetilcarnitina o propionilcarnitina, acilcarnitina, loro forme levogire e loro derivati semplici o complessati.

10. Composizione secondo la rivendicazione 9, in cui la composizione è in forma liquida e comprende i polidesossiribonucleotidi (PDRN) ad una concentrazione

di 0,001 a 50 mg/ml, preferibilmente di 0,01 a 20 mg/ml, od in cui la composizione è in una forma solida e comprende i polidesossiribonucleotidi (PDRN) ad una concentrazione di 5 a 500 mg/g, preferibilmente di 10 a 200 mg/g.

11. Composizione secondo la rivendicazione 9 o 10, in cui la composizione è in forma liquida e comprende la metilammide ad una concentrazione di 5 a 3000 mg/l, preferibilmente di 10 a 1500 mg/l, od in cui la composizione è in forma solida e comprende la metilammide ad una concentrazione di 100 a 5000 mg/g, preferibilmente di 200 a 3000 mg/g.

12. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 9 a 11, comprendente inoltre un sale di calcio, preferibilmente scelto nel gruppo che consiste di calcio carbonato, calcio gluconato, calcio lattato, calcio fosfato, calcio fosfato bibasico, calcio nitrato, calcio citrato, monocalcio citrato, tricalcio citrato, calcio dicitrato, dicitrato di tricalcio tetratridrato.

13. Composizione secondo la rivendicazione 12, in cui la composizione è in forma liquida e comprende il sale di calcio ad una concentrazione degli ioni calcio di 1-40 mM, preferibilmente di 3-25 mM, od in cui la composizione è in forma solida e comprende il

sale di calcio ad una concentrazione degli ioni calcio di 50 a 2000 mg/g.

14. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 9 a 13, comprendente inoltre almeno una vitamina, preferibilmente scelta fra una vitamina del gruppo D, una vitamina del gruppo B e loro derivati.

15. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 9 a 14, in cui la vitamina del gruppo D è scelta fra calciferolo, ergocalciferolo, lumisterolo, colecalciferolo, diidroergocalciferolo, sitocalciferolo, calcitriolo e calcifediolo.

16. Composizione secondo la rivendicazione 14 o 15, in cui la vitamina del gruppo B è scelta fra tiamina (vitamina B1), ribloflavina (vitamina B2), niacina, acido nicotinico, nicotinamide (vitamina B3), adenina (vitamina B4 o fattore vitaminoide), acido pantotenico, pantenolo, pantetina (vitamina B5), piridossamina, piridossina e piridossale (vitamina B6).

17. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 14 a 16, in cui la composizione è in forma liquida e comprende la vitamina del gruppo D ad una concentrazione di 0,1 a 10,0 µg/l, preferibilmente di 0,25 a 4,0 µg/l, od in cui la composizione è in forma solida e comprende la vitamina del gruppo D ad

una concentrazione di 0,1 a 10,0 µg/g, preferibilmente di 0,25 a 5,0 µg/g.

18. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 14 a 17, in cui la composizione è in forma liquida e comprende la vitamina del gruppo B ad una concentrazione di 1 a 1000 mg/l, preferibilmente di 10 a 500 mg/l, od in cui la composizione è in forma solida e comprende la vitamina del gruppo B ad una concentrazione di 1 a 1000 mg/g, preferibilmente di 10 a 500 mg/g.

19. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 9 a 18, comprendente inoltre una sale di potassio e/o un sale di sodio, preferibilmente scelti fra sodio citrato e/o potassio citrato, monosodio citrato e/o monopotassio citrato, disodio citrato, trisodio citrato e/o tripotassio citrato, sodio carbonato e/o potassio carbonato, sodio bicarbonato e/o potassio bicarbonato, sodio solfato e/o potassio solfato, sodio bisolfato e/o potassio bisolfato, sodio cloruro e/o potassio cloruro, sodio tartrato e/o potassio tartrato, sodio fosfato e/o potassio fosfato, disodio inosinato e/o dipotassio inosinato, sodio ascorbato e/o potassio ascorbato, sodio nitrato e/o potassio nitrato, o loro derivati.

20. Composizione secondo la rivendicazione 19, in

cui la composizione è in forma liquida e comprende il sale di potassio e/o il sale di sodio a una concentrazione ciascuno di 1 a 1000 mg/l, preferibilmente di 2 a 500 mg/l, od in cui la composizione è in una forma solida e comprende il sale di potassio e/o il sale di sodio a una concentrazione ciascuno di 5 a 7000 mg/g, preferibilmente di 10 a 3500 mg/g.

21. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 9 a 20, che è una composizione farmaceutica, un dispositivo medico o un integratore alimentare.

22. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 9 a 21, che è in una formulazione idonea alla somministrazione parenterale o enterale, preferibilmente endovenosa, intramuscolare, infusione, orale, sub-linguale o rettale.

23. Composizione secondo la rivendicazione 22, che è in forma di soluzione orale, gel orale, compressa, capsula, compressa effervescente, confetto, polvere, granulato, supposta, soluzione o sospensione iniettabile.

24. Uso di una composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 9 a 23, come coadiuvante di terreno di coltura, per cellule o tessuti *in vitro*.

25. Uso secondo la rivendicazione 24, in cui la com-

posizione comprende in aggiunta, in un veicolo fisiologicamente accettabile, gli usuali aminoacidi, zuccheri, sali e vitamine per colture in vitro di cellule o tessuti eucariotici.

CLAIMS

1. Polydeoxyribonucleotides (PDRN) for use as a medicament in the treatment of an acidosis condition.
2. Polydeoxyribonucleotides (PDRN) according to claim 1, consisting of a mixture of polydeoxyribonucleotide chains having a molecular weight distribution comprised between 20 kDalton and 2500 kDalton, preferably between 70 kDalton and 240 kDalton.
3. Polydeoxyribonucleotides (PDRN) according to claim 2, wherein said mixture of polydeoxyribonucleotide chains is extracted from an animal source, preferably fish sperm.
4. Polydeoxyribonucleotides (PDRN) according to claim 2 or 3, wherein said mixture of polydeoxyribonucleotide chains has a purity of at least 85%.
5. Polydeoxyribonucleotides (PDRN) according to any of claims 2 to 4, wherein said polydeoxyribonucleotide chains are non-coding.
6. Polydeoxyribonucleotides (PDRN) according to any of claims 1 to 5, wherein the acidosis condition is metabolic acidosis or lactic acidosis.
7. Polydeoxyribonucleotides (PDRN) according to any of claims 1 to 6, in a formulation suitable for parenteral or enteral, preferably intravenous, intramuscular, infusional, oral, sublingual or rectal ad-

ministration.

8. The use of polydeoxyribonucleotides (PDRN) as defined in any of claims 1 to 5, for the preparation of a medicament for the treatment of an acidosis condition preferably selected from lactic acidosis and metabolic acidosis, the medicament preferably being in a pharmaceutical form suitable for parenteral or enteral, more preferably intravenous, intramuscular, infusional, oral, sublingual or rectal administration.

9. A composition comprising polydeoxyribonucleotides (PDRN) as defined in any of claims 1 to 5 and at least a methylamide, preferably selected from the group consisting of carnitine, a carnitine ester, such as preferably acetylcarnitine or propionylcarnitine, acylcarnitine, L-isomers and simple or complexed derivatives thereof.

10. The composition according to claim 9, wherein the composition is in a liquid form and comprises the polydeoxyribonucleotides (PDRN) at a concentration of 0.001 to 50 mg/ml, preferably of 0.01 to 20 mg/ml, or wherein the composition is in a solid form and comprises the polydeoxyribonucleotides (PDRN) at a concentration of 5 to 500 mg/g, preferably of 10 to 200 mg/g.

11. The composition according to claim 9 or 10, wherein the composition is in a liquid form and comprises the methylamide at a concentration of 5 to 3000 mg/l, preferably of 10 to 1500 mg/l, or wherein the composition is in a solid form and comprises the methylamide at a concentration of 100 to 5000 mg/g, preferably of 200 to 3000 mg/g.

12. The composition according to any of claims 9 to 11, further comprising a calcium salt, preferably selected from the group consisting of calcium carbonate, calcium gluconate, calcium lactate, calcium phosphate, dibasic calcium phosphate, calcium nitrate, calcium citrate, monocalcium citrate, tricalcium citrate, calcium dicitrate, tricalcium dicitrate tetrahydrate.

13. The composition according to claim 12, wherein the composition is in a liquid form and comprises the calcium salt at a concentration of the calcium ions of 1-40 mM, preferably 3-25 mM, or wherein the composition is in a solid form and comprises the calcium salt at a concentration of the calcium ions of 50 to 2000 mg/g.

14. The composition according to any of claims 9 to 13, further comprising at least a vitamin, preferably selected from a vitamin of the D group, a vita-

min of the B group and derivatives thereof.

15. The composition according to any of claims 9 to 14, wherein the vitamin of the D group is selected from calciferol, ergocalciferol, lumisterol, cholecalciferol, dihydroergocalciferol, sitocalciferol, calcitriol and calcifediol.

16. The composition according to claim 14 or 15, wherein the vitamin of the B group is selected from thiamine (vitamin B1), riboflavin (vitamin B2), niacin, nicotinic acid, nicotinamide (vitamin B3), adenine (vitamin B4 or vitamin-like factor), pantothenic acid, pantenol, pantenine (vitamin B5), pyridoxamine, pyridoxine and pyridoxal (vitamin B6).

17. The composition according to any of claims 14 to 16, wherein the composition is in a liquid form and comprises the vitamin of the D group at a concentration of 0.1 to 10.0 µg/l, preferably 0.25 to 4.0 µg/l, or wherein the composition is in a solid form and comprises the vitamin of the D group at a concentration of 0.1 to 10.0 µg/g, preferably 0.25 to 5.0 µg/g.

18. The composition according to any of claims 14 to 17, wherein the composition is in a liquid form and comprises the vitamin of the B group at a concentration of 1 to 1000 mg/l, preferably of 10 to 500

mg/l, or wherein the composition is in a solid form and comprises the vitamin of the B group at a concentration of 1 to 1000 mg/g, preferably of 10 to 500 mg/g.

19. The composition according to any of claims 9 to 18, further comprising a potassium salt and/or a sodium salt, preferably selected from sodium citrate and/or potassium citrate, monosodium citrate and/or monopotassium citrate, disodium citrate, trisodium citrate and/or tripotassium citrate, sodium carbonate and/or potassium carbonate, sodium dicarbonate and/or potassium dicarbonate, sodium sulfate and/or potassium sulfate, sodium disulfate and/or potassium disulfate, sodium chloride or potassium chloride, sodium tartrate and/or potassium tartrate, sodium phosphate and/or potassium phosphate, disodium inosinate and/or dipotassium inosinate, sodium ascorbate and/or potassium ascorbate, sodium nitrate and/or potassium nitrate, or derivatives thereof.

20. The composition according to claim 19, wherein the composition is in a liquid form and comprises the potassium salt and/or the sodium salt each at a concentration of 1 to 1000 mg/l, preferably of 2 to 500 mg/l, or wherein the composition is in a solid form and comprises the potassium salt and/or the so-

dium salt each at a concentration of 5 to 7000 mg/g, preferably of 10 to 3500 mg/g.

21. The composition according to any of claims 9 to 20, which is a pharmaceutical composition, a medical device or a dietary supplement.

22. The composition according to any of claims 9 to 21, which is in a formulation suitable for parenteral or enteral, preferably intravenous, intramuscular, infusional, oral, sublingual or rectal administration.

23. The composition according to claim 22, which is in the form of an oral solution, oral gel, tablet, capsule, effervescent tablet, coated tablet, powder, granulate, suppository, injectable solution or suspension.

24. The use of a composition according to any of claims 9 to 23, as a culture medium adjuvant, for *in vitro* cells or tissues.

25. The use according to claim 24, wherein the composition further comprises, in a physiologically acceptable carrier, the usual amino acids, sugars, salts and vitamins for *in vitro* cultures of eukaryotic cells or tissues.