



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

DOMANDA NUMERO	102006901439384
Data Deposito	04/08/2006
Data Pubblicazione	04/02/2008

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Titolo

PREPARAZIONI PER SOMMINISTRAZIONE ORALE AVENTI EFFETTI SALUTISTICI SUGLI APPARATI OSTEOARTICOLARE E MUSCOLOSCELETRICO

DESCRIZIONE dell'invenzione industriale dal titolo:
"Preparazioni per somministrazione orale aventi effetti salutistici sugli apparati osteoarticolare e muscoloscheletrico"

Di: ROTTAPHARM S.p.A., nazionalità italiana, Galleria Unione, 5, 20122 MILANO

Inventori designati: Paolo SENIN, Ivo SETNIKAR, Angelo Luigi ROVATI

Depositata il: 4 Agosto 2006

DESCRIZIONE

L'oggetto della presente invenzione consiste in preparazioni per somministrazione orale, in forma di compresse, capsule, polvere per uso estemporaneo o liquida, atte ad esercitare effetti salutistici sugli apparati osteoarticolare e muscoloscheletrico grazie ad una combinazione di attività quali quella di stimolo del trofismo cartilagineo, di protezione della cartilagine ed antinfiammatoria sui tessuti osteoarticolari e muscoloscheletrici, con conseguenti effetti benefici sul mantenimento dell'efficienza funzionale osteoarticolare e su patologie, quali ad esempio l'osteoartrite, che portano a stati invalidanti legati a dolore e limitazione dei movimenti più o meno marcati dipendentemente dallo

PR/cp

stato di avanzamento del processo patologico in corso.

INTRODUZIONE

La libertà di movimento e l'efficienza degli apparati osteoarticolare e muscoloscheletrico sono componenti fondamentali per la buona qualità della vita, come ben sanno gli sfortunati che, per traumi, malattie nervose o muscoloscheletriche, soffrono di invalidità dovute a dolori o a limitazioni dei movimenti.

Una patologia osteoarticolare che affligge un gran numero di persone in tutto il mondo e interferisce con la loro vita sociale, con lo stato socio-economico e con il benessere fisico e psichico di chi ne è affetto è rappresentata dall'osteoartrite (OA) [Carr 1999]. L'OA è una malattia degenerativa che peggiora gradualmente con l'età ed è dovuta al logoramento delle articolazioni che rende dolorosi e limitati i movimenti. L'OA colpisce soprattutto nella seconda metà della vita umana [Creamer et al. 1997] e il progressivo invecchiamento delle popolazioni ha fatto diventare l'OA uno dei principali problemi sanitari mondiali.

L'OA è caratterizzata da una degenerazione della cartilagine articolare che perde la sua elasti-

cità, si rammollisce e si usura facilmente, con comparsa di fissurazioni e perdite di continuo, fino all'esposizione dei capi ossei, condizioni che rendono difficili e dolorosi i movimenti.

La degenerazione della cartilagine si instaura lentamente ed è asintomatica fino a quando il processo patologico non sia tanto avanzato da non essere più reversibile e da provocare dolore e invalidità. In questo stadio gli interventi terapeutici sono di natura farmacologica e sono sintomatici per lenire il dolore e contenere i processi infiammatori delle articolazioni colpite dall'OA, ma comportano molti e talvolta gravi effetti collaterali. I farmaci più usati sono i FANS (Farmaci Antinfiammatori Non Steroidei) che agiscono inibendo le cicloossigenasi (COX). Le COX intervengono nella cascata biochimica dell'acido arachidonico che porta alle citochine proinfiammatorie (prostaglandine, prostacicline, trombossani e leucotrieni) responsabili dei tipici sintomi dell'infiammazione e cioè dolore, iperemia, edema e attivazione leucocitaria. I FANS però non inibiscono soltanto le COX-2, vale a dire quelle indotte dai processi infiammatori, ma anche le COX-1 costitutive, ossia quelle normalmente presenti nei tessuti e che generano prostaglan-

dine che hanno funzioni protettive, come la produzione del muco gastrico o la regolazione del flusso renale. L'uso prolungato dei FANS può quindi provocare gravi effetti avversi e soprattutto ledere le mucose del tratto gastroenterico e la funzione renale. È noto inoltre da lungo tempo [McKenzie et al. 1976] che i FANS accelerano il processo degenerativo dell'OA e non dovrebbero essere usati perciò in questa malattia. D'altra parte le alternative farmacologiche (cortisonici, paracetamolo ad alte dosi, ecc.) sono ancora più pericolose dei FANS e non permettono una terapia prolungata senza gravi effetti collaterali.

Più recentemente sono stati sviluppati dei FANS con un'azione più selettiva sulle COX-2 (meloxicam, rofecoxib, celecoxib, parecoxib, valdecoxib, etoricoxib), ma si è visto che anche questi non hanno una selettività assoluta e provocano effetti collaterali simili a quelli dei FANS tradizionali. Inoltre essi aumentano i rischi trombotici cardiovascolari e quindi devono essere usati con estrema prudenza.

Per tutte queste ragioni si dovrebbe ricorrere precocemente a provvedimenti che impediscano i processi patogenetici che portano all'OA, molto prima

cioè che essa si manifesti clinicamente. Questi provvedimenti dovrebbero assicurare e mantenere fin dalla giovane età il benessere e la perfetta funzionalità delle articolazioni.

I principali fattori patogenetici che conducono alla degenerazione della cartilagine articolare sono rappresentati da una disregolazione metabolica della biosintesi dei proteoglicani della matrice della cartilagine e dall'azione di sostanze endogene che ne accelerano la depolarimerizzazione e il catabolismo. L'integrità chimica e fisica dei proteoglicani imprigionati nella rete tridimensionale delle fibre di collagene è, infatti, la condizione essenziale per mantenere la cartilagine articolare turgida, elastica, liscia e senza lesioni di continuo. Per mantenere la salute della cartilagine articolare sono necessari adeguati stili di vita e in particolare una moderata e regolare attività fisica che non esponga però la cartilagine a traumi eccessivi. È anche essenziale l'apporto con gli alimenti delle sostanze utilizzate dall'organismo per la biosintesi dei proteoglicani ed è necessario, infine, prevenire la formazione di quelle sostanze che aggrediscono la cartilagine e ne provocano il degrado.

Queste condizioni non sono sempre facili da ottenere ed è proprio in quest'ottica che si è fondata la ricerca dell'oggetto della presente invenzione e cioè l'individuazione di sostanze naturali o di origine naturale in grado di entrare nell'integrazione alimentare coadiuvando le azioni sopradette.

A tal fine i principi attivi identificati e prescelti dopo accurata selezione sono stati la glucosamina ed i suoi sali semplici o misti e la mangostina, preferibilmente sotto forma di estratti dal frutto di *Garcinia mangostana*, per brevità denominati EFGM. La glucosamina è un substrato per la biosintesi dei proteoglicani e ne stimola e regola l'anabolismo. L'EFGM ostacola la formazione e l'azione delle citochine proinfiammatorie e degli enzimi di produzione endogena che aggrediscono la cartilagine e ne accelerano i processi degenerativi.

L'associazione glucosamina e mangostina o EFGM esercita effetti salutistici sinergici dimostrati sperimentalmente su test "in vitro" ed "in vivo", i cui risultati straordinariamente positivi e superiori a qualsiasi aspettativa sono esposti in dettaglio nella Parte Sperimentale. Inoltre, grazie

all'azione sinergica, i suddetti effetti sono ottenuti a dosi relativamente basse e accettate anche nelle normative concernenti gli integratori alimentari.

Le composizioni sinergiche oggetto dell'invenzione ed il loro impiego per la preparazione di medicinali e/o di integratori alimentari e/o di altri preparati aventi gli effetti salutistici sopra indicati sono definiti nelle Rivendicazioni della presente domanda di brevetto.

CARATTERISTICHE DELLE SOSTANZE IMPIEGATE

Glucosamina e suoi sali semplici o misti

Informazioni generali

La glucosamina è il 2-ammino-2-deossiglucosio, un monosaccaride sintetizzato fisiologicamente nell'organismo umano dal glucosio e utilizzato per la sintesi di molte macromolecole strutturali dei tessuti connettivi e in particolare delle cartilagini articolari.

Nella composizione oggetto della presente invenzione, la glucosamina è preferibilmente presente come glucosamina solfato cristallina (CGS), che apporta anche i solfato-ioni necessari per la biosintesi del condroitinsolfato e dei proteoglicani, componenti strutturali fondamentali della matrice

della cartilagine articolare. La CGS è un sale misto nel quale glucosamina, ioni solfato, ioni sodio e cloruro sono presenti in proporzioni stechiometriche di 2:1:2:2. La CGS è un composto originale e brevettato dal Rotta Research Group (CGS RRG) nel quale la glucosamina è di origine naturale ed ottenuta dall'idrolisi acida della chitina, componente organica dell'esoscheletro dei crostacei. Questa glucosamina ottenuta dalla chitina ha le identiche caratteristiche biochimiche e biologiche della glucosamina prodotta dal nostro organismo per via endogena.

La CGS RRG, a dosi farmacologiche, è stata utilizzata con successo nella terapia dell'osteoartrite. I relativi studi clinici sono raccolti nella meta-analisi della Cochrane Collection [Towheed et al. 2005] che ne hanno dimostrato l'efficacia come Symptomatic Slow Acting Drug for Osteoarthritis (SSADOA). Studi più recenti e di lunga durata (3 anni) ne hanno dimostrato anche l'efficacia nell'arrestare la progressione dell'osteoartrite, ossia l'efficacia come Disease Modifying Drug (DMD) [Reginster et al. 2001, Pavelka et al. 2002].

Proprietà condronutritive

La CGS è il substrato preferito e completo per

la biosintesi delle molecole strutturali della cartilagine articolare [Noyszewski et al. 2001] ed è anche un precursore della galattosamina, amminosaccharide necessario per la sintesi del cheratansolfato [Setnikar et al.1986].

Proprietà condrostimolanti e condroanabolizzanti

La CGS stimola e normalizza la sintesi dei proteoglicani e la condroformazione [Rodén 1956, Vidal y Plana 1980, Piperno et al. 2000, Bassleer et al. 1998]. Essa inoltre aumenta l'espressione di aggregano, proteoglicano necessario per l'aggregazione dei proteoglicani alle catene di acido ialuronico con formazione finale dei proteoglican-aggregati (PA). I PA sono molecole giganti (40-100 milioni di dalton), imprigionate a causa delle loro dimensioni nella rete tridimensionale di fibre collagene che forma lo scheletro molecolare della matrice della cartilagine articolare. I PA sono avidissimi di acqua che li rigonfia. Non potendo sfuggire dalla rete tridimensionale di fibre collagene conferiscono le tipiche caratteristiche reologiche al tessuto cartilagineo, ossia il turgore, l'elasticità e la plasticità necessari per lo svolgimento della funzione articolare [Dodge et al. 2003].

Proprietà condroprotettrici e condroriparatrici

La CGS contrasta la formazione di diverse citochine che danneggiano le strutture cartilaginee. Essa inibisce gli enzimi che attaccano e demoliscono le macromolecole della matrice della cartilagine come la collagenasi, la stromelisinina e l'aggrecanasi [Piperno et al. 2000].

Posologia

La dose giornaliera di glucosamina utilizzata nell'ambito dell'invenzione è preferibilmente 200-1000 mg (corrispondenti a 320-1600 mg di CGS) e preferibilmente 250 mg (400 mg di CGS), dose giornaliera accettata per l'integrazione alimentare.

Sicurezza d'impiego della CGS

La sicurezza d'impiego della CGS utilizzata da Rottapharm per la presente invenzione è assicurata da approfondite ricerche di tossicologia sperimentale acuta, subacuta e cronica, di fertilità maschile e femminile, di embriogenesi e embriotossicità ecc. e soprattutto dal vasto impiego che essa ha avuto come farmaco su decine di milioni di giorni-paziente documentato dalle ricerche postmarketing in merito.

Mangostina ed estratti dal frutto di *Garcinia mangostana* (EFGM)

Informazioni generali

La *Garcinia mangostana* è un albero tropicale di paesi del Sud-Est Asiatico come Thailandia, India, Malaysia, Vietnam e Filippine, e anche Australia e Hawaii. Vari EFGM sono utilizzati tradizionalmente per applicazione topica per la cura delle ferite e delle escoriazioni della pelle e, per via orale, per le diarree infettive e le infezioni urinarie. Più recentemente gli EFGM hanno attratto l'interesse della medicina occidentale e sono stati sottoposti alle moderne tecniche di identificazione dei componenti e di sperimentazione farmacologica. Nell'ambito di queste indagini sono state identificate ed isolate sostanze appartenenti per la maggior parte alla famiglia degli Xantoni, classe chimica assimilabile alla famiglia dei polifenoli derivati dal benzo- γ -pirone. La principale di queste sostanze è la mangostina, ossia il 1,3,6-triidrossi-7-metossi-2,8-bis-(3-metil-2-butenil)-9H-xanten-9-one, formula bruta $C_{24}H_{26}O_6$, p.m. 410,47. La mangostina è usata per standardizzare il titolo degli EFGM.

Gli studi farmacologici condotti sugli EFGM ne hanno evidenziato le seguenti attività.

Attività antibatterica e antifungina

Gli xantoni contenuti nel fitocomplesso degli EFGM esercitano proprietà antibatteriche ed anti-

fungine. In particolare l' α -mangostina e la β -mangostina sono attive sul *Mycobacterium tuberculosis* con una MIC di 6,25 $\mu\text{g/ml}$ [Suksamrarn et al. 2003] e su ceppi meticillina- e penicillina-resistenti di *Staphylococcus aureus*, con una MIC di 1,6 $\mu\text{g/ml}$ [Mahabusarakam et al. 1986, Inuma et al. 1996].

Attività antiossidante

Gli EFGM esercitano una notevole attività antiossidante, superiore a quella della vitamina E [Fan et al. 1997, Williams et al. 1994]. Di particolare interesse è la capacità di inibire la perossidazione delle lipoproteine a bassa densità (LDL), reazione chimica che rende aterogene le LDL e che dà inizio alla patogenesi dell'arteriosclerosi [Williams et al. 1994].

Attività antistaminica e antiprostaglandinica

Gli EFGM inibiscono il rilascio di istamina mediato dalla IgE e la sintesi di prostaglandina E2 stimolata da A23187. Essi inibiscono anche l'anafilassi cutanea passiva nel ratto [Nakatani, Atsumi et al. 2002].

Inibizione della conversione dell'acido arachidonico in prostaglandina E2

Nelle cellule C6 di glioma di ratto, gli EFGM

inibiscono la conversione dell'acido arachidonico in prostaglandina E2 e la produzione quindi di una potente citochina infiammatoria [Nakatani, Nakahata et al. 2002].

Inibizione delle ciclo-ossigenasi

In vitro gli EFGM inibiscono le ciclo-ossigenasi indotte da agenti proinfiammatori (COX-2), enzimi responsabili della produzione di potenti citochine proinfiammatorie. Questa attività è dipendente dalla concentrazione di mangostina contenuta negli estratti e si manifesta con concentrazioni inibitrici al 50% (IC50) di 1-2 μM di mangostina [Nakatani, Nakahata et al. 2002].

Conclusioni

Gli EFGM, inibendo l'espressione e gli effetti di citochine proinfiammatorie, esercitano attività indispensabili per mantenere il benessere delle articolazioni, tanto che sono utilizzati negli USA come integratore alimentare (Dietary Supplement) per il benessere delle articolazioni (joint health).

Eman

Eman è l'estratto secco dal frutto di *Garcinia mangostana* titolato al 40% di mangostina ed è il prodotto di riferimento della presente invenzione

utilizzato nella parte sperimentale.

Posologia di Eman

La dose giornaliera di Eman è preferibilmente 12,5-450 mg (corrispondenti a 5-180 mg di mangostina) e preferibilmente 75 mg di Eman (corrispondenti a 30 mg di mangostina).

PARTE SPERIMENTALE

Il target inventivo della presente domanda di brevetto è stato verificato su una serie di test farmacologici "in vitro" ed "in vivo" valutando e confrontando i risultati relativi ai due principi attivi e cioè la glucosamina (impiegata sotto forma di CGS) ed Eman, utilizzati individualmente o in associazione (Ass).

I test "in vitro" prescelti sono stati:

- Su sangue umano: Produzione di IL-1, di TNF α e di IL-10 stimolata da LPS.
- Su sangue umano: Produzione di PGE2 stimolata da LPS.
- Su sangue umano: Produzione di TXB2 indotta da coagulazione.
- Su condrociti di coniglio: Produzione di PGE2 stimolata da IL-1 β .
- Su espianti di cartilagine articolare tibiale di

coniglio New Zealand white per valutare l'azione protettiva nei confronti della degradazione della cartilagine indotta da IL-1 β .

I test "in vivo" prescelti sono stati:

- Attività antinfiammatoria di CGS, Eman ed Ass sull'edema indotto da zymosan sulla zampa di ratto.
- Attività analgesica di CGS, Eman ed Ass secondo Randall e Selitto [1957] sull'iperalgia indotta con zymosan nella zampa di ratto.

Materiali, Dosi e Metodi

Materiali

Glucosamina

È stata impiegata Glucosamina Solfato Cristallina (CGS) di grado farmaceutico, complesso molecolare nel quale glucosamina, ioni solfato, ioni sodio e cloruro sono presenti in proporzioni molari pari a: 2:1:2:2. La CGS ha un p.m. di 573,30, un contenuto di glucosamina pari al 62,50% e di glucosamina solfato pari al 79,60%. Si è usata la CGS RRG originale.

Eman

L'estratto, secondo le caratteristiche precedentemente specificate, è normalmente reperibile

sul mercato (per esempio da HP Botanicals S.r.l., Milano).

Ass (Associazione di CGS con Eman)

Le dosi giornaliere di glucosamina e di mangostina autorizzate e raccomandate in Italia per un integratore alimentare sono di 250 mg e rispettivamente 30 mg. Esse corrispondono a 0,70 mmol di CGS e a 0,07 mmol di mangostina. Per le indagini farmacologiche con l'associazione dei due principi attivi si sono perciò utilizzate miscele di CGS e di Eman tali da rispettare un rapporto molecolare 10:1 fra CGS e la mangostina contenuta in Eman.

Concentrazioni utilizzate "in vitro"

• Eman

Sono state usate soluzioni di pari a concentrazioni di mangostina di 0,1, 0,3, 1,0, 3,0, 10,0 e 30,0 μM ($\mu\text{moli/l}$), indicate nelle tabelle come Man 0,1, Man 0,3, Man 1, Man 3, Man 10 e Man 30.

• Glucosamina solfato cristallina (CGS)

Sono state usate concentrazioni di CGS di 1, 3, 10, 30, 100 e 300 μM ($\mu\text{moli/l}$), indicate nelle tabelle come CGS 1, CGS 3, CGS 10, CGS 30, CGS 100, CGS 300.

• Associazione (Ass)

Come precedentemente specificato, per rispettare la dose giornaliera raccomandata nell'uomo, il rapporto molecolare fra CGS e mangostina è stato 10:1 e conseguentemente il set di concentrazioni impiegato è stato Man 0,1 + CGS 1, Man 0,3 + CGS 3, Man 1 + CGS 10, Man 3 + CGS 30, Man 10 + CGS 100, Man 30 + CGS 300, indicate nelle tabelle come Ass 0,1, Ass 0,3, Ass 1, Ass 3, Ass 10 e Ass 30.

• Lipopolisaccaride

È stato usato lipopolisaccaride di *Escherichia coli* (Sigma Italia) 1µg/ml, indicato come LPS.

• SB2 3580 (standard di riferimento per l'attività LPS-inibitrice)

È stato usato il set di concentrazioni 0,3, 1,0 e 3,0 µM, indicato nelle tabelle come SB 0,3, SB 1 e SB 3.

• CHX (Cicloheximide)

La cicloheximide è lo standard di riferimento per l'attività inibitrice sugli enzimi degradanti la cartilagine ed è stata usata alla concentrazione di 2,5 µg/ml.

Dosi utilizzate "in vivo"

In farmacologia le patologie indotte sperimentalmente negli animali sono sempre drammaticamente

ed innaturalmente più gravi di quelle che si manifestano spontaneamente nell'uomo. È perciò prassi normale usare sui modelli sperimentali dosi espresse in mg/kg di peso corporeo più elevate di quelle utilizzate per la somministrazione all'uomo. Inoltre, è necessario considerare che nell'estrapolazione di dosi da una specie animale ad un'altra è più razionale il riferimento alla superficie corporea che al peso corporeo [Guidance for Industry 2002]. Se si tiene conto del riferimento alla superficie, da ratto a uomo è necessario dividere la dose espressa in mg/kg per un fattore di 6,2 [Guidance for Industry 2002]. Tenendo conto di quanto sopra e delle dosi giornaliere utilizzate nell'uomo e descritte negli esempi formulativi oggetto della presente invenzione, nei nostri esperimenti si sono adottate le seguenti dosi somministrate ai ratti per via orale.

- Eman

Le dosi sono state pari a 3, 10 e 30 mg/kg di mangostina, indicate come Man 3, Man 10 e Man 30.

- Glucosamina solfato cristallina (CGS)

Le dosi sono state 40, 133 e 400 mg/kg indicate come CGS 40, CGS 133, CGS 400.

• Associazione (Ass)

Le dosi sono state Man 3 + CGS 40, Man 10 + CGS 133 e Man 30 + CGS 400 ed indicate come Ass 3, Ass 10 e Ass 30.

Metodi

1. Sangue umano: Espressione di IL-1, di TNF α e di IL-10 stimolata da LPS.

Sangue venoso è stato raccolto da volontari sani e trattato con 0,38% Na citrato per impedirne la coagulazione. Campioni di 200 μ l sono stati stimolati con 1 μ g/ml di LPS per 24 ore a 37°C [Hartel et al. 2004], in presenza dei prodotti in esame. Le citochine rilasciate nel plasma sono state analizzate con un sistema multiplo per citochine (Bio-Plex, Bio-Rad Laboratories, Milano Italia) che permette la determinazione contemporanea di IL-1, TNF α e di IL-10.

2. Sangue umano: Produzione di PGE2 stimolata da LPS (Marker di COX-2)

Sangue umano è stato raccolto da volontari sani e reso incoagulabile con 0,38% Na citrato. Campioni di 200 μ l sono stati addizionati con i prodotti in esame e quindi stimolati con LPS 100 μ g/ml per 24 ore a 37°C. La PGE2 nel plasma, marker dell'attività COX-2 dei monociti [Panara et al. 1999], è stata

determinata con metodo RIA specifico.

3. Sangue umano: Produzione di trombossano indotta da coagulazione

Campioni di sangue umano, raccolti da volontari sani, sono stati addizionati con i prodotti in esame e quindi lasciati coagulare per 1 ora a 37°C. Il trombossano (TXB2) nel siero, marker dell'attività COX-1 delle piastrine [Panara et al. 1999] è stato determinato con metodo RIA specifico.

4. Condrociti di coniglio: Produzione di PGE2 (marker di COX-2) stimolata da IL-1 β

Condrociti di cartilagine articolare ottenuta da conigli New Zealand white, sono stati coltivati con la tecnica descritta da Berenbaum [1994]. Cellule confluenti sono state stimolate per 24 ore con IL-1 β 1 ng/ml. I prodotti da esaminare sono stati aggiunti 20 minuti prima della stimolazione. Alla fine della stimolazione si è raccolto il liquido soprannatante che è stato conservato a -80°C fino all'esecuzione delle analisi. La PGE2 nel medium di coltura è stata misurata con metodo radio-immunologico. La produzione di PGE2 in questo modello è un marker dell'attività delle ciclo-ossigenasi indotte (COX-2) nella cartilagine dallo stimolo proinfiammatorio rappresentato da IL-1 β .

5. Cartilagine di coniglio. Azione protettiva contro la degradazione della cartilagine indotta da IL-1 β

L'azione condroprotettiva è stata valutata secondo Sabatini et al. [2005] su espianti di cartilagine articolare tibiale ottenuti da conigli New Zealand white. Gli espianti (2x2 mm) sono stati trasferiti in piastre con pozzetti ed equilibrati per 48 ore a 37°C con DMEM ad elevata concentrazione di glucosio con 10% FCS e 50 μ g/ml di gentamicina. Gli espianti sono stati poi stimolati per 48 ore con IL-1 β 1 ng/ml in DMEM afenolico, 1 g/l glucosio, 50 μ g/ml gentamicina e 1% di sieroalbumina bovina. IL-1 β provoca una forte attivazione degli enzimi che depolimerizzano gli aggregati proteoglicanici della matrice della cartilagine e ne causano la degradazione, con il rilascio nel liquido di coltura dei prodotti di degradazione rappresentati soprattutto dai vari glicosaminoglicani (GAG) che fanno parte degli aggregati proteoglicanici. La quantità di GAG rilasciati nel liquido di coltura sono quindi un indicatore della degradazione delle macromolecole che conferiscono alle cartilagini articolari il turgore, l'elasticità e la durezza necessarie alla loro normale funzionalità [Farndale

et al. 1982]. Per valutare gli effetti dei prodotti in esame sulla degradazione della cartilagine provocata da IL-1 β , essi sono stati aggiunti agli espianti di cartilagine 20 minuti prima della stimolazione con IL-1 β . La degradazione della cartilagine è stata valutata esprimendo i GAG rilasciati nel liquido di coltura come percentuale dei GAG totali misurati dopo digestione degli espianti di cartilagine con papaina. Come standard di riferimento si è utilizzata la cicloheximide che, alla concentrazione di 2,5 μ g/ml, blocca la sintesi degli enzimi degradanti e quindi il degrado degli aggregati proteoglicanici della cartilagine.

6. Ratto. Attività antinfiammatoria in vivo

L'attività antinfiammatoria dei prodotti in esame è stata valutata secondo Di Rosa et al. [1971] sull'edema della zampa di ratto indotto da un'iniezione subplantare di 4 mg di zymosan in 0,1 ml di soluzione fisiologica. Il volume della zampa è stato misurato pletismograficamente a 0, 1, 2, 4, 6 e 24 ore dopo l'iniezione di zymosan, ed espresso in ml di differenza rispetto al volume basale. I prodotti in esame, sospesi in 5 ml/kg di 5% metilcellulosa, sono stati somministrati con sonda gastrica 30 minuti prima dell'iniezione di zymosan. Come

standard di riferimento è stato usato il celecoxib, noto COX-2 inibitore e di largo impiego clinico, alla dose di 10 mg/kg somministrata per via orale. Per esprimere numericamente gli effetti dei trattamenti si sono misurate le aree sotto le curve dell'incremento di volume della zampa da 0 a 24 ore, ottenendo così la misura in mlx24 ore dell'edema della zampa.

7. Ratto. Attività analgesica in vivo

L'attività analgesica dei prodotti in esame è stata valutata con la tecnica di Randall e Selitto [1957] sull'iperalgia indotta nella zampa di ratto da un'iniezione subplantare di 4 mg di zymosan in 0,1 ml di soluzione fisiologica. La soglia nocicettiva meccanica è stata determinata con analgesimetro (Ugo Basile, Varese Italia) a 0, 1, 2, 4, 6 e 24 ore dopo l'iniezione di zymosan. L'analgesimetro misura il peso (in grammi) esercitato sulla zampa che provoca la retrazione riflessa della zampa stessa. La soglia nocicettiva è stata espressa come differenza (in grammi) della soglia nocicettiva al tempo 0. I prodotti in esame sono stati somministrati per via orale 30 minuti prima dell'iniezione di zymosan. Come standard di riferimento è stato usato il celecoxib, noto COX-2 inibitore e di largo

impiego clinico come analgesico-antinfiammatorio, alla dose di 10 mg/kg somministrata per via orale. Per esprimere numericamente gli effetti dei trattamenti si sono misurate le aree sotto le curve dell'incremento di peso analgesimetrico sulla zampa infiammata, da 0 a 24 ore, ottenendo così la misura in g x 24 ore dell'area sotto la curva analgesimetrica.

RISULTATI

1. Sangue umano: Effetti delle sostanze in esame sulla produzione di IL-1 stimolata da LPS

L'interleuchina 1 (IL-1) è una delle citochine proinfiammatorie più aggressive. A livello della cartilagine articolare inibisce la sintesi dei proteoglicani e provoca notevoli danni biochimici, morfologici e meccanici [Sundy et al. 1999].

L'effetto delle sostanze in esame sull'espressione di IL-1 è stato valutato sul sangue umano nel quale lo stimolo da LPS libera IL-1. Standard di riferimento in questo modello è SB2 3580 (SB). SB esercita la concentrazione inibitrice al 50% (IC50) ad una concentrazione 1,6 μ M.

I risultati, riportati nella tabella 1, mostrano che:

- **Eman** (espresso nelle tabelle dal suo contenuto in

mangostina, abbreviato col termine "Man") inibisce l'espressione di IL-1 indotta da LPS in modo concentrazione dipendente. La concentrazione inibente al 50% (IC50) è superiore a 30 μM di mangostina e si può stimare essere attorno a 65 μM .

- CGS non esercita apprezzabili attività inibenti fino a concentrazione 300 μM .
- Ass. Sorprendentemente CGS a concentrazioni di per sé inattive, potenzia l'attività IL-1-inibitrice di Ean, tanto che Ass 10 esercita un'inibizione del 40% già con la concentrazione 10 μM di mangostina (Man 10), questa ultima da sola poco efficace. Ass 30 (Man 30 + CGS 300) esercita un'inibizione del 70%. La IC50 riferita a mangostina è 22 μM . CGS, inefficace da sola, potenzia perciò Man di 3 volte nell'associazione.
- In conclusione, CGS, di per sé poco attiva nell'inibire nel sangue umano il rilascio di IL-1 stimolato da LPS, potenzia in modo sorprendente l'inibizione del rilascio di IL-1 esercitata da Eman.

2. Sangue umano. Effetti delle sostanze in esame sulla produzione di TNF α stimolata da LPS

Il Tumor Necrosis Factor α (TNF α) è anche esso

una citochina proinfiammatoria molto aggressiva, che a livello della cartilagine articolare provoca danni biochimici, morfologici e meccanici [Sundy et al. 1999]. L'effetto delle sostanze in esame sull'espressione di TNF α è stato valutato sul sangue umano nel quale lo stimolo da LPS libera TNF α . Standard di riferimento in questo modello è SB2 3580 (SB), che esercita l'IC50 ad una concentrazione 2,8 μ M.

I risultati, riportati nella tabella 2, mostrano che:

- **Eman** (espresso nelle tabelle dal suo contenuto in mangostina, abbreviato col termine "Man") inibisce l'espressione di TNF α in modo concentrazione-dipendente. La concentrazione inibente al 50% (IC50) è pari a 38 μ M di mangostina.
- **CGS** è scarsamente inibente anche a concentrazione 300 μ M.
- **Ass.** CGS potenzia l'attività TNF α -inibitrice di Eman. Infatti, Man 10 da sola, provoca un'inibizione dell'espressione di TNF α del 15%, però quando è associata a CGS provoca un'inibizione del 37% (Ass 10). La IC50 di Ass è pari ad una concentrazione di mangostina di 20 μ M, potenzian-

do Eman di quasi 2 volte.

- In conclusione, la CGS, di per sé poco attiva nell'inibire nel sangue umano il rilascio TNF α stimolato da LPS, quando è associata a Eman potenzia in modo sorprendente l'inibizione del rilascio di TNF α esercitata da Eman.

3. Sangue umano. Effetti delle sostanze in esame sulla produzione di IL-10 stimolata da LPS

L'interleuchina 10 (IL-10) è considerata una citochina condroprotettiva perché modula in senso positivo la produzione e gli effetti delle sostanze proinfiammatorie e condrolesive [Sundy et al. 1999]. Infatti essa:

- a) inibisce la produzione di citochine proinfiammatorie da parte dei macrofagi,
- b) inibisce la differenziazione delle cellule T_H1,
- c) inibisce la funzione delle cellule NK,
- d) stimola la proliferazione e le funzione dei macrofagi.

Gli effetti delle sostanze in esame sull'espressione di IL-10 stimolata nel sangue umano da LPS sono riportati nella tabella 3. Standard di riferimento è stato SB2 3580 (SB), che stimola l'espressione di IL-10 già a concentrazione 0,3 μ M.

I risultati, riportati nella tabella 3, mostra-

no che:

- **Eman** (espresso nelle tabelle dal suo contenuto in mangostina, abbreviato col termine "Man") stimola l'espressione di IL-10 già a concentrazione pari 3 μM di mangostina (Man 3). La stimolazione è concentrazione dipendente ed è molto pronunciata. Alla concentrazione 30 μM di mangostina si è avuto un aumento del 187% di IL-10 rispetto ai livelli basali.
- **CGS** non esercita significative attività stimolanti o inibenti alle concentrazioni indagate (30, 100 e 300 μM).
- **Ass.** CGS sorprendente potenzia l'attività stimolante di Eman che praticamente è raddoppiata. Alla concentrazione di Man 30 (con 300 μM di CGS) si osserva un aumento di IL-10 del 254%.
- In conclusione, Eman esercita una potente azione stimolante sull'espressione della citochina IL-10, marker tra l'altro di effetti condroprotettori. CGS non esercita apprezzabili effetti stimolanti o inibenti sull'espressione di IL-10. In Ass, però, CGS sorprendentemente potenzia Eman nello stimolare l'espressione di IL-10.

4. Sangue umano. Effetti delle sostanze in esame

sulla produzione di trombossano (marker dell'attività COX-1 delle piastrine) indotta da coagulazione

Nel processo della coagulazione del sangue le ciclo-ossigenasi costitutive delle piastrine (COX-1) liberano trombossano (TXB2) e gli effetti sulla liberazione di TXB2 da coagulazione sono considerate un marker dell'attività inibitrice o stimolante le COX-1 [Panara et al. 1999].

Gli effetti delle sostanze in esame sulla produzione di TXB2 durante la coagulazione sono riportati nella tabella 4. I risultati indicano che:

- **Eman** (espresso nelle tabelle dal suo contenuto in mangostina, abbreviato col termine Man 1, 3 e 10) esercita una lieve inibizione sulla liberazione di TXB2, che non è significativa e non è concentrazione-dipendente.
- **CGS** non esercita significative attività stimolanti o inibenti a concentrazioni 10, 30 o 100 μM .
- **Ass.** Le tre associazioni studiate (Ass 1, Ass 3 e Ass 10) non esercitano sostanziali effetti stimolanti o inibenti l'espressione di TXB2.
- In conclusione, Eman, CGS e le loro associazioni non esercitano effetti sulla liberazione di TXB2.

Si può quindi concludere che questi prodotti non interferiscono sulle ciclo-ossigenasi costitutive COX-1.

5. Sangue umano. Effetti delle sostanze in esame sull'inibizione della produzione di PGE2 stimolata da 100 µg/ml di LPS

La PGE2 che compare nel sangue umano in seguito alla stimolazione con LPS è prodotta dalle ciclo-ossigenasi proinfiammatorie indotte (COX-2) dei monociti. Un'attività inibitrice dell'espressione della PGE2 in questo test è quindi un marker di un'attività anti-COX-2, ossia di un'attività antinfiammatoria.

Gli effetti delle sostanze in esame sulla produzione di PGE2 stimolata dal LPS nel sangue umano sono riportati nella tabella 5. I risultati indicano che:

- **Eman** (espresso nelle tabelle dal suo contenuto in mangostina, abbreviato col termine Man 1, 3 e 10) inibisce in modo dose dipendente l'espressione di PGE2 stimolata nel sangue umano da LPS. La IC50 è pari a 12,3 µM di mangostina.
- **CGS** non esercita significative attività stimolanti o inibenti a concentrazioni 10, 30 o 100 µM.

- **Ass.** CGS potenzia significativamente l'inibizione dell'espressione di PGE2 esercitata da Eman, tanto che l'IC50 di Ass corrisponde ad una concentrazione 7,8 μ M di mangostina, con un potenziamento di 1,6 volte dell'efficacia di Eman non associata.
- In conclusione, Eman esercita un'inibizione concentrazione dipendente sull'espressione di PGE2 indotta nel sangue umano da LPS e marker dell'attività delle ciclossigenasi proinfiammatorie inducibili COX-2.

CGS alle concentrazioni 10, 30 e 100 μ M non esercita significativi effetti stimolanti o inibenti su questo marker, ma potenzia in modo sorprendente e inatteso l'effetto inibente di Eman.

6. Condrociti di coniglio. Effetti delle sostanze in esame sulla produzione di PGE2 stimolata da IL-1 β

IL-1 β induce nei condrociti di coniglio un'attivazione della ciclo-ossigenasi COX-2 che si esprime attraverso la produzione di PGE2, citochina proinfiammatoria e fortemente lesiva della cartilagine.

Gli effetti delle sostanze in esame sulla produzione di PGE2 da attivazione delle COX-2 sono ri-

portati nella tabella 6. I risultati indicano che:

- **Eman** (espresso nelle tabelle dal suo contenuto in mangostina, abbreviato col termine "Man") già a concentrazione $0,1 \mu\text{M}$ di mangostina provoca un'inibizione del 23% della produzione di PGE2 indotta da IL-1 β . L'inibizione raggiunge il 50% a concentrazione $0,3 \mu\text{M}$ di mangostina (Man 0,3) e il 94% a concentrazione di $3 \mu\text{M}$ di mangostina (Man 3). La concentrazione calcolata in grado di inibire del 50% la produzione di PGE2 (IC50) è pari a $0,38 \mu\text{M}$ di mangostina.
- **CGS** non esercita significative attività inibenti o stimolanti a concentrazioni 1, 3 o $10 \mu\text{M}$.
- **Ass.** Le associazioni di CGS con Eman (Ass 0,1, Ass 0,3 e Ass 1) esercitano un effetto inibente pari a quello esercitato da Eman non associato a CGS. CGS non interagisce con l'attività PGE2-inibente di Eman.
- In conclusione, Eman esercita un potente effetto inibente sulle COX-2 della cartilagine, che si manifesta già a concentrazione $0,1 \mu\text{M}$ di mangostina. CGS non è attiva a concentrazioni 1, 3 e $10 \mu\text{M}$. L'associazione di Eman con CGS è fortemente inibente grazie alla presenza di Eman, la CGS non inter-

ferisce però con l'attività inibente di Eman.

Su questo modello, che è molto rappresentativo dei danni provocati a livello delle cartilagini da una citochina fortemente condrolesiva come l'IL-1 β , Eman esercita un potentissimo effetto protettivo anti-COX-2, che si manifesta già a concentrazioni 0,1 μ M di mangostina e si mantiene invariato nell'associazione con CGS.

7. Effetti protettivi delle sostanze in esame contro la degradazione della cartilagine indotta da IL-1 β

In questo test si misurano i GAG rilasciati da espunti di cartilagine nel liquido di cultura in seguito a una stimolazione con una citochina fortemente condrolesiva come la IL-1 β . I GAG nel liquido di coltura derivano dalla depolimerizzazione dei proteoglican-aggregati imprigionati nella rete tridimensionale di fibre collagene che fungono da scheletro organico nella matrice della cartilagine. I GAG nel liquido di coltura sono quindi un marker della degradazione della cartilagine per opera di enzimi distruttivi (metalloproteasi e aggrecanasi) attivati da IL-1 β .

Gli effetti delle sostanze in esame sul rilascio di GAG nel liquido di coltura stimolato da IL-

1 β sono riportati nella tabella 7. I risultati indicano che:

1. In condizioni basali, durante le 48 ore di incubazione, c'è stata una degradazione del 14% di aggregati proteoglicanici.

2. IL-1 β induce negli espianti di cartilagine un'attivazione degli enzimi che provocano il degrado aumentando il degrado al 69%.

- **Eman** (espresso nelle tabelle dal suo contenuto in mangostina, abbreviato col termine "Man") a concentrazioni 0,1, 0,3 e 1,0 μ M di mangostina non esercita effetti significativi sul rilascio di GAG indotto da IL-1 β .
- **CGS** a concentrazione 1 μ M protegge per il 41% dal degrado della cartilagine indotto da IL-1 β . La protezione raggiunge il 64% e 77% a concentrazioni 3 e rispettivamente 10 μ M di CGS, con una concentrazione protettiva al 50% (PC50) che si può stimare essere 2,3 μ M.
- **Ass.** Le associazioni di CGS con Eman (Ass 0,1, Ass 0,3 e Ass 1) esercitano un effetto protettivo simile a quello della CGS non associata, con una PC50 circa 2,2 μ M di CGS associata con Eman pari a 0,22 μ M di mangostina.

- In conclusione, CGS esercita un notevole e potente effetto inibente sulla degradazione della cartilagine causata da IL-1 β che si manifesta già a concentrazione 1 μ M. L'effetto protettivo al 50% si ha con CGS 2,3 μ M. Eman non esercita significative attività sul rilascio dei GAG. L'associazione di CGS con Eman è inibente grazie alla presenza di CGS e Eman non interferisce con l'attività inibente della CGS.

8. Ratto Attività antinfiammatoria in vivo delle sostanze in esame

I risultati ottenuti con il metodo di Di Rosa et al. [1971] sono riportati nella tabella 8 che mostra l'aumento di volume della zampa durante le 24 ore seguenti l'iniezione subplantare di zymosan misurata dall'area sotto la curva dei ml di edema.

- **Eman** (espresso nelle tabelle dal suo contenuto in mangostina, abbreviato col termine "Man") alle dosi orali di 3, 10 e 30 mg/kg di mangostina inibisce in modo dose-dipendente l'edema da zymosan. Questa inibizione è significativa rispetto ai controlli, già alla dose di 10 mg/kg ($p < 0,05$), con una differenza percentuale verso i controlli del 7%. La differenza percentuale aumenta al 18% con la dose di 30 mg/kg ed è molto significativa

($p < 0,0001$).

- CGS alle dosi orali di 40, 133 e 400 mg/kg non ha mostrato attività antinfiammatorie significative su questo modello sperimentale.
- Ass. CGS, che di per sé non svolge attività antinfiammatorie, associata a Eman ne potenzia significativamente l'attività, tanto da renderla significativa già alla dose di 3 mg/kg di mangostina (Man da sola non è significativamente efficace a questa dose). Molto efficace diventa la dose di Eman pari a 30 mg/kg di mangostina (associata a 400 mg/kg di CGS) tanto da superare in efficacia il celecoxib alla dose di 10 mg/kg.
- In conclusione, Ean, alle dosi di 10 e 30 mg/kg di mangostina, esercita un effetto antinfiammatorio notevole, significativo e dose-dipendente. CGS è praticamente priva di effetti antinfiammatori alle dosi indagate (40, 133 e 400 mg/kg). Sorprendentemente però, CGS potenzia l'effetto antinfiammatorio di Eman, tanto che con la dose di Eman pari a 30 mg/kg di mangostina (associata a 400 mg/kg di CGS) si osserva un effetto antinfiammatorio paragonabile a quello del celecoxib a 10 mg/kg.

9. Ratto Attività analgesica delle sostanze in esame

La tabella 9 riporta le aree sotto la curva di aumento di peso analgesimetrico sulla zampa infiammata durante le 24 ore seguenti l'iniezione subplantare di zymosan.

- **Eman** (espresso nelle tabelle dal suo contenuto in mangostina, abbreviato col termine "Man") alle dosi orali pari a 3, 10 e 30 mg/kg di mangostina esercita in modo dose-dipendente un effetto analgesico. L'effetto è significativo, rispetto ai controlli, già alla dose di 10 mg/kg di mangostina ($p < 0,01$), con una differenza percentuale verso i controlli del 35%. La differenza percentuale aumenta al 48% con la dose di 30 mg/kg ed è molto significativa ($p < 0,0001$).
- **CGS** alle dosi orali di 40, 133 e 400 mg/kg non ha mostrato attività analgesiche significative su questo modello sperimentale.
- **Ass. CGS**, che di per sé non svolge attività analgesiche, quando è associata a Eman ne potenzia significativamente l'effetto analgesico, tanto che rende significativa l'attività della dose di Ean pari a 3 mg/kg di mangostina (Eman da solo

non è significativamente analgesico a questa dose). Molto efficace diventa la dose di Eman di 30 mg/kg (associata a 400 mg/kg di CGS), tanto da superare in efficacia il celecoxib alla dose di 10 mg/kg.

- In conclusione, Eman, alle dosi pari a 10 e 30 mg/kg di mangostina, esercita un effetto analgesico notevole, significativo e dose dipendente. CGS è praticamente privo di effetti antinfiammatori alle dosi indagate (40, 133 e 400 mg/kg). Essa, però, sorprendentemente, potenzia l'effetto analgesico di Eman, tanto che con la dose di Eman pari a 30 mg/kg di mangostina (associata a 400 mg/kg di CGS) si osserva un effetto analgesico superiore a quello del celecoxib a 10 mg/kg.

10. Conclusioni

1. **Eman** esercita le seguenti attività.

a) Antinfiammatoria

L'attività antinfiammatoria è esercitata in vitro su diversi modelli sperimentali ed è probabilmente correlata ad un'attività inibitrice di Eman sulle COX-2 (ciclossigenasi indotte da noxa proinfiammatorie). Eman non influenza invece le ciclossigenasi costitutive (COX-1) che svolgono effetti protettivi sulle mucose gastrointestinali e

sull'apparato renale.

L'attività antinfiammatoria di Eman è stata confermata in vivo sull'edema da zymosan nel ratto in cui Eman è stata somministrata per via orale.

b) Condroprotettrice

L'attività condroprotettrice di Eman è dimostrata in vitro dalla capacità di inibire l'espressione di citochine condrolesive (IL-1, TNF α , PGE2) e dalla capacità di inibire i danni condrolesivi provocati da IL 1 β . Inoltre, Eman stimola l'espressione di IL-10, citochina condroprotettrice e antinfiammatoria.

c) Analgesica

L'attività analgesica di Eman è dimostrata in vivo nel ratto con somministrazione orale di Eman applicando l'analgesimetro sulla zampa resa iperalgesica con un'iniezione subplantare di zymosan.

2. La glucosamina solfato cristallina (CGS) esercita una potente condroprotezione, inibendo la depolimerizzazione dei proteoglican-aggregati della cartilagine articolare indotta da citochine condrolesive come l'IL-1 β . La concentrazione di CGS efficace al 50% è 2,3 μ M.

CGS non ha mostrato effetti significativi sugli altri modelli sperimentali utilizzati in questo

studio.

3. Associazione di Eman con glucosamina solfato cristallina (Ass)

CGS, che da sola svolge soltanto un effetto condroprotettivo inibendo la depolimerizzazione dei proteoglican-aggregati, potenzia in modo notevole, sorprendente e imprevisto:

- a) l'effetto inibente che Eman esercita sull'espressione di citochine proinfiammatorie e condrolesive (IL-1, TNF α , PGE2);
- b) l'effetto inibente di Eman sull'espressione di PGE2, marker di COX-2;
- c) l'effetto stimolante di Eman sull'espressione di IL-10, citochina che si oppone alle citochine proinfiammatorie e condrolesive e che svolge effetti condroprotettori.

CGS potenzia anche:

- a) l'attività antinfiammatoria di Eman in vivo;
- b) l'attività analgesica di Eman in vivo.

ESEMPI

Le formulazioni qui di seguito riportate illustrano possibili applicazioni pratiche della presente invenzione e come tali non devono essere ritenute, in alcun modo, limitative dell'invenzione stessa.

Si fa particolare riferimento agli eccipienti delle varie forme considerate, che possono essere utilizzati in alternativa a quelli esplicitamente menzionati nella presente invenzione, dipendentemente dalle esigenze formulativo-tecnologiche e che comunque possono essere scelti fra una larghissima serie di prodotti presenti sul mercato e ben noti agli esperti di tecnica farmaceutica e pertanto di nessuna originalità inventiva.

Esempio 1: Compresse per uso orale

La formulazione riportata (Tabella 10), concerne principi attivi ed eccipienti (con descrizione della corrispondente funzione tecnologica) che possono essere impiegati nella preparazione di compresse da utilizzarsi per la somministrazione orale dell'oggetto della presente invenzione.

La dose giornaliera dei principi attivi è incorporata in un'unica compressa la cui preparazione richiede solo normali operazioni ben note a qualsiasi tecnico del settore e cioè:

- Pesata dei singoli componenti la formulazione.
- Granulazione a umido, mediante soluzione acquosa di Polivinilpirrolidone K-25, di CGS e cellulosa microcristallina (Granulato A) in un opportuno granulatore.

- Essiccamento del Granulato A in stufa a circolazione d'aria a temperatura non superiore a 50°C e fino a peso costante (è utilizzabile qualsiasi altro tipo di essiccamento purché previamente validato).
- Setacciatura del Granulato A e degli altri componenti la formulazione.
- Preparazione della miscela di compressione per omogeneizzazione del Granulato A con gli altri componenti la formulazione in un opportuno miscelatore.
- Compressione della risultante miscela in un'opportuna comprimitrice automatica con ottenimento finale di compresse aventi forma e dimensioni opportune.

Tabella 10. Esempio di formulazione in compresse

Principi attivi	Quantità/compressa
Garcinia mangostana frutto estr. secco ^(*) (Corrispondente a mangostina)	75 mg (30 mg)
Glucosamina solfato cristallina (Corrispondente a glucosamina)	400 mg (250 mg)

(*) Contiene il 40% di mangostina

Eccipienti	Quantità/compr.	Funzione
Cellulosa microcristallina ^(*)	31,6 mg	Diluente/Disintegr.
Polivinilpirrolidone K-25 ^(*)	11,8 mg	Legante
Carbossimetilcellulosa sodica cross-linkata ^(**)	q.b.	Disaggregante
Talco ^(**)	q.b.	Lubrif./Antiaderente
Mg stearato ^(**)	q.b.	Lubrif./Antiaderente
Acqua ^(***)	q.b.	Supporto formulativi

(*) Utilizzati nella preparazione del granulato di GSC (granulato A)

(**) Le quantità assolute e relative di questi eccipienti dipendono dalle dimensioni e forma del punzone di compressione, dal tipo di comprimitrice e dal sistema di caricamento delle polveri nella camera di compressione in essa installato

(***) L'acqua viene impiegata nella preparazione del granulato A e la sua quantità relativa ai componenti del granulato stesso dipende dal tipo e dalle dimensioni del granulatore impiegato. Essa viene completamente eliminata in fase di essiccamento.

Esempio 2: Capsule per uso orale

La formulazione riportata (Tabella 11), concerne principi attivi ed eccipienti (con descrizione della corrispondente funzione tecnologica) che possono essere impiegati nella preparazione di capsule da utilizzarsi per la somministrazione orale dell'oggetto della presente invenzione.

La dose giornaliera dei principi attivi è incorporata in un'unica capsula la cui preparazione richiede solo normali operazioni ben note a qualsiasi tecnico del settore e cioè:

- pesata dei singoli componenti la formulazione
- preparazione della miscela da incapsulare per omogeneizzazione a secco in un opportuno miscelatore
- riempimento finale in un'opercolatrice automatica in capsule di gelatina dura di dimensioni opportune e del colore desiderato.

Tabella 11. Esempio di formulazione in capsule

Principi attivi	Quantità/capsula
Garcinia mangostana frutto estr. secco ^(*) (Corrispondente a mangostina)	75 mg (30 mg)
Glucosamina solfato cristallina (Corrispondente a glucosamina)	400 mg (250 mg)

(*) Contiene il 40% di mangostina

Eccipienti	Quantità/caps	Funzione
Cellulosa microcristallina ^(*)	q.b.	Diluente/Disintegrante
Talco ^(*)	q.b.	Lubrif./Antiaderente
Mg stearato ^(*)	q.b.	Lubrif./Antiaderente

(*) Le quantità assolute e relative degli eccipienti dipendono dalla dimensione delle capsule utilizzate come veicolo di somministrazione e dal tipo/sistema

di dosaggio installato sull'opercolatrice impiegata nella ripartizione in capsule della formulazione.

Esempio 3: Polvere per sospensione estemporanea per uso orale in bustine termosaldate

La formulazione (Tabella 12) concerne principi attivi ed eccipienti (con descrizione della corrispondente funzione tecnologica) che possono essere impiegati nella formulazione di una polvere per la preparazione di sospensioni estemporanee da assumere per via orale. La dose giornaliera è incorporata in un'unica porzione di polvere, contenuta in una bustina termosaldata e costituita da uno strato esterno di carta, un'interfaccia di alluminio ed uno strato interno di polietilene.

Le operazioni di preparazione della forma farmaceutica in oggetto, ben note ed applicate da qualsiasi staff tecnico del settore, sono essenzialmente le seguenti:

- pesata e setacciatura dei singoli componenti la formulazione
- preparazione della miscela dei componenti per omogeneizzazione a secco in un opportuno miscelatore
- termoformatura delle bustine in un'opportuna li-

nea automatica

- riempimento e sigillatura delle bustine sulla stessa linea automatica sopra descritta con ottenimento finale di bustine aventi la forma e le dimensioni desiderate e contenenti la polvere monodose per uso estemporaneo.

Tabella 12. Esempio di formulazione di polvere per sospensione estemporanea da ripartire in bustine

Principi attivi	Quantità/bustina
Garcinia mangostana frutto estr. secco ^(*) <i>(Corrispondente a mangostina)</i>	75 mg <i>(30 mg)</i>
Glucosamina solfato cristallina <i>(Corrispondente a glucosamina)</i>	400 mg <i>(250 mg)</i>

(*) Contiene il 40% di mangostina

Eccipienti	Quantità/bust.	Funzione
Sorbitolo ^(*)	q.b.	Diluente/Dolcificante
Acido citrico ^(*)	q.b.	Esaltazione sapore
Polietilen glicole 4000 ^(*)	q.b.	Lubrif./Plastificante
Altri ^(**)	q.b.	Dolcificanti/Aromatizz.

(*) Le quantità assolute e relative di questi eccipienti dipendono dal tipo di imbustinatrice impiegata e dalle dimensioni delle bustine.

(**) Agenti aromatizzanti e dolcificanti possono essere aggiunti liberamente, dipendentemente dalle preferenze organolettiche.

BIBLIOGRAFIA

1. Bassleer CT, Combal J-PA, Bougaret S, Malaise M. Effects of chondroitin sulfate and interleukin-1 β on human articular chondrocytes cultivated in clusters. *Osteoarthritis Cartilage* 1998; 6:196-204.
2. Berenbaum F, Thomas CGS, Poiraudreau S, Béréziat G, Corvol MT, Masliah J. Insulin-like growth factors counteract the effect of interleukin-1 β on type II phospholipase A2 expression and arachidonic acid release by rabbit articular chondrocytes. *FEBS Lett* 1994; 340:51-55.
3. Carr AJ. Beyond disability: measuring the social and personal consequences of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 1999; 7:230-238.
4. Carr AJ. Beyond disability: measuring the social and personal consequences of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 1999; 7:230-238.
5. Creamer P, Hochberg MC. Osteoarthritis. *Lancet* 1997; 350:503-509.
6. Di Rosa M, Willoughby DA. Screens for anti-inflammatory drugs. *J Pharm Pharmacol* 1971; 23,297.
7. Fan CT, De Su J (1997).

8. Farndale RW, Sayers CA, Barrett AJ. A direct spectrophotometric microassay for sulfated glycosaminoglycans in cartilage cultures. *Conn Tiss Res* 1982; 9:247-248.
9. *Garcinia mangostana* Chem Pharm Bull (Tokyo) 51(7) 857-859.
10. Guidance for Industry and reviewers. Estimate safe starting dose in clinical trials. FDA, CDER 2002.
11. Hartel C, von Puttkamer J, Gallner F, Strunk T, Schultz C. Dose-dependent immunomodulatory effects of acetylsalicylic acid and indomethacin in human whole blood: potential role of cyclooxygenase-2 inhibition. *Scand J Immunol*. 2004;60: 412-420.
12. Iinuma M, Tosa H, Tanaka T, Asai F et al (1996).
13. McKenzie LS, Horsburgh BA, Gosh P, Taylor TKF: Osteoarthritis: unceratin rationale for antiinflammatory drug therapy. *Lancet*, 1976; 1:980.
14. Mahabusarakam W, Wiriyachitra P, Phongpaichit S (1986).
15. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* J Pharm Pharmacol 48(8) 861-865.

16. Nakatani K, Atsumi M, Arakawa T, Oosawa K, Shimura S, Nakahata N, Ohizumi Y. Inhibitions of histamine release and prostaglandin E2 synthesis by mangosteen, a Thai medicinal plant. Biol Pharm Bull 2002; 25:1137-1141.
17. Nakatani K, Nakahata N, Arakawa T, Yasuda H, Ohizumi Y. Inhibition of cyclooxygenase and prostaglandin E2 synthesis by gamma-mangostin, a xanthone derivative in mangosteen, in C6 rat glioma cells. Biochem Pharmacol 2002; 63:73-79.
18. Noyszewski EA, Wroblewski K, Dodge GR, Kudchodkar S, Beers J, Sarma AVS, Reddy R. Preferential incorporation of glucosamine into the galactosamine moieties of chondroitin sulfates in articular cartilage explants. Arthritis Rheum 2001; 44:1089-1095.
19. Panara MR, Renda G, Sciulli MG, Santini G, Di Giamberardino M, Rotondo MT, Tacconelli S, Seta F, Patrono C, Patrignani P. Dose-dependent inhibition of platelet cyclooxygenase-1 and monocyte cyclooxygenase-2 by meloxicam in healthy subjects. J Pharmacol Exp Ther 1999; 290:276-280.
20. Pavelká K, Gatterova J, Olejarova M, Machacek S, Giacobelli G, Rovati LC. Glucosamine sulfate use

and delay of progression of knee osteoarthritis: a 3-year, randomized, placebo-controlled, double-blind study. Arch Intern Med 2002; 162:2113-2123.

21. Piperno M, Reboul P, Hellio Le Graverand MP, Peschard MJ, Anfeld M, Richard M, Vignon E. Glucosamine sulfate modulates dysregulated activities of human osteoarthritic chondrocytes in vitro. Osteoarthritis Cartilage 2000; 8:207-212.

22. Randall LO, Selitto JJ. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. Arch Int Pharmacodyn 1957; 111:409.

23. Reginster JY, Deroisy R, Rovati LC, Lee RL, Lejeune E, Bruyere O, Giacovelli G, Henrotin Y, Dacre JE, Gossett C. Long-term effects of glucosamine sulfate on osteoarthritis progression: a randomized, placebo-controlled clinical trial. Lancet 2001; 357:251-256.

24. Rodén L. Effect of hexosamines on the synthesis of chondroitin sulfuric acid in vitro. Arkiv för Kemi 1956; 10:345-352.

25. Sabatini M, Lesur C, Thomas M, Chomel A, Anract P, de Nanteuil G, Pastoureau P. Effect of inhibition of matrix metalloproteinases on cartilage loss in vitro and in a guinea pig model of osteoarthri-

- tis. Arthritis Rheum. 2005; 52, 171-180.
26. Sandy JD, Gamett D, Thompson V, Verscharen C. Chondrocyte-mediated catabolism of aggrecan: aggrecanase-dependent cleavage induced by interleukin-1 or retinoic acid can be inhibited by glucosamine. Biochem J 1998; 335:59-66.
27. Setnikar I, Giachetti C, Zanolo G. Pharmacokinetics of glucosamine in the dog and in man. Arzneimittelforschung 1986; 36:729-735.
28. Suksamrarn S, Suwannapoch N, Phakhodee W, Thanuhiranlert J et al (2003).
29. Sundry JS, Patel DD, Haynes BF. Cytokines and cytokine receptors. In: Gallin JI, Snyderman R eds. Inflammation basic principles and clinical correlates. Lippincott Philadelphia 1999 Appendix B, pages 1303-1308.
30. Towheed TE, Anastassiades TP, Shea B, Houpt J, Welch V, Hochberg MC. Glucosamine therapy for treating osteoarthritis (Cochrane Review). In: The Cochrane Library, Issue 2, 2001. Oxford: Update Software.
31. Vidal y Plana RR, Karzel K. Glukosamin. Seine Bedeutung für den Knorpelstoffwechsel der Gelenke.

Biochemie der Proteoglycane. Untersuchungen auf in vitro-Kulturen embryonaler Mäuse-Fibroblasten und Knochenanlagen. Fortschr Med 1980;98:555-562.

32. Volpi N. Oral absorption and bioavailability of ichthyc origin chondroitin sulfate in healthy male volunteers. Osteoarthritis Cartil 2003; 11:433-441.

33. Williams P, Ongsakul M, Proudfoot J, Croft K, Beilin L (1994) Mangostin inhibits the oxidative modification of human low density lipoprotein. Free Rad Res 23:175-184.

TABELLE

Tabella 1. Sangue umano. Espressione di IL-1 stimolata da 1 $\mu\text{g/ml}$ di LPS

Medie e DS. N = 8

Prodotto μM	IL-1 ng/ml	DS ng/ml	Diff.% vs Controllo	IC50 μM
Controllo	4,55	0,28	0,0	
Man 3	4,74	0,18	4,1	
Man 10	4,49	0,20	-1,3	65
Man 30	3,06	0,20	-32,7	
CGS 30	4,65	0,20	2,1	
CGS 100	4,72	0,19	3,6	ND
CGS 300	4,69	0,21	3,1	
Ass 3	4,51	0,22	-0,9	
Ass 10	2,75	0,19	-39,6	22
Ass 30	1,36	0,17	-70,2	
SB 0,3	3,44	0,40	-24,5	
SB 1	2,48	0,24	-45,6	1,6
SB 3	1,35	0,15	-70,4	

Tabella 2. Sangue umano. Espressione di TNF α stimolata da 1 μ g/ml di LPS

Medie e DS. N = 8

Prodotto μ M	TNF α ng/ml	DS ng/ml	Diff.% vs Controllo	IC50 μ M
Controllo	15,96	2,45	0,0	
Man 3	15,65	2,50	-2,0	
Man 10	13,60	2,40	-14,8	38
Man 30	7,06	0,96	-55,8	
CGS 30	14,70	2,25	-7,9	
CGS 100	13,80	2,35	-13,5	>300
CGS 300	12,70	2,22	-20,4	
Ass 3	13,80	2,50	-13,5	
Ass 10	10,07	2,40	-36,9	20
Ass 30	5,89	0,96	-63,1	
SB 0,3	12,47	1,10	-21,9	
SB 1	9,25	1,03	-42,1	2,8
SB 3	7,68	0,95	-51,9	

Tabella 3. Sangue umano. Espressione di IL-10 stimolata da 1 $\mu\text{g/ml}$ di LPS

Medie e DS. N = 8

Prodotto μM	IL-10 ng/ml	DS ng/ml	Diff.% vs Controllo
Controllo	0,25	0,07	0,0
Man 3	0,27	0,05	6,3
Man 10	0,32	0,06	27,6
Man 30	0,73	0,08	187,4
CGS 30	0,25	0,05	-3,5
CGS 100	0,26	0,06	1,6
CGS 300	0,27	0,06	6,3
Ass 3	0,29	0,05	12,6
Ass 10	0,40	0,06	57,5
Ass 30	0,90	0,10	253,5
SB 0,3	0,39	0,06	53,9
SB 1	0,48	0,09	87,4
SB 3	0,69	0,07	170,9

Tabella 4. Sangue umano. Produzione di trombossano (TXB2) stimolata da coagulazione

Medie e DS. N = 8

Prodotto μM	TXB2 ng/ml	DS ng/ml	Diff.% vs Controllo
Basale	120	10	0,0
Man 1	104	12	-13,3
Man 3	91	11	-24,2
Man 10	99	9	-17,5
CGS 10	124	28	3,3
CGS 30	118	23	-1,7
CGS 100	125	20	4,2
Ass 1	115	17	-4,2
Ass 3	100	6	-16,7
Ass 10	108	4	-10,0

Tabella 5. Sangue umano. Espressione di PGE2 stimolata da 100 µg/ml di LPS

Medie e DS. N = 8

Prodotto µM	PGE2 ng/ml	DS ng/ml	Diff.% vs Controllo	IC50 µM
Controllo	24,5	2,2	0,0	
Man 1	20,2	1,8	-17,6	
Man 3	16,4	1,5	-33,1	12,3
Man 10	12,6	1,2	-48,6	
CGS 10	22,7	2,1	-7,3	
CGS 30	24,3	2,2	-0,8	ND
CGS 100	23,5	2,1	-4,1	
Ass 3	18,1	1,7	-26,1	
Ass 10	11,3	1,0	-53,9	7,8
Ass 30	6,2	0,6	-74,7	
SB 0,3	18,4	1,7	-24,9	
SB 1	8,7	0,8	-64,5	0,8
SB 3	2,4	0,2	-90,2	

Tabella 6. Condrociti di coniglio. Produzione di PGE2 stimolata da 1 ng/ml di IL-1 β

Medie e DS. N = 8

Prodotto μ M	PGE2 ng/ml	DS ng/ml	Diff.% vs Controllo	IC50 μ M
Basale	9	4		
IL-1 β	188	77	0,0	
Man 0,1	144	12	-23,4	
Man 0,3	95	15	-49,5	0,38
Man 1	20	6	-89,4	
Man 3	11	5	-94,1	
CGS 1	200	60	6,4	
CGS 3	180	70	-4,3	ND
CGS 10	210	60	-11,7	
Ass 0,1	140	45	-25,5	
Ass 0,3	105	12	-44,1	0,42
Ass 1	22	9	-88,3	

Tabella 7. Espianti di cartilagine di coniglio.

Percento GAG rilasciati

Medie e DS. N = 6

Prodotto μM	%GAG rilasciati	DS	Diff.% vs Basale	PC50 μM
Basale	10	2	85,5	
IL-1 β	69	10	0,0	
Man 0,1	72	12	-4,3	
Man 0,3	62	17	10,1	ND
Man 1	65	10	5,8	
CGS 1	41	10	40,6	
CGS 3	25	8	63,8	2,3
CGS 10	16	9	76,8	
Ass 0,1	43	12	37,7	
Ass 0,3	24	8	65,2	2,2*
Ass 1	15	3	78,3	
CHX	12	5	82,6	

*Riferito a CGS

Tabella 8. Ratto. Edema della zampa da zymosan. E-
dema mlx24 ore

Medie, differenze e ES. N = 10

Prodotto e dose	Edema Δ mlx24h	Diff. vs Controllo	ES Diff.	t_{diff}	Diff.% vs Controllo
Controllo	15,7	0,0	0,47	0,00	0
Man 3 mg/kg	15,3	-0,4	0,46	0,85	-3
Man 10 mg/kg	14,6	-1,1	0,47	2,35	-7
Man 30 mg/kg	12,9	-2,8	0,45	6,37	-18
CGS 40 mg/kg	15,6	-0,1	0,47	0,22	-1
CGS 133 mg/kg	15,4	-0,3	0,47	0,64	-2
CGS 400 mg/kg	15,2	-0,6	0,41	0,47	-4
Ass 3	14,6	-1,1	0,46	2,44	-7
Ass 10	13,4	-2,4	0,44	5,37	-15
Ass 30	10,9	-4,8	0,41	11,74	-31
CLX 10 mg/kg	11,8	-4,7	0,41	11,28	-30

Tabella 9. Ratto. Attività analgesica delle sostanze in esame

Medie, differenze e ES. N = 10

Prodotto e dose	Analgesia Δ gx24h	Diff. vs Controllo	ES Diff.	t_{diff}	Diff.% vs Controllo
Controllo	1071	0,0	126	0,00	0
Man 3 mg/kg	931	-140	118	1,18	-13
Man 10 mg/kg	694	-378	106	3,55	-35
Man 30 mg/kg	557	-514	101	5,11	-48
CGS 40 mg/kg	1079	7	127	0,22	1
CGS 133 mg/kg	1012	-59	123	0,64	-6
CGS 400 mg/kg	1026	-46	124	1,21	-4
Ass 3	923	-148	118	2,44	-14
Ass 10	680	-391	106	5,37	-36
Ass 30	436	-635	96	11,74	-59
CLX 10 mg/kg	574	-497	101	11,28	-46

RIVENDICAZIONI

1. Composizione farmaceutica o di integratore alimentare o di un'altro preparato, comprendente glucosamina, sotto forma di un suo sale semplice o misto, in associazione con mangostina.
2. Composizione secondo la rivendicazione 1, caratterizzata dal fatto che comprende glucosamina solfato cristallina.
3. Composizione secondo le rivendicazioni 1 o 2, caratterizzata dal fatto che comprende un estratto del frutto di *Garcinia mangostana* contenente mangostina.
4. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 3, caratterizzata dal fatto che comprende un estratto secco del frutto di *Garcinia mangostana* che presenta un contenuto di mangostina da 10% a 60% in peso, preferibilmente 40% in peso.
5. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 4, caratterizzata dal fatto che comprende glucosamina e mangostina in un range di rapporti molari compreso tra 2,5:1 e 500:1, preferibilmente tra 10:1 e 50:1, particolarmente 19:1.
6. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 5, in forme idonee alla somministrazione orale, quali compresse, capsule o polvere

da utilizzare come sospensione in veicolo acquoso o liquide.

7. Impiego di una composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 6, per la preparazione di un medicamento o di un integratore alimentare o di un altro preparato utile per mantenere il benessere e il trofismo osteoarticolare.

8. Impiego di una composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 6, per preparare un medicamento o un integratore alimentare o un altro preparato utile nel trattamento di affezioni dell'apparato osteoarticolare di carattere degenerativo o infiammatorio.

9. Impiego di una composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 6 per preparare un medicamento o un integratore alimentare o altro preparato, utile per il trattamento e la prevenzione dell'osteoartrite.

10. Impiego di una composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 6 per la preparazione di un medicamento o di un integratore alimentare o di un altro preparato aventi attività anti-COX-2.

11. Impiego di una composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 6 per la preparazione di un medicamento o di un integratore alimentare

o di un altro preparato aventi attività antinfiammatoria e/o analgesica.

12. Impiego di una composizione, per somministrazione orale, secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 6 per la preparazione di un medicamento o di un integratore alimentare o di un altro preparato idonei per la somministrazione contemporanea di 200-1000 mg di glucosamina come tale o sotto forma di un suo sale semplice o misto e di mangostina alle dosi da 5 a 180 mg come tale o sotto forma di estratto del frutto di *Garcinia mangostana* e preferibilmente di estratto secco contenente da 10% a 60% in peso di mangostina.