

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 287**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/05** (2006.01)

**A61K 31/7024** (2006.01)

**A61P 29/00** (2006.01)

**A61P 31/12** (2006.01)

**A61P 3/00** (2006.01)

**A61P 9/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2013 E 13171794 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017 EP 2674155**

54 Título: **Asociación de resveratrol y carboximetilglucano**

30 Prioridad:

**13.06.2012 IT RM20120275**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**04.12.2017**

73 Titular/es:

**NOOS S.R.L. (100.0%)  
Via Campello sul Clitunno 34  
00181 Roma, IT**

72 Inventor/es:

**MORETTI, GIANCARLO y  
MOSCA, LUCIANA**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 645 287 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Asociación de resveratrol y carboximetilglucano

5 La presente invención se refiere a la asociación de resveratrol y carboximetilglucano (CMG) con el fin de aumentar la solubilidad en solución acuosa y la consiguiente biodisponibilidad de resveratrol, así como para fortalecer la estabilidad de esta molécula. La presente invención se refiere además a composiciones farmacéuticas, suministros dietéticos, dispositivos médicos, cosméticos, piezas funcionales de productos alimenticios y veterinarios y el uso de los mismos.

10 Estado de la técnica

15 El resveratrol (3,4',5-trihidroxiestilbeno) pertenece a una clase de polifenoles definidos estilbenos o fitoalexinas y es producido por las plantas en respuesta a tensiones, daños, infecciones causadas por hongos y rayos ultravioleta (UV). Se puede encontrar en altas concentraciones en las cáscaras de uva roja, así como en frambuesas, moras, arándanos y en *Polygonum cuspidatum*, una planta herbácea perenne perteneciente a la misma familia de trigo sarraceno, conocida desde tiempos antiguos como hierba laxante y ocasionalmente utilizado como alimento. Los extractos de *P. cuspidatum* representan una rica fuente de resveratrol, ya que la concentración de este polifenol en el extracto puede llegar incluso al 98 %. Durante los últimos años se ha demostrado que este compuesto tiene varios efectos ventajosos con respecto a patologías neurodegenerativas, tumores y aterosclerosis. Las propiedades antioxidantes y la capacidad de modular algunas de las rutas de señalización intracelular más importantes (principalmente aquellas mediadas por NF-kB) son los elementos principales en la base de su actividad (1-3).

25 Gracias a su acción antioxidante, el resveratrol podría interferir con el estado redox intracelular implicado en las infecciones virales. De hecho, ha demostrado in vitro una fuerte actividad antiviral frente a un amplio número de virus, entre los que se encuentra el de influenza A, virus herpes simplex 1 y 2, citomegalovirus, virus varicela zoster, ortomixovirus, adenovirus, virus sincitial respiratorio y poliomavirus (4,5). Además, parece que tiene un efecto sinérgico con los fármacos antivirales utilizados contra el virus del VIH (6,7). No obstante las propiedades muy interesantes mencionadas, el resveratrol todavía se usa de manera limitada en formulaciones farmacéuticas sustancialmente por dos razones: pobre solubilidad en solución acuosa y estabilidad limitada. De hecho, el resveratrol es un polifenol lipofílico y, como tal, insoluble en sí mismo en ambientes acuosos (solubilidad en agua - 0,03 mg/ ml (8)). Esto hace difícil el uso del mismo en productos líquidos a base de agua y también es un problema para la biodisponibilidad de la molécula una vez ingerida. Aparte de esto, el resveratrol no es estable, sino que tiende a ser sometido a reacciones oxidantes que alteran las propiedades del mismo. Para confirmar esto, en la actualidad hay varios productos basados en el resveratrol en el mercado, en su mayor parte bajo la forma de tabletas, cápsulas o en polvo. Por lo tanto, se sintió, en el estado de la técnica, la necesidad de aumentar la solubilidad en solución acuosa de resveratrol y la estabilidad del mismo.

40 A. AMRI ET AL: "Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations?", JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, vol. 158, no. 2, 1 March 2012, páginas 182-193, divulga una mejora de la biodisponibilidad de resveratrol con perlas de zink-pectina, modificadas con adición de glutaraldehído o de quitosano. Sorprendentemente se ha encontrado que una asociación de resveratrol y CMG (carboximetilglucano) tiene éxito en el aumento de la solubilidad del resveratrol e incluso la estabilidad del mismo.

45 Un primer objeto de la presente invención es una asociación de resveratrol y/o sales de los mismos y CMG. En una realización tal asociación está constituida por resveratrol y CMG.

50 Un segundo objeto de la presente invención es una asociación de resveratrol y/o sales del mismo y CMG para uso en un tratamiento terapéutico humano o veterinario en particular de patologías inflamatorias, virales, diabéticas, cardíacas, neurodegenerativas, ateroscleróticas. En una realización tal asociación está constituida por resveratrol y CMG.

55 Otro objeto de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende, como principio activo, una asociación de resveratrol y/o sales farmacéuticamente aceptables del mismo y CMG y uno o uno o más vehículos y/o diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables, para uso en un tratamiento terapéutico humano o veterinario, en particular de patologías inflamatorias, virales, diabéticas, cardíacas, neurodegenerativas, ateroscleróticas. En una realización, tal composición comprende, como principio activo, una asociación constituida por resveratrol y CMG. Objeto adicional de la presente invención es un dispositivo médico y/o un suministro dietético y/o un alimento funcional y/o un producto cosmético que comprende una asociación de resveratrol y/o sales del mismo y CMG y uno o más vehículos y/o diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables para uso humano y veterinario.

60 Objeto adicional de la presente invención es un proceso para preparar la composición de acuerdo con la presente invención, en el que la asociación que comprende resveratrol y CMG se formula en unidades de dosificación adecuadas con uno o más vehículos y/o diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables.

65

Se adjuntan nueve figuras a la presente invención, en las que:

la figura 1 muestra el cromatograma de una muestra que contiene resveratrol, cuyo tiempo de retención resulta ser de aproximadamente 6 min, bajo las condiciones cromatográficas descritas a continuación;

la figura 2 muestra el espectro de absorción UV-Vis del resveratrol del pico mostrado en la figura 1, con el máximo típico a 306 nm;

la figura 3 muestra el porcentaje de resveratrol con respecto al esperado detectado en HPLC para soluciones acuosas que contienen concentraciones crecientes de resveratrol y CMG en una relación 1: 1 en comparación con una solución de solo resveratrol;

la figura 4 muestra el porcentaje de resveratrol con respecto al esperado detectado en HPLC para soluciones acuosas que contienen concentraciones constantes de resveratrol (0,5 mg/ml) y concentraciones crecientes de CMG, en comparación con una solución de solo resveratrol;

la figura 5 muestra la estabilidad en el tiempo del resveratrol en solución acuosa a 0,03 mg/ml (límite de solubilidad en solución acuosa);

la figura 6 muestra la estabilidad en tiempo de resveratrol (0,5 mg/ml) en solución acuosa en presencia de CMG 1 mg/ml;

la figura 7 muestra la estabilidad en tiempo de resveratrol (1 mg/ml) en solución acuosa en presencia de CMG (1 mg/ml);

la figura 8 muestra la actividad metabólica de las células VERO en presencia de resveratrol 0,5 mg/ml, CMG 1 mg/ml o asociación de las dos moléculas, 6 horas después de la exposición;

la figura 9 muestra el aumento de solubilidad del acetil-resveratrol y trimetiléter de resveratrol en presencia de CMG al 0,1 %, respectivamente, en comparación con el valor de solubilidad del compuesto puro tomado como referencia.

#### Descripción de la invención

La presente invención se refiere a una asociación de resveratrol y/o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y CMG en la que los dos componentes están presentes en una relación en peso de 20: 1 hasta 1: 100.

En una realización preferida, los dos componentes de la asociación se utilizan preferiblemente en los siguientes rangos de concentración incluso si dentro de la relación en peso mencionada anteriormente:

Resveratrol: solución de 0,003 % a 10 % en peso en solución acuosa

CMG: solución de 0,003 % a 10 % en peso en solución acuosa

Las dosis de los productos derivados de la presente invención podrían variar de acuerdo con las características farmacodinámicas de un agente específico, los modos de administración y la ruta, raza, edad, sexo, peso, estado de salud del usuario, naturaleza y extensión del síntoma, tipo de tratamiento concurrente, frecuencia de tratamiento.

CMG es un compuesto que tiene propiedades bioprotectoras significativas, como agente antimutagénico, antígenotóxico, antioxidante y antitumoral (9-11). Se cree que el mecanismo que está en la base de los efectos protectores de CMG es su capacidad de actuar como "depurador" de las especies reactivas de oxígeno (12), ya a concentraciones muy bajas. Además, CMG ha demostrado aumentar significativamente los niveles de linfocitos T CD4+ y CD8+ en pacientes con cáncer de próstata (13) y estimular la producción de TNF-alfa por el tejido macrófago mediante el aumento de la actividad fagocítica de los mismos (14,15 ). Estos datos subrayan entonces para esta molécula propiedades inmunomoduladoras considerables.

CMG, en el alcance de la presente patente, se refiere al producto como tal, de cualquier origen.

El resveratrol, en el alcance de la presente patente, se entiende en las formas disponibles: producto extraído de P. cuspidatum o de otras fuentes vegetales, diversas formas de la molécula disponible en el mercado o sintetizada en laboratorio, todas las sales posibles de resveratrol obtenidas por medios de salificación, sustituciones, derivaciones y/o enlaces a grupos reactivos de la molécula. Como sales adecuadas en el alcance de la presente invención se pueden mencionar las compatibles con las formulaciones farmacéuticas, nutracéuticas y cosméticas. Entre los vehículos y/o los diluyentes y/o excipientes aceptables, de acuerdo con la ruta de administración y con la práctica de los estándares farmacéuticos/nutricionales se pueden mencionar los siguientes:

- para las formulaciones líquidas, preferiblemente un vehículo que comprende: sacarosa o sacarosa con glicerina y/o manitol y/o sorbitol, polisorbato 20, PEG, propilenglicol;

5     • para las formulaciones bajo suspensión y emulsión preferiblemente un vehículo que comprende: un caucho natural, agar, alginato de sodio, pectina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa o alcohol polivinílico.

- para las formulaciones inyectables preferiblemente un vehículo que comprende: agua estéril, aceite de oliva, oleato de etilo, propilenglicol y una cantidad adecuada de clorhidrato de lidocaína;

10     • para las formulaciones sólidas preferiblemente un vehículo que comprende uno o más diluyentes tales como: lactosa, dextrosa, sacarosa, celulosa, almidón de maíz; uno o más lubricantes tales como: sílica, ácido esteárico, estearato de magnesio o de calcio, polietilenglicoles; uno o más agentes aglomerantes (aglutinantes) tales como: almidones, mucílagos, gelatina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, o polivinilpirrolidona; uno o más agentes desagregantes tales como: almidón, ácido algínico, alginatos o glicolatos; mezclas efervescentes; desecantes; endulzantes; uno o más agentes humectantes tales como: lecitina, polisorbato, laurilsulfato; sustancias conocidas, inactivas y no tóxicas desde el punto de vista farmacéutico/nutracéutico.

15     Los vehículos, diluyentes y excipientes mencionados anteriormente se entienden exclusivamente a manera de ejemplo, sin embargo no constituyen una lista exhaustiva.

20     Las ventajas de la asociación de acuerdo con la presente invención son las siguientes:

1) la solubilización del resveratrol y la estabilización del mismo en solución acuosa;

25     2) la mayor estabilidad del polifenol en solución constituye una ventaja desde el punto de vista industrial para la producción de formulaciones líquidas. De hecho, esta asociación permite obtener una vida útil prolongada del resveratrol, ya que la molécula no está sometida a degradación o al menos la degradación tiene lugar con un modo retardado;

30     3) a nivel productivo, la solubilización del resveratrol permite utilizar una menor cantidad de esta molécula en la producción de formulaciones líquidas de especialidades farmacéuticas, dispositivos médicos, suministros dietéticos, productos cosméticos, piezas funcionales de alimentos, productos veterinarios;

35     4) la mayor solubilidad y estabilidad del resveratrol permite una mejor biodisponibilidad del mismo. Esto hace que a nivel de tejido se alcancen mayores concentraciones de esta molécula en presencia de CMG con respecto a la ingestión de solo resveratrol, con el consecuente aumento de la eficiencia;

40     5) la solubilización del resveratrol permite el uso del mismo incluso en formulaciones para uso parenteral, enteral y/o intratecal;

6) dado que la CMG solubiliza el resveratrol haciéndolo más biodisponible y consecuentemente más efectivo, fortalece incluso los posibles efectos sinérgicos ya conocidos entre el resveratrol y otras moléculas.

45     Los datos de solubilidad y estabilidad del resveratrol se mostrarán a continuación, obtenidos utilizando una asociación en la que las concentraciones de resveratrol y CMG varían en una solución acuosa.

#### Métodos

##### Método de análisis en HPLC

50     El método cromatográfico ideado para determinar resveratrol proporciona el uso de un sistema Waters de HPLC constituido por una bomba, modelo 600, por un modulador de muestras de Waters mod. 717 y por un detector de conjunto de UV-Visible Photodiode mod 2996. El sistema es manejado por el software Millennium<sup>32</sup>. La columna cromatográfica utilizada es una Symmetry C-18 con longitud de 15 cm, asociada a una precolumna específica del mismo material con longitud de 1 cm. La elución se realiza bajo condiciones isocráticas usando las siguientes mezclas:

1) 30 % [Ácido acético 0,1 % en metanol] y 70 % [Ácido acético 0,1 % en agua]

60     2) 80 % [Ácido acético 10 % en agua] y 20 % [Acetonitrilo].

Para las mediciones se toman 50 µl de muestra, se diluyen en 500 µl de fase móvil y se inyecta una alícuota de 50 µl en HPLC.

65

Método para evaluar la actividad metabólica celular

5 La actividad metabólica celular se evalúa en la línea celular VERO, mediante el ensayo de proliferación celular MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). La prueba con MTT es un método simple para determinar la activación metabólica de las células y se basa en la acción de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa que reduce las sales de tetrazolio en cristales de un producto azulado llamado formazan. Por lo tanto, la reacción puede tener lugar solamente en las células metabólicamente activas y el valor de la densidad óptica (D.O.) obtenida mediante lectura espectrofotométrica puede correlacionarse con la cantidad de células vitales existentes.

10 Preparación de las soluciones

Las soluciones de CMG y resveratrol siempre se han preparada en una solución acuosa regulada, isotónica, fisiológica, que contiene pH, constituida por:

- 15 • fosfato dipotásico 0,74 %
- cloruro de sodio 0,42 %
- 20 • fosfato de potasio 0,175 %

Todas las soluciones se prepararon en frío y sin utilizar ningún solvente orgánico.

Determinación de la solubilidad del resveratrol

25 Con el fin de evaluar la solubilidad, con el consiguiente efecto sobre su biodisponibilidad, se prepararon formulaciones que contenían resveratrol en asociación con CMG a concentraciones crecientes (de 0,5 mg/ml a 10 mg/ml) en una relación 1: 1, en una solución acuosa de la composición antes mencionada. A partir de los resultados obtenidos se realizaron pruebas adicionales manteniendo constante la concentración de resveratrol a 0,5 mg/ml y aumentando la concentración de CMG de 0,025 mg/ml a 4 mg/ml. Los resultados muestran una alta actividad solubilizante de CMG sobre resveratrol.

Determinación de la estabilidad del resveratrol

35 El resveratrol en medio acuoso no es estable, pero tiende a ser sometido a reacciones de degradación.

La Figura 5 muestra los datos relacionados con la concentración de resveratrol detectada en una solución reguladora después de 8 meses de conservación a temperatura controlada (25 °C), en ambiente cerrado y protegido de la luz. La concentración examinada de la solución de resveratrol fue de 0,03 mg/ml, correspondiente a la cantidad máxima que se puede solubilizar en agua del producto original. Se observa que ya después de 2 meses tiene lugar una fuerte degradación del producto, que no se detecta más después de 7 meses. Con el fin de evaluar el efecto estabilizador de CMG sobre la molécula de resveratrol en solución acuosa se prepararon 2 soluciones manteniendo fija la concentración de CMG (1 mg/ml) y variando la del resveratrol (0,5 mg/ml y 1 mg/ml), con una relación CMG: resveratrol respectivamente de 2: 1 y 1: 1. Las dos soluciones se mantuvieron bajo las mismas condiciones descritas anteriormente para la solución de resveratrol solamente y se evaluaron en diferentes momentos a partir de la hora de su preparación. Se encontró que CMG es capaz de estabilizar el polifenol en solución acuosa, evitando su degradación.

Determinación de la actividad metabólica celular

50 Al considerar la aplicación de la asociación CMG-resveratrol para la formulación de productos farmacéuticos, suministros dietéticos, dispositivos médicos, productos cosméticos, piezas funcionales de alimentos, productos veterinarios, con la consiguiente interacción con los sistemas biológicos de hombres y animales en general, se evaluó incluso la posible citotoxicidad. En particular se realizaron pruebas de actividad metabólica celular en presencia de resveratrol y CMG en línea celular VERO. Las células se sembraron en placas de 96 pozos a una densidad igual a 7000 células por pozo. 24 horas después de la siembra, el medio de cultivo se reemplazó por medios que contenían resveratrol y/o CMG a las siguientes concentraciones:

- Resveratrol 0,5 mg/ml
- 60 • CMG 1 mg/ml
- Resveratrol 0,5 mg/ml + CMG 1 mg/ml

65 6 horas después de la exposición a estas sustancias, se añadió colorante MTT, luego el formazán producido por las células metabólicamente activas se extrajo con isopropanol y la densidad óptica se midió a 570 nm restando el valor de referencia a 690 nm.

Los resultados obtenidos muestran que en presencia de CMG se limita el efecto de la reducción de la actividad metabólica ejercida por el resveratrol cuando se usa sobre cultivos celulares a tan altas concentraciones.

5 Los productos objeto de la presente invención se pueden usar para preparar composiciones farmacéuticas, suministros dietéticos, piezas funcionales de alimentos y dispositivos médicos, con propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antivirales, antidiabéticas, cardioprotectoras, neuroprotectoras y quimioprotectoras.

10 Los productos objeto de la presente invención se pueden utilizar para preparar productos cosméticos, con propiedades antienvjecimiento y antioxidantes.

15 La presente invención se puede aplicar en la formulación de compuestos farmacéuticos, suministros dietéticos, dispositivos médicos, productos cosméticos, piezas funcionales de alimentos y productos para uso veterinario. La asociación, las composiciones farmacéuticas y veterinarias, los suministros dietéticos, los dispositivos médicos, las piezas funcionales de los alimentos y los productos cosméticos de acuerdo con la invención pueden utilizarse en el uso oral, tópico, parenteral, enteral, intratecal. Como formas de administración, pueden mencionarse formas líquidas o en gel constituidas por soluciones acuosas, jarabes, emulsiones, ungüentos, preparaciones para infusión, para administración intraperitoneal, subcutánea, intramuscular o formas sólidas tales como tabletas, cápsulas, polvo, granulado, a medida que esta asociación mejora la biodisponibilidad del resveratrol. Ventajosamente, la asociación de acuerdo con la invención puede estar asociada a otras moléculas farmacéuticamente/nutracéuticamente activas. A continuación se muestran algunos ejemplos ilustrativos, no limitativos, de la invención.

#### Ejemplo 1 (Figura 3)

25 Con el fin de evaluar la solubilidad del resveratrol, con el consiguiente efecto sobre su biodisponibilidad, se prepararon formulaciones que contenían resveratrol en asociación con CMG a concentraciones crecientes (0,5 mg/ml a 10 mg/ml) en relación 1: 1. El resveratrol y el CMG se solubilizaron en solución acuosa constituida por:

- fosfato de dipotasio 0,74 %
- 30 • cloruro de sodio 0,42 %
- fosfato de potasio 0,175 %

35 Las concentraciones probadas de CMG y resveratrol fueron las siguientes:

- CMG 0,5 mg/ml + resveratrol 0,5 mg/ml
- CMG 1 mg/ml + resveratrol 1 mg/ml
- 40 • CMG 2 mg/ml + resveratrol 2 mg/ml
- CMG 3 mg/ml + resveratrol 3 mg/ml
- 45 • CMG 4 mg/ml + resveratrol 4 mg/ml
- CMG 5 mg/ml + resveratrol 5 mg/ml
- CMG 7,5 mg/ml + resveratrol 7,5 mg/ml
- 50 • CMG 10 mg/ml + resveratrol 10 mg/ml

La determinación del resveratrol en disolución se realizó en HPLC de acuerdo con el método descrito en la sección específica.

55 A partir de los datos obtenidos (Figura 3) se observa una solubilización óptima del resveratrol, perceptible incluso con un simple examen visual, con una solubilización al menos 100 veces superior a la descrita en la bibliografía para este polifenol, el límite de solubilidad en agua del mismo es de 0,03 mg/ml. A concentraciones superiores a 5 mg/ml se observa un efecto de saturación, es decir, la concentración solubilizada de resveratrol permanece constante y no es más comparada con la cantidad existente de CMG.

#### Ejemplo 2 (Figura 4)

65 Se evaluó la solubilidad del resveratrol en una solución acuosa (de la misma composición descrita en el ejemplo 1) en presencia de CMG, utilizando soluciones en las que la concentración de resveratrol se mantuvo constante a 0,5 mg/ml, mientras que la concentración de CMG varió. En particular, se prepararon y probaron las siguientes concentraciones de CMG: 0,025 mg/ml, 0,05 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,75 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml y

4 mg/ml. Los resultados obtenidos confirman la acción altamente solubilizante de CMG sobre el resveratrol que ya comienza a partir de la concentración de 0,25 mg/ml, es decir con una relación CMG: resveratrol igual a 1: 2 (Figura 4).

- 5 Sin embargo, la solubilización del resveratrol ya es evidente a la concentración de 0,025 mg/ml, que corresponde a una ración CMG: resveratrol de 1:20, y aumenta gradualmente al aumentar la concentración de CMG.

Ejemplo 3 (Figura 5, Figura 6, Figura 7)

- 10 Partiendo de los datos de estabilidad del resveratrol en solución acuosa (Figura 5), en los que es evidente una fuerte degradación de la molécula ya después de 2 meses, se procedió a comprobar la estabilidad del resveratrol en presencia de CMG.

15 Las soluciones bajo examen se prepararon usando la misma solución acuosa descrita anteriormente y con las siguientes concentraciones de resveratrol y CMG:

a) Resveratrol 0,5 mg/ml + CMG 1 mg/ml

20 b) Resveratrol 1 mg/ml + CMG 1 mg/ml

Las soluciones, mantenidas en ambiente cerrado, a temperatura controlada ( $25 \pm 2$  °C) y protegidas de la luz, se examinaron en diferentes momentos a partir de la preparación de las mismas, obteniendo los siguientes resultados:

- 25 • Solución a) 11 meses después de la preparación, las concentraciones de resveratrol obtenidas se redujeron solamente en un 20 % con respecto a la basal (Figura 6)

• Solución b) 6 meses después de la preparación se detectó una reducción de la concentración de resveratrol de aproximadamente 20 % (Figura 7).

- 30 Estos datos muestran que CMG no solamente es capaz de solubilizar eficientemente el resveratrol, sino incluso de estabilizarlo en el tiempo en una solución acuosa, retardando la degradación natural del mismo.

Ejemplo 4 (Figura 8)

- 35 Al considerar la aplicación de la asociación de CMG y resveratrol para la formulación de productos farmacéuticos, suministros dietéticos, dispositivos médicos, cosméticos, piezas funcionales de alimentos, productos veterinarios y luego una interacción con los sistemas biológicos humanos, el perfil de seguridad de esta asociación fue examinado.

40 En particular, se realizaron pruebas de actividad metabólica sobre la línea celular VERO, comparando el efecto de los productos individuales y la asociación de los mismos. Se utilizaron las soluciones siguientes, resuspendidas directamente en el medio de cultivo:

• Resveratrol 0,5 mg/ml

- 45 • CMG 1 mg/ml

• Resveratrol 0,5 mg/ml + CMG 1 mg/ml

50 El efecto de la vitalidad celular se evaluó 6 horas después de la exposición a los productos. Los datos así obtenidos, comparados con los resultantes de las células no tratadas (CTRL), muestran que el resveratrol sobre sí mismo, a la concentración de 0,5 mg/ml (2,2 mM), determina 6 horas después de la exposición el 20 % de reducción en la actividad metabólica celular, mientras que el CMG solo no tiene influencia sobre la vitalidad celular. Del mismo modo, la exposición de las células a la asociación de resveratrol y CMG a las concentraciones anteriormente mencionadas (0,5 mg/ml de resveratrol + 1 mg/ml de CMG), no altera en modo alguno la actividad metabólica de las células, que muestra el efecto sorprendentemente positivo ejercido por CMG frente al resveratrol y su citotoxicidad natural (Figura 8). La asociación objeto de la presente patente permite así al resveratrol llevar a cabo las varias actividades biológicas de la misma en total seguridad, haciéndola aún más disponible a nivel celular.

Ejemplo 5 (Figura 9)

60 Referencia

65 Se evaluó la solubilidad de triacetil-resveratrol y de trimetiléter de resveratrol en una solución acuosa (de la misma composición descrita en el ejemplo 1) en presencia de CMG. En particular, se evaluó en primer lugar la solubilidad en fase acuosa de triacetil-resveratrol y de trimetil éter de resveratrol y este valor se consideró unitario. A continuación, se prepararon soluciones acuosas de las mismas sustancias en presencia de 1 mg/ml de CMG y se

comprobó la solubilidad de las mismas, lo que resulta que se incrementa en más de un tiempo y medio para el triacetilresveratrol y tres veces para el trimetiléter de resveratrol. Los resultados obtenidos confirman la acción altamente solubilizante de CMG sobre ambos compuestos.

## 5 Bibliografía

1. Pietraforte D. 2005. Antiossidanti polifenolici della dieta nella prevenzione delle patologie degenerative. ISS, reports ISTISAN 05/40.
- 10 2. Kasdallah-Grissa A, Mornagui B, Aouani E, et al., 2006. Protective effect of resveratrol on ethanol-induced lipid peroxidation in rats. *Alcohol Alcoholism* 41:236-9.
- 15 3. Tsai SH, Lin-Shiau SY, Lin JK. 1999. Suppression of nitric oxide synthase and the down-regulation of the activation of NF- $\kappa$ B in macrophages by resveratrol. *British J Pharmacol* 126:673-680.
4. Palamara AT, Nencioni L, Aquilano K, et al., 2005. Inhibition of influenza A virus replication by resveratrol. *J Infect Dis* 191:1719-1729.
- 20 5. Drago L, Nicola L, Ossola F, et al., 2008. In vitro antiviral activity of resveratrol against respiratory viruses. *J Chemother* 20:393-394.
6. Ragione FD, Cucciolla V, Borriello A, et al., 1998. Resveratrol arrests the cell division cycle at S/G2 phase transition. *Biochem Biophys Res Commun* 250:53-58.
- 25 7. Wang LX, Heredia A, Song H, et al., 2004. Resveratrol glucuronides as the metabolites of resveratrol in humans: characterization, synthesis, and anti-HIV activity. *J Pharm Sci* 93:2448-2457.
8. <http://it.wikipedia.org/wiki/Resveratrolo>
- 30 9. Wang Y, Yu Y, Mao J, 2009. Carboxymethylated beta-glucan derived from *Poria cocos* with biological activities. *J.Agric Food Chem* 57 (22):10913-5.
10. Babincová M, Bacová Z et al, 2002. Antioxidant properties of carboxymethyl glucan: comparative analysis. *J Med Food* 5(2): 79-83.
- 35 11. Magnani M, Castro-Gomez RJ et al. 2011. Protective effect of carboxymethyl-glucan (CM-G) against DNA damage in patients with advanced prostate cancer. *Genet Mol Biol* 34 (1):131-5.
12. Schronerová K, Babincová M et al, 2007. Carboxymethylated (1-3)-beta-D-glucan protects liposomes against ultraviolet light-induced lipid peroxidation. *J Med Food* 10 (1): 189-193.
- 40 13. Magnani M, Castro-Gomez RH et al, 2012. Analysis of peripheral T cells and the CC chemokine receptor (CCR5) delta 32 polymorphism in prostate cancer patients treated with carboxymethyl-glucan (CM-G). *Nat Prod Res*,26(10): 945-951.
- 45 14. Dergunova MA, Alexeenko TV et al, 2009. Characterization of the novel chemically modified fungal polysaccharides as the macrophage stimulators. *Int Immunopharmacol* 9(6): 729-33.
- 50 15. Majtán J, Kogan et al, 2005. Stimulation of TNF-alpha release by fungal cell wall polysaccharides. *Z Naturforsch C* 60 (11-12): 921-6.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una asociación de resveratrol y/o sales y carboximetilglucano, en la que resveratrol y carboximetilglucano están presentes en una relación en peso comprendida entre 20: 1 y 1: 100.
2. La asociación de acuerdo con la reivindicación 1 constituida por resveratrol y carboximetilglucano.
- 10 3. La asociación de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 2 para uso en un tratamiento terapéutico humano o veterinario.
4. La asociación de acuerdo con la reivindicación 3 para uso en el tratamiento de patologías inflamatorias, virales, diabéticas, cardíacas, neurodegenerativas y ateroscleróticas.
- 15 5. Una composición que comprende una asociación de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 2 y uno o más vehículos y/o diluyentes y/o excipientes y/o aditivos farmacéuticamente/nutracéuticamente aceptables.
6. La composición de acuerdo con la reivindicación 5 para uso en el tratamiento de patologías inflamatorias, virales, diabéticas, cardíacas, neurodegenerativas y ateroscleróticas.
- 20 7. Un suministro dietético que comprende una asociación como se reivindica en al menos una de las reivindicaciones 1 a 2.
8. Un dispositivo médico que comprende una asociación como se reivindica en al menos una de las reivindicaciones 1 a 2.
- 25 9. Un alimento funcional que comprende una asociación como se reivindica en al menos una de las reivindicaciones 1 a 2.
- 30 10. Un producto cosmético que comprende una asociación como se reivindica en al menos una de las reivindicaciones 1 a 2.
- 35 11. Un proceso para fabricar la composición de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la mezcla activa que comprende resveratrol y/o sales y carboximetilglucano se formula en unidades de dosificación adecuadas con uno o más excipientes y/o aditivos farmacéuticamente/nutracéuticamente aceptables.

FIGURA 1

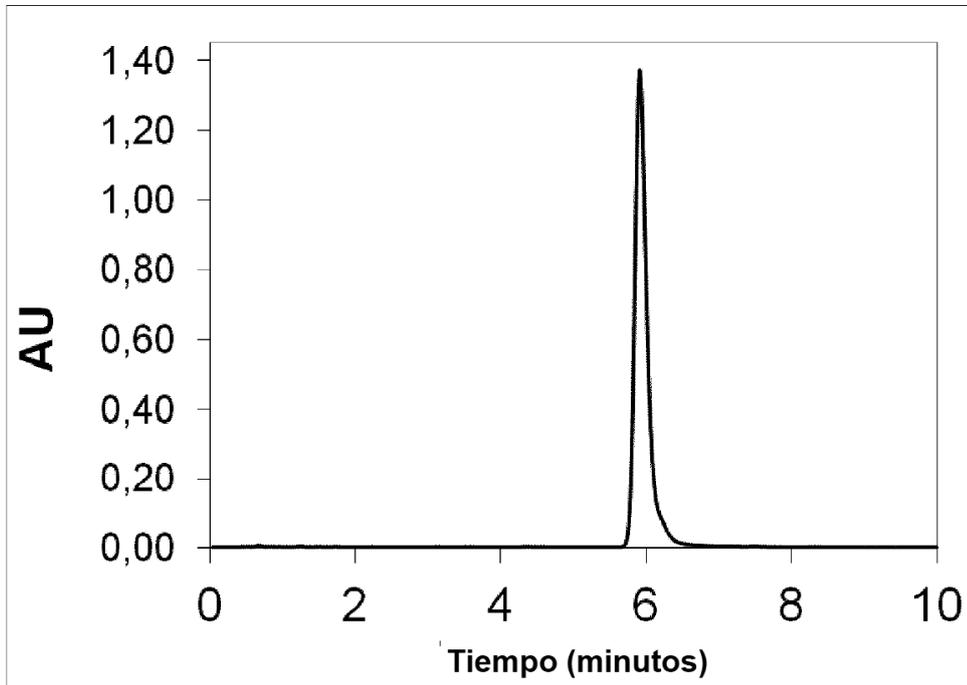


FIGURA 2

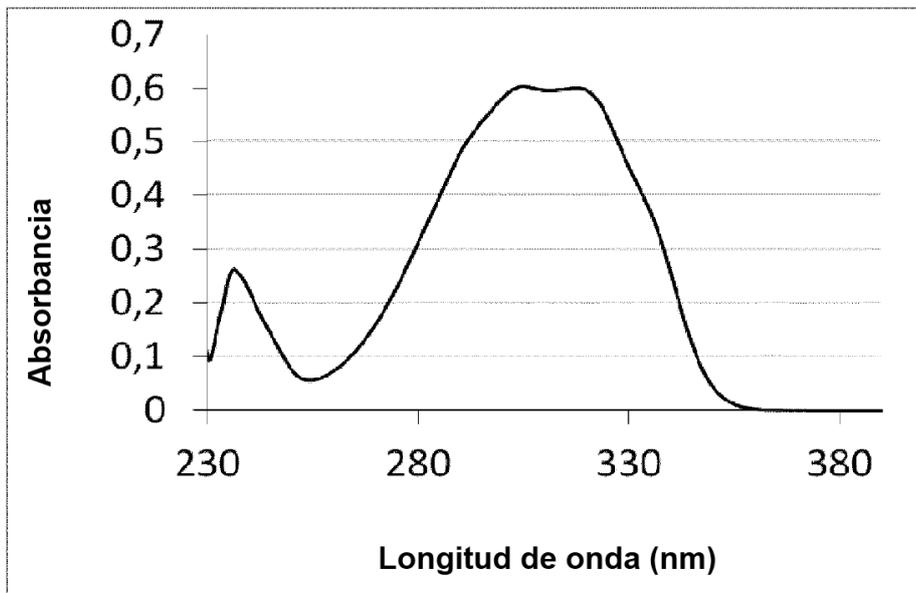


FIGURA 3

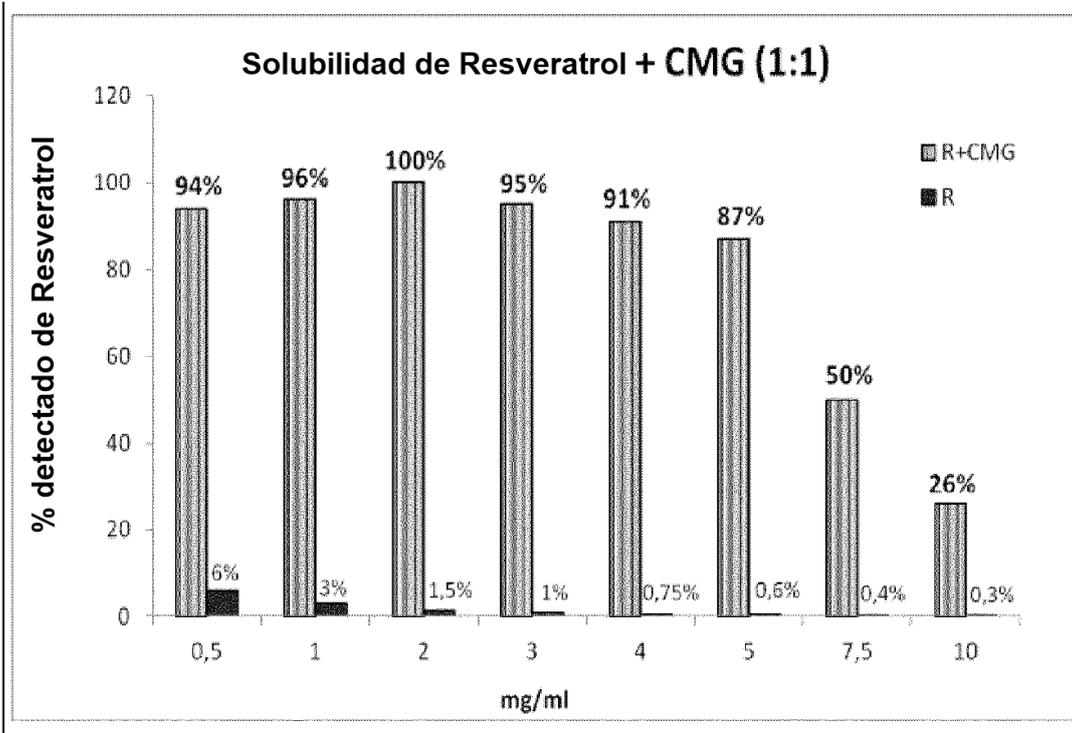


FIGURA 4

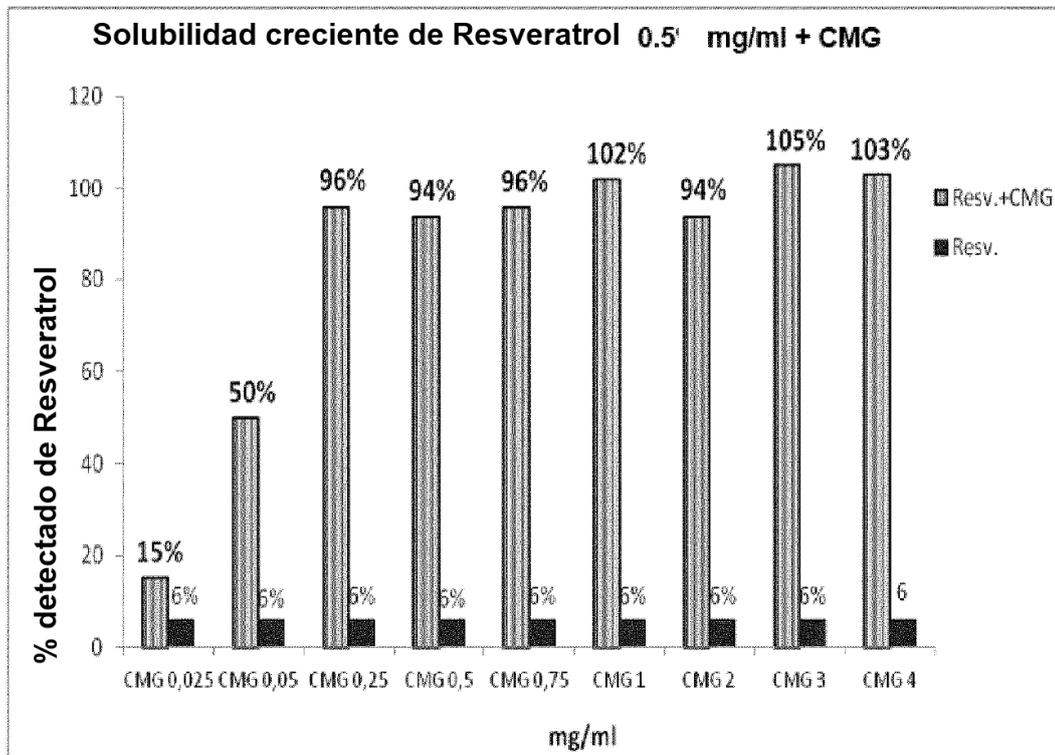


Figura 5

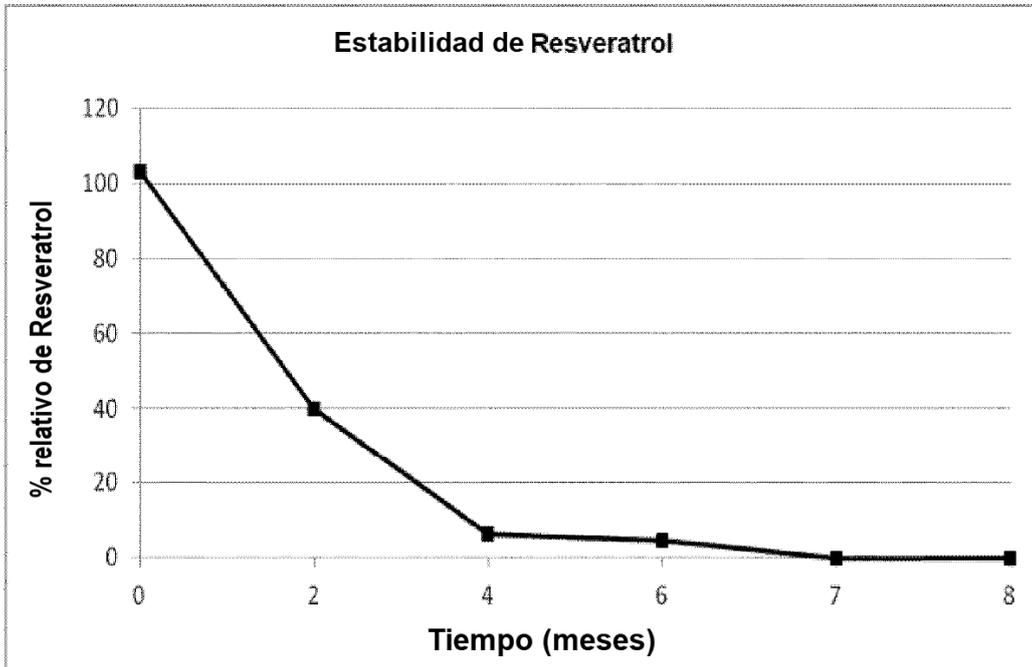


Figura 6

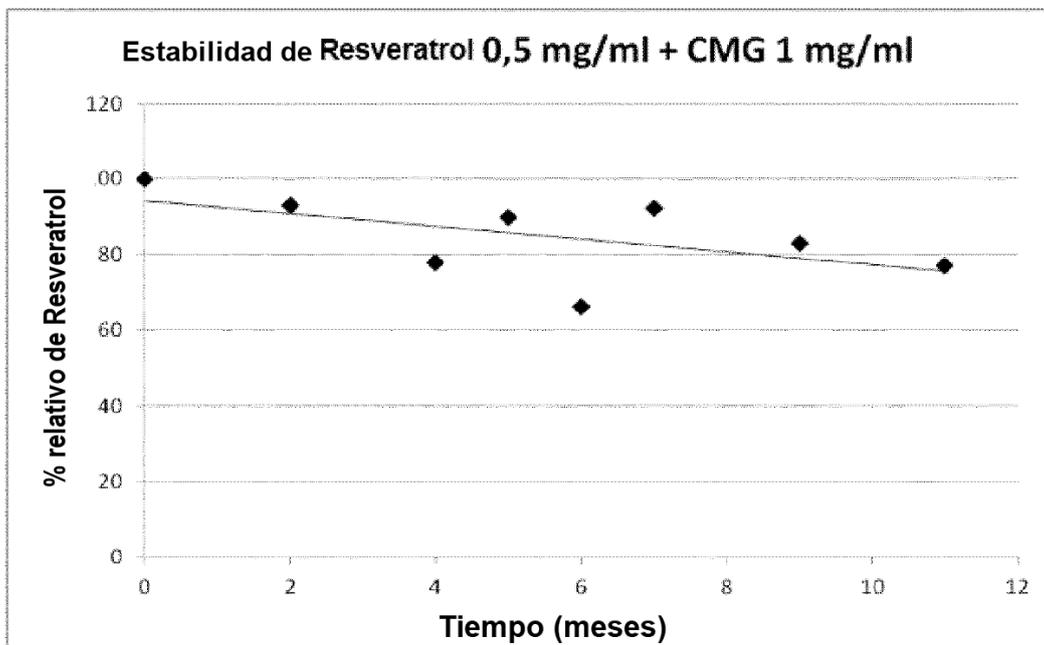


Figura 7

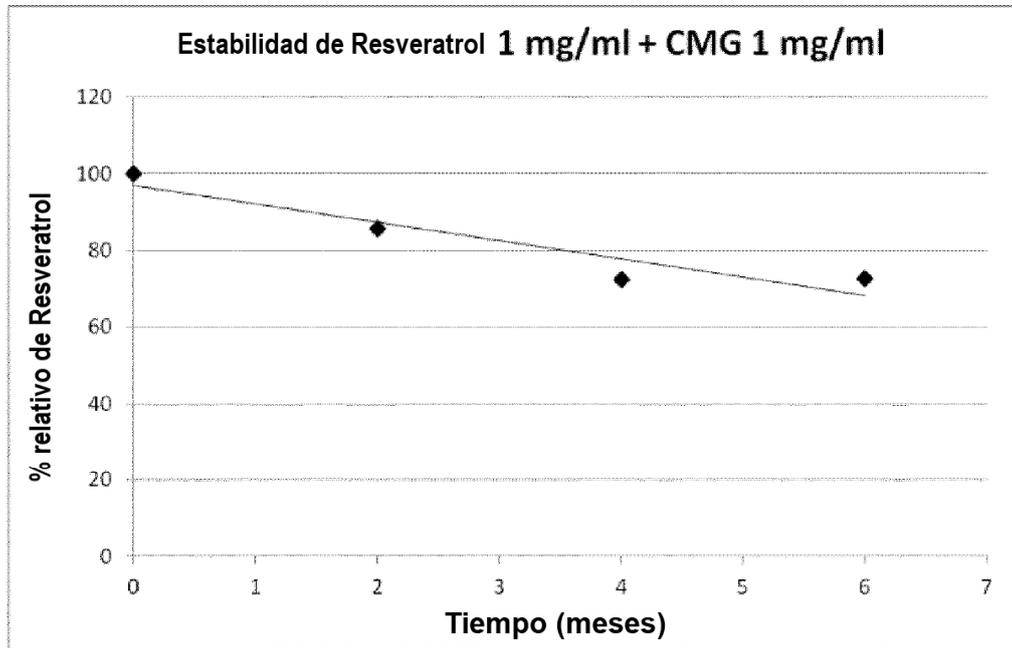


Figura 8

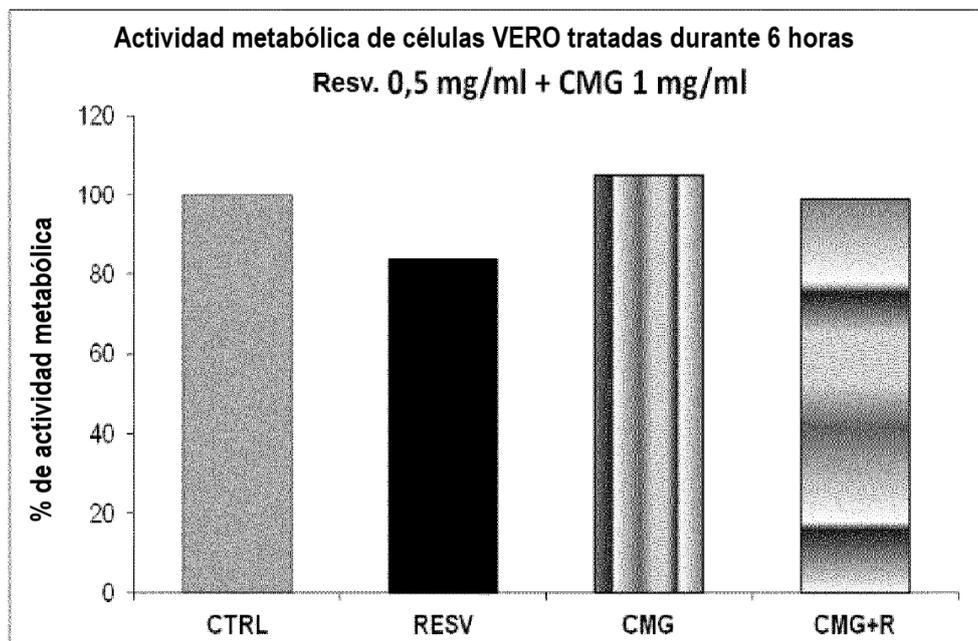


FIGURA 9

