

Composizione per l'uso nella prevenzione e/o nel trattamento di disturbi gastrici o gastroesofagei.

La presente invenzione riguarda una composizione di sostanze, preferibilmente ottenute da fonti naturali, efficace nella prevenzione e/o il trattamento di disturbi gastrici o gastroesofagei.

Più in particolare, la presente invenzione riguarda una composizione di sostanze, preferibilmente ottenute da fonti naturali, efficace nella prevenzione e/o il trattamento di disturbi gastrici o gastroesofagei scelti dal gruppo che consiste di pirosi, dispepsia, reflusso gastro-esofageo.

La pirosi, definita anche come dolore retrosternale, è un sintomo dolorifico localizzato generalmente in prossimità dello sterno ed associato a disturbi gastrointestinali, in particolare disturbi a carico dello stomaco.

La pirosi può insorgere spontaneamente o in seguito all'ingestione di alimenti irritanti o di farmaci particolari. Essa è generalmente associata al reflusso, che porta materiale gastrico o duodenale a contatto con un esofago disfunzionale. In assenza della dimostrazione di ernia iatale o aerofagia, la pirosi è da considerarsi un disturbo funzionale. Se la pirosi è secondaria a malattie come l'esofagite da reflusso in genere compare quotidianamente e qualsiasi fattore in grado di facilitare il reflusso, come per esempio chinarsi in avanti, determina la comparsa del disturbo. Ostacoli allo svuotamento gastrico e il decubito notturno possono aumentare la pirosi.

Dal momento che la principale causa della pirosi è il contatto dell'acido con la mucosa esofagea, una delle strategie maggiormente utilizzate per il trattamento di questo disturbo è l'uso di farmaci in grado di ridurre, attraverso diversi meccanismi d'azione, la secrezione di acido nello stomaco.

La secrezione gastrica è un processo dipendente da fattori neuronali (acetilcolina), paracrini (istamina), endocrini (gastrina). Questi fattori agiscono sul recettore M_3 , H_2 , CCK_2 , rispettivamente, collocati principalmente sulla membrana delle cellule parietali gastriche.

Tre sono i principali composti endogeni responsabili della secrezione gastrica e ciascuno svolge un ruolo specifico nell'adeguare l'entità della secrezione alle richieste funzionali:

- **GASTRINA:** ormone protettivo secreto dalle cellule G dell'antro gastrico, è il più potente stimolatore della secrezione acida gastrica. Tra gli stimoli che ne determinano il rilascio vi è il peptide rilasciante la gastrina, liberato dalle terminazioni enteriche. La gastrina agisce sulle cellule parietali, sulle cellule principali, e sulle cellule enterocromaffinosimili, responsabili della secrezione di istamina.
- **ISTAMINA:** si lega ai recettori istaminergici delle cellule parietali. L'istamina, interagendo con il recettore H₂, in sinergia con la gastrina stimola il rilascio di acido cloridrico e pepsina.
- **ACETILCOLINA:** stimola le cellule parietali e le cellule principali, incrementando così l'attività secretoria dello stomaco, inoltre aumenta le contrazioni della muscolatura liscia.

Uno dei meccanismi che intervengono nell'inibizione della secrezione gastrica è l'azione della somatostatina, secreta dalle cellule D dell'antro gastrico, che inibisce la secrezione gastrica. Il suo rilascio è indotto da un pH intraluminale gastrico inferiore a 3, che contemporaneamente sopprime la secrezione di gastrina attraverso un meccanismo a feedback negativo.

La secrezione di acido dallo stomaco avviene per azione della pompa protonica H⁺/K⁺-ATPasi, presente nelle cellule parietali ed attivata dalla via dell'AMP ciclico e dello ione calcio.

I trattamenti farmacologici maggiormente utilizzati in caso di iperacidità gastrica sono i seguenti:

- **Inibitori di pompa protonica.** Dopo essere stati assorbiti penetrano le cellule parietali gastriche e si legano covalentemente alla pompa protonica (gruppi sulfidrilici), inattivandola irreversibilmente. L'uso prolungato di questi farmaci è associato ad un aumento del rischio cardiovascolare e del rischio di andare incontro a insufficienza renale cronica.
- **Antagonisti del recettore H₂.** Competono reversibilmente con l'istamina per il legame ai recettori H₂. Sono decisamente meno potenti degli inibitori di pompa.

- Analoghi delle prostaglandine. Inducono un effetto analogo a quello generato dalle prostaglandine attraverso l'interazione con i recettori EP₃, riducono l'AMP ciclico intracellulare e, di conseguenza, la secrezione acida gastrica. Inoltre la PGE₂ esercita effetti citoprotettivi che includono la secrezione di muco e bicarbonato, oltre all'aumento del flusso ematico nella mucosa attraverso la promozione della produzione di NO da parte delle NOS con conseguente vasodilatazione.

Con il termine dispepsia si indica una serie di sintomi, episodici o persistenti, avvertiti prevalentemente a livello della porzione superiore dell'addome. La dispepsia può essere associata a senso di pesantezza e ad anoressia.

Si tratta di un disturbo gastrointestinale piuttosto comune, che si riscontra in gran parte della popolazione mondiale: nel Regno Unito, oltre il 40% degli adulti ha riportato almeno un episodio di dispepsia negli ultimi 12 mesi.

La dispepsia è classificata come segue:

- Dispepsia funzionale o primitiva. Disturbo della parte superiore dell'addome, del quale non è possibile identificare una causa organica, biochimica o strutturale adeguata.
- Dispepsia organica o secondaria. Può avere diverse cause, tra le quali patologie come l'esofagite, la gastrite, la duodenite, la pancreatite, l'epatite, ma anche intossicazioni alimentari, uso di sostanze stupefacenti o di alcuni tipi di farmaci.

Diversi sono i trattamenti farmacologici di questo disturbo. I principali sono i seguenti:

- Farmaci ad azione procinetica. Agiscono tramite diversi meccanismi d'azione farmacologica. Portano ad un aumento della frequenza di movimento dello stomaco, incrementando così la velocità di svuotamento gastrico.
- Inibitori di pompa protonica. Come descritto in precedenza, inibiscono la secrezione gastrica.
- Antiacidi. Reagiscono con l'acido cloridrico presente nello stomaco, incrementando il pH del contenuto gastrico e prevenendo il danno alla mucosa esofagea in caso di reflusso.
- Acidi biliari;

- Ansiolitici.

Per reflusso gastroesofageo si intende il passaggio involontario ed incosciente di una parte del contenuto gastrico nell'esofago, senza compartecipazione della muscolatura gastrica e addominale.

L'esofago è un canale lungo 25-30 cm che collega la bocca con lo stomaco, lungo il suo decorso è possibile individuare due strutture sfinteriali: la prima tra ipofaringe e tratto cervicale dell'esofago (Upper Esophageal Sphincter, UES), la seconda, sfintere esofageo inferiore (Lower Esophageal Sphincter, LES), a livello della giunzione esofago-gastrica. Quest'ultima è una zona ad alta pressione che rappresenta la principale struttura anti-reflusso, grazie alla sua localizzazione tra la zona a pressione negativa intra-toracica e la zona a pressione positiva intra-addominale. Pertanto, in condizioni normali, un aumento della pressione addominale si ripercuote a livello del LES impedendo il ritorno nell'esofago del materiale ingerito. Il LES in condizioni fisiologiche è chiuso e si rilascia per un tempo di circa 3-10 secondi in seguito alla deglutizione. Altre strutture anatomiche, oltre al LES, che contribuiscono al mantenimento della barriera anti-reflusso sono:

- Angolo di His, angolo acuto formato tra l'esofago e il fondo gastrico;
- Il legamento freno-esofageo;
- Il collare diaframmatico, costituito da fasci del diaframma, che disponendosi a sciarpa attorno all'esofago ne strozzano il lume durante la fase inspiratoria.

Nella patogenesi della malattia da reflusso gastro-esofageo (MRGE), rientrano numerosi fattori, come ad esempio:

1. Insufficiente barriera anti-reflusso dello sfintere esofageo inferiore, che ha lo scopo di impedire meccanicamente ai succhi gastrici di refluire nell'esofago.
2. Ritardo nello svuotamento gastrico, per anomalie anatomiche o alterazioni funzionali: (i) anomalie anatomiche: stenosi del piloro (è la regione terminale dello stomaco, che regola il passaggio del contenuto gastrico nel duodeno); (ii) alterazioni funzionali: alterazioni motorie del fundus (regione deputata allo svuotamento dei liquidi)
3. Insufficiente meccanismo di clearing esofageo, che ha lo scopo di minimizzare il contatto tra mucosa esofagea e succhi gastrici agendo sia attraverso la peristalsi esofagea

sia attraverso la neutralizzazione dei residui acidi grazie alla saliva.

4. Iperacidità gastrica.
5. Aggressività del contenuto gastrico che refluisce nell'esofago, per azione dell'acido cloridrico.
6. Reflusso duodeno-gastrico con passaggio nello stomaco di secrezioni pancreatico-biliari, che in caso di reflusso gastro-esofageo, possono determinare lesioni più severe.

Tra gli altri fattori predisponenti vi è il fumo, abitudini dietetico—comportamentali scorrette (pasti abbondanti, cibi ricchi di grassi, caffeina); inoltre, farmaci, gravidanza e obesità possono esacerbare la MRGE. Anche l'ernia iatale (passaggio di una porzione dello stomaco all'interno del torace, attraverso un foro nel diaframma chiamato iato esofageo) si accompagna frequentemente a MRGE e può contribuire alla prolungata esposizione al contenuto gastroduodenale. In genere le pareti dello iato esofageo sono ben aderenti all'esofago, ma può capitare che le strutture di ancoraggio della porzione inferiore dell'esofago perdano tono, favorendo la risalita di una piccola parte di stomaco nel torace.

Ad ogni modo, qualunque sia la causa, il frequente e ripetuto contatto del materiale gastrico rigurgitato con la mucosa esofagea, esercita su questa un'azione lesiva che è tanto più grave quanto più lungo è il tempo di contatto e quanto più basso è il pH del reflusso. La persistente azione flogistica a carico della mucosa esofagea diventa col tempo responsabile della reazione infiammatoria che può evolvere in ulcerazioni, in stenosi e nella cosiddetta metaplasia colonnare (o epitelio di Barrett, fattore di rischio singolo più importante per lo sviluppo dell'adenocarcinoma esofageo). I sintomi considerati tipici sono rappresentati dalla pirosi retrosternale (definita dal paziente come sensazione di bruciore che esordisce in corrispondenza dello stomaco o dalla porzione inferiore del torace e che risale verso il collo) e dal rigurgito (percezione di liquido con sapore amaro e acido all'interno della cavità orale), sintomi la cui specificità per MRGE è pari all'89 e 95%, rispettivamente. Sintomi frequenti, ma meno specifici sono l'odinofagia, la disfagia, le eruttazioni, il dolore epigastrico, il gonfiore, la difficoltà digestiva. Alcuni di questi sintomi caratterizzano la diagnosi di dispepsia funzionale ed è noto che tra il 10% e il 17% dei pazienti che richiedono intervento medico per dispepsia hanno MRGE.

La MRGE è una delle condizioni patologiche maggiormente riscontrate dai medici gastroenterologi. Da uno studio sulla prevalenza della patologia è emerso che la MRGE ha una prevalenza del 10-20% nei paesi occidentali contro solo il 5% riscontrato in Asia; in particolare un maggior numero di casi sono stati riscontrati in nord America poi in Europa del Nord e in Europa del Sud.

Studi scientifici dimostrano come i sintomi della patologia hanno un forte impatto sulla qualità della vita in quanto i sintomi persistenti di reflusso, anche durante il trattamento con inibitori della pompa protonica, sono associati ad un ridotto benessere fisico e mentale.

Trattandosi di una patologia cronica, il trattamento convenzionale è quasi sempre di lunga durata e consiste, in base alla gravità, in cambiamenti nello stile di vita (eliminare cioccolato, caffeina, alcol, fumo di sigaretta, perdere peso ecc.), cure farmacologiche, terapia chirurgica.

Le classi di farmaci comunemente utilizzati per il trattamento della MRGE includono farmaci antiacidi, antagonisti del recettore H₂ dell'istamina, inibitori della pompa protonica (PPI) e agenti procinetici.

Gli antiacidi sono farmaci da banco che offrono un rapido sollievo ai sintomi della patologia ma non sono in grado di indurre un effetto curativo nell'esofagite erosiva. Questi farmaci contengono carbonati o bicarbonati od altri sali basici che riducono l'acidità dello stomaco reagendo con l'acido cloridrico e liberando anidride carbonica.

I farmaci H₂ antagonisti – quali ranitidina, famotidina, cimetidina - garantiscono un sollievo temporaneo dei sintomi, sebbene con un tempo di insorgenza più lento rispetto agli antiacidi. L'utilizzo per periodi di tempo prolungato non è raccomandato in quanto i pazienti potrebbero sviluppare tolleranza entro 1-2 settimane e comunque l'effetto di questi farmaci non è di tipo curativo.

I farmaci PPI (pantoprazolo, lansoprazolo, omeprazolo etc.) rappresentano il trattamento standard nelle patologie da reflusso gastro esofageo, infatti il numero di prescrizioni di tali

farmaci è raddoppiato negli ultimi 10 anni. Spesso tali prescrizioni sono associate a quelle di farmaci anti infiammatori di natura steroidea o non steroidea. Il meccanismo d'azione dei PPI include il blocco della pompa protonica a livello delle cellule parietali dello stomaco; questa pompa idrogeno/potassio ATPasica determina il rilascio di acido cloridrico nel lume dello stomaco. Rispetto ai farmaci H₂-antagonisti, questi farmaci hanno un'azione più rapida e soprattutto esercitano un effetto curativo a carico delle lesioni dell'esofago. Gli effetti collaterali maggiormente riscontrati nel trattamento con PPI sono nausea, diarrea, mal di testa, insonnia e reazioni anafilattiche.

Gli agenti procinetici, come la cisapride o metoclopramide, attivano i recettori della serotonina o della dopamina in grado di aumentare la peristalsi esofagea o gastrica. Questi farmaci hanno un lento onset d'azione, una durata breve e non hanno effetto curativo sulla patologia. Inoltre presentano diversi effetti collaterali come tremori, discinesia, affaticamento e aumento di eventi avversi a livello cardiaco per cui il loro utilizzo è abbastanza limitato nel trattamento della MRGE.

Oltre ai classici rimedi farmacologici, anche gli alginati sono utilizzati per il trattamento sintomatico della MRGE. Gli alginati, come il sodio alginato, sono polisaccaridi naturali che, a contatto con l'ambiente gastrico, precipitano formando, in pochi minuti, un gel a bassa densità. I bicarbonati e carbonati, quasi sempre presenti nelle formulazioni in commercio con alginati, liberano biossido di carbonio che viene intrappolato all'interno del gel di alginato che è in grado di galleggiare sul contenuto gastrico. Il gel di alginato si viene a formare nella porzione di stomaco vicina alla giunzione gastroesofagea, proprio lì dove si sviluppa la tasca acida. In questo modo si blocca o si riduce fortemente la risalita di acido dallo stomaco al canale esofageo.

Vi è comunque la costante necessità di mettere a disposizione trattamenti, alternativi a quelli già esistenti, che siano efficaci nella prevenzione e/o trattamento dei disturbi gastrici o gastroesofagei, particolarmente pirosi, dispepsia e/o reflusso gastroesofageo, ma che non presentino gli effetti collaterali e/o svantaggi dei trattamenti presenti nello stato della tecnica.

Queste ed altre necessità sono soddisfatte dalla presente invenzione, che mette a disposizione una composizione caratterizzata dal fatto di comprendere una combinazione sinergica di sostanze attive, ottenute da fonti naturali, la suddetta combinazione essendosi dimostrata particolarmente efficace nei confronti dei disturbi gastrici o gastroesofagei summenzionati.

La composizione dell'invenzione è come definita nell'annessa rivendicazione 1. Ulteriori caratteristiche e vantaggi dell'invenzione sono definiti nelle rivendicazioni dipendenti. Le rivendicazioni formano parte integrante della presente descrizione.

Nel seguito è fornita una descrizione dettagliata di alcune forme di realizzazione preferite dell'invenzione.

La composizione sinergica della presente invenzione è un integratore, utile per il trattamento e la prevenzione dei disturbi gastrici o gastroesofagei, preferibilmente pirosi, dispepsia e/o reflusso gastro-esofageo. Nella composizione della presente invenzione l'azione sinergica avviene tra l'antiacido, l'estratto di una pianta del genere *Musa* e l'enzima proteasico.

L'antiacido presente nella composizione dell'invenzione è un qualsiasi composto chimico comunemente noto per essere efficace come antiacido, cioè un composto che sia in grado di reagire con l'acido cloridrico presente negli acidi gastrici ed incrementare così il pH dello stomaco, riducendo in tal modo i potenziali danni alle mucose gastrica ed esofagea che potrebbero derivare dal contatto con l'acido. L'antiacido è preferibilmente un sale basico farmaceuticamente accettabile, più preferibilmente scelto dal gruppo che consiste di carbonati, bicarbonati, citrati, idrossidi, ossidi metallici, trisilicati e qualsiasi loro combinazione.

Il genere *Musa* include le piante dalle quali si ottiene il frutto della banana, come ad esempio la *Musa paradisiaca* e la *Musa sapientum*.

La *Musa paradisiaca* è una pianta erbacea lunga fino a 9 metri con frutti oblungi di lunghezza di circa 5-7 cm o maggiore. La *Musa sapientum* è un'erba perenne che cresce tra i 5

e i 9 metri in altezza, con delle grandi infiorescenze e con frutti maturi che sono dolci e presentano una buccia più spessa rispetto ad altri tipi di banane.

Sono circa 300 le varietà di banana che crescono in tutto il mondo, ma principalmente in Asia, Indo-Malesia, Australia e paesi tropicali e sub tropicali. L'India, le Filippine, la Cina, l'Ecuador e il Brasile sono tra i principali paesi produttori.

Sin dall'antichità la banana veniva utilizzata nella pratica comune per contrastare diverse condizioni patologiche come: diarrea, dissenteria, lesioni intestinali derivanti dalla colite ulcerativa, diabete, uremia, nefriti, ipertensione, problemi cardiaci ecc. Le numerose funzionalità di questo frutto sono dovute ai diversi componenti che sono stati isolati.

Nella polpa e nella buccia dei frutti di *M. sapientum* e *M. paradisiaca* sono stati isolati catecolammine quali norepinefrina, dopamina, serotonina, triptofano e pectina. Inoltre, sono stati ritrovati flavonoidi e derivati (leucocianidina, quercetina), sitosterolo, sitoindosidi, triterpeni, cellulose, emicellulose amminoacidi ecc.

Tra le diverse attività terapeutiche che vanta la banana, di particolare interesse è il suo utilizzo nel trattamento di patologie gastriche quali l'ulcera. Nei diversi studi scientifici condotti, si è osservato che vari componenti potrebbero essere coinvolti nell'azione mucoprotettiva e antiulcerogena. La pectina e la fosfatidilcolina potrebbero legare la mucosa gastrica, proteggendone l'integrità. Inoltre la leucocianidina è stata considerata da alcuni autori come protettore della mucosa in diversi modelli di ulcera indotta da aspirina, indometacina, fenilbutazone, prednisolone, istamina ed altri.

Ad esempio, in un modello di ulcera indotta su ratti, l'assunzione orale dell'estratto del frutto di *M. sapientum* (100 mg/Kg) grazie alla presenza di leucocianidina determinava una protezione della mucosa attraverso la stimolazione della proliferazione, della secrezione del muco e aumento della resistenza della mucosa gastrica.

In un altro studio condotto nel 2013 è stata valutata l'azione dell'estratto metanolico dei frutti di *M. sapientum* su un modello di ulcera indotta da aspirina. I risultati mostrano

l'efficacia dell'estratto al dosaggio di 100 mg/Kg paragonabile a quella della ranitidina nel proteggere l'integrità della mucosa.

Gli estratti dei frutti della *M. sapientum*, grazie alla presenza di diversi composti tra cui principalmente il derivato flavonoico leucocianidina e la pectina, potrebbero essere utilizzati come adiuvanti nel trattamento di patologie associate ad ipersecrezione di acido o in caso di cattiva digestione per la protezione dell'integrità della mucosa gastrica.

L'enzima digestivo presente nella composizione della presente invenzione è un enzima proteasi capace di rompere i legami peptidici presenti nelle proteine riducendole a peptidi assimilabili dall'organismo.

Proteasi idonee all'impiego nella composizione della presente invenzione sono ad esempio l'actinidina (presente nel kiwi), la bromelina (presente nell'ananas), la papaina (presente nella papaia).

Il frutto del kiwi è conosciuto per le sue diverse proprietà farmacologiche, per l'alto contenuto di vitamina C e, in particolare, per l'enzima proteasico actinidina, che è stato dimostrato essere in grado di favorire la digestione e lo svuotamento gastrico.

L'actinidina appartiene alla famiglia delle cistein-proteasi e contiene gruppi sulfidrilici liberi, essenziali per la sua attività. Caratteristiche importanti di questo enzima includono un ampio pH utile per le attività catalitiche e una buona stabilità ad elevate concentrazioni; l'enzima è, però, suscettibile all'ossidazione.

Sebbene la sua funzione non sia ancora completamente chiarita, è stato suggerito che l'actinidina sia coinvolta nella difesa del frutto di kiwi dai patogeni. Numerosi studi hanno dimostrato che la velocità e l'entità della digestione delle proteine assunte con la dieta abbiano la capacità di modificare la velocità di svuotamento gastrico (*stomach emptying rate*, SER).

È stato inoltre dimostrato che l'actinidina è in grado di degradare diversi tipi di proteine tra

cui le proteine del muscolo di manzo, il collagene, la caseina e di incrementare l'effetto digestivo della pepsina a livello gastrico.

È stato altresì dimostrato un incremento della digestione gastrica di proteine da diverse fonti (proteina della soia e del manzo, gelatina e glutine) risultante dalla somministrazione di actinidina estratta da kiwi.

In aggiunta, sono stati testati gli effetti dell'actinidina su ratti, in particolare in relazione allo svuotamento gastrico. Per farlo, la digestione gastrica delle proteine della dieta totali è stata quantificata basandosi sull'analisi dei gruppi amminici liberi presenti nel chimo. Anche in questo caso è risultato che l'actinidina favorisce la digestione di muscolo di manzo, glutine e proteine di soia ma non di gelatina e proteine del latte, a causa della loro differente struttura. Inoltre, l'actinidina assunta con la dieta è in grado di aumentare la digestione gastrica di proteine ad alto peso molecolare. Si è potuto evincere che si verifica un aumento dello svuotamento gastrico per diete contenenti muscolo di manzo e zeina, mentre tale effetto non si osserva per quelle a base di glutine, gelatina e proteine di soia e del latte. Tali osservazioni sono state inoltre confermate sui maiali.

In letteratura si suggerisce l'impiego di 200 g di frutto di kiwi liofilizzato associato a 14 mg di actinidina purificata contenente 2154 U/g.

Nell'ambito della presente invenzione, l'uso di actinidina favorisce la digestione delle proteine e, di conseguenza, aumenta la velocità dello svuotamento gastrico: in questo modo si riduce la frequenza degli episodi di reflusso, con conseguente riduzione del danno alla mucosa esofagea.

La papaina si ottiene dal frutto della *Carica papaya*, che appartiene alla piccola famiglia delle Caricaceae. Il frutto, le foglie e il lattice che si estrae dal frutto sono ampiamente utilizzate per le diverse proprietà farmacologiche. Il principale composto chimico estratto dal frutto è appunto la papaina, un enzima proteolitico utilizzato come principio attivo e come reattivo nell'industria alimentare e delle pelli. Oltre alla papaina, sono presenti diversi altri composti chimici nell'estratto di *C. papaya*, come vitamine, proteine, fibre, carboidrati,

minerali, carpaina, carposide e l'enzima mirosina.

La papaina è una cisteina proteasi e appartiene ad una famiglia di proteine dotate di varie attività, che includono quella endopeptidasica, amminopeptidasica, dipeptidil peptidasica.

All'interno del sito attivo dell'enzima sono presenti 3 residui amminoacidici, Cys-25, Asn-175 e His-159, che costituiscono la triade catalitica. L'Asn-175 modifica l'orientamento dell'anello imidazolico dell'His-159, che va a deprotonare la cisteina Cys-25: in questo modo si forma un potente nucleofilo che è in grado di attaccare il legame peptidico e formare un tioetere intermedio che, a sua volta, è attaccato da una molecola di acqua che porta a termine la reazione di idrolisi.

La papaina non è dotata di una grande selettività d'azione, sebbene l'idrolisi catalizzata da questo enzima avvenga preferenzialmente a livello di un legame peptidico tra un residuo amminoacidico idrofobico (Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Tyr) ed un residuo di arginina o lisina.

L'uso di questo enzima all'interno della composizione dell'invenzione si basa sulla sua capacità di idrolizzare i legami peptidici delle proteine assunte con la dieta. Questo consente una maggiore velocità di digestione e, di conseguenza, una maggiore velocità di svuotamento gastrico. Sebbene non esistano in letteratura studi sull'aumento della velocità di svuotamento gastrico a seguito della somministrazione di papaina, sono presenti diversi studi che dimostrano la stessa attività da parte dell'actinidina, un'altra cistein-proteasi isolata dal kiwi. Vista la similitudine dei due enzimi, è prevedibile che entrambi siano in grado di contribuire ad incrementare la velocità di digestione delle proteine assunte con la dieta. Questo dovrebbe portare a minori problemi di dispepsia e reflusso gastroesofageo. La bromelina è una miscela di enzimi proteolitici contenuti nel frutto e nel gambo dell'ananas (*Ananas comosus L. Merr.*). La bromelina contiene anche perossidasi, fosfatasi acide, inibitori delle proteasi. Tra i suoi impieghi si annovera l'uso negli integratori alimentari come coadiuvante della digestione, grazie alla sua azione proteolitica. Sono utilizzati differenti titoli per indicare l'attività della bromelina, i più utilizzati sono i seguenti:

- GDU: Gelatin Dissolving Units

- MCU: Milk Clotting Units

Un grammo di bromelina standardizzato a 2000 MCU corrisponderebbe a 1200 GDU, la dose giornaliera è compresa tra 200-2000 mg.

Spesso la dose Bromelina viene suddivisa in 4 volte/die.

La presente composizione può essere utilizzata per il trattamento delle patologie gastriche ed esofagee, in particolare della pirosi e della malattia da reflusso gastroesofageo. L'efficacia della composizione deriva dalle seguenti attività dei componenti:

- I bicarbonati sono in grado di neutralizzare l'acidità gastrica reagendo con l'acido cloridrico. In questo modo proteggono le mucose da eventuali danni indotti dall'acido.
- L'estratto della pianta del genere *Musa*, grazie al contenuto di composti chimici come la pectina, la fosfatidilcolina e la leucocianidina, possiede attività mucoprotettive ed antiulcerogeniche.
- Gli enzimi digestivi, degradando le proteine, portano ad un aumento della velocità di svuotamento gastrico. In questo modo riducono il contatto dell'acido con la mucosa gastrica, e la frequenza degli episodi di reflusso gastroesofageo, prevenendo le eventuali lesioni che potrebbero derivare dal contatto dell'acido con le mucose gastrica ed esofagea.

Come precedentemente enunciato, nella presente invenzione l'azione sinergica avviene tra l'antiacido, preferibilmente carbonato e/o bicarbonato, l'estratto di una pianta del genere *Musa* e almeno un enzima digestivo, preferibilmente actinidina, papaina e/o bromelina.

In una forma di realizzazione preferita, l'antiacido è somministrato in una quantità compresa fra 10 mg e 500 mg, per esempio mediante la somministrazione di una forma di dosaggio in cui l'antiacido è presente ad una concentrazione compresa fra il 5% e il 90% p/p, più preferibilmente in una quantità compresa fra il 10% e l'80% in peso sul peso totale della composizione; l'estratto della pianta del genere *Musa* è somministrato in una quantità compresa fra 20 mg e 4000 mg, per esempio mediante la somministrazione di una forma di dosaggio in cui l'estratto è presente ad una concentrazione compresa fra il 2% e il 90% p/p, più preferibilmente in una quantità compresa fra il 5% e l'85% in peso sul peso totale della

composizione; l'almeno un enzima digestivo, che è scelto preferibilmente tra actinidina, papaina e/o bromelina, è somministrato in una quantità compresa fra 0,1 mg e 300 mg, per esempio mediante somministrazione di una forma di dosaggio in cui l'enzima è presente ad una concentrazione in peso compresa fra lo 0,1% e il 40% p/p, più preferibilmente in una quantità compresa fra lo 0,25% e il 30% in peso sul peso totale della composizione.

La forma di dosaggio può essere una composizione farmaceutica o un integratore includente i summenzionati ingredienti attivi in miscela fra loro, oppure può essere un corredo di parti per la somministrazione simultanea o sequenziale dei summenzionati ingredienti attivi.

Gli esempi che seguono sono forniti a puro titolo illustrativo e non limitativo della portata dell'invenzione come definita dalle annesse rivendicazioni.

ESEMPI

Gli esempi che seguono riguardano specificamente la formulazione della composizione della presente invenzione in bustina (polveri o granulati), ma occorre comprendere che qualsiasi forma di dosaggio farmaceuticamente accettabile, preferibilmente orale, è idonea nell'ambito della presente invenzione. Una forma di realizzazione preferita consiste in un corredo di parti, in cui i principi attivi sono formulati in due bustine separate, in modo da garantire una maggiore flessibilità nella somministrazione della formulazione stessa. In particolare, con questa forma di realizzazione gli enzimi digestivi sono somministrati immediatamente dopo i pasti, mentre gli antiacidi sono somministrati lontano dai pasti, quando il pH dello stomaco si abbassa. Tale modalità di somministrazione massimizza l'efficacia della combinazione di principi attivi secondo l'invenzione nei confronti dei disturbi gastrici e gastroesofagei. L'estratto del frutto della pianta del genere *Musa* in questa forma di realizzazione viene somministrato insieme agli antiacidi, ma è anche ipotizzabile la somministrazione con l'almeno un enzima digestivo.

Sono riportati alcuni esempi di formulazione, con le quantità delle relative sostanze attive, presenti in ciascuna unità posologica.

Esempio 1

| Principio attivo | Quantità |
|---|-----------------|
| Calcio carbonato | 267 mg |
| Sodio bicarbonato | 150 mg |
| Bromelina da <i>Ananas comosus</i> L., 2500 GDU/g | 75 mg |
| Actinidina 7500 AU/g | 53,32 mg |
| Papaina 2000 USP/mg | 50 mg |
| <i>Musa x sapientum</i> , e.s. | 50 mg |
| Totale (con eccipienti) | 900 mg |

Esempio 2

| Principio attivo | Quantità |
|--------------------------------|-----------------|
| Calcio carbonato | 267 mg |
| Sodio bicarbonato | 150 mg |
| Actinidina | 53,32 mg |
| <i>Musa x sapientum</i> , e.s. | 50 mg |
| Totale (con eccipienti) | 700 mg |

Esempio 3

| Principio attivo | Quantità |
|--------------------------------|-----------------|
| Calcio carbonato | 267 mg |
| Actinidina | 53,32 mg |
| <i>Musa x sapientum</i> , e.s. | 50 mg |
| Totale (con eccipienti) | 500 mg |

Esempio 4

| Principio attivo | Quantità |
|--------------------------------|-----------------|
| <i>Musa x sapientum</i> , e.s. | 1750 mg |
| Calcio carbonato | 267 mg |
| Actinidina | 53,32 mg |

| | |
|-------------------------|---------|
| Totale (con eccipienti) | 2900 mg |
|-------------------------|---------|

Esempio 5

| Principio attivo | Quantità |
|--------------------------------|----------|
| <i>Musa x sapientum</i> , e.s. | 1750 mg |
| Calcio carbonato | 267 mg |
| Sodio bicarbonato | 150 mg |
| Actinidina | 100 mg |
| Totale (con eccipienti) | 2700 mg |

Esempio 6

| Principio attivo | Quantità |
|--------------------------------|----------|
| <i>Musa x sapientum</i> , e.s. | 500 mg |
| Calcio carbonato | 267 mg |
| Sodio bicarbonato | 150 mg |
| Actinidina | 20 mg |
| Totale (con eccipienti) | 1300 mg |

Esempio 7

| Bustina | Principio attivo | Quantità |
|---------|---|----------|
| A | Calcio carbonato | 267 mg |
| | Sodio bicarbonato | 150 mg |
| | <i>Musa x sapientum</i> , e.s. | 50 mg |
| | Totale (con eccipienti) | 650 mg |
| B | Bromelina da <i>Ananas comosus</i> L., 2500 GDU/g | 75 mg |
| | Actinidina 7500 AU/g | 53,32 mg |
| | Papaina 2000 USP/mg | 50 mg |
| | Totale (con eccipienti) | 250 mg |

Parte sperimentale

E' valutato l'effetto della presente invenzione:

- sullo svuotamento gastrico,
- sull'esofagite da reflusso,
- sulla secrezione gastrica (volume del contenuto gastrico, pH ed acidità totale),
- sull'ulcera gastrica.

Materiali e metodi

Animali

Sono utilizzati topi di sesso maschile di ceppo ICR del peso di 20-25 g forniti dalla ditta Charles River. Gli animali, stabulati in locali termoregolati (temperatura di 23 ± 2 °C, umidità del $50\pm 2\%$, cicli di luce-buio di 12 ore), hanno libero accesso ad acqua e cibo, costituito da una dieta standard fornita dalla ditta Mucedola Mangimi (Settimo Milanese, Italia). Tutti gli esperimenti sono eseguiti nel rispetto del D.L. n° 116 del 27 gennaio 1992 e secondo le linee guida del Consiglio Direttivo della Comunità Europea (86/609/ECC e 2010/63/UE).

Svuotamento Gastrico

Lo svuotamento gastrico è valutato con il metodo descritto da Smits e Lefebvre (1996) [4]. Per la determinazione dello svuotamento gastrico gli animali ricevono per via orale un marker (0.2 ml/topo di una sospensione contenente 50 mg di rosso fenolo in 100 ml di carbossimetilcellulosa all'1,5%). Dopo venti minuti, gli animali sono sacrificati in atmosfera satura di CO₂ e lo stomaco prelevato. Lo stomaco viene posizionato all'interno di una provetta contenente 4 ml di soluzione fisiologica; dopo 20 secondi di agitazione, ad ogni provetta sono aggiunti 2 ml di NaOH 1 M allo scopo di sviluppare la massima intensità di colore. L'analisi spettrofotometrica (560 nm) è effettuata su 1 ml di tale soluzione. La percentuale di svuotamento gastrico viene calcolata secondo la seguente formula:

$100 \times (1 - [\text{quantità di rosso fenolo presente nello stomaco dopo 20 min}] / [\text{quantità di rosso fenolo presente nello stomaco a tempo 0}])$.

Esofagite da reflusso e secrezione/ulcera gastrica

L'esofagite da reflusso e la secrezione/ulcera gastrica sono indotte utilizzando il modello sperimentale della legatura del piloro descritto da Shay e coll. (1945) [5]. Gli animali, tenuti a digiuno per 24 ore ma con libero accesso all'acqua, vengono anestetizzati, l'addome

aperto ed il piloro legato. Dopo 4 ore dalla procedura chirurgica (tempo necessario a determinare una lesione submassimale della mucosa dell'esofago) [6], i topi sono sacrificati in atmosfera satura di CO₂ e l'esofago e lo stomaco prelevati per la valutazione 1) del danno macroscopico esofageo e gastrico, 2) del grado di infiammazione (attività della mieloperossidasi) esofageo e gastrico e 3) dei parametri caratteristici della secrezione gastrica (volume del contenuto gastrico, pH ed acidità totale).

1) Danno macroscopico esofageo e gastrico

L'esofago (aperto longitudinalmente) e lo stomaco (aperto lungo la grande curvatura), sono distesi su un supporto di polistirolo ed analizzati con l'ausilio di un microscopio per l'individuazione di lesioni della mucosa. Il danno della mucosa è determinato utilizzando una scala a punteggio che prende in considerazione la severità e la grandezza dell'iperemia e delle erosioni emorragiche.

2) Grado di infiammazione dell'esofago e dello stomaco

Il grado di infiammazione dell'esofago e dello stomaco è valutato mediante determinazione dell'attività della mieloperossidasi (MPO). La MPO è una proteina che si trova nei granuli azzurrofilari dei neutrofilari polimorfonucleati e viene utilizzato come marker di infiltrazione leucocitaria. Per la valutazione dell'attività dell'MPO, i tessuti sono sottoposti a tre cicli di omogenizzazione di 10 sec ciascuno, alla massima velocità, in un opportuno buffer di lisi definito MOPS (0.5% HTAB in MOPS 10 Mm), nel rapporto di 50 mg di tessuto/1ml di MOPS. Sugli omogenati è effettuata una centrifuga a 12.000 rpm per 20 min a 4°C. Successivamente, i surnatanti verranno incubati con NaPP (sodio fosfato buffer pH 5.5) e TMB 16 mM (tetra-metil-benzidina) e dopo cinque minuti di incubazione, a temperatura ambiente, è aggiunto H₂O₂ diluito in NaPP. La reazione verrà bloccata con acido acetico freddo 2M e su 1 ml della soluzione di reazione verrà effettuata una lettura allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda (λ) di 650-655 nm. I valori ottenuti saranno rapportati ad una curva standard di MPO ed i risultati saranno espressi come U/ml di MPO.

3) Valutazione dei parametri caratteristici della secrezione gastrica

Il contenuto gastrico è raccolto per la determinazione del valore del pH e del quantitativo totale del succo gastrico (volume). Successivamente il contenuto gastrico viene aggiunto con 2 ml di acqua distillata e centrifugato a 5000 rpm per 15 min per la determinazione dell'acidità totale che verrà effettuata sul surnatante mediante titolazione fino a pH=7 (usando la fenolftaleina al 2% come indicatore) con NaOH 0.01 N. L'acidità totale verrà

espressa come mequiv.[H⁺]/ml/4 h.

Bibliografia

- [1] El-Serag HB, Sweet S, Winchester CC, et al. Update on the epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease: a systematic review. *Gut* 2014; 63: 871–80.
- [2] Harnik Ian G. Gastroesophageal Reflux Disease *Ann Intern Med.* 2015;163(1):ITC1.
- [3] Boeckxstaens G, El-Serag HB, Smout AJ, Kahrilas PJ. Symptomatic reflux disease: the present, the past and the future. *Gut.* 2014; 63(7):1185-93.
- [4] Smits GJ, Lefebvre RA. Influence of aging on gastric emptying of liquids, small intestine transit, and fecal output in rats. *Exp Gerontol.* 1996; 31(5):589-96.
- [5] Shay H, Komarow SA, Fels SS, Meranze D, Gruenstein M, Siplet H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. *Gastroenterol* 1945; 5:43.61
- [6] Takeuchi K, Nagahama K. Animal model of acid-reflux esophagitis: pathogenic roles of acid/pepsin, prostaglandins, and amino acids. *Biomed Res Int.* 2014; 2014:532594.

RIVENDICAZIONI

1. Composizione comprendente la combinazione di almeno un antiacido, un estratto del frutto di una pianta del genere *Musa* e almeno un enzima digestivo proteasico.
2. Composizione secondo la rivendicazione 1, in cui l'almeno un antiacido è scelto dal gruppo che consiste di carbonati, bicarbonati, citrati, idrossidi, ossidi metallici, trisilicati e qualsiasi loro combinazione, e l'antiacido è preferibilmente presente nella composizione in una quantità compresa fra il 5% e il 90% in peso sul peso totale della composizione, più preferibilmente in una quantità compresa fra il 10% e l'80% in peso sul peso totale della composizione.
3. Composizione secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui la pianta del genere *Musa* è *Musa paradisiaca* o *Musa sapientum*, e l'estratto è preferibilmente presente nella composizione in una quantità compresa fra il 2% e il 90% in peso sul peso totale della composizione, più preferibilmente in una quantità compresa fra il 5% e l'85% in peso sul peso totale della composizione.
4. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 3, in cui l'almeno un enzima digestivo è scelto dal gruppo che consiste di papaina, actinidina e bromelina, e l'enzima digestivo è preferibilmente presente nella composizione in una quantità compresa fra lo 0,1% e il 40% in peso sul peso totale della composizione, più preferibilmente in una quantità compresa fra lo 0,25% e il 30% in peso sul peso totale della composizione.
5. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 4, che è formulata in una forma farmaceutica orale.
6. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 5, per l'uso nella prevenzione e/o il trattamento di disturbi gastrici o gastroesofagei.
7. Composizione per l'uso secondo la rivendicazione 6, in cui i disturbi gastrici o gastroesofagei sono scelti tra dispepsia, pirosi e reflusso gastroesofageo.

8. Corredo di parti per la somministrazione sequenziale o simultanea di almeno un antiacido, un estratto del frutto di una pianta del genere *Musa* e almeno un enzima digestivo proteasico, per l'uso nella prevenzione e/o il trattamento di disturbi gastrici o gastroesofagei, preferibilmente scelti fra dispepsia, pirosi e reflusso gastroesofageo.

9. Corredo di parti secondo la rivendicazione 8, in cui l' almeno un antiacido è come definito nella rivendicazione 2, l'estratto del frutto di una pianta del genere *Musa* è come definito nella rivendicazione 3 e l' almeno un enzima digestivo proteasico è come definito nella rivendicazione 4.

10. Corredo di parti secondo la rivendicazione 8 o 9, che è formulato in una forma farmaceutica orale.

RIASSUNTO

Composizione per l'uso nella prevenzione e/o nel trattamento di disturbi gastrici o gastroesofagei.

L'invenzione riguarda una composizione sinergica di sostanze di origine naturale, particolarmente efficace nel trattamento e la prevenzione di disturbi gastrici o gastroesofagei. La composizione dell'invenzione comprende la combinazione sinergica di almeno un antiacido, un estratto di un frutto di una pianta del genere *Musa* e almeno un enzima digestivo proteasico. La composizione sinergica della presente invenzione può essere provvista sotto forma di composizione farmaceutica o di integratore alimentare, oppure sotto forma di corredo di parti.