



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETÀ INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

DOMANDA NUMERO	101994900368377
Data Deposito	20/05/1994
Data Pubblicazione	20/11/1995

Titolo

IMPIEGO DELL'EPILATTOSIO NEL TRATTAMENTO DEI TUMORI E DELLE MALATTIE
AUTOIMMUNI

MI 94 A 00 1036

20 MAG. 1994

INA.18

Notarbartolo & Gervasi s.r.l.

Domanda di brevetto per invenzione industriale dal titolo:

Impiego dell'epilattosio nel trattamento dei tumori e delle
malattie autoimmuni

a nome: INALCO S.p.A.

con sede in: MILANO

Inventori designati: CIPOLLETTI Giovanni

Depositata il con il N.

* * * * *

TECNICA ANTERIORE

Significativi progressi sono stati conseguiti negli anni recenti
nel campo della chemioterapia dei tumori e delle malattie
autoimmuni.

Sfortunatamente tutti i farmaci che presentano un'attività contro
queste patologie esercitano severi effetti collaterali che
limitano l'impiego ed il dosaggio.

Ad esempio un farmaco impiegato come agente antiproliferativo in
dette patologie è il Methotrexate il quale tuttavia è fortemente
tossico (The pharmaceutical basis of therapeutics, third edition,
Louis S. Goodman and Alfred Gilman, pages 1361-1362).

Le più importanti lesioni causate da questo farmaco avvengono nel
tratto intestinale e nel midollo osseo.

Un rigonfiamento ed una vacuolizzazione del citoplasma delle
cellule mucose dell'epitelio intestinale sono evidenti dopo poche
ore dalla somministrazione. Segue la desquamazione delle cellule
epiteliali, l'estrusione del plasma nel lume intestinale e

l'infiltrazione leucocitaria della sottomucosa. Alla fine, l'intero tratto intestinale mostra una severa enterite emorragica desquamante.

Anche la degenerazione del midollo osseo si sviluppa rapidamente con un evidente disturbo della maturazione degli eritrociti. Viene inibita la proliferazione dei precursori eritroidi e significative quantità di elementi eritroidi primitivi hanno l'aspetto di megaloblasti. Ha luogo anche una rapida alterazione patologica della mielopoiesi ed il midollo osseo diviene aplastico. C'è una diminuzione del contenuto di cellule linfoidi nel tessuto linfatico ed il disturbo dell'ematopoiesi si riflette nel sangue circolante con una marcata granulocitopenia e reticolocitopenia ed una moderata linfopenia.

Infine il Methotrexate interferisce seriamente con l'embrionogenesi.

Disturbi analoghi a quelli sopradescritti, e numerosi altri, vengono causati da tutti i farmaci sinora noti atti al trattamento dei tumori e delle malattie autoimmuni.

In particolare l'azione tossica di questi farmaci riguarda anche la cute, le gonadi, il sistema nervoso centrale, i reni ed il fegato. Considerata questa situazione è fortemente sentita l'esigenza di trovare nuovi farmaci atti al trattamento dei tumori e delle malattie autoimmuni aventi effetti collaterali ridotti.

SOMMARIO

Noi abbiamo sorprendentemente trovato che l'epilattosio esercita un potente effetto inibitorio sulla proliferazione cellulare.

La presente invenzione si riferisce quindi all'impiego dell'epilattosio o di un suo sale farmacologicamente accettabile come sostanza attiva nella preparazione di composizioni farmaceutiche atte all'inibizione della proliferazione cellulare ed in particolare al trattamento dei tumori e delle malattie autoimmuni.

Rispetto ai farmaci attualmente impiegati per il trattamento di queste patologie, l'epilattosio presenta il grande vantaggio di non produrre alcun effetto collaterale nocivo.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Le caratteristiche ed i vantaggi dell'impiego dell'epilattosio, 4-O-(β -D-galattopiranosil)- α -D-mannopiranosio, nella preparazione di composizioni farmaceutiche atte al trattamento dei tumori e delle malattie autoimmuni secondo la presente invenzione saranno maggiormente evidenziati nel corso della seguente descrizione dettagliata.

In una sperimentazione farmacologica, come descritto più avanti, è stato trovato che l'epilattosio esercita una potente azione antiproliferativa nei confronti dei lifociti sia umani che di topo.

L'epilattosio impiegato per la sperimentazione aveva le seguenti caratteristiche:

- titolo 100%;

- contenuto di umidità <0,1%;
- temperatura di fusione 201,5-203°C;
- rotazione specifica $[\alpha]_D^{18} = +27,5$ (C=1,5H₂ 0,2H).

L'effetto dell'epilattosio sulla proliferazione dei linfociti è stato studiato in quattro test in vitro e precisamente:

- test sulla proliferazione dei linfociti umani indotta da forbolo 12-miristato 13-acetato;
- test sulla proliferazione dei linfociti umani indotta da cellule allogeniche;
- test sulla proliferazione dei linfociti di topo indotta da lectina pokeweed mitogen;
- test sulla proliferazione dei linfociti di topo indotta da concanavalina A.

Allo scopo di controllare il corretto funzionamento dei sistemi di saggio sono stati condotti controlli con methotrexate il quale è un noto potente inibitore della proliferazione cellulare.

Tutti i test sono stati condotti a dosi non tossiche.

Il test sulla proliferazione dei linfociti umani indotta da forbolo 12-miristato 13-acetato (PMA) è stato condotto con i seguenti reagenti:

- Mezzo di coltura (CM): RPMI-1640, siero di vitello fetale 10%;
- Forbolo 12-Miristato 12-Acetato (PMA) Sigma P-8139, lotto 73H0191;
- Ionomicina: Calbiochem 407952, lotto 312692;

- MTT: Sigma M-5655, lotto 102H50195;
- Alcool acidificato al 4%;
- Ficoll-Paque: Pharmacia 17-0840-02.

La concentrazione finale di epilattosio nei pozzetti è stata da 0,0001 a 100 µg/ml.

La preparazione dell'epilattosio e dei controlli è stata eseguita nel modo seguente: è stato preparato uno stock in mezzo di coltura a concentrazione di 100 µg/ml e da questo stock sono state preparate le opportune diluizioni nel mezzo di coltura.

Linfociti umani di sangue periferico (PBL) sono stati isolati da 60 ml di sangue venoso di donatori sani eparinizzato. Il sangue è stato diluito 1:2 con soluzione salina bilanciata di Harks (HBSS), stratificato su Ficoll-Paque e centrifugato per 30 minuti a 1450 rpm. I linfociti sono stati rimossi dall'interfaccia e lavati tre volte con HBSS e poi sono stati risospesi in mezzo di coltura ad una concentrazione di $4,0 \times 10^6$ cellule/ml.

Aliquote di 100 µl di ciascuna diluizione da testare sono state distribuite in pozzetti in triplo di piastre per microtitolazione da 96 pozzetti. Ciascun pozzetto riceveva 50 µl di una sospensione di 4×10^6 cellule/ml ($2,0 \times 10^5$ cellule), 25 µl di PMA (0,1 ng/pozzetto) e 25 µl di ionomicina (0,1 µM/pozzetto). Per ciascun saggio sono stati condotti appropriati controlli costituiti solamente da cellule in mezzo di coltura e da cellule più PMA/ionomicina in mezzo di coltura (risposta controllo).

Le piastre sono state incubate per 72 ore a 37°C e CO₂ al 5%.

Alla fine del periodo di incubazione è stata determinata la proliferazione cellulare mediante il metodo MTT. Sono stati aggiunti 20 µl di soluzione MTT (10 mg/ml) e le piastre sono state incubate per 4 ore a 37°C.

Dopo l'incubazione le piastre sono state centrifugate per 5 minuti a 1600 rpm e quindi i pozzetti sono stati portati a secchezza mediante aspirazione.

A ciascun pozzetto sono stati aggiunti 150 µl di alcool acidificato al 4% e le piastre sono state incubate per ulteriori 60 minuti a 37°C prima di leggere le densità ottiche di ciascun pozzetto su un lettore a micropiastra (Molecular Devices Emax Precision Microplate Reader, SoftMax software package).

Il percento del controllo è stato calcolato mediante la formula:

$$\frac{\text{OD del composto in esame}}{\text{OD della risposta controllo}} \times 100 = \% \text{ del controllo}$$

I risultati sono riportati nelle figure 1 e 2 rispettivamente per l'epilattosio e per il methotrexate.

Detti risultati mostrano un potente effetto antiproliferativo dell'epilattosio a tutte le concentrazioni con un'inibizione massima alla concentrazione di 0,1 µg/ml di epilattosio. Il methotrexate, noto potente inibitore della proliferazione cellulare, è stato impiegato come controllo positivo per controllare se i sistemi di saggio funzionavano in modo appropriato.

Con i linfociti T umani da sangue periferico è stato studiato

anche l'effetto dell'epilattosio sulla risposta proliferativa allo stimolo da parte di cellule allogeniche. Sono state impiegate dosi di epilattosio da 0,001 a 1000 µg/ml come concentrazione finale dei pozzetti.

Anche questo esperimento ha confermato una inibizione della proliferazione dei linfociti T da parte dell'epilattosio con un effetto massimo alla concentrazione di 0,1 µg/ml di epilattosio.

Il test sulla proliferazione dei linfociti di topo indotta da lectina pokeweed mitogen (PWM) è stato condotto con i seguenti reagenti:

- Mezzo di coltura (CM): RPMI-1640, siero di vitello fetale 10%;
- Pokeweed mitogen (lectina da *Phytolacca americana*) (PWM),
Boehringer Mannheim 373-184, lotto 102H50195;
- MTT : Sigma M-5655, lotto 102H50195;
- Alcool acidificato al 4%.

La concentrazione finale dell'epilattosio nei pozzetti è stata da 0,0001 a 100 µg/ml. La preparazione dell'epilattosio e dei controlli è stata eseguita nel modo seguente: è stato preparato uno stock in mezzo di coltura a concentrazione di 100 mg/ml e da questo stock sono state preparate le opportune diluizioni in mezzo di coltura. Sono stati impiegati linfociti prelevati da topi Balb/cByJ di sesso femminile e di età otto settimane.

I topi sono stati sacrificati mediante dislocazione cervicale e sono state rimosse le milze chirurgicamente. Sono state preparate sospensioni cellulari delle milze in soluzione salina bilanciata

di Earles (EBSS) supplementata con 12,5 ml di KH_2PO_4 1,2 M per 500 ml di EBSS ottenendo una concentrazione finale di 0,45 M di KH_2PO_4 in EBSS. La sospensione cellulare è stata filtrata attraverso un filtro per cellule da 70 micrometri ed è stata centrifugata in un tubo conico da 50 ml a 1650 rpm. Allo scopo di lisare gli eritrociti, le cellule sono state risospese in 4,5 ml di H_2O distillata sterile e immediatamente addizionate con 0,5 ml di soluzione salina bilanciata di Hanks (HBSS). I linfociti rimanenti sono stati lavati e portati a concentrazione di 5×10^6 cellule/ml di mezzo di coltura.

Aliquote di 100 μl di ciascuna diluizione del composto da testare sono state distribuite in pozzetti in triplo di piastre da microtitolazione da 96 pozzetti. A ciascun pozzetto vennero aggiunti 50 μl di sospensione di cellule di milza di topo a 5×10^6 cellule/ml ($2,5 \times 10^5$ cellule) e 50 μl di PWM (1,0 μg /pozzetto).

Appropriati controlli costituiti solamente da cellule in mezzo di coltura e da cellule più PWM in mezzo di coltura (risposta controllo) sono stati condotti in ciascun saggio.

Le piastre sono state incubate per 72 ore a 37°C in CO_2 al 5%. Alla fine dell'incubazione è stata determinata la proliferazione cellulare mediante il metodo MTT. Sono stati aggiunti 20 μl di soluzione di MTT (10 mg/ml) e le piastre sono state incubate per quattro ore a 37°C . Dopo incubazione le piastre sono state centrifugate per cinque minuti a 1600 rpm e quindi i pozzetti sono stati portati a secchezza mediante aspirazione. Sono stati

aggiunti 150 µl di alcool acidificato al 4% a ciascun pozzetto e le piastre sono state incubate per altri 60 minuti a 37°C prima della lettura delle densità ottiche su un lettore per micropiastre (Molecular Devices Emax Precision Microplate Reader, SoftMax software package).

I risultati sono riportati nelle figure 3 e 4, rispettivamente per l'epilattosio e per il methotrexate. Il percento del controllo è stato calcolato mediante la formula precedentemente definita.

I risultati dimostrano che l'epilattosio inibisce la proliferazione dei linfociti T e B del topo indotta da PWM a tutte le concentrazioni testate. L'effetto antiproliferativo massimo è stato osservato a 100 µg/ml di epilattosio (54% della risposta controllo). Anche in questo test il methotrexate è stato impiegato come controllo positivo.

Con i linfociti T da milza di topo è stata studiata anche l'inibizione da parte dell'epilattosio della proliferazione indotta da concanavalina A. Sono state testate concentrazioni di epilattosio da 0,001 a 1000 µg/ml e si è trovato un effetto antiproliferativo a tutte le concentrazioni con un effetto massimo alla concentrazione di 1 µg/ml.

Dai test sopradescritti risulta chiaramente che l'epilattosio esercita una potente attività antiproliferativa nei confronti delle cellule sia umane che di topo.

Inoltre l'epilattosio non presenta tossicità sino a

concentrazioni di 100 µg/ml.

Grazie a queste caratteristiche l'epilattosio ed i suoi sali farmacologicamente accettabili possono essere impiegati con successo come sostanze attive nella preparazione di composizioni farmaceutiche atte al trattamento dei tumori e delle malattie autoimmuni come l'artrite reumatoide, il lupus sistemico eritematoso, lo scleroderma, la psoriasi, l'osteoartrite e l'asma. Dette composizioni sono costituite da quantità terapeuticamente efficaci di epilattosio in miscela con diluenti ed eccipienti farmacologicamente accettabili.

L'epilattosio ed i suoi sali farmacologicamente accettabili possono essere somministrati in forma di microcapsule oppure in combinazione con eccipienti farmacologicamente accettabili.

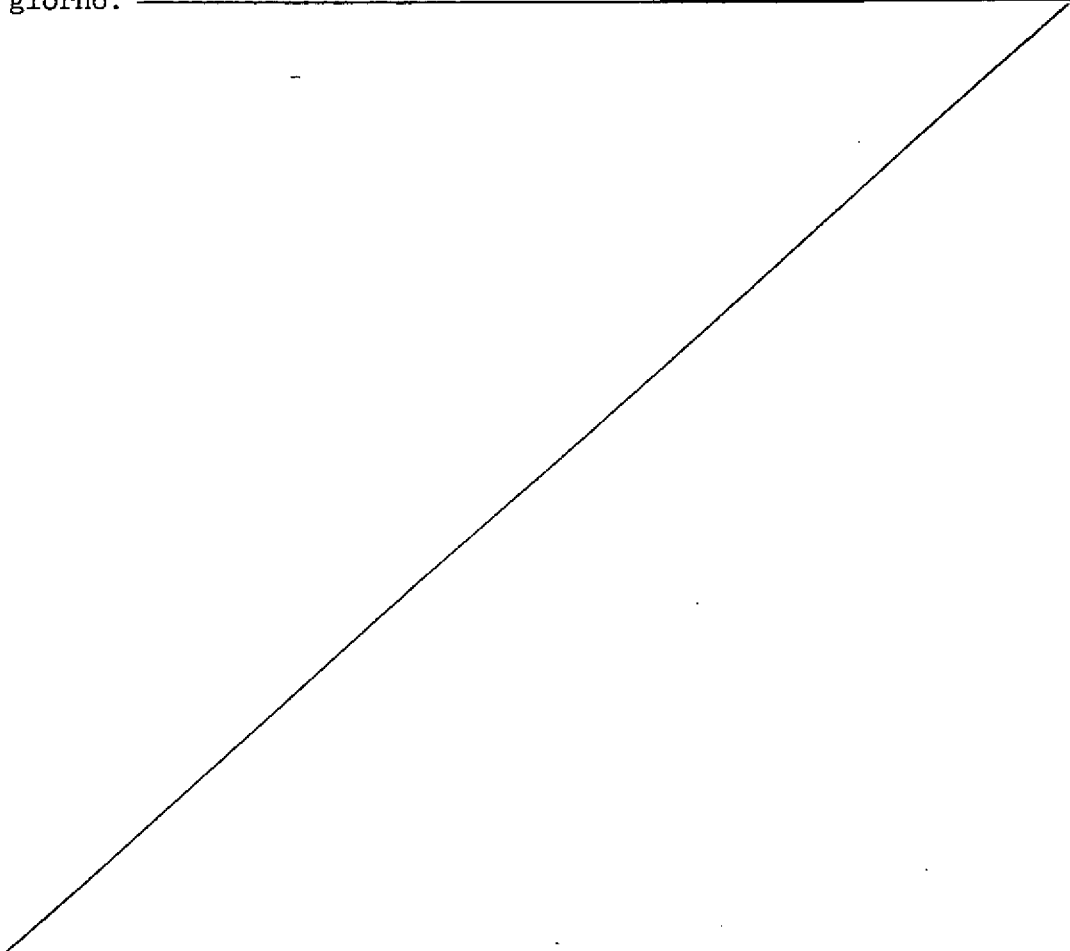
La presente invenzione comprende anche un metodo terapeutico per trattare le patologie soprariportate. Questo metodo comprende il somministrare all'animale o alla persona una quantità efficace di epilattosio o di un suo sale farmacologicamente accettabile, con o senza eccipienti farmacologicamente accettabili. 

Adatte formulazioni solide o liquide sono, per esempio, granuli, polveri, compresse rivestite, microcapsule, gocce e soluzioni iniettabili.

I composti dell'invenzione possono essere impiegati anche in preparazioni a lento rilascio. Come additivi possono essere impiegati, ad esempio, magnesio stearato, magnesio carbonato, titanio biossido, lattosio, mannitolo, talco, lactalbumina,

gelatina, amido, cellulosa e suoi derivati, oli animali e vegetali, polietilene glicoli e solventi. I solventi comprendono acqua sterile, alcoolli e glicoli come il glicerolo.

Le composizioni farmaceutiche sono preferibilmente prodotte e somministrate in unità di dosaggio, ciascuna unità contenendo come componente attiva una dose efficace di epilattosio o di un suo sale farmacologicamente accettabile. Nel caso di mammiferi la dose efficace è compresa fra 1 e 100 mg/kg di peso corporeo per giorno.



RIVENDICAZIONI

1. Impiego dell'epilattosio o di un suo sale farmacologicamente accettabile nella preparazione di composizioni farmaceutiche atte al trattamento delle malattie che richiedono una inibizione della proliferazione cellulare.
2. Impiego secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che dette malattie comprendono i tumori, l'artrite reumatoide, il lupus sistemico eritematoso, lo scleroderma, la psoriasi, l'osteoartrite e l'asma.
3. Composizioni farmaceutiche atte al trattamento delle malattie che richiedono una inibizione della proliferazione cellulare costituite da una quantità farmacologicamente efficace di epilattosio o di un suo sale farmacologicamente accettabile e da diluenti ed eccipienti farmacologicamente accettabili.
4. Composizioni secondo la rivendicazione 3, caratterizzate dal fatto di essere realizzate in forma solida.
5. Composizioni secondo la rivendicazione 3, caratterizzate dal fatto di essere realizzate in forma liquida.
6. Metodo terapeutico per il trattamento delle malattie che richiedono una inibizione della proliferazione cellulare consistente nella somministrazione di una quantità farmacologicamente efficace di epilattosio o di un suo sale farmacologicamente accettabile. 
7. Metodo secondo la rivendicazione 6, caratterizzato dal fatto che detta quantità farmacologicamente efficace è compresa fra 1 e 

INA.18

Notarbartolo & Gervasi s.r.l.

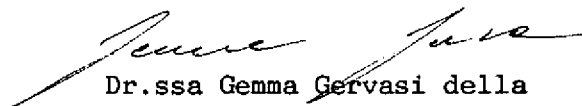
100 mg/kg di peso corporeo per giorno.

(PIC/ub)


Milano, li 20 MAG. 1994

p. INALCO S.p.A.

il Mandatario



Dr.ssa Gemma Gervasi della

NOTARBARTOLO & GERVASI s.r.l.



Fig. 1

MI 94 A 00 1036

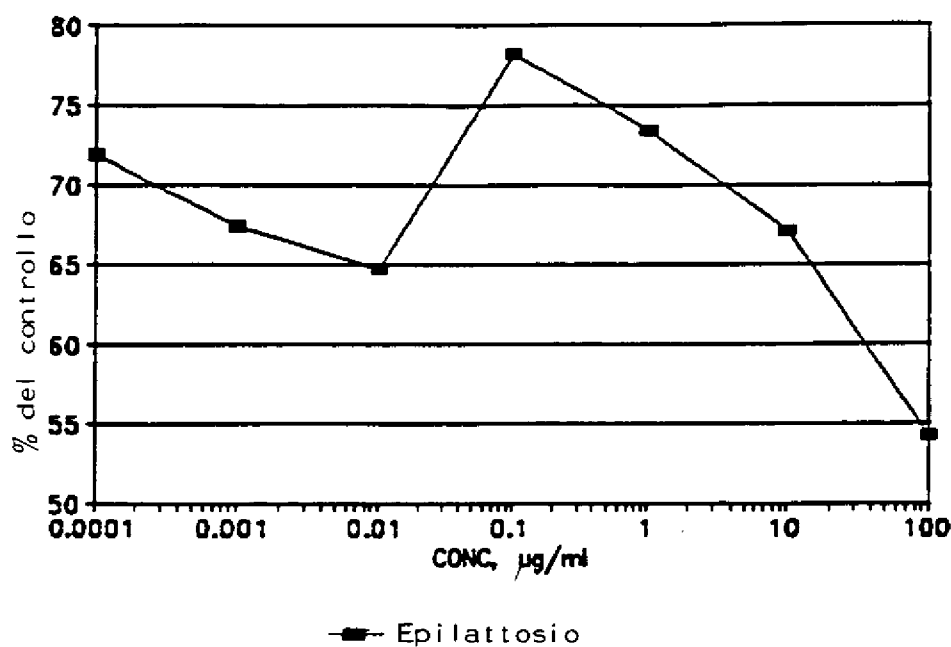
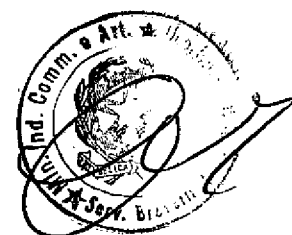
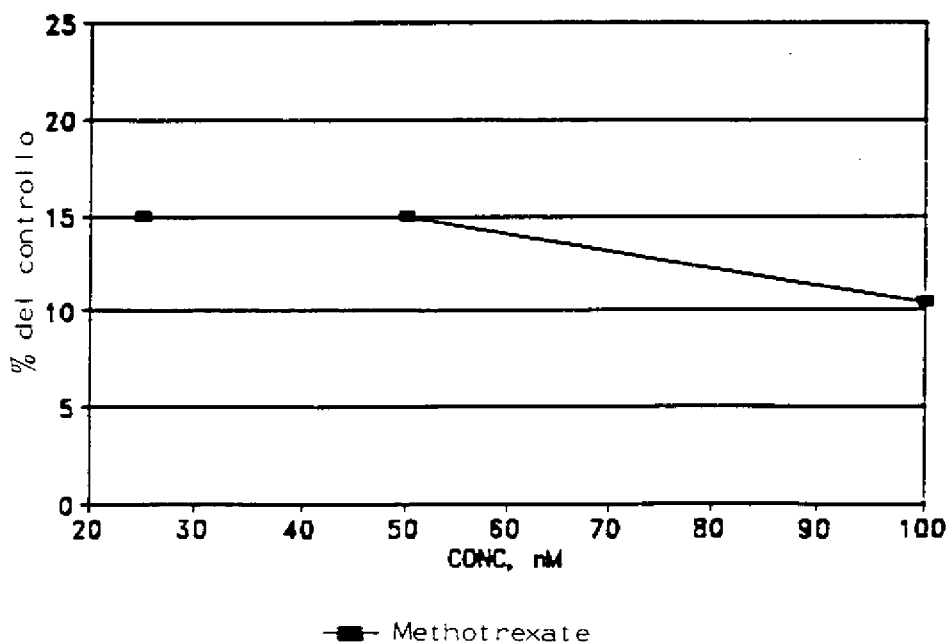


Fig. 2



MI 94 A 001036

Fig. 3

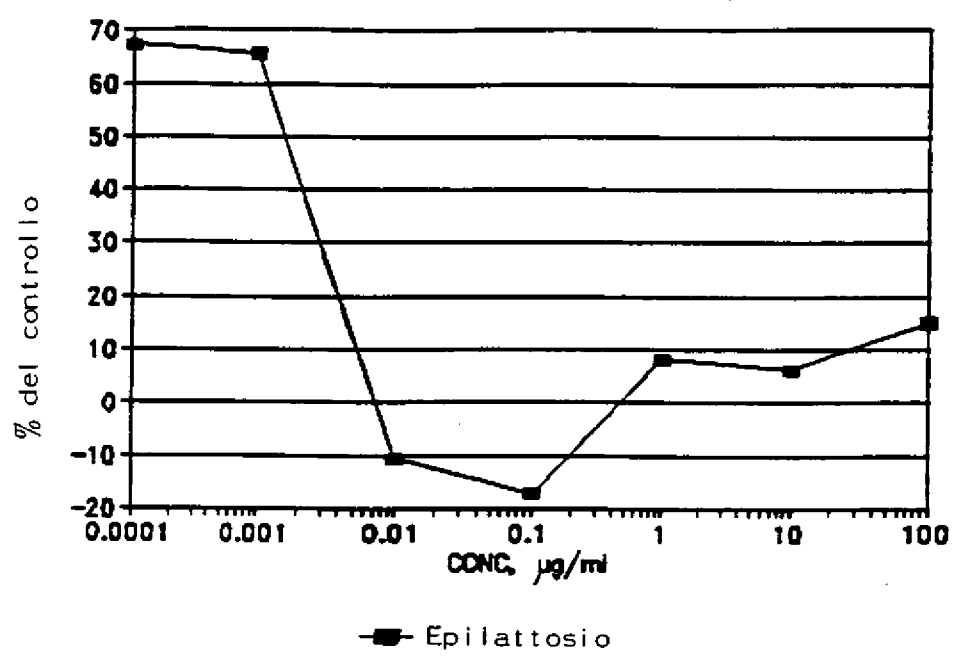


Fig. 4

