



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

DOMANDA NUMERO	102007901524782
Data Deposito	22/05/2007
Data Pubblicazione	22/11/2008

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Titolo

USO DI XENON PER LA PROTEZIONE DI ORGANI DA DANNO ISCHEMICO

7932 M Descrizione del brevetto per invenzione industriale avente per titolo:

FM/mc **“USO DI XENON PER LA PROTEZIONE DI ORGANI DA DANNO ISCHEMICO”**

a nome: **SOCIETÀ ITALIANA ACETILENE & DERIVATI
S.I.A.D. S.p.A. in breve SIAD S.p.A.**

con sede in: Bergamo

* * *

La presente invenzione riguarda l'uso di xenon in miscela con ossigeno per la preparazione di un medicamento da somministrarsi in fase acuta per la protezione di organi da danni conseguenti a trauma.

Stato dell'arte

Lo xenon è usato sperimentalmente in anestesia clinica da più di 50 anni [a] è un gas di dimostrata efficacia e atossicità clinica e possiede un profilo di sicurezza ambientale molto favorevole [b] con un unico neo: il costo [c].

Numerosi studi clinici, soprattutto nell'ultima decade, hanno dimostrato pressoché unanimemente quattro caratteristiche fondamentali possedute dallo xenon:

1) Profilo farmacocinetico estremamente favorevole con coefficiente di partizione sangue/gas molto basso e conseguente onset ed offset estremamente rapidi [d, e, f];

2) Profonda analgesia [g, h];

3) Profilo cardiovascolare favorevole, assenza di effetti negativi sull'inotropismo e sul tono vascolare [i, j, k, l];

4) Protezione d'organo: protezione nei confronti del danno cerebrale

ischemico, ipossico, eccitotossico; preconditionamento miocardico [*m, n, o, p*].

Gli studi sullo xenon hanno mostrato che tali effetti si sviluppano attraverso complessi, ed ancora non ben compresi fenomeni. Un panorama di questi fenomeni è illustrato negli studi riportati in bibliografia e riguardano l'interferenza dello xenon sui neurotrasmettitori.

Il glutammato è il più importante neurotrasmettitore eccitatorio nel sistema nervoso centrale dei mammiferi ed è essenziale per il suo corretto funzionamento. L'aminoacido eccitatorio glutammato (Glu) può aumentare la neurotrasmissione e indurre un potenziamento a lungo termine delle sinapsi centrali. Il Glu esogeno ed i suoi agonisti che mimano gli effetti del trasmettitore endogeno, possono agire sui recettori del Glu stesso ed essere ricaptati dai suoi trasportatori, alterando le normali funzioni neurofisiologiche. Elevati livelli extracellulari di agonisti del Glu possono indurre un afflusso di ioni calcio e sodio dentro le cellule, soprattutto attraverso il legame ai recettori NMDA. La presenza in eccessive quantità del glutammato nel vallo sinaptico può portare i neuroni a morte.

Il termine "eccitotossicità", che fu coniato da Olney [*q*], denota il processo attraverso il quale l'iperattivazione dei recettori del glutammato, ed in particolare di quelli del sottotipo NMDA (N-metil-D-aspartato), portando ad un sovraccarico intracellulare di calcio, scatena una cascata biochimica che porta a morte i neuroni esposti ad elevate concentrazioni del neurotrasmettitore. Questo stesso processo patologico è ritenuto responsabile del mantenimento del danno neuronale acuto (stroke, trauma cranico, ...) ma è anche l'evento patologico responsabile del lento deterioramento neuronale che

avviene nel decorso delle malattie neurodegenerative croniche (SLA, M. di Parkinson, M. di Alzheimer, ...) [p].

Molti studi sono quindi stati intrapresi per capire come una molecola con proprietà NMDA-antagoniste possa comportarsi nei confronti del danno eccitotossico e per valutare un suo eventuale uso clinico come “farmaco neuroprotettore”.

La ketamina, così come la fenciclidina (PCP) e la dizolcipina (MK101), sono potenti inibitori del recettore NMDA ma il loro uso clinico è impedito dalle profonde modificazioni psico-comportamentali che possono evocare. Queste molecole sono inoltre in grado di determinare importanti modificazioni istologiche degenerative del giro cingolato posteriore e della corteccia retrosplenica, che possono essere responsabili del loro effetto psicotomimetico [r, s, t]. Il protossido d’azoto possiede simili caratteristiche in quanto anch’esso è dotato di proprietà NMDA-bloccanti [u] ma ha alcuni effetti collaterali che ne limitano l’uso. Molti dati sperimentali indicano che gli antagonisti del recettore NMDA possano essere neuroprotettivi in modelli di danno neuronale in vitro e in vivo (Sarraf-Yazdi *et al.*, 1998; Harada *et al.*, 1999; Popovic *et al.*, 2000; Kudo *et al.*, 2001) e possano anche prevenire il deterioramento della funzione cognitiva dopo bypass cardiopolmonare (Arrowsmith *et al.*, 1998; Franks *et al.*, 1998; de Sousa *et al.*, 2000; Yamakura e Harris, 2000; Nagata *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2002; Wilhelm *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2003). Nonostante i presupposti di un effetto neuroprotettivo in modelli animali, parecchi antagonisti del recettore NMDA hanno mostrato una neurotossicità intrinseca (caratterizzata da una specifica lesione della corteccia retrosplenica) o un profilo farmacocinetico sfavorevole (Arrowsmith

et al., 1998).

Anche se rimane ancora da dimostrare se a determinare questi effetti sia solo il semplice antagonismo NMDA o se occorra la perturbazione anche di altri sistemi di neurotrasmissione, è certo invece che lo xenon, che è un inibitore non competitivo dei recettori NMDA [v, w], è del tutto scevro da questi inconvenienti. Lo xenon sembra inoltre in grado di ridurre il rilascio di dopamina [x], neurotrasmettitore direttamente coinvolto nell'induzione e nel mantenimento degli stati psicotici; l'attività del sistema dopaminergico sembra potenziata da qualsiasi altra molecola ad attività NMDA-antagonista [y, z, aa] Recenti studi hanno rivelato che lo xenon, unico tra gli anestetici volatili a possedere proprietà da antagonista del recettore NMDA, non induce neurotossicità a livello della corteccia retrosplenica (Ma *et al.*, 2002), ma protegge dal danno neurotossico prodotto dalla ketamina (Nagata *et al.*, 2001) e riduce il danno indotto dagli aminoacidi eccitatori (Ma *et al.*, 2002; Wilhelm *et al.*, 2002). Inoltre lo xenon attraversa prontamente la barriera emato-encefalica (BEE) potendo così raggiungere rapidamente la sede del danno. È stato recentemente dimostrato che lo xenon è un antagonista del recettore NMDA (Franks *et al.*, 1998; de Sousa *et al.*, 2000; Yamakura e Harris, 2000).

In precedenti studi, lo xenon è stato sperimentato e sono stati esclusi effetti citotossici ultrastrutturali (Natale *et al.*, 2002) e danni macroscopici ai principali organi (Natale *et al.*, 1998; Burov *et al.*, 1998), ma il sistema nervoso centrale non è mai stato valutato attraverso la microscopia elettronica.

Quantunque siano ormai solide le evidenze di ricerca preclinica

disponibili in letteratura in merito alla possibilità di utilizzare lo xenon come farmaco protettore d'organo, al momento nessun protocollo di utilizzo in ambito clinico extraospedaliero è stato ancora avviato. Allo stato attuale nessuna terapia eziologica per il danno ischemico è disponibile e viene routinariamente somministrato al momento del soccorso un trattamento puramente sintomatologico.

Descrizione dell'invenzione

Si è ora trovato che lo xenon in miscela con ossigeno, se somministrato in una fase precoce in soggetti traumatizzati, è in grado di prevenire e contrastare efficacemente il danno ischemico di organi, in particolare a livello cardiaco e cerebrale.

L'attività dello xenon in miscela con ossigeno è stata messa in evidenza da uno studio morfologico avente come scopo la valutazione qualitativa e quantitativa dell'effetto che lo xenon esercita sul danno eccitotossico indotto da un'agonista NMDA nel SNC di ratto.

L'invenzione pertanto riguarda l'uso di xenon in miscela con ossigeno per la preparazione di un medicamento da somministrarsi in fase acuta per la protezione di organi da danni conseguenti a trauma.

Il medicamento è somministrato preferibilmente entro i 20 minuti dal trauma, per via inalatoria o per via endovenosa, allo scopo di limitare al massimo l'attività apoptotica naturale.

La miscela ha la seguente composizione preferita:

- 40% - 80% vol di xenon;
- 60% - 20% vol di ossigeno.

e può eventualmente comprendere altri gas rari, in particolare kripton,

in modo che la concentrazione di ossigeno sia superiore al 20% vol. La presenza opzionale di altri gas rari può avere effetti importanti per quanto riguarda la purezza dello xenon da utilizzare per preparare le miscele da somministrare in quanto può essere utilizzato come gas di partenza una miscela di xenon con altri gas rari, ad esempio kripton.

Il medicamento potrà essere vantaggiosamente somministrato in una fase di pronto soccorso: allo scopo, le unità mobili di soccorso (autoambulanze, eliambulanze, etc.) potranno essere agevolmente dotate di mezzi di erogazione della miscela gassosa di xenon/ossigeno per somministrazione inalatoria. Lo xenon potrà anche essere somministrato per via endovenosa, come descritto in IT1312017.

Come prima accennato, la nuova applicazione oggetto dell'invenzione è stata evidenziata su un modello animale di danno eccitotossico acuto, indotto dalla somministrazione di acido N-metil-DL-aspartico (NMA) nel nucleo arcuato del ratto, verificando gli effetti morfologici del danno a livello tissutale in fase acuta.

Sono stati inoltre verificati gli effetti dello xenon sui neuroni del nucleo arcuato di ratto dal punto di vista morfologico e si è stabilito se la somministrazione di xenon insieme alla tossina possa ridurre il danno e se la neuroprotezione possa essere mantenuta nel tempo.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che l'NMA ha effetto tossico sui neuroni del NA e che lo xenon non solo è privo di tossicità intrinseca, ma può prevenire il danno eccitotossico a carico del NA.

Nel nucleo arcuato dei ratti di controllo i neuroni e le cellule gliali corrispondono alle descrizioni standard.

Nei preparati provenienti dai ratti trattati con NMA, la colorazione con cresil violetto ed ematossilina-eosina ha consentito di evidenziare una perdita neuronale tipicamente contraddistinta da degenerazione cellulare e identificabile dai nuclei picnotici e dal rigonfiamento del compartimento citoplasmatico che conferisce il tipico aspetto ad “occhio di bue”.

Secondo le attuali conoscenze, la distinzione tra apoptosi e necrosi cellulare appare sempre meno netta. Infatti possiamo osservare che i neuroni in via di degenerazione presentano un profilo morfologico tipico sia dell'apoptosi che della necrosi. L'evoluzione verso l'una o l'altra forma di morte cellulare dipende soprattutto dalle microcondizioni ambientali specifiche di ogni cellula e in teoria dalla relazione dose-risposta alla neurotossina (nel danno ischemico questo fenomeno è conosciuto come “fenomeno della maturazione”).

Negli animali trattati con NMA abbiamo osservato immagini morfologiche diverse in base ai differenti tempi sperimentali a cui abbiamo sacrificato gli animali (3 ore, 24 ore, 7 giorni) ed attribuibili sempre e comunque al danno eccitotossico specifico e alla risposta infiammatoria astrocitaria secondaria alla morte neuronale (gliosi).

Questo in pratica significa che il danno a 3 ore è critico e che si può osservare una risposta reattiva della glia a 24 ore; infine il danno sembra stabilizzarsi a 7 giorni.

I dati ottenuti dalla microscopia a fluorescenza (FJB) sono interessanti e particolarmente significativi.

Nei nuclei arcuati degli animali sacrificati a 3 ore la fluorescenza appare positiva in modo marcato. La colorazione con FJB è in grado di

marcare solo i neuroni in via di degenerazione in cui particolari composti vengono rilasciati all'interno del citoplasma. È quindi ipotizzabile che mentre la maggior parte dei neuroni muore in un breve lasso di tempo, gli altri neuroni potrebbero sviluppare un processo degenerativo, ma solo dopo alcuni giorni, quando i segni del danno possono essere evidenziati da alcune tracce di positività alla fluorescenza con FJB. Tutti gli animali trattati con NMA e successivamente esposti allo xenon 70%, studiati a qualunque tempo e con qualunque metodica, hanno mostrato una significativa riduzione del danno eccitotossico (Abramo *et al*, 2004).

I neuroni dei nuclei arcuati provenienti dai ratti trattati con xenon e osservati al microscopio ottico, corrispondono alle descrizioni ottenute dai ratti appartenenti al gruppo di controllo e colorati con ematossilina-eosina e cresil violetto; inoltre appaiono negativi al FJB e intensamente positiva è la fluorescenza dei nuclei colorati con DAPI, che marca le cellule vitali.

Anche nell'ippocampo, le cui cellule sono ritenute particolarmente sensibili verso insulti quali l'ipossia o l'ischemia e il danno neurotossico, non abbiamo rilevato alcuna alterazione morfologica indotta dallo xenon.

Durante il periodo di esposizione allo xenon non abbiamo osservato a carico degli animali alcuna alterazione comportamentale: questo dato conferma il buon profilo neuropsicolettico di questo gas.

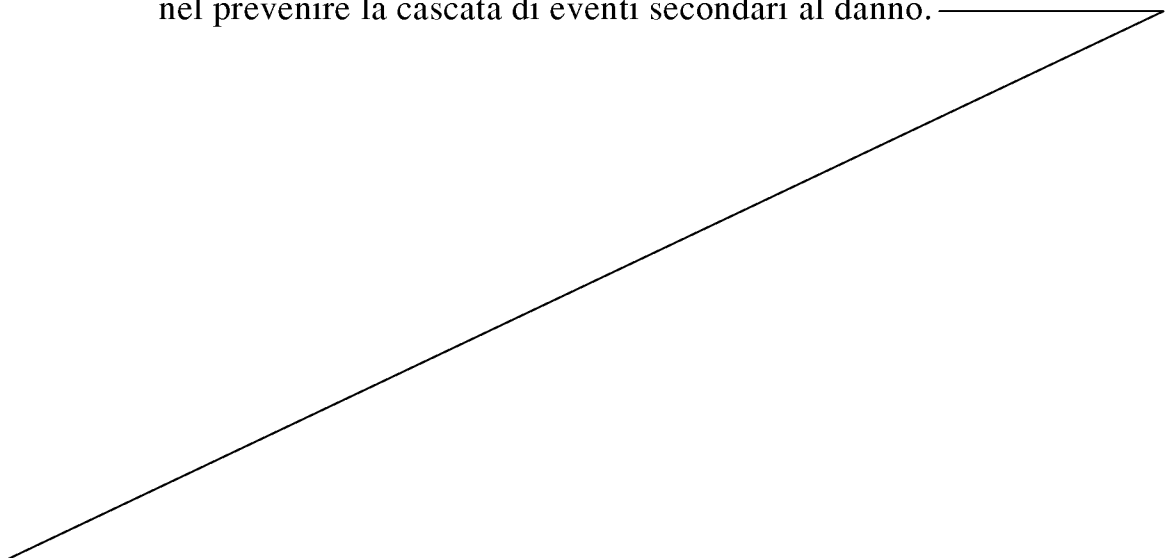
Lo xenon agisce in accordo con i dati sulla eziologia e la fisiopatologia del danno acuto e ritarda o comunque interferisce con i meccanismi alla base del danno subacuto. Possiamo anche assumere che il danno eccitotossico si realizzi con un tempo di latenza in cui lo xenon sembra operare sia a livello molecolare che a livello cellulare (nei rapporti tra glia e neuroni).

Sia dal punto di vista qualitativo che quantitativo i risultati hanno dimostrato un importante effetto neuroprotettivo sul tessuto nervoso e quest'azione sembra coinvolgere sia le cellule nervose in fase precoce che la glia in una fase successiva.

Questi risultati preliminari dimostrano con efficacia il fenomeno della neuroprotezione.

Per concludere i nostri risultati confermano che:

- l'NMA è in grado di indurre un danno neuronale importante nel nucleo arcuato di ratto e questo è già evidente dopo 3 ore dalla somministrazione della sostanza. Al microscopio ottico si può rilevare una riduzione marcata del numero dei neuroni vitali. Comunque la perdita cellulare oltre che essere dipendente dalla dose di tossina, è anche dipendente dal tempo.
- Lo xenon è privo di proprietà neurotossiche dal punto di vista della valutazione morfologica. Lo xenon sembra attenuare il danno eccitotossico da quando ha inizio e, sebbene sia stato somministrato dopo l'NMA, è confermato il suo unico ruolo neuroprotettivo anche nel prevenire la cascata di eventi secondari al danno.



Bibliografia citata

- a) Cullen SC, Gross EG. *The anaesthetic properties of xenon in animals and human beings, with additional observations on krypton. Science* 1951; 113: 580-2.
- b) Sanders RD, Franks NP, Maze M. *Xenon: no stranger to anaesthesia. Br J Anaesth.* 2003 Nov;91(5):709-17. Lachmann B, Armbruster S, Schairer W, et al. *Safety and efficacy of xenon in routine use as an inhalational anaesthetic. Lancet* 1990; 335: 141-5.
- c) Nakata Y, Goto T, Niimi Y, Morita S. *Cost analysis of xenon anesthesia: a comparison with nitrous oxide-isoflurane and nitrous oxide-sevoflurane anesthesia. J Clin Anesth* 1999; 11:477-81.
- d) (Goto T, Saito H, Shinkai M, Nakata Y, Ichinose F, Morita S. *Xenon provides faster emergence from anesthesia than does nitrous oxide-sevoflurane or nitrous oxide-isoflurane. Anesthesiology* 1997; 86: 1273-8.
- e) Goto T, Suwa K, Uezono S, Ichinose F, Uchiyama M, Morita S. *The blood-gas partition coefficient of xenon may be lower than generally accepted. Br J Anaesth* 1998; 80: 255-6.
- f) Nakata Y, Goto T, Morita S. *Comparison of inhalation inductions with xenon and sevoflurane. Acta Anaesthesiol Scand* 1997; 41: 1157-61).
- g) Petersen-Felix S, Luginbuhl M, Schnider TW, Curatolo M, Arendt-Nielsen L, Zbinden AM. *Comparison of the analgesic potency of xenon and nitrous oxide in humans evaluated by experimental pain. Br J Anaesth.* 1998 Nov;81(5):742-7.

- h) *Yagi M, Mashimo T, Kawaguchi T, Yoshiya I. Analgesic and hypnotic effects of subanaesthetic concentrations of xenon in human volunteers: comparison with nitrous oxide. Br J Anaesth. 1995 Jun;74(6):670-3.*
- i) *Boomsma F, Ruprecht J, Veld AJ, de Jong FH, Dzoljic M, Lachmann B. Haemodynamic and neurohumoral effects of xenon anaesthesia. A comparison with nitrous oxide. Anaesthesia 1990; 45: 273.*
- j) *Dingley J, King R, Hughes L, et al. Exploration of xenon as a potential cardiostable sedative: a comparison with propofol after cardiac surgery. Anaesthesia 2001; 56: 829-35.*
- k) *Lachmann B, Armbruster S, Schairer W, et al. Safety and efficacy of xenon in routine use as an inhalational anaesthetic. Lancet 1990; 335: 1413-5.*
- l) *Luttrupp HH, Romner B, Perhag L, Eskilsson J, Fredriksen S, Werner O. Left ventricular performance and cerebral haemodynamics during xenon anaesthesia. A transoesophageal echocardiography and transcranial Doppler sonography study. Anaesthesia 1993; 48: 1045-9.*
- m) *Wilhelm S, Ma D, Maze M, Franks NP. Effects of xenon on in vitro and in vivo models of neuronal injury. Anesthesiology 2002; 96: 1485-91.*
- n) *Petzelt C, Blom P, Schmehl W, Muller J, Kox WJ. Prevention of neurotoxicity in hypoxic cortical neurons by the noble gas xenon. Life Sci. 2003 Mar 14;72(17):1909-18.*
- o) *Weber NC, Toma O, Wolter JI, Obal D, Mullenheim J, Preckel B, Schlack W. The noble gas xenon induces pharmacological preconditioning in the rat heart in vivo via induction of PKC-epsilon and p38 MAPK. Br J Pharmacol. 2005 Jan;144(1):123-32.*

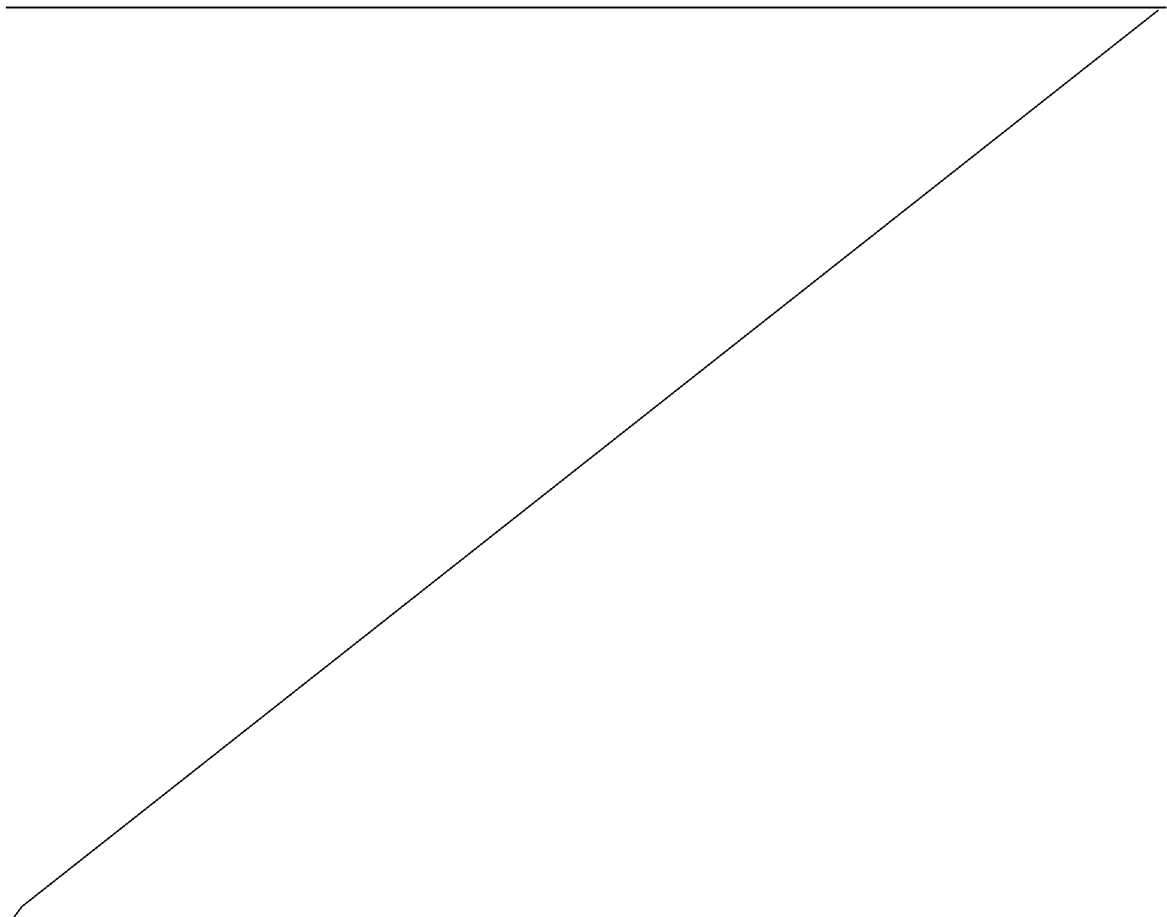
- p) *Preckel B, Weber NC, Sanders RD, Maze M, Schlack W. Molecular mechanisms transducing the anesthetic, analgesic, and organ-protective actions of xenon. Anesthesiology. 2006 Jul;105(1):187-97).*
- q) *Olney JW. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. Science 1969; 164: 719-21.*
- r) *Choi DW, Koh JY, Peters S. Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonists. J Neurosci 1988; 8: 185-96.*
- s) *Malhotra AK, Pinals DA, Weingartner H, et al. NMDA receptor function and human cognition: the effects of ketamine in healthy volunteers. Neuropsychopharmacology 1996; 14: 301-7.*
- t) *Olney JW, Labruyere J, Price MT. Pathological changes induced in cerebrocortical neurones by phencyclidine and related drugs. Science 1989; 244: 1360-2.*
- u) *Allen HL, Iversen LL. Phencyclidine, dizocilpine, and cerebrocortical neurones. Science 1990; 247: 221.*
- v) *Jevtovic-Todorovic V, Todorovic SM, Mennerick S, et al. Nitrous oxide (laughing gas) is an NMDA antagonist, neuroprotectant and neurotoxin. Nature Med 1998; 4: 460-3.*
- w) *Franks NP, Dickinson R, de Sousa SLM, Hall AC, Lieb WR. How does xenon produce anaesthesia? Nature 1998; 396: 324.*
- x) *De Sousa SL, Dickinson R, Lieb WR, Franks NP. Contrasting synaptic actions of the inhalational general anesthetics isoflurane and xenon. Anesthesiology 2000; 92: 1055-66.*
- y) *Petzelt CH. New concepts in neuroprotection. J Anasth*

Intensivbehandlung 2001; 3: S38.

z) *Murakawa M, Adachi T, Nakao S, Seo N, Shingu K, Mori K. Activation of the cortical and medullary dopaminergic systems by nitrous oxide in rats: a possible neurochemical basis for psychotropic effects and postanesthetic nausea and vomiting. Anesth Analg 1994; 78: 376-81.*

aa) *Moghaddam B, Adams B, Verma A, Daly D. Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. J Neurosci 1997; 17: 2921-7.*

ab) *Lindfors N, Barati S, O'Connor WT. Differential effects of single and repeated ketamine administration on dopamine, serotonin and GABA transmission in rat medial prefrontal cortex. Brain Res 1997; 759: 205-12.*



RIVENDICAZIONI

1. Uso di xenon in miscela con ossigeno per la preparazione di un medicamento da somministrarsi in fase acuta per la protezione di organi da danni conseguenti a trauma.
2. Uso secondo la rivendicazione 1, in cui il medicamento è somministrato preferibilmente entro 20 minuti dal trauma.
3. Uso secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui il medicamento è somministrato per via inalatoria o per via endovenosa.
4. Uso secondo una delle rivendicazioni 1-3, in cui il medicamento protegge gli organi dal danno ischemico cardiaco, renale o cerebrale.
5. Uso secondo la rivendicazione 1 per via inalatoria, in cui la miscela ha la seguente composizione:
 - 40% - 80% vol di xenon;
 - 60% - 20% vol di ossigeno.
6. Uso secondo una qualunque delle rivendicazioni da 1 a 5 in cui la miscela comprende altri gas rari, in particolare kripton, in qualunque concentrazione, in modo che la concentrazione di ossigeno sia superiore al 20% vol.

Milano, 22 maggio 2007