



CONFEDERAZIONE SVIZZERA
UFFICIO FEDERALE DELLA PROPRIETÀ INTELLETTUALE

⑪ CH 650 149 A5

⑤① Int. Cl.4: A 61 K 31/205

Brevetto d'invenzione rilasciato per la Svizzera ed il Liechtenstein
Trattato sui brevetti, del 22 dicembre 1978, fra la Svizzera ed il Liechtenstein

⑫ **FASCICOLO DEL BREVETTO** A5

⑳ Numero della domanda: 4144/82	㉔ Titolare/Titolari: Sigma-Tau Industrie Farmaceutiche Riunite S.p.A., Roma (IT)
㉒ Data di deposito: 07.07.1982	
㉓ Priorità: 09.07.1981 IT 48866/81	㉕ Inventore/Inventori: Cavazza, Claudio, Roma (IT)
㉔ Brevetto rilasciato il: 15.07.1985	
㉕ Fascicolo del brevetto pubblicato il: 15.07.1985	㉖ Mandatario: Dr. Mario Pozzi, Lugano

㉗ **Composizione farmaceutica ad attività immunomodulante comprendente un derivato acilico della carnitina.**

㉘ Viene descritta una composizione farmaceutica ad azione immunomodulante comprendente acetilcarnitina quale agente attivo.

RIVENDICAZIONI

1. Composizione farmaceutica immunomodulante somministrabile per via orale o parenterale, comprendente

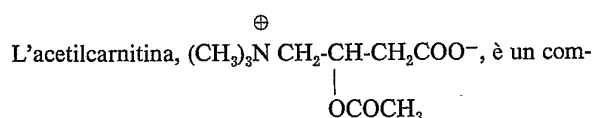
(a) una quantità di acetilcarnitina efficace a stimolare il sistema immunitario di un paziente il cui sistema immunitario necessita di venir normalizzato e/o stimolato; e

(b) un eccipiente farmaceuticamente accettabile.

2. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 1, somministrabile per via orale o parenterale, in forma di dosaggio unitario, comprendente 100-1000 mg di acetilcarnitina.

3. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 2, in cui detta acetilcarnitina è L-acetilcarnitina.

La presente invenzione riguarda una composizione farmaceutica ad attività immunomodulante comprendente, quale principio attivo, acetilcarnitina.



posto noto la cui preparazione è stata ad esempio descritta da E. Strack et al. in Chem. Ber. 86 525/9, (1953).

L'acetilcarnitina contiene un atomo di carbonio asimmetrico e pertanto esiste nella forma racema (D, L) e nelle forme otticamente attive destrogira (D) e levogira (L). Nel seguito si farà riferimento per semplicità all'acetilcarnitina, intendendo riferirsi a tutte le forme precedentemente menzionate, sebbene la L-acetilcarnitina sia la forma più attiva.

Sebbene siano già noti composti immunomodulanti quali ad esempio levamisolo, metilsoprinolo ed ormoni timici, è evidente l'opportunità di allargare la gamma limitata di tali agenti terapeutici attualmente a disposizione del medico. Va altresì notato che gli immunomodulatori precedentemente menzionati non sono privi di effetti collaterali indesiderabili. Ad esempio in Clin. Immunol. Immunopathol. 14 70, (1979) vengono riportati casi di reazioni allergiche in un certo numero di pazienti trattati con ormoni timici (timosina), cosicché la timosina non dovrebbe essere somministrata a pazienti proclivi ad allergie, mentre in generale i pazienti cui vengono somministrate iniezioni di questo immunostimolante dovrebbero venire strettamente controllati mediante test cutanei. Il levamisolo presenta tutta una gamma di effetti collaterali e sovente i pazienti cui viene somministrato questo immunostimolante lamentano nausea e malesseri del tipo di quelli provocati dall'influenza. Sono stati riportati casi di esantema che scompaiono alla sospensione del farmaco. L'effetto collaterale più preoccupante è costituito dalla granulocitopenia, fenomeno che, sebbene reversibile e tendente a scomparire alla sospensione della terapia, impone che il conteggio dei globuli bianchi venga strettamente controllato in pazienti cui il farmaco viene somministrato per prolungati periodi di tempo. Inoltre, poiché in Cancer Trea. Rep. 62, 1623 (1978) è stato riportato che alle elevate concentrazioni il farmaco provoca la soppressione piuttosto che l'aumento delle risposte delle cellule T umane ai mitogeni, il trattamento clinico dei pazienti deve comprendere un accurato controllo volto ad assicurare che il sistema immunitario venga stimolato e non soppresso. Un fenomeno analogo è presentato anche dagli ormoni timici (si veda «Advances in immunopharmacology, Editors J. Hadden, L. Chedid, P. Mullen, F. Spreafico; Pergamon Press [1981]). Gli studi di tossicità, teratogenicità e carcino-

genesi effettuati sul metisoprinolo hanno mostrato che questa sostanza è generalmente ben tollerata e sostanzialmente esente da effetti collaterali anche quando somministrata per lunghi periodi di tempo. Tuttavia, poiché la molecola del metisoprinolo contiene il nucleo dell'inosina, una purina che è presente nei linfociti e che viene metabolizzata ad acido urico secondo i normali processi biochimici, sono riscontrabili dei fenomeni di iperuricemia.

Da quanto sopra menzionato risulta evidente l'opportunità di mettere a disposizione del medico una nuova sostanza immunomodulante che sia priva degli effetti collaterali non desiderati solitamente presentati dagli immunostimolanti noti ed in commercio.

Si è ora sorprendentemente trovato che l'acetilcarnitina, particolarmente la L-acetilcarnitina, è un efficace agente immunomodulante che risulta privo degli effetti collaterali precedentemente menzionati.

Pertanto, la presente invenzione è essenzialmente basata sull'impiego dell'acetilcarnitina quale immunomodulante.

La presente invenzione comprende una composizione farmaceutica immunomodulante somministrabile per via orale o parenterale, comprendente

(a) una quantità di acetilcarnitina efficace a stimolare il sistema immunitario di un paziente il cui sistema immunitario necessita di essere normalizzato e/o stimolato; e

(b) un eccipiente farmaceuticamente accettabile.

Il trattamento di pazienti il cui sistema immunitario necessita di venir normalizzato e/o stimolato, consiste nella somministrazione per via orale o parenterale a detti pazienti di acetilcarnitina, preferibilmente di una quantità giornaliera di acetilcarnitina compresa fra circa 5 e circa 50 mg/kg di peso corporeo. Si utilizzeranno preferibilmente a tale scopo delle composizioni in forma di dosaggio unitario, comprendenti 100-1000 mg di acetilcarnitina.

Le proprietà immunostimolanti della acetilcarnitina sono state accertate sperimentalmente mediante studi condotti su cellule immunocompetenti prelevate da animali o da esseri umani sani.

Fra questi studi vengono qui di seguito illustrati i seguenti:

(A) Studi nel topo

Risposta ai mitogeni

(B) Studi nell'uomo

1-Risposta ai mitogeni

(a) Sintesi del DNA

(b) Sintesi del RNA

2-Effetto sui leucociti

3-Effetto sulle cellule trattate con glucocorticoidi

È ben noto che i test sopramenzionati costituiscono uno screening universalmente riconosciuto per valutare le caratteristiche di sostanze immunosoppressive e immunostimolanti.

(A) Studi nel topo

Risposta ai mitogeni

I linfociti se opportunamente stimolati con varie sostanze vanno incontro a trasformazione blastica e proliferazione. Gli agenti che evocano una proliferazione su una base non immune sono definiti aspecificamente mitogeni.

Alcuni mitogeni stimolano selettivamente i linfociti T maturi ed immaturi (Con A = concanavalina A), mentre altri (LPS = lipopolisaccaride) sono specifici per le cellule B. La proliferazione cellulare può essere opportunamente quan-

tizzata impiegando un radiotracciante quale la timidina marcata con trizio ($^3\text{Htdr}$) e leggendo i preparati mediante un beta counter. A causa della loro selettività i mitogeni possono essere di aiuto nell'identificazione delle sottopopolazioni cellulari sensibili all'azione di una determinata sostanza.

I linfociti sono stati ottenuti da milze di topini maschi ceppo C57B1/6 di peso pari a 18-20 gr. Le cellule sono state sospese sterilmente in terreno RPMI 1640 addizionato con il 5% di siero di vitello fetale, 4 mM glutamina ed antibiotici e successivamente seminate in piastre microtiter ad una concentrazione di 5×10^5 cellule per pozzetto. Come mitogeni sono stati impiegati la Con A e l'LPS a varie concentrazioni (4 e 6 $\mu\text{g/ml}$ 20 e 100 $\mu\text{g/ml}$ rispettivamente). La L-acetil carnitina è stata aggiunta alle dosi di 0,1-0,5-1-5-10-50-100 $\mu\text{g/ml}$ (concentrazione finale) all'inizio delle colture. Dopo 72 ore di incubazione in 5% CO_2 , di cui le ultime 18 in presenza di $^3\text{Htdr}$ (1 μCi), le piastre sono state aspirate con un Harvester Mash II. I preparati sono stati successivamente letti in un beta counter Beckman ed i risultati espressi in colpi per minuto (c.p.m.).

La percentuale di variazione rispetto alle cellule stimulate con mitogeni delle cellule stimulate con mitogeni in presenza di L-acetil carnitina è riportata graficamente nelle figg. 1 e 2. Ovviamente a tutti i preparati è stata sottratta la radioattività di base delle cellule incubate con o senza sostanza e senza mitogeni.

La L-acetil carnitina favorisce l'incorporazione di $^3\text{Htdr}$ da parte degli splenociti stimolati con il mitogeno Con A o LPS. L'effetto è maggiore per i T linfociti, piuttosto che per i B linfociti. L'effetto potenziante della L-acetil carnitina è evidenziabile solamente se essa è messa in contatto con cellule attivate dai mitogeni. Questo prova che la L-acetil carnitina non ha proprietà mitogeniche e neppure è in grado di indurre la produzione di fattori mitogenici. È altresì evidente che l'azione immunomodulante della L-acetil carnitina è diversa a seconda della quantità di mitogeno impiegata, ciò che lascia individuare: a) un'azione facilitante a determinare concentrazioni di mitogeno; b) un aumento della proporzione relativa delle cellule in grado di rispondere ad una determinata concentrazione di mitogeno. A seconda della quantità di mitogeno utilizzato per stimolare le cellule, la sostanza esplica un'azione immunomodulante a concentrazioni diverse.

(B) Studi nell'uomo

1 - Risposta ai mitogeni

(a) Sintesi del DNA

La capacità dei linfociti umani di trasformarsi in presenza di minime quantità di certe sostanze di origine batterica o vegetale o anche molecole inorganiche in blasti e di proliferare per mitosi «in vitro» è una caratteristica ben definita che riflette sia lo stato immunologico sia il potenziale immune dell'intero organismo «in vivo». La trasformazione linfocitaria è valutata misurando l'incorporazione nel DNA della cellula che si divide di un aminoacido marcato con un radiotracciante, solitamente la timidina triziata ($^3\text{Htdr}$). La velocità e la quantità di isotopi incorporati espresse in conte per minuto (c.p.m.) da un beta counter riflette l'intensità della risposta ed è direttamente proporzionale al numero delle cellule che rispondono alla stimolazione.

Per stimolare i linfociti sono stati utilizzati mitogeni di origine vegetale. La fitoemmaglutinina (PHA) agisce sui T linfociti anche se non può essere esclusa una partecipazione alle risposte proliferative delle cellule B, e così analogamente la concanavalina (Con A), mentre il PWM (mito-

geno da fitolacca americana) ha un'azione sia sui T sia sui linfociti.

È noto che i tests di stimolazione linfocitaria sono un utile mezzo per valutare l'influenza di una sostanza sulle risposte immunitarie «in vitro». Infatti, un'aumentata risposta dopo stimolazione mitogenica in presenza di una sostanza di cui si vuole saggiare l'effetto immunologico può essere attribuito alla sostanza stessa e precisamente ad: 1) aumento della proporzione relativa delle cellule in grado di rispondere ai mitogeni impiegati; 2) una risposta facilitata a determinate concentrazioni di un certo mitogeno; 3) un ampliamento del fenomeno una volta che sia stato messo in moto; 4) un maggiore coinvolgimento di cellule accessorie quali i macrofagi e/o alcune sottopopolazioni linfocitarie.

Per questo test sono stati impiegati linfociti separati da sangue periferico di soggetti sani (n. 10) di entrambi i sessi, secondo le metodiche precedentemente descritte. Controllata la vitalità, le cellule sono state contaminate e portate alla concentrazione di 1×10^6 cellule/ml in RPMI 1640 addizionato con il 20% di siero AB scomplementato. 100 μl della sospensione cellulare sono stati seminati in piastre microtiter monouso a fondo piatto ed incubati in presenza o meno di PHA (6 γ/ml), Con A (10 γ/ml) o PWM (6 γ/ml), con o senza L-acetil carnitina alle concentrazioni finali di 0,1-0,5-1-5-10-50-100 $\mu\text{g/ml}$, per 72 ore in una atmosfera con il 5% di CO_2 a 37°C . La timidina triziata in quantità di 1 μCi per pozzetto è stata aggiunta 16 ore prima del termine delle colture. Le piastre sono state aspirate mediante apparecchiatura automatica (Harvester Mash II) e la radioattività è stata valutata in un beta counter (Beckman). Ogni risultato è la media di 10 esperienze condotte singolarmente su tre pozzetti (in triplo).

I risultati ottenuti sono riportati graficamente nelle figure 3, 4 e 5. L'aggiunta di L-acetil carnitina a varie concentrazioni nei pozzetti non esplica alcun effetto significativo se le colture non sono state stimulate dai mitogeni. Questo dimostra che la sostanza non ha proprietà mitogeniche. In presenza di PHA la sostanza incrementa la sintesi del DNA alle concentrazioni di 1 $\mu\text{g/ml}$ e 100 $\mu\text{g/ml}$ in maniera statisticamente significativa. Se le colture linfocitarie vengono stimulate con Con A, l'effetto potenziante è massimo alle concentrazioni di 1 e 10 $\mu\text{g/ml}$. Per converso, le cellule incubate con PWM risentono in misura minore dell'effetto della L-acetil carnitina e la percentuale di incremento non supera il 22%. L'effetto immunomodulante della L-acetil carnitina, come si può notare dalle tabelle accluse, è presente a varie concentrazioni con un caratteristico doppio picco. Tale fenomeno è già stato descritto per altri farmaci con proprietà immunomodulanti e può verosimilmente essere attribuibile a una differente sensibilità di differenti sottopopolazioni cellulari a varie concentrazioni della sostanza o anche al fatto che esso possa esplicare azioni diverse a seconda delle concentrazioni impiegate.

I nostri risultati inoltre sembrano confermare i precedenti dati ottenuti con linfociti murini in un sistema analogo «in vitro» nel senso che la L-acetil carnitina agisce sui T linfociti ed anche probabilmente sui linfociti B umani.

(b) Sintesi dell'RNA

Dopo attivazione mitogenica e prima che sia evidenziabile la sintesi del DNA, i linfociti vanno incontro a tutta una serie di modificazioni metaboliche, tra cui la sintesi dell'RNA.

Analogamente con quanto dimostrato per la sintesi del DNA, anche la sintesi dell'RNA dopo stimolazione con mitogeni può essere opportunamente quantizzata mediante l'impiego di un radiotracciante che nella fattispecie è l'uri-

dina marcata con trizio (^3H -uridina). Si è visto che la sintesi di RNA inizia immediatamente dopo la stimolazione mitogenica e che l'aumento di RNA è circa il doppio della quantità iniziale dopo 20 ore dalla stimolazione con PHA. Sia l'RNA informativo (RNA messaggero ed RNA ad alto peso molecolare) che l'RNA strutturale (RNA ribosomiale e transfer) aumentano, ma è l'RNA informativo che avendo un maggior turnover è responsabile della gran parte del nuovo RNA di sintesi.

Lo scopo di questo test è quello di valutare l'effetto della L-acetil carnitina alle concentrazioni finali di 0,1-0,5-1-5-10-50-100 $\mu\text{g/ml}$ sulla sintesi di RNA da parte dei linfociti umani stimolati con il mitogeno PHA.

La metodica per valutare la sintesi dell'RNA da parte dei linfociti umani ottenuti da donatori sani è essenzialmente la medesima che si impiega per la sintesi del DNA e che è stata descritta precedentemente, tranne che le cellule vengono mantenute in coltura per un totale di 12 ore, di cui le ultime 3 in presenza di ^3H -uridina.

I risultati graficamente illustrati in fig. 6 dimostrano come la L-acetil carnitina sia in grado di favorire la sintesi dell'RNA da parte dei linfociti stimolati con PHA. In base alle conoscenze attuali è ipotizzabile che l'incremento sia a carico dell'RNA informativo (RNA messaggero ed RNA ad alto peso molecolare) piuttosto che dell'RNA strutturale. Poiché i picchi di attivazione in presenza di L-acetil carnitina dei linfociti stimolati con PHA e saggiati nel test della sintesi del DNA e nel test della sintesi dell'RNA sono praticamente sovrapponibili, si può affermare che l'immunomodulazione indotta dalla L-acetil carnitina ha luogo attraverso un'incrementata sintesi di RNA, che successivamente si riflette anche sulla sintesi del DNA.

2 - Effetto sui leucociti

È noto che numerosi studi clinici e sperimentali hanno dimostrato che la locomozione dei leucociti è un aspetto importante nei complessi meccanismi di difesa dell'ospite nei confronti degli agenti patogeni esterni. Infatti, un numero adeguato di cellule non è di per sé sufficiente a proteggere l'organismo se esse non si localizzano nei siti infiammatori. In corso di infezioni e/o danno tissutale i leucociti interrompono il loro movimento apparentemente casuale e si dirigono verso il sito della lesione. Il meccanismo che permette a tali cellule di rispondere a gradienti chemiotattici è tuttora poco chiaro. Indubbiamente lo stimolo alla locomozione è un fenomeno multisequenziale che, poiché coinvolge i nucleotidi ciclici, un certo numero di reazioni enzimatiche, Na, K, ATPasi ed induce modificazioni a livello dei microtubuli e dei microfilamenti, può essere modulato a più livelli:

- migrazione spontanea
- migrazione diretta.

I leucociti neutrofili sono stati separati dal sangue periferico di donatori sani a saggiati in un sistema sotto agarosio.

A seguito dell'incubazione delle cellule con varie concentrazioni di L-acetil carnitina (da 3 a 250 $\mu\text{g/ml}$), è possibile riscontrare una stimolazione della locomozione diretta leucocitaria. Anche la migrazione spontanea è influenzata positivamente dalla L-acetil carnitina, maggiormente alle dosi di 6 e 30 $\mu\text{g/ml}$. La L-acetil carnitina è in grado di incrementare non solamente la distanza lineare percorsa dalle cellule verso lo stimolo (nel caso della migrazione diretta) o meno (migrazione spontanea), ma anche il numero di cellule che migrano. I risultati sono illustrati nella tabella e graficamente in fig. 7.

Studi condotti nel ratto hanno dimostrato che la motilità degli spermatozoi lungo il tratto seminale è proporzionale al contenuto di carnitina presente nel liquido seminale sotto forma di acetil carnitina. Tale sostanza, infatti, costituirebbe il substrato più importante per fornire l'energia richiesta per la mobilità degli spermatozoi. Gli studi condotti dalla Richiedente provano che la L-acetil carnitina stimola la locomozione leucocitaria sia questa diretta verso un gradiente chemiotattico o spontanea. Il fenomeno è presente, anche se con una diversa intensità, in un ampio arco di dosaggi che vanno dai 3 ai 250 $\mu\text{g/ml}$ e si manifesta sia con un incremento del numero degli elementi cellulari che migrano sia con un aumento della distanza lineare percorsa dalle cellule. È ipotizzabile che la L-acetil carnitina favorisca il trasporto degli acili attraverso la membrana interna dei mitocondri fornisca un surplus di energia in grado di facilitare la locomozione leucocitaria.

TABELLA

Migrazione diretta e migrazione spontanea di leucociti

L-acetil carnitina	Migraz. diretta (n. cellule)	Migraz. spontanea (n. cellule)
3 $\mu\text{g/ml}$	370 $\pm$ 34	185 $\pm$ 21
6 $\mu\text{g/ml}$	330 $\pm$ 41	180 $\pm$ 29
30 $\mu\text{g/ml}$	450 $\pm$ 46	243 $\pm$ 18
125 $\mu\text{g/ml}$	487 $\pm$ 53	225 $\pm$ 31
250 $\mu\text{g/ml}$	354 $\pm$ 41	260 $\pm$ 29
Controllo	225 $\pm$ 38	164 $\pm$ 19

3 - Effetto sulle cellule trattate con glucocorticoidi

Gli ormoni corticosteroidi esplicano molteplici attività a seconda dei tessuti o dell'organo bersaglio. In alcuni casi essi inducono una sintesi proteica (effetto anabolico), in altri reprimono la trascrizione genica oppure attivano molecole proteiche ad azione inibitoria (effetto antianabolico). A livello del sistema immunitario è stato visto che l'incubazione in vitro di timociti murini in presenza di 10^{-6}M idrocortisone porta ad una rapida lisi cellulare. Per converso le cellule linfoidi dell'uomo sono corticoresistenti, eccetto che in determinate condizioni indotte sperimentalmente o in corso di malattie autoimmuni. Tali dati hanno lasciato supporre che esista una sensibilità delle cellule T attivate nei confronti dei glucocorticosteroidi e che pertanto l'efficacia terapeutica di tali farmaci sia parzialmente spiegabile su tale base. Scopo delle esperienze condotte dalla Richiedente è stato quello di valutare una possibile azione sinergica della L-acetil carnitina con i glucocorticoidi.

I linfociti sono stati isolati dal sangue periferico di donatori sani di entrambi i sessi e posti in coltura in un sistema di colture miste bidirezionali per 6 giorni. Dopo tale periodo le cellule ($10^6/\text{ml}$) sono state trasferite in piastre microtiter a fondo piatto ed incubate con idrocortisone o meno in presenza o meno di L-acetil carnitina alle concentrazioni finali di 0,1-0,5-1-5-10-50-100 $\mu\text{g/ml}$ per 20 ore a 37°C in 5% CO_2 . La sensibilità ai glucocorticosteroidi è stata valutata in base alla lisi cellulare. L'idrocortisone è stato impiegato alle concentrazioni finali di 0,20 e 0,05 mg/ml, dosi ritenute ottimali per tale tipo di esperienze. I risultati ottenuti sono graficamente illustrati in fig. 8.

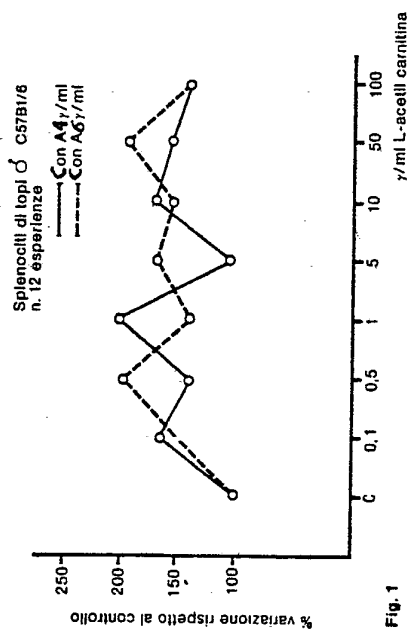


Fig. 1

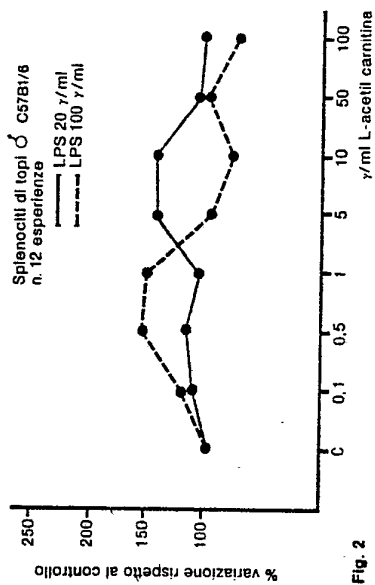


Fig. 2

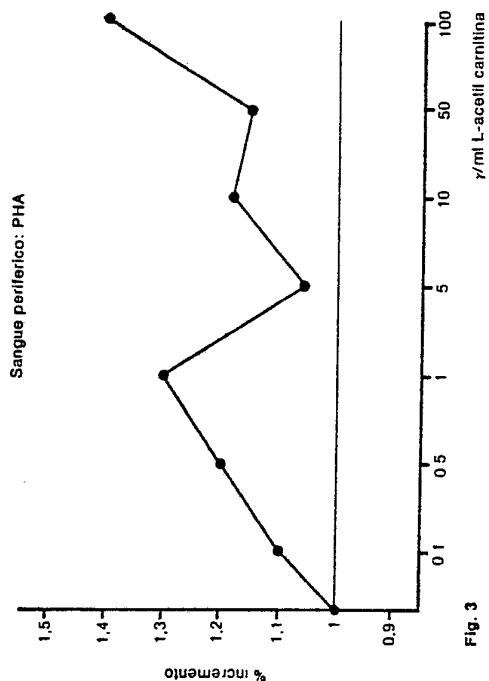


Fig. 3

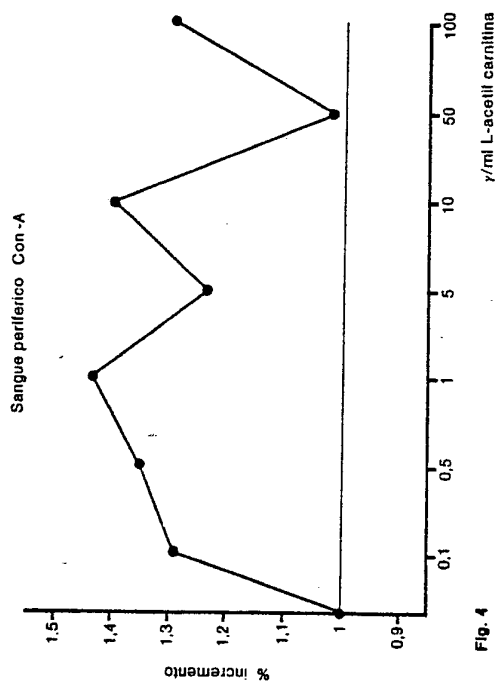


Fig. 4

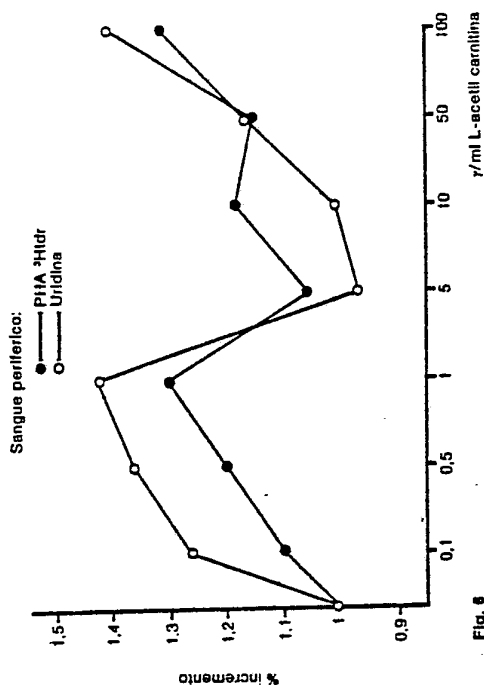


Fig. 8

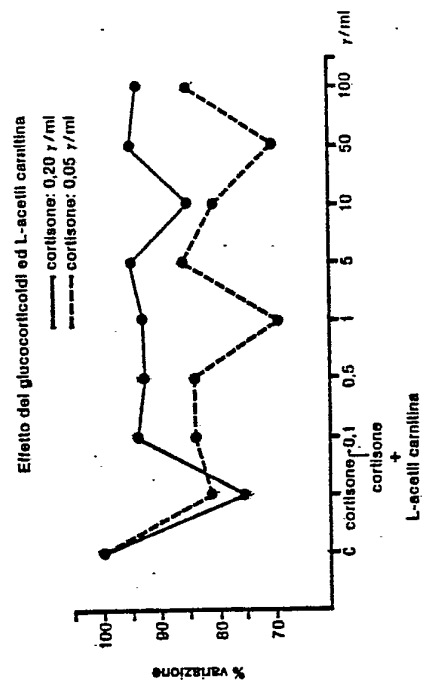


Fig. 9

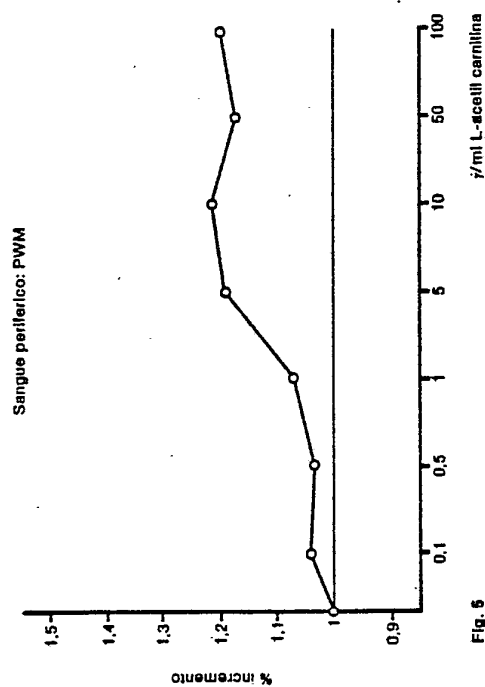


Fig. 5

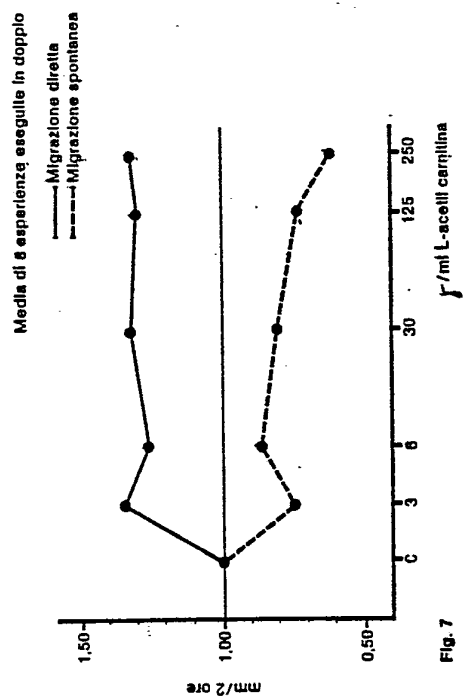


Fig. 7