

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102010901832142A1

Publication Date

20111023

Applicant

ALFA WASSERMANN S.P.A.

Title

USO DEL SULODEXIDE PER LA RIDUZIONE DELLE METALLOPROTEINASI
DI MATRICE.

Descrizione del brevetto per invenzione industriale avente per titolo:

“USO DEL SULODEXIDE PER LA RIDUZIONE DELLE METALLOPROTEINASI DI MATRICE”

a nome di:

1. Alfa Wassermann S.p.A.
con sede ad Alanno (PE)
2. Università degli Studi “Carlo Bo” - Urbino
con sede a Urbino (PU)

* * *

Oggetto dell'invenzione

La presente invenzione descrive l'uso di sulodexide per la preparazione di medicinali in grado di ridurre la concentrazione delle metalloproteinasi di matrice (MMP) ed in particolare di MMP-9, da leucociti e da piastrine. Tali medicinali sono utili per il trattamento di patologie in cui le MMP sono coinvolte, tra cui le complicanze cardiovascolari, vene varicose e insufficienza cronica venosa, CVI.

Stato dell'arte dell'Invenzione

Recenti studi hanno mostrato il coinvolgimento di un gruppo di endopeptidasi zinco-dipendenti, dette metalloproteinasi di matrice (MMP), nelle alterazioni vascolari di molte condizioni patologiche cardiovascolari.

L'ipertensione venosa è alla base di molte patologie legate a disfunzioni della macro e micro circolazione, ad infiltrazioni di leucociti nell'endotelio, deterioramento delle valvole e rimodellamento/ristrutturazione delle pareti venose, le quali portano a reflusso, formazioni di vene varicose e patologie del derma, come descritto da Bergan J. et al. in Ann. Vasc. Surg. 21 (2007), 260-266. Raffetto JD. et al. descrivono in Thromb. Res. 123 (2009), S66-S71 che le modificazioni osservate durante la

9



progressione della patologia venosa cronica possono essere legate ad una alterazione del bilancio ematico tra i livelli delle metalloproteinasi di matrice (MMP) ed i loro inibitori tissutali specifici (TIMP). Sia le MMP che i TIMP, oltre ad intervenire nel rimodellamento della matrice extracellulare, giocano ruoli importanti anche nelle attività di comunicazione cellulare. Elevati livelli delle MMP sono stati trovati in numerosi tipi di patologie e studiate in molti studi clinici, come riportato da Mannello F. et al. in *Curr. Cancer Drug Targets* 5 (2005), 285-298. Tra le varie MMP, in modo particolare, la MMP-9 (Gelatinasi B, EC3.4.24.35 di 92, 130 e 225 Kda) è coinvolta in molte patologie, comprese quelle neoplastiche, al punto da suggerire che la sua presenza come enzima circolante e il suo aumento è correlabile con la progressione in molti tipi di tumore tra cui le neoplasie della mammella, polmone, ovaio, prostata, melanoma come descritto da Rahko E. et al. in *Tumor Biol.*, 30 (5-6) (2009), 574-64. Anche nelle condizioni patologiche vascolari causate dal diabete è chiaramente mostrato il ruolo svolto dalle MMP. Galis Z.S. et al. in *Circ. Res.* 90 (2002), 251-262, Kadoglou N.P. et al. in *Angiology* 56 (2005), 173-189, Derosa G. et al. in *Diabetes Metab.* 33 (2007), 129-134 e Tayejee M.H. et al. in *Diabetes Care* 27 (2004), 2049-2051 descrivono un aumentato livello di MMP circolanti in pazienti diabetici.

Raffetto JD. et al. dimostrano l'importanza delle MMP in *Biochem. Pharmacol.* 75 (2008), 346-359, riportando che l'aumentata degradazione della matrice extracellulare (ECM) delle pareti venose è coinvolta nei primi stadi del rilassamento venoso, formazione di vene varicose, modificazioni a livello dermico e formazione di ulcere venose.

Tra i molti meccanismi patologici legati all'aumentata espressione delle MMP, le interazioni leucocita-endotelio sono importanti e rappresentano un possibile

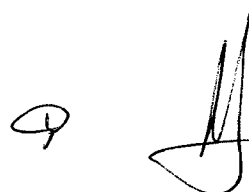


obiettivo per gli interventi farmacologici. Mannello F. et al. descrivono in *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28 (2008), 611-614 che le piastrine e i leucociti contengono elevate quantità di MMP, le quali possono essere rilasciate a livello extracellulare in seguito all'attivazione/degranulazione leucocitaria o durante l'aggregazione piastrinica. Inoltre, MMP-9 è rilasciata dalle piastrine e dai leucociti a seguito di uno stimolo come quello indotto dalla coagulazione. E' noto infatti che la plasmina, attivata nella fase di coagulazione, è a sua volta un attivatore delle MMP.

Tra i molti enzimi proteolitici presenti nei tessuti umani e potenzialmente associati all'invasione tumorale, le MMP hanno dimostrato la capacità di tagliare le componenti della matrice interstiziale e della membrana basale, permettendo alle cellule di penetrare ed infiltrare i tessuti circostanti. I substrati su cui agiscono le MMP sono numerosi e comprendono recettori dei fattori di crescita, molecole di adesione cellulare, chemochine, citochine, ligandi apoptotici e fattori angiogenici.

Questi enzimi agiscono su molti substrati bioattivi essendo coinvolti nelle tappe dello sviluppo neoplastico come crescita del tumore primario, angiogenesi, extravasazione ed intravasazione delle cellule neoplastiche, migrazione, invasione delle cellule metastatiche nell'organo secondario, inizio e mantenimento della crescita tumorale.

Sono stati eseguiti numerosi studi preclinici in modelli tumorali per valutare l'importanza della riduzione delle concentrazioni delle MMP circolanti ed i risultati ottenuti hanno portato allo sviluppo di prodotti sintetici con attività inibitoria come descritto da Ramnath N. et al. in *Curr. Oncol. Rep.* 6 (2004), 96-102. Le classi maggiormente studiate includono inibitori peptido-mimetici e non-peptido-mimetici del collagene, derivati della tetracicline e bifosfonati.



Studi clinici eseguiti con i composti a disposizione hanno mostrato che trattamenti prolungati causano dolori muscolo-scheletrici e infiammazione. Sebbene questi eventi si siano dimostrati reversibili ed i pazienti siano stati in grado di riprendere il trattamento dopo un breve periodo di sospensione, gli effetti collaterali inaspettati hanno limitato i dosaggi di somministrazione.

Inoltre, quando gli studi clinici furono estesi ad un numero maggiore di pazienti per il trattamento di malattie neoplastiche, oltre a seri problemi tossicologici dovuti agli effetti citostatici, non è stato osservato alcun significativo beneficio terapeutico come descritto da Mannello F. et al. in *Curr. Cancer Drug Targets* 5 (2005), 285-298.

Alcuni tra gli inibitori di MMP studiati in fase clinica sono Batimastat, Marimastat, Prinomastat, BAY 12-9566, CGS27023A e derivati delle tetracicline.

Il Batimastat, BB-94 (WO 90057191), è un derivato dell'acido idrossamico, che mima la struttura peptidica dei substrati naturali. Il Batimastat è un potente inibitore delle metalloproteinasi ed è stato il primo inibitore delle MMP ad essere utilizzato in studi clinici, ma ha mostrato una bassa selettività e a causa della sua bassa solubilità e basso assorbimento. Inoltre, ha mostrato una bassa accettazione da parte del paziente essendo somministrabile solo per via iniettiva nello spazio pleurico o addominale. Gli studi clinici in fase III sono stati sospesi quasi immediatamente a causa di severi effetti avversi, quali reazioni tissutali locali, nausea e dolori addominali come riportato da Tu G. et al. in *Curr. Med. Chem.* 15 (2008), 1388-1395.

Il Marimastat, BB-2516 (WO 9402447), è un derivato dell'acido idrossamico con struttura simile al Batimastat, ma con una maggiore solubilità e quindi più facile assorbimento mediante somministrazioni orali. Il Marimastat come il Batimastat ha



una bassa specificità. Si è dimostrato tossico in circa il 30% dei pazienti trattati che hanno riscontrato dolore muscolo-scheletrico e rigidità che iniziava nelle piccole giunture delle mani e poi aumentava verso le braccia e le spalle, soprattutto nei pressi dei punti di inserzione tendinea, fibrosi e necrosi nei tessuti periarticolari della caviglia e del ginocchio e disturbi gastrici con perdita di peso come descritto da Vihinen et al. in Int. J. Cancer 99 (2002), 157-166.

Il Prinomastat, AG3340 (WO 90720824) è un derivato dell'acido idrossamico selettivo verso alcune MMP ritenute coinvolte nell'invasione tumorale e nelle metastasi. Nel corso però di studi clinici sono comparsi effetti negativi alle giunture delle spalle, ginocchia e mani, tali da richiedere l'immediata sospensione del trattamento, come descritto da Ramnath N. et al. in Curr. Oncol. Rep. 6 (2004), 96-102.

Il BAY 12-9566, (US 4,705,798) è un derivato dell'acido butanoico e in molti studi clinici ha mostrato tossicità, rappresentata da trombocitopenia, anemia, aumento degli enzimi epatici e della bilirubina accompagnata da nausea, stanchezza e mal di testa come descritto da Nelson A. et al. J. Clin. Oncol. 18 (2000), 1135-1149.

Il CGS27023A, (US 5,455,258) ha riportato effetti tossici con una vasta irritazione cutanea, artralgia e mialgia.

Anche i derivati delle tetracicline in fase clinica hanno mostrato severi eventi avversi, quali stanchezza, confusione mentale, nausea, vomito, fototossicità cutanea ed aumento degli enzimi pancreatici, che hanno limitato la dose somministrabile, come descritto da Hidalgo M. et al. in J. Natl. Cancer Inst. 93 (2001), 178-193.

La zimografia è tra i metodi correntemente usati per lo studio delle MMP e TIMP nei liquidi biologici. In questa tecnica le proteine sono separate mediante

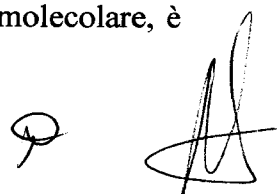


elettroforesi in condizioni denaturanti in presenza di sodio dodecil solfato (SDS), non riducenti. La gelatina-zimografia è usata principalmente per la determinazione delle gelatinasi e questa tecnica è estremamente sensibile riuscendo ad evidenziare livelli di MMP-2 e MMP-9 a concentrazioni di pochi picogrammi.

La tecnica si basa su corse elettroforetiche in condizioni denaturanti-non riducenti dei campioni da analizzare su gel ottenuti con poliacrilammide copolimerizzato con uno specifico substrato, l'SDS denatura le MMP che diventano inattive, dopo la migrazione elettroforetica il gel viene incubato in detergente non ionico per eliminare l'SDS e successivamente il gel è incubato in appropriato tampone che consente alle MMP di recuperare struttura e funzioni. Durante l'incubazione, le gelatinasi attivate digeriscono la gelatina che è convertita in peptidi a basso peso molecolare che vengono eliminati durante i lavaggi come descritto da Mannello F. et al. in Clin. Chem. 49 (2003), 339-34.

I gel sono poi posti in una soluzione colorante, ad esempio costituita da Coomassie Brilliant blue R-250 ad una concentrazione allo 0,2%, e poi lavati in soluzioni costituite da alcol metilico o etilico e acido acetico. A seguito di queste operazioni risulta che solo la gelatina non degradata si colora in modo permanente, pertanto l'attività enzimatica si evidenzia dalla presenza di zone non colorate, che appaiono come bande bianche, contro lo sfondo blu del substrato dovuto alla gelatina non degradata. L'attività enzimatica risulta così proporzionale all'estensione delle bande bianche che possono essere determinate con un densitometro con analizzatore di immagini.

Dai zimogrammi si hanno informazioni specifiche e distinte su MMP-2 e MMP-9, infatti, poiché la mobilità elettroforetica dipende dalla massa molecolare, è

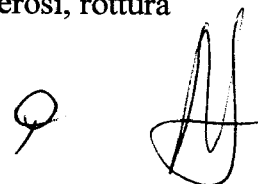


possibile distinguere le varie componenti mediante il punto di migrazione in confronto ad opportuni standard di peso molecolare, corrispondenti a pro-MMP-2 a 72 KDa, e complessi di proMMP-9 e MMP-9 a 92, 130 e 225 KDa.

Mannello F. et al. descrivono in Clin. Biochem. 41 (2008), 1466-73 con esperimenti in gelatina zimografia l'effetto dell'aggiunta di litio eparina ad alto peso molecolare in campioni di prelievi di sangue periferico rilasciato sulla MMP-9 e sul suo inibitore TIMP-1, a seguito dei processi di coagulazione e fibrinolisi che avvengono nel campione stesso. Lo scopo di questa pubblicazione era di descrivere l'effetto di una eparina ad alto peso molecolare nell'espressione di MMP nel sangue, di standardizzare le procedure di manipolazione dei campioni di sangue destinati alla misura di MMP, non facendo alcuna menzione e suggerimento ad un nuovo uso farmacologico dell'eparina. Inoltre, poiché non è riportato a quali concentrazioni la litio eparina mostrava l'effetto osservato, non è dato conoscere se le concentrazioni di litio eparina alle quali l'effetto era stato osservato, potessero, qualora raggiunte in vivo, essere terapeuticamente utili, essendo ben noto l'alto rischio di emorragie legato all'uso di eparine ad alto peso molecolare.

Infine, essendo noto che le eparine possono essere somministrate solo per via iniettiva, risulta da Chim. Biochem. 41 (2008), 1466-73 che qualsiasi uso in vivo di eparina fatto per eventualmente alterare le concentrazioni plasmatiche di MMP, doveva necessariamente prevedere solo una somministrazione iniettiva.

C'era quindi la necessità di trovare un farmaco, che fosse efficace nel ridurre la concentrazione delle MMP circolanti nel sangue per essere utilizzato in tutte le patologie in cui queste svolgono un ruolo importante, quali ad esempio quelle derivanti da diabete, insufficienza venosa cronica, vene varicose, aterosclerosi, rottura



cardiaca dopo infarto del miocardio, aneurisma dell'aorta addominale. Inoltre c'era la necessità di avere a disposizione un farmaco che fosse privo di eventi avversi o effetti tossici alle dosi terapeuticamente efficaci, fosse meglio accettato dai pazienti rispetto ai farmaci a disposizione e fosse somministrabile per via orale, intramuscolare ed endovena.

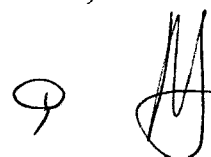
Il sulodexide è una miscela naturale di glicosaminoglicani naturali, GAGs, estratto da mucosa intestinale di mammifero, come descritto in US 3,936,351, e costituita principalmente da una componente di eparina, detta "fast -moving", con un peso molecolare medio di 7 kDa e da una componente di dermatan solfato (DS) di peso molecolare medio di 25 kDa. Il sulodexide deve essere inteso come un unico ingrediente farmaceutico distinto da altri glicosaminoglicani comprendente circa l'80% in peso di eparina e il 20% in peso di DS.

È noto che il sulodexide mostra un'alta affinità per l'antitrombina III e per il cofattore II dell'eparina, inibisce il fattore Xa e la trombina, attiva il plasminogeno tissutale e riduce i livelli di fibrinogeno come descritto da Ofosu F.A. in Semin. Thromb. Hemost. 24 (1998), 127-38 e da Ceriello A. et al. in Diab. Nutr. Metab., 6 (1993), 1-4.

Poiché è noto che l'attivazione della plasmina, derivante dal plasminogeno, è uno dei meccanismi di attivazione locale delle MMP, le proprietà conosciute del sulodexide portavano alla conclusione che questo composto avrebbe dovuto aumentare la concentrazione delle MMP circolanti.

Descrizione dell'invenzione

Si è invece sorprendentemente trovato, ed è oggetto della presente invenzione, che la somministrazione di sulodexide porta ad una diminuzione delle MMP, in

Handwritten signature and initials in black ink, located at the bottom right of the page.

particolare della gelatinasi inducibile MMP-9 con conseguente diminuzione della concentrazione delle MMP circolanti nel sangue.

Il sulodexide è già presente in farmaci commercialmente disponibili, quali ad esempio Vessel 2F®, ed è somministrato per via orale, intramuscolare o endovenosa nel trattamento di patologie vascolari con rischio trombotico come disturbi arteriosi periferici, sindromi post-flebitiche e nel trattamento di albuminuria in nefropatie come descritto da Harenberg J. in Med. Res. Rev. 18 (1998), 1-20 e Tamarin R. in Medical Praxis 8 (1997), 1.

Il sulodexide è qui inteso comprendere i suoi sali farmaceuticamente accettabili, solvatati, idratati e clatrati.

La presente invenzione descrive l'uso del sulodexide come inibitore del rilascio di MMP, in particolare della classe delle gelatinasi. Un aspetto importante della presente invenzione è la specificità di azione del sulodexide verso la MMP-9 detta anche gelatinasi B, coinvolta nel rilassamento venoso, nella formazione delle vene varicose, nell'insufficienza venosa cronica e nelle ulcere degli arti inferiori. Il sulodexide può quindi essere utilizzato come farmaco in tutte le patologie correlate ad un aumento della MMP-9 inducibile senza influenzare la MMP-2 costitutiva. Un vantaggio del sulodexide è di poter essere somministrato sia per via orale sia iniettiva, intramuscolare ed endovenosa. Altro vantaggio di utilizzare il sulodexide è la possibilità di somministrare alti dosaggi, essendo il composto ben tollerato anche a 1000 mg/giorno nel caso di somministrazioni orali, come descritto in EP 1292315.

La presente invenzione pertanto si riferisce ad un nuovo uso del sulodexide per la riduzione della concentrazione delle MMP, e in particolare della MMP-9 (Gelatinasi B, EC3.4.24.35 di 92, 130 e 225 Kda).



La presente invenzione descrive quantità di sulodexide sufficienti a produrre una riduzione immediata e duratura del rilascio della MMP-9 nel sangue a concentrazioni di sulodexide terapeuticamente accettabili, corrispondenti a quantità in un intervallo da circa 12 µg/ml a 48 µg/ml. Queste concentrazioni possono essere raggiunte nel sangue mediante iniezioni endovenose. In alternativa si possono somministrare per iniezione intramuscolare o per via orale quantità di sulodexide considerate terapeuticamente equivalenti a quelle ottenibili per via endovenosa in altre patologie, tipicamente da 20 mg a 1000 mg/giorno. L'effetto del sulodexide alle concentrazioni descritte è stato evidenziato mediante esperimenti ex-vivo su campioni di sangue di soggetti umani.

In maggior dettaglio, sono stati raccolti campioni di sangue da cinquanta volontari sani di entrambi i sessi, la cui età media era di 37 anni. I campioni tal quali, e trattati per ottenere i corrispondenti campioni di plasma e di siero, sono stati studiati in presenza di concentrazioni variabili di sulodexide in confronto con campioni privi dell'aggiunta.

L'Esempio 1 descrive l'effetto dell'aggiunta di quantità crescenti di sulodexide in un intervallo di concentrazioni finali da circa 12 µg/ml a 48 µg/ml in campioni di sangue intero. Dopo centrifugazione i supernatanti dei campioni così preparati sono stati opportunamente aliquotati ed analizzati in gelatina-zimografia.

I risultati delle gelatina-zimografie sono mostrati in Tabella 1, dove è stato assegnato il valore di 100% all'area di degradazione di MMP, media dei valori ottenuti nei soggetti, indotta nei campioni di siero utilizzati come controllo, privi dell'aggiunta di sulodexide ed è stata riportata il valore medio proporzionale dell'area dei campioni con sulodexide. E' stato osservato che l'area della banda relativa a

P A

MMP-9 si riduce a circa il 50% con una quantità di sulodexide corrispondente ad una concentrazione pari a 12 µg/ml ed a meno di un decimo con una quantità di sulodexide corrispondente ad una concentrazione di 48 µg/ml.

Le bande corrispondenti a MMP-2 invece rimangono inalterate anche in presenza di sulodexide.

Risulta pertanto che l'aggiunta di sulodexide a campioni di sangue intero in quantità corrispondenti a concentrazioni finali da circa 12 µg/ml a circa 48 µg/ml riduce in modo proporzionale la concentrazione di MMP circolanti, in particolare di MMP-9, mentre lascia inalterata la concentrazione di MMP-2.

Questi dati sono stati confermati anche dall'analisi quantitativa in Elisa con il kit Biotrak® MMPS Amersham che rinosce le proMMP delle gelatinasi con un limite di rivelazione (LOD) corrispondente a 0,37- 0,25 µg/ml.

La dimostrazione che il sulodexide agisce sulla riduzione della concentrazione delle MMP da parte dei leucociti e piastrine è fornita nell'Esempio 2, dove il sulodexide è aggiunto ai campioni dopo che il corrispondente plasma è stato preparato mediante l'eliminazione per centrifugazione della componente cellulare.

Nell'Esempio 2 i campioni di sangue raccolti da 50 volontari sani di età media di 37 anni sono stati trattati con una quantità compresa tra 1 e il 10% in volume con una soluzione 0,13 molare di sodio citrato e poi centrifugati. Ai supernatanti dei campioni sono state poi aggiunte quantità crescenti di sulodexide fino ad ottenere concentrazioni finali nell'intervallo compreso tra circa 12 µg/ml e circa 48 µg/ml. I campioni sono stati poi analizzati in zimografia nelle stesse condizioni descritte nell'Esempio 1.



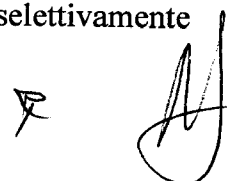
E' stato assegnato un valore di 100% all'area della banda del campione di siero privo dell'aggiunta di sulodexide, media dei valori ottenuti nei soggetti sani, e determinato la diminuzione percentuale delle aree in funzione dell'aggiunta crescente di sulodexide ai campioni di siero. Si osserva che le bande relative a MMP-9 non subiscono variazione con l'aggiunta di sulodexide, come riportato in Tabella 2 in Esempio 2, a dimostrazione che il sulodexide non influenza la quantità di MMP nel campione di plasma, essendo stati rimossi i leucociti e le piastrine prima dell'aggiunta di sulodexide.

La prova che il sulodexide non ha un'azione diretta sulla riduzione delle MMP è data dall'Esempio 3, dove quantità crescenti di sulodexide sono aggiunte a campioni di siero, in cui il rilascio di MMP è già avvenuto nella fase di preparazione del siero. In tali condizioni non si osserva alcun effetto dose dipendente del sulodexide sulle quantità di MMP presenti.

In particolare nell'Esempio 3, quantità crescenti di sulodexide da circa 12 µg/ml e circa 48 µg/ml sono stati aggiunti a campioni di siero ottenuti dopo centrifugazione dei campioni di sangue raccolti da 50 volontari sani di età media di 37 anni. I campioni così ottenuti sono poi analizzati in zimografia come descritto in Esempio 1.

La percentuale delle aree relative alle bande gelatinolitiche di MMP-2 e MMP-9 risultanti è riportata in Tabella 3 in cui non si osserva alcuna diminuzione rispetto alle bande dei campioni prive dell'aggiunta di sulodexide.

I risultati dell'Esempio 1 dimostrano che il sulodexide diminuisce la quantità di MMP-9 presenti nel sangue, mediante un'azione di riduzione della concentrazione delle MMP. L'esperimento dimostra inoltre che il sulodexide agisce selettivamente

Handwritten signature and initials in the bottom right corner of the page.

sulla MMP-9, identificando un suo possibile uso terapeutico per il trattamento di tutte le patologie dove è riconosciuto che la presenza e l'azione di MMP-9 è correlata con il decorso della patologia.

Al fine di ottenere in vivo il raggiungimento delle concentrazioni efficaci per la riduzione della concentrazione delle MMP, in particolare di MMP-9, il sulodexide può essere somministrato per via endovenosa, iniettando da una a quattro fiale di una soluzione contenente circa 60 mg/ml di sulodexide. In alternativa, il sulodexide può essere somministrato a dosaggi terapeuticamente equivalenti per via intramuscolare o per via orale. In quest'ultimo caso si possono somministrare fino a circa 1000 mg/giorno senza apprezzabili effetti tossici, come descritto in EP 1292315.

La riduzione delle MMP circolanti e soprattutto l'azione selettiva nei confronti di MMP-9 da parte del sulodexide è un effetto non noto e del tutto inaspettato, particolarmente utile in tutte le patologie in cui la MMP-9 è coinvolta, come le infezioni venose croniche, le vene varicose, le ulcere venose, lo sviluppo e la progressione tumorale, intesa come crescita del tumore primario, angiogenesi, extravasazione ed intravasazione delle cellule neoplastiche.

Gli esperimenti riportati e non limitanti dimostrano un nuovo uso del sulodexide nella riduzione del rilascio delle MMP, ed in particolare delle MMP-9 rilasciate dai leucociti e dalle piastrine nel processo di coagulazione. I risultati ex-vivo sono completamente trasferibili ad un uso del sulodexide in vivo a concentrazioni non tossiche e ben tollerate fino a 1000 mg/giorno. Inoltre la somministrazione del sulodexide può avvenire per via iniettiva, intramuscolare e/o endovenosa o per via orale.



L'uso del sulodexide rispetto ai composti studiati e presenti nello stato dell'arte risolve molti problemi tra cui la selettività specifica per le MMP-9, l'accettabilità e la facilità di somministrazione.

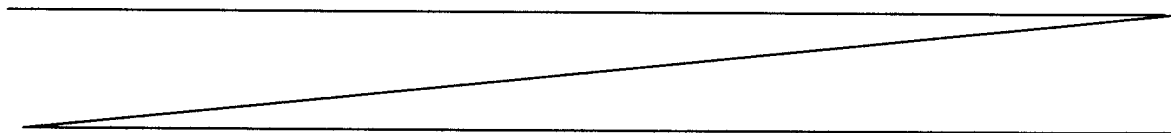
Questa invenzione si riferisce pertanto ad un nuovo uso terapeutico diverso da quello per cui il sulodexide è commercializzato nella prevenzione delle patologie vascolari. Il sulodexide può essere presente in una composizione che può comprendere eccipienti o diluenti farmaceuticamente accettabili in formulazioni utili per una somministrazione orale, intramuscolare o venosa e che può essere usata nella presente invenzione.

Nella pratica farmaceutica il sulodexide può essere combinato con eccipienti farmaceuticamente accettabili utilizzando le tecniche convenzionali note all'esperto nell'arte.

Il sulodexide della presente invenzione può essere in una composizione farmaceutica consistente, ma non limitatamente, in compresse, capsule, granulati, sospensioni, soluzioni e aerosol.

Le composizioni possono essere somministrate in singoli o multipli dosaggi per una o più volte al giorno o in formulazioni a rilascio controllato.

L'invenzione è illustrata in maggior dettaglio nei seguenti esempi.



9

A handwritten signature, possibly reading 'M. M.', written in dark ink.

Esempio 1

Effetto del sulodexide sulle quantità di MMP gelatinasiche circolanti nel siero.

Campioni di sangue, raccolti da 50 volontari sani, 25 donne e 25 uomini di età compresa tra i 25 e 58 anni, con età media di 37 anni, sono posti in provette alle quali sono aggiunte quantità crescenti di sulodexide fino ad ottenere concentrazioni finali corrispondenti a 0, 12, 24 e 48 µg/ml, in cui i campioni privi dell'aggiunta di sulodexide, sono usati come controllo.

Tutti i campioni sono stati centrifugati a 1500 g per 10 minuti a 4°C e una quantità dei supernatanti dei campioni di siero (S) corrispondente a 150 µg di proteine totali, determinate con il metodo colorimetrico Bradford, è analizzata mediante zimografia in gelatina. I campioni sono caricati nel gel in zimografia e la separazione elettroforetica è confrontata con gli standard di MMP preparati diluendo sangue capillare da volontari sani diluito con 15 volumi di tampone Laemmli U.K. (Nature, 227 (1970), 680-685) in condizioni non riducenti.

Gli zimogrammi in gelatina sono preparati con poliacrilammide al 7,5% (p/v) copolimerizzato con 0,2% (p/v) di gelatina isolata da cute suina (Tipo A 90 Bloom, Sigma).

La corsa elettroforetica è stata eseguita a 35 mA per 75 minuti e i gel sono poi lavati con una soluzione di Triton X-100 ad una concentrazione di 2,5% (v/v) e incubati per 24 ore a 37 °C in una soluzione costituita da 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 5 mM CaCl₂, 100 mM NaCl, 1 mM ZnCl₂, 0,3 mM NaN₃, 0,02% (p/v) di detergente Brij®-35 e 0,25%(v/v) di Triton X-100. La rivelazione delle attività gelatinasiche in situ avviene mediante colorazione dei gel con Coomassie Brilliant blue R-250 alla



concentrazione di 0,2% (p/v), e successiva decolorazione con una soluzione costituita da metanolo-acido acetico in un rapporto volumetrico pari a 80/20.

Si osserva che il sulodexide agisce solo sulle bande relative alle MMP-9, mantenendo inalterata la banda di MMP-2 e la determinazione delle aree avviene con un densitometro con analizzatore di immagine. Le aree percentuali di digestione gelatinolitica relative a MMP-9 nei campioni di siero con e senza sulodexide sono riportate in Tabella 1.

Tabella 1

**Gelatina-Zimografia: Concentrazioni di MMP-9 sieriche
dopo trattamento con sulodexide.**

Concentrazioni di sulodexide ($\mu\text{g/ml}$)	Area % MMP-9
0	100 $\pm$ 7
12	57 $\pm$ 4
24	41 $\pm$ 5
48	7 $\pm$ 1

Le concentrazioni delle MMP-9 nei campioni sono state determinate anche con il saggio Elisa per la misura dell'attività enzimatica delle metalloproteinasi, utilizzando il saggio Biotrak MMPS, Amersham, che riconosce le forme proMMP delle gelatinasi con un limite di rivelazione di 0,37 – 0,25 $\mu\text{g/L}$ per MMP-2 e MMP-9 e i risultati ottenuti sono riportati in Tabella 2. Non sono evidenti differenze statisticamente significative tra le attività gelatinolitiche delle zimografie e quelle dei saggi Elisa.



Tabella 2

**Saggio Elisa: Concentrazioni di MMP sieriche
dopo trattamento con sulodexide.**

Concentrazioni di sulodexide ($\mu\text{g/ml}$)	Concentrazione % MMP
0	100 $\pm$ 4
12	61 $\pm$ 6
24	43 $\pm$ 8
48	6 $\pm$ 3

Esempio 2

Effetto del sulodexide sulle quantità di MMP gelatinasiche circolanti nel plasma.

Campioni di sangue sono stati raccolti da 50 volontari sani, 25 donne e 25 uomini di età compresa tra i 25 e 58 anni, con età media di 37 anni, ed un volume corrispondente a 1 ml è stato aggiunto a 38 μl di una soluzione di sodio citrato 0,13 M e centrifugati a 1500 g per 10 minuti a 4°C.

Ai campioni sono state poi aggiunte quantità crescenti di sulodexide fino alle concentrazioni finali di 0, 12, 24 e 48 $\mu\text{g/ml}$ rispettivamente.

Una quantità corrispondente a 150 μg di proteine totali dei supernatanti dei campioni di plasma (P) ottenuti dalla centrifugazione, misurate con il metodo colorimetrico Bradford, è analizzata mediante zimografia in gelatina. Nel gel sono caricati gli standard di gelatinasi preparati diluendo sangue capillare da volontari sani



diluito con 15 volumi di tampone preparato secondo Laemmli in condizioni non riducenti.

Gli zimogrammi in gelatina e la corsa elettroforetica sono eseguiti come descritto in Esempio 1.

Le aree delle bande dei zimogrammi sono determinate utilizzando un densitometro con analizzatore di immagine calcolando la diminuzione dell'area delle bande relative alle metalloproteinasi rispetto a quelle del plasma non addizionato di sulodexide. Le aree percentuali di digestione gelatinolitica relative alle MMP nei campioni di plasma con e senza sulodexide sono riportate Tabella 3.

Tabella 3

**Gelatina-zimografia: Concentrazioni di MMP-9 plasmatiche
dopo trattamento con sulodexide.**

Concentrazioni di sulodexide ($\mu\text{g/ml}$)	Area % MMP-9
0	100 $\pm$ 5
12	98 $\pm$ 4
24	101 $\pm$ 4
48	99 $\pm$ 4

L'analisi densitometrica delle MMP-9 dello zimogramma è stata confermata dall'analisi quantitativa effettuata con saggio Elisa i cui dati, riportati in Tabella 4, non mostrano differenze statisticamente significative quando confrontati con le analisi densitometriche dei gel in zimografia.

9 

Tabella 4

**Saggio Elisa: Concentrazioni di MMP plasmatiche
dopo trattamento con sulodexide.**

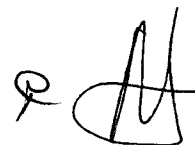
Concentrazioni di sulodexide ($\mu\text{g/ml}$)	Concentrazione % MMP
0	100 ± 7
12	99 ± 5
24	100 ± 3
48	98 ± 4

Esempio 3

**Effetto del sulodexide, aggiunto dopo la formazione del siero, sulle
quantità di MMP gelatinasiche circolanti nel siero.**

Campioni di sangue raccolti da 50 volontari sani, 25 donne e 25 uomini di età compresa tra i 25 e 58 anni, con età media di 37 anni, sono posti in provette e centrifugati a 1500 g per 10 minuti a 4°C.

A 150 μg di proteine totali di siero, misurate con il metodo colorimetrico Bradford, sono aggiunte quantità di sulodexide per ottenere rispettivamente le concentrazioni finali nei campioni di 0, 12, 24 e 48 $\mu\text{g/ml}$ e analizzati mediante zimografia in gelatina in confronto con gli standard di gelatinasi preparati diluendo sangue capillare da volontari sani diluito con 15 volumi di tampone preparato secondo Laemli in condizioni non riducenti.



Gli zimogrammi in gelatina, la corsa elettroforetica e la colorazione/decolorazione sono stati eseguiti come in Esempio 1.

Le aree delle bande dei zimogrammi sono determinate utilizzando un densitometro con analizzatore di immagine ed è stata calcolata la diminuzione dell'area delle bande relative alle metalloproteinasi rispetto a quelle del siero non addizionato di sulodexide. Le aree percentuali di digestione gelatinolitica relative a MMP-9 nei campioni di siero con e senza sulodexide sono riportati Tabella 5.

Tabella 5

**Gelatina-zimografia: Concentrazioni di MMP-9 sieriche in
presenza di concentrazioni di crescenti di sulodexide.**

Concentrazioni di sulodexide ($\mu\text{g/ml}$)	Area (%) MMP-9
0	100 $\pm$ 6
12	98 $\pm$ 4
24	101 $\pm$ 3
48	99 $\pm$ 4



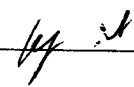
I dati ottenuti in zimografia non mostrano differenze statisticamente significative rispetto a quelli ottenuti mediante Elisa con il saggio Biotrak Amersham e riportati in Tabella 6.

Tabella 6

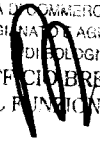
**Saggio Elisa: Concentrazioni di MMP plasmatiche
a differenti concentrazioni di sulodexide.**

Concentrazioni di sulodexide ($\mu\text{g/ml}$)	Concentrazione % MMP-9
0	100 $\pm$ 5
12	99 $\pm$ 2
24	101 $\pm$ 4
48	97 $\pm$ 6

Alfa Wassermann S.p.A. 
Ing. Andrea Golinelli (*Consigliere Delegato*)

Università degli Studi "Carlo Bo"- Urbino 
Prof. Stefano Pivato (*Magnifico Rettore*)



CAMERA DI COMMERCIO INDUSTRIA
ARTIGIANATO E AGRICOLTURA
DI BOLOGNA
UFFICIO BREVETTI
IL FUNZIONARIO 



RIVENDICAZIONI

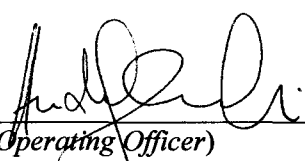
1. Uso del sulodexide per la preparazione di una composizione farmaceutica per la diminuzione della concentrazione delle metalloproteinasi di matrice, MMP, nel sangue.
2. L'uso del sulodexide in accordo alla rivendicazione 1 in cui le MMP sono le MMP-9 circolante nel sangue.
3. L'uso del sulodexide in accordo alle rivendicazioni 1 e 2 nella prevenzione o trattamento delle malattie con aumentata concentrazione delle metalloproteinasi quali malattie vascolari e insufficienze venose croniche, sviluppo e progressione tumorale, della crescita del tumore primario, angiogenesi, extravasione ed intravasione delle cellule neoplastiche.
4. L'uso del sulodexide in accordo alla rivendicazione 3 in cui le malattie vascolari sono selezionate tra vene varicose, aterosclerosi umana, rottura cardiaca dopo infarto del miocardio, aneurisma dell'aorta addominale.
5. L'uso del sulodexide in accordo alle precedenti rivendicazioni in cui il medicamento è somministrato per via orale, intramuscolare, parenterale in una quantità compresa tra 10 a 1000 mg/giorno.
6. L'uso del sulodexide in accordo alla rivendicazione 5 in cui detto medicamento è in forma di compresse, capsule, dispersione, sospensione o soluzione.

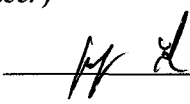
Alfa Wassermann S.p.A.
Ing. Andrea Golinelli (*Consigliere Delegato*)

Università degli Studi "Carlo Bo"- Urbino
Prof. Stefano Pivato (*Magnifico Rettore*)

CLAIMS

1. Use of sulodexide for the preparation of pharmaceutical composition for the reduction of matrix metalloproteinase concentration, MMP, in the blood.
2. The use of claim 1 wherein the matrix metalloproteinase are the MMP-9 in the blood.
3. The use of sulodexide, according to claim 1 and 2 for the prevention or treatment of the diseases characterized in an increasing of the metalloproteinase, as vascular disease, chronic venous insufficiency (CVI), increase and progression of the tumor, growing in the primary tumor, angiogenesis, extravasation and intravasation of the neoplastic cells.
4. The use of sulodexide according to claim 3 wherein the vascular disease are selected in a group of varicose veins, human atherosclerosis, cardiac break after myocardium infarct, abdominal aortic aneurysm.
5. The use of sulodexide according to the preview claims wherein the sulodexide is administered by oral route, intramuscular, parenteral in a quantity between from 10 to 1000 mg/day.
6. The use of sulodexide according to claim 5, wherein the pharmaceutical form is in tablets, capsules, dispersion, suspension or solution.

Alfa Wassermann S.p.A. 
Ing. Andrea Golinelli (*Chief Operating Officer*)

Università degli Studi "Carlo Bo"- Urbino 
Prof. Stefano Pivato (*the Rector*)

