

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102012902106830A1

Publication Date

20140603

Applicant

SBRACIA MARCO

Title

GM-CSF PER L'UTILIZZO NELLA PREVENZIONE DELL'ABORTO
SPONTANEO E DEL FALLIMENTO DELL'IMPIANTO DELL'EMBRIONE

DESCRIZIONECampo di applicazione

La presente invenzione si riferisce all'utilizzo del fattore stimolante le colonie granulocitarie-macrofagiche o GM-CSF ("Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor") nella prevenzione dell'aborto spontaneo e del fallimento dell'impianto dell'embrione.

Arte nota

Il Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF) è una proteina secreta da diversi stipiti cellulari tra i quali macrofagi, linfociti T, mastociti, cellule NK, cellule endoteliali e fibroblasti.

Il GM-CSF è una citochina che svolge un ruolo di fattore di crescita sulle cellule bianche del sangue. Il GM-CSF stimola la crescita delle cellule staminali e la loro differenziazione in granulociti (neutrofili, eosinofili e basofili) ed in monociti. I monociti fuoriusciti dal sistema circolatorio e penetrati nei tessuti si sviluppano e maturano in macrofagi e cellule dendritiche. Pertanto il GM-CSF è un componente del sistema immuno-infiammatorio, che è un sistema a cascata che, tramite l'attivazione di un piccolo numero di macrofagi, conduce rapidamente ad un sostanziale aumento del numero di queste cellule attivate, un processo cruciale nella lotta contro le infezioni. La forma attiva di questa proteina è presente extracellularmente come omodimero. Nella sua forma biologica matura, il Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor umano è una proteina

glicosilata.

Il gene del GM-CSF è stato localizzato nell'uomo in un cluster di geni correlati sul braccio lungo del cromosoma 5 nella regione 5q31, riconosciuta per essere associata con la delezione cromosomica 5 determinante la sindrome 5q e la leucemia mielogenica acuta. I geni di questo cluster codificano anche per le interleuchine 4, 5 e 13.

Questo fattore di crescita svolge la sua funzione legandosi ad un suo specifico recettore presente sulla superficie delle cellule bersaglio, il Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor receptor, conosciuto anche come CD116 (Cluster of Differentiation 116). Il recettore per il GM-CSF si trova sulle cellule della serie bianca del sangue, promuovendone la crescita, così come sulle cellule staminali, sui mieloblasti e sui neutrofilii, ma non sulle cellule eritroidi e sui megacariociti. Inoltre questo recettore è associato con la disfunzione del metabolismo del surfattante di tipo 4.

Questo recettore è un eterodimero composto di almeno due differenti subunità, catena alfa e catena beta, quest'ultima presente anche nel recettore dell'IL-3 e IL-5. La sub-unità alfa contiene un sito specifico per il legame con il GM-CSF, mentre la sub-unità beta è coinvolta nella trasduzione del segnale. L'associazione delle unità alfa e beta determina l'attivazione funzionale del recettore. Al momento della dimerizzazione delle due sub-unità, alfa e beta, quest'ultima viene fosforilata su un residuo di tirosina da una chinasi, un enzima fosforilante della famiglia Janus (JAK). Questo porta ad una associazione del recettore con una proteina Shc, o proteina adattatrice.

Questa proteina interagisce con il complesso GRB2/SoS, il quale attiva tutta una serie di molecole della via post-recettoriale che conduce all'attivazione nucleare della cellula.

Il GM-CSF è anche conosciuto come molgramostim o, quando
5 la proteina è prodotta dalle cellule dei lieviti, come sargramostim (Leukine); queste molecole hanno utilizzo farmacologico.

Il GM-CSF è usato come farmaco per stimolare la produzione di cellule bianche del sangue in pazienti che sono stati sottoposti a chemioterapia oncologica.

10 Il GM-CSF è anche utilizzato e attualmente sotto valutazione in studi controllati per le sue potenzialità come adiuvante nella vaccinazione contro l'HIV in pazienti infetti. Gli studi preliminari sono stati particolarmente incoraggianti ma la Food and Drug Administration (FDA) Americana non ha ancora approvato l'utilizzo del GM-CSF per
15 questo scopo.

Il Leukine è il marchio commerciale registrato del sargramostim, GM-CSF ricombinante prodotto dalle cellule dei lieviti sviluppato dalla Immunex (ora Amgen), somministrato per la prima volta nel 1987, nell'ambito di un protocollo di utilizzo compassionevole,
20 a sei uomini vittime di contaminazione da Cesio radioattivo per l'incidente avvenuto in Guayana. E' attualmente prodotto dalla Berlex Laboratories, sussidiaria della Schering AG. Il suo uso è attualmente approvato sia negli USA che in Europa per il trattamento post trapianto di midollo osseo autologo in pazienti con patologie mieloproliferative
25 come il linfoma non-Hodgkin, la leucemia linfocitica acuta, o la

malattia di Hodgkin. Inoltre nel 1996, l'FDA ha approvato l'uso del sargramostim per il trattamento delle infezioni fungine e il trattamento dell'anemia aplastica post chemioterapia.

Recentemente la Berlex, la società farmaceutica produttrice
5 del GM-CSF, ha sovvenzionato uno studio pubblicato nel 2005 sul New
England Journal of Medicine, che ha concluso che il GM-CSF promuove
un aumento significativo delle remissioni nei pazienti affetti da Morbo di
Crohn con una riduzione della severità della malattia ed un
miglioramento della qualità della vita, anche se questo dato non è stato
10 confermato da altri studi.

Inoltre recentemente il GM-CSF è stato provato nel
trattamento dei pazienti con malattia di Alzheimer, nelle patologie da
demyelinizzazione come la sclerosi multipla, nel trattamento e
rivascolarizzazione nell'infarto del miocardio e nel trattamento della
15 trombosi cerebrale, con risultati incoraggianti. In questi casi si sfrutta
la capacità del GM-CSF di stimolare la crescita delle cellule staminali,
ed in particolare quelle che rigenerano le cellule endoteliali.

Nel 1999 inoltre è stato dimostrato come il GM-CSF aggiunto
al mezzo di coltura per embrioni di topo promuoveva il loro sviluppo a
20 blastocisti.

E' stato anche proposto l'utilizzo di mezzi di coltura
addizionati di GM-CSF ("Granulocyte-macrophage colony stimulating
factor") per favorire lo sviluppo di embrioni umani in vitro (C. Sjöblom *et*
al., "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes
25 human blastocyst development *in vitro*", Human Reproduction vol. 14,

no. 12, pp3069-3076, 1999).

La domanda di brevetto WO 2005/539505 si riferisce ad un metodo per prevenire l'aborto spontaneo, comprendente la somministrazione di una quantità efficace di G-CSF. La domanda in
5 questione si riferisce altresì ad un metodo per prevenire il fallimento dell'impianto durante la riproduzione assistita, comprendente la somministrazione di una quantità efficace di G-CSF.

La domanda di brevetto WO 2010/126528 descrive un metodo per prevenire o ridurre la probabilità di fallimento dell'impianto in un
10 soggetto sottoposto a inseminazione artificiale, comprendente la somministrazione di una quantità efficace di una composizione contenente G-CSF. E' menzionata la possibilità che tale composizione comprenda un additivo e tra i numerosi additivi citati è compreso il GM-CSF ma ad esso non viene attribuita alcuna particolare funzione.

15 La domanda di brevetto WO 2010/126553 si riferisce ad un metodo per ridurre la probabilità di fallimento dell'impianto o di aborto spontaneo in un soggetto sottoposto a una procedura di riproduzione assistita scelta tra FET, ICSI, GIFT o ZIFT, comprendente la somministrazione di una quantità efficace di una composizione
20 contenente G-CSF. E' menzionata la possibilità che tale composizione comprenda un additivo e tra i numerosi additivi citati è compreso il GM-CSF ma ad esso non viene attribuita alcuna particolare funzione.

Il gruppo di ricerca dei Richiedenti dal 1997 svolge diversi studi, sia clinici che di laboratorio, sull'utilizzo del G-CSF (Granulocyte
25 Colony Stimulating Factor), un ormone della famiglia dei CSF, alla quale

appartengono anche il GM-CSF e l'M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor), nella terapia dell'aborto ricorrente, del fallimento ripetuto dell'impianto e dello sviluppo dell'embrione in vitro.

In considerazione degli studi summenzionati, i Richiedenti
5 hanno indirizzato i loro sforzi di ricerca alla messa a punto di un nuovo metodo per la prevenzione dell'aborto ricorrente e del fallimento ripetuto dell'impianto dell'embrione, che presentasse effetti inattesi nei confronti dei metodi noti.

Pertanto, in un suo primo aspetto, la presente invenzione ha
10 lo scopo di mettere a disposizione un metodo per prevenire l'aborto spontaneo in soggetti con una storia di aborto ricorrente, dove per aborto ricorrente si intende il verificarsi di almeno tre aborti.

In un suo secondo aspetto, la presente invenzione ha lo scopo di mettere a disposizione un metodo per prevenire o ridurre la
15 probabilità di aborto spontaneo e di fallimento dell'impianto nei suddetti soggetti, quando sottoposti a procedure di riproduzione assistita.

Sommario dell'invenzione

Per raggiungere il primo scopo, la presente invenzione mette a
20 disposizione GM-CSF per l'utilizzo in un metodo per la prevenzione di aborto spontaneo in un soggetto affetto da aborto ricorrente, che comprende la somministrazione a tale soggetto di una quantità efficace di GM-CSF.

Per raggiungere il secondo scopo, la presente invenzione mette
25 a disposizione GM-CSF per l'utilizzo in un metodo per la prevenzione di aborto spontaneo e per la prevenzione o la riduzione della probabilità di

fallimento dell'impianto nel suddetto soggetto, quando sottoposto ad una procedura di riproduzione assistita, comprendente la somministrazione di una quantità efficace di GM-CSF a tale soggetto.

In entrambi i casi, il GM-CSF è preferibilmente somministrato per via parenterale, convenientemente per via sottocutanea. La dose somministrata giornalmente è preferibilmente di 0,1-100 mcg/kg, convenientemente 0,5-10 mcg/kg, vantaggiosamente circa 1 mcg/kg.

Il GM-CSF, quando utilizzato per il metodo sopra descritto, viene somministrato giornalmente dal giorno dell'ovulazione fino alla nona settimana di gestazione.

La procedura di riproduzione assistita summenzionata può essere una qualunque tra quelle comunemente utilizzate nella pratica medica, come ad esempio le procedure ICSI (iniezione intracitoplasmatica di spermatozoo), GIFT (trasferimento intratubarico di gameti), ZIFT (trasferimento intratubarico di zigoti) e FET (trasferimento di embrioni congelati).

Il GM-CSF è utilizzato nelle forme farmaceutiche disponibili in commercio ovvero in forma di polvere liofilizzata destinata ad essere ricostituita mediante aggiunta di acqua per iniettabili e contenente eventuali eccipienti atti a garantire la stabilità della proteina GM-CSF, a favorirne la solubilizzazione e a garantire l'isotonia della soluzione ricostituita. Un esempio di formulazione di GM-CSF utilizzabile per la presente invenzione è costituito dal prodotto commercializzato da Novartis con il marchio Leucomax®.

Come risulterà dagli esempi forniti nel seguito della

descrizione, il GM-CSF utilizzato nel metodo sopra citato ha consentito di ottenere effetti del tutto inattesi alla luce dei metodi noti nella tecnica antecedente e di conseguire sensibili riduzione del tasso di aborti spontanei in soggetti affetti da aborto ricorrente e tassi di gravidanza e di impianto embrionale superiori a quelli finora conseguiti con le metodiche secondo la tecnica nota.

Breve descrizione dei disegni

La Figura 1 è una rappresentazione diagrammatica dei risultati delle sperimentazioni di cui all'esempio 1 riportato nel seguito della descrizione.

La Figura 2 è una rappresentazione diagrammatica dei risultati delle sperimentazioni di cui all'esempio 2 riportato nel seguito della descrizione.

La Figura 3 è una rappresentazione diagrammatica dei risultati delle sperimentazioni di cui all'esempio 3 riportato nel seguito della descrizione.

Descrizione dettagliata di una forma di realizzazione preferita

Ulteriori caratteristiche e vantaggi della presente invenzione risulteranno evidenti dagli esempi forniti qui di seguito a titolo illustrativo e non limitativo.

ESEMPIO 1

In questo esperimento è stato studiato l'utilizzo del GM-CSF o Molgramostim (Leucomax nome commerciale) al dosaggio di 1 mcg/kg giornaliero (circa 60 mcg giornalieri) in donne affette da Aborto Ricorrente (almeno tre aborti consecutivi) "sine causa" (senza una causa

diagnosticabile con gli attuali presidi diagnostici) nel tentativo di prevenire l'aborto in queste donne.

Questo trattamento era confrontato con un gruppo controllo di donne affette dalla stessa patologia trattate con progesterone intramuscolo 100 mg giornalmente per lo stesso periodo dopo l'avvenuta ovulazione.

Sono state incluse nello studio 30 donne divise in due gruppi di 15 pazienti ciascuno, che erano affette da Aborto Ricorrente ed avevano avuto almeno 4 precedenti aborti consecutivi, di età inferiore a 38 anni, ed in cui l'ultimo evento abortivo era avvenuto durante trattamento con immunoglobuline endovena ad alti dosaggi, ed in cui il cariotipo dell'embrione abortito era normale (46XX o 46XY).

15 di queste donne venivano trattate con 1 mcg/kg giornalieri di Molgramostim (Leucomax, Novartis) con dosaggio di circa 60 mcg al dì, per via sottocutanea, iniziando dal giorno dell'ovulazione (diagnosticata ecograficamente durante monitoraggio del ciclo mestruale) fino al test di gravidanza, cioè 14 giorni dopo l'ovulazione, e se il test era positivo fino alla nona settimana di gestazione sempre allo stesso dosaggio.

Le altre 15 donne erano trattate con progestinici intramuscolo giornalmente con le stesse modalità e per la stessa durata dell'altro gruppo (Prontogest, IBSA, 100 mg al dì). Tutte e 30 le donne venivano monitorate nello stesso modo con ecografie ogni 15 giorni dal test di gravidanza positivo e con dosaggi plasmatici settimanali della beta-HCG.

Tutte le donne rimanevano in gravidanza entro tre mesi dopo l'entrata nello studio. I risultati evidenziavano come le donne trattate con GM-CSF (Molgramostim 1mcg/kg al di) portavano a termine la gravidanza in 12 casi su 15 con una percentuale dell'80% mentre le
5 donne trattate con "placebo", ovvero Prontogest, portavano a termine la gravidanza in 6 casi su 15 uguale al 40% (P = 0,03).

Inoltre i valori di beta-HCG nelle gravidanze a termine nei due gruppi evidenziava che questi erano molto più elevati nelle donne trattate con GM-CSF. (vedi Fig. 1). I valori delle beta-HCG nelle donne
10 trattate con GM-CSF, oltre ad essere superiori a quelli riscontrati nel gruppo trattato con "placebo" erano anche superiori ai valori delle beta-HCG riscontrati in donne che avevano gravidanze non patologiche e senza aborto, riportati nelle colonne del grafico di Figura 1 indicate come "Normali".

15 Questo esperimento dimostra che il GM-CSF è in grado di prevenire efficacemente e significativamente l'aborto spontaneo in soggetti femminili affetti da aborto ricorrente "sine causa".

ESEMPIO 2

In questo esperimento è stato studiato l'utilizzo del GM-CSF o
20 Molgramostim (Leucomax nome commerciale) al dosaggio di 1 mcg/kg giornaliero (circa 60 mcg giornalieri) in donne affette da Fallimento Ripetuto dell'Impianto dopo cicli di fertilizzazione in vitro (almeno tre tentativi di riproduzione assistita ovvero cicli ICSI, con il trasferimento in utero di almeno 8 embrioni di buona qualità morfologica) "sine
25 causa" (senza una causa diagnosticabile con gli attuali presidi

diagnostici) nel tentativo di ottenere la gravidanza in queste donne. Questo trattamento era confrontato con un gruppo controllo di donne affette dalla stessa patologia trattate con progesterone intramuscolo 100 mg giornalmente per lo stesso periodo dopo la fecondazione in vitro.

5 Sono state incluse nello studio 30 donne divise in due gruppi di 15 pazienti ciascuno, che erano affette da Fallimento Ripetuto dell'Impianto dopo cicli di fecondazione in vitro come sopra specificato. Il primo gruppo di 15 donne veniva trattato con 1mcg/kg giornalieri di Molgramostim (Leucomax, Novartis) per via sottocutanea con dosaggio
10 di circa 60 mcg al dì, iniziando dal giorno prima dell'embrio transfer fino al test di gravidanza, cioè 14 giorni dopo il transfer, e se il test era positivo fino alla nona settimana di gestazione sempre allo stesso dosaggio.

Le 15 donne del secondo gruppo erano trattate con
15 progestinici intramuscolo giornalmente con le stesse modalità e per lo stessa durata dell'altro gruppo (Prontogest, IBSA, 100 mg al dì). Tutte e 30 le donne venivano monitorate nello stesso modo con ecografie ogni 15 giorni dal test di gravidanza positivo e con dosaggi plasmatici settimanali della beta-HCG.

20 I risultati, rappresentati graficamente nella Figura 2, evidenziavano come le donne trattate con GM-CSF (Molgramostim 1 mcg/kg al dì) ottenevano la gravidanza in 10 casi su 15 con una percentuale ("pregnancy rate" o tasso di gravidanza) del 66,6% mentre le donne trattate con "placebo" (Prontogest) ottenevano la gravidanza in
25 4 casi su 15, ciò che corrisponde al 26,7% (P=0,0328).

Inoltre l'"implantation rate" (ovvero la percentuale degli embrioni che si erano impiantati e davano segno clinico come una camera gestazionale ecograficamente evidenziata) nelle donne trattate con GM-CSF era del 31,1% contro l'11,1% (P=0.0185).

5 ESEMPIO 3

In questo esperimento è stato studiato l'utilizzo del GM-CSF o Molgramostim (Leucomax nome commerciale) al dosaggio di 1 mcg/kg giornaliero (circa 60 mcg giornalieri) in donne affette da Fallimento Ripetuto dell'Impianto dopo cicli di fertilizzazione in vitro (almeno tre
10 tentativi di riproduzione assistita ovvero cicli ICSI, con il trasferimento in utero di almeno 8 embrioni di buona qualità morfologica) "sine causa" (senza una causa diagnosticabile con gli attuali presidi diagnostici) nel tentativo di ottenere la gravidanza in queste donne. Questo trattamento era confrontato con un gruppo controllo di donne
15 affette dalla stessa patologia trattate con G-CSF (Granulokine 30) 1 mcg/kilo giornalmente per lo stesso periodo dopo la fertilizzazione in vitro.

Sono state incluse nello studio 40 donne, divise in due gruppi di 20 pazienti ciascuno, che erano affette da Fallimento Ripetuto
20 dell'Impianto dopo cicli di fertilizzazione in vitro (almeno tre tentativi di riproduzione assistita ovvero cicli ICSI, con il trasferimento in utero di almeno 8 embrioni di buona qualità morfologica). Le 20 donne del primo gruppo venivano trattate con 1 mcg/kilo giornalieri di Molgramostim (Leucomax, Novartis) con dosaggio di circa 60 mcg al di,
25 per via sottocutanea, iniziando dal giorno prima dell'embrio transfer

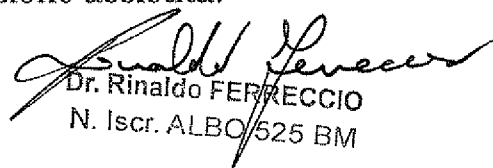
fino al test di gravidanza, cioè 14 giorni dopo il transfer, e se il test era positivo fino alla nona settimana di gestazione sempre allo stesso dosaggio.

Le 20 donne del secondo gruppo erano trattate con G-CSF (Granulokine 30) al dosaggio giornaliero di 1 mcg/kg giornalmente (circa 60 mcg) con le stesse modalità e per lo stessa durata dell'altro gruppo. Tutte le 40 le donne venivano monitorate nello stesso modo con ecografie ogni 15 giorni dal test di gravidanza positivo e con dosaggi plasmatici settimanali della beta-HCG.

I risultati, rappresentati graficamente nella Figura 3, evidenziavano come le donne trattate con GM-CSF (Molgramostim 1 mcg/kg al di) ottenevano la gravidanza in 14 casi su 20 con una percentuale ("pregnancy rate" o tasso di gravidanza) del 70,0% mentre le donne trattate con G-CSF ottenevano la gravidanza in 7 casi su 20, ciò che corrisponde al 35,0% (P = 0,028).

Inoltre l'"implantation rate" (ovvero la percentuale degli embrioni che si erano impiantati e davano segno clinico come una camera gestazionale ecograficamente evidenziata) nelle donne trattate con GM-CSF era del 31,6% contro il 15,0% (P = 0,0225).

I risultati di questo esperimento dimostrano chiaramente la superiorità del GM-CSF rispetto al G-CSF nella prevenzione o riduzione della probabilità di aborto spontaneo e di fallimento dell'impianto in soggetti sottoposti a procedure di riproduzione assistita.


Dr. Rinaldo FERRECCIO
N. Iscr. ALBO 525 BM

RIVENDICAZIONI

1. GM-CSF per l'utilizzo in un metodo per la prevenzione di aborto spontaneo in un soggetto affetto da aborto ricorrente, che comprende la somministrazione a detto soggetto di una quantità
5 efficace di GM-CSF.
2. GM-CSF per l'utilizzo secondo la rivendicazione 1, in cui detto metodo previene o riduce altresì la probabilità di fallimento dell'impianto in detto soggetto, quando sottoposto ad una procedura di riproduzione assistita.
- 10 3. GM-CSF per l'utilizzo secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui il GM-CSF è somministrato per via parenterale.
4. GM-CSF per l'utilizzo secondo la rivendicazione 3, in cui il GM-CSF è somministrato per via sottocutanea.
5. GM-CSF per l'utilizzo secondo una qualunque delle
15 rivendicazioni 1-4, in cui la dose di GM-CSF somministrato giornalmente è di 0,1-100 mcg/kg, preferibilmente 0,5-10 mcg/kg.
6. GM-CSF per l'utilizzo secondo la rivendicazione 5, in cui detta dose giornaliera è di circa 1 mcg/kg.
7. GM-CSF per l'utilizzo secondo una qualunque delle
20 rivendicazioni precedenti, in cui il GM-CSF viene somministrato giornalmente dal giorno dell'ovulazione fino alla nona settimana di gestazione.
8. GM-CSF per l'utilizzo secondo la rivendicazione 2 o secondo una qualunque delle rivendicazioni da 3 a 7, quando
25 dipendenti dalla rivendicazione 2, in cui detta procedura di riproduzione

SCP003BIT

Dott. Rinaldo Ferreccio
(Iscr. Albo n°525 BM)

assistita è scelta dal gruppo comprendente le procedure ICSI, GIFT,
ZIFT e FET.


Dr. Rinaldo FERRECCIO
M. Iscr. ALBO 525 BM

CLAIMS

1. GM-CSF for use in a method for preventing spontaneous abortion in a subject suffering from recurrent miscarriage, comprising administering to said subject an effective amount of GM-CSF.
- 5 2. GM-CSF for the use according to claim 1, wherein said method prevents or reduces the likelihood of implantation failure in said subject, when undergoing an assisted reproduction procedure.
3. GM-CSF for the use according to claim 1 or 2, wherein GM-CSF is administered parenterally.
- 10 4. GM-CSF for the use according to claim 3, wherein GM-CSF is administered subcutaneously.
5. GM-CSF for the use according to any one of claims 1 to 4, wherein the daily administered dose is 0.1 mcg/kg to 100 mcg/kg, preferably 0.5 mcg/kg to 10 mcg/kg.
- 15 6. GM-CSF for the use according to claim 5, wherein said daily administered dose is about 1 mcg/kg.
7. GM-CSF for the use according to any one of the preceding claims, wherein GM-CSF is administered every day from the day of ovulation until the ninth week of pregnancy.
- 20 8. GM-CSF for the use according to claim 2 or according to any one of claims 3 to 7, when depending on claim 2, wherein said assisted reproduction procedure is selected among the group comprising the ICSI, GIFT, ZIFT e FET procedures.

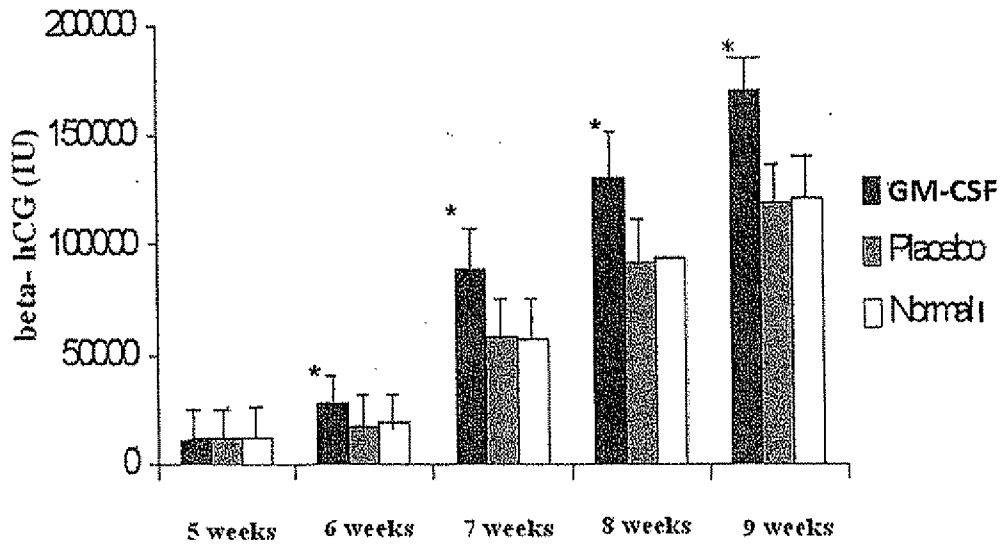


FIG. 1

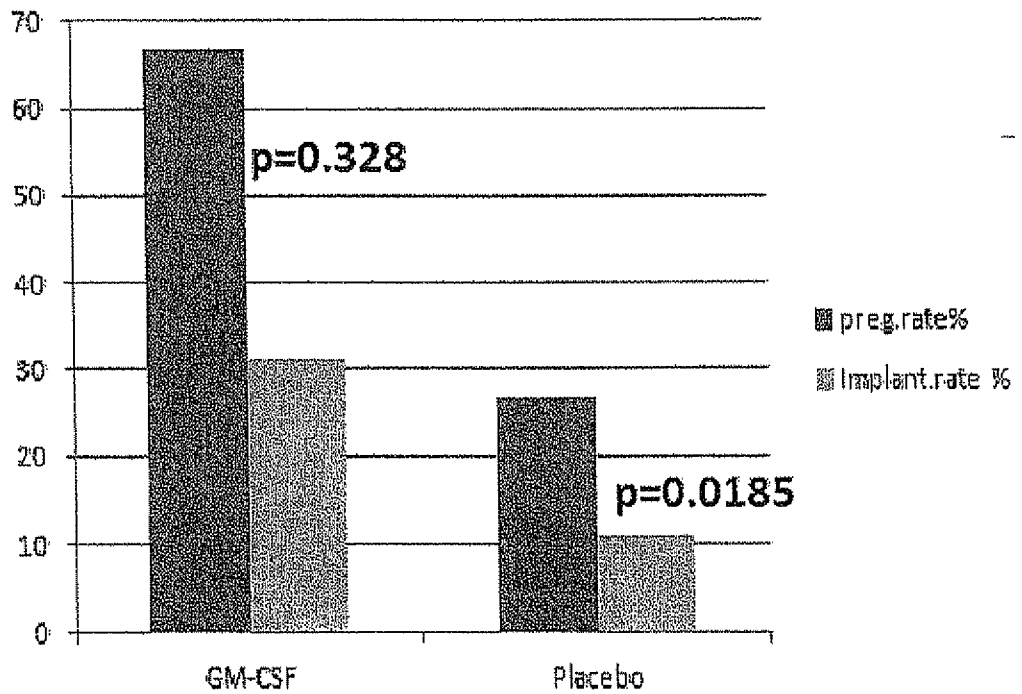


FIG. 2

Rinaldo Ferreccio
 Dr. Rinaldo FERRECCIO
 N. Iscr. ALBO 525 BM

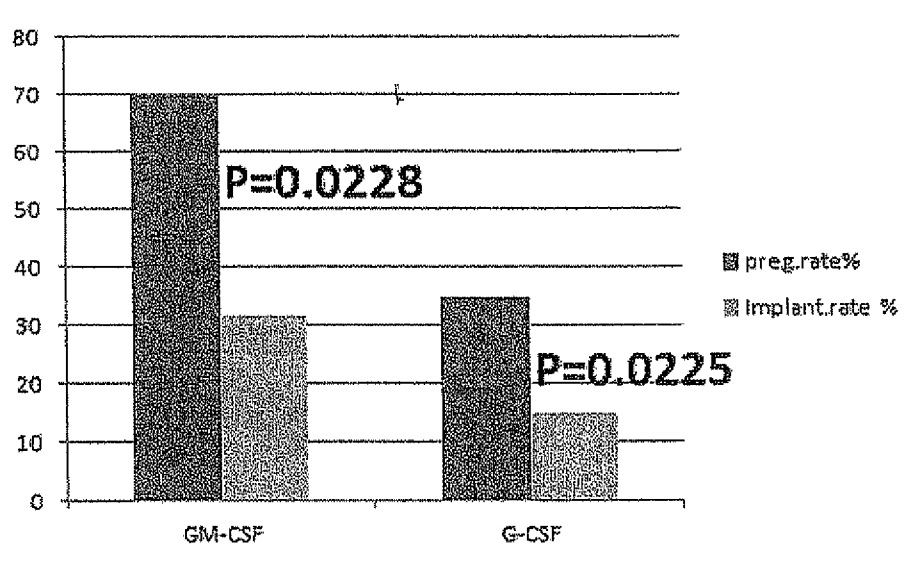


FIG. 3

Rinaldo Ferreccio
Dr. Rinaldo FERRECCIO
N. Iscr. ALBO 525 BM