



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

UIBM

DOMANDA NUMERO	101995900447383
Data Deposito	13/06/1995
Data Pubblicazione	13/12/1996

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Titolo

COMBINAZIONI DI PIRROLOBENZOTIAZEPINE CON ANALOGHI DI NUCLEOSIDI PER LA TERAPIA DELL'AIDS.

SRC.003

Notarbartolo & Gervasi s.r.l.

Descrizione della domanda di brevetto per invenzione industriale dal titolo: Combinazioni di pirrolobenzotiadiazepine con analoghi di nucleosidi per la terapia dell'AIDS

a nome di: SARC s.c.a.r.l.

con sede in: CAGLIARI

inventori designati: LA COLLA Paolo, LOI Anna Giulia, TRAMONTANO Enzo, DE MONTIS Antonella

depositata il con n.

* * * * *

TECNICA ANTERIORE

La sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS) e' una patologia di origine virale caratterizzata dalla progressiva compromissione delle difese immunitarie. Trattandosi di un'infezione letale a sviluppo pandemico, in questi ultimi anni ha ricevuto un notevole impulso la ricerca indirizzata allo sviluppo di farmaci capaci di bloccare la moltiplicazione dei virus che ne sono la causa, e cioe' i virus dell'immunodeficienza umana (HIV). L'identificazione di farmaci da utilizzare per la terapia dell'infezione da HIV, e' attualmente uno dei traguardi piu' impegnativi della ricerca virologica. Infatti, l'intima dipendenza del processo di moltiplicazione del virus dal

Rag. Franco Carboni



Handwritten signature

SRC.003

Notarbartolo & Gervasi s.r.l.

metabolismo cellulare lascia pochi margini per la messa a punto di farmaci dotati di notevole selettività'.

Con l'aumentare delle conoscenze sulla biologia molecolare della replicazione dell'HIV sono state individuate numerose tappe metaboliche e/o attività enzimatiche del tutto peculiari al ciclo di moltiplicazione virale e, quindi, suscettibili di inibizione selettiva. Tra queste, il processo di trascrizione inversa del genoma di HIV è stato uno dei più studiati ed ha permesso di individuare inibitori estremamente potenti quali AZT, ddI, ddC, d4T, da tempo approvati per la terapia dell'AIDS. Dopo il loro ingresso nella cellula questi analoghi di nucleosidi vengono fosforilati a mono, di e trifosfati da parte di kinasi cellulari. Come trifosfati si dimostrano ottimi substrati per la trascrittasi inversa di HIV e da questa vengono incorporati nella catena di DNA virale in via di sintesi della quale non permettono l'ulteriore estensione in quando privi dell'ossidrile legato al carbonio 3' dello zucchero. L'esperienza clinica ha tuttavia evidenziato che la monoterapia con tali analoghi di nucleosidi è inefficace nel sopprimere la moltiplicazione virale in vivo. Infatti, alle

Rag. Franco Carboni



dosi comunemente impiegate in clinica, nessuno di essi e' in grado di ridurre la viremia a meno del 10% dei valori iniziali o di prevenire la comparsa di HIV con nuove sequenze il tutto spesso accompagnato dall'instaurarsi di tossicita' a carico del midollo, del sistema nervoso o del pancreas. Da cio' il forte impulso alla ricerca di nuove strategie terapeutiche piu' efficaci nel rallentare la progressione della malattia nei pazienti e nel ritardare la comparsa dei sintomi nei soggetti sieropositivi.

Di recente sono state individuate diverse classi di composti quali HEPT, TIBO, Nevirapine, BHAP e TSAO descritti in MIYASAKA, T. TANAKA, H. BARA, M. HAYAKAWA, H. WALKER, R.T. BALZARINI, J. and DE CLERCO, E. (1988). Journal of Medicinal Chemistry 32.2507-2509.

PAUWELS, R., ANDRIES, K., DESMYTER, J., SCHOLS, D., KUKLA, M.J., BRESLIN, H.J., RAEYMAECKER, A., VANGELDER, J., WOESTEN-BORCHS, R., HEYRANTS, J., SCHELLEKENS, J., JANSSEN, M.A.C., DE CLERCO, E., and JANSSEN, P.A.J. (1990). Nature 343.470-474.

MERLUZZI, V.J., HARGRAVE, K.D., LABADIA, M., GROZINGER, K., SKOOG, M., WU, J.C., SHIS, C-K., ECKNER, K., HATTOX, S., ADAMS, J., ROSENTHAL, A.S.,

Rag. Franco Carbone



Handwritten signature

FAANES, R., ECKNER, R.J., KOUP. R.A., and SULLIVAN, J.L. (1990). Science 250.1411-1413.

ROMERO, D.L., BUSO, M., TAN, C.K., REUSSER. F., PALMER, J.K., POPPE, S.M., ARISTOFF, P.A., DOWNEY, K.M., SO. A.G., RESMICK. L., and TARPLEY, W.G. (1991). Proceeding of the National Academy of Science USA 88.8806-8810.

Camarasa M-J, PEREZ-PEREZ M-J, San-Felix A, Balzarini J. De Clercq E. J. Med. Chem. 1992;35:2721-7. Detti composti sono definiti complessivamente inibitori non-nucleosidici della trascrittasi inversa (NNRTI). Sebbene strutturalmente molto diversi tra loro, non necessitano di fosforilazione da parte di enzimi cellulari, hanno come bersaglio la trascrittasi inversa di HIV-1 ma non di HIV-2 o di altri retrovirus ed inibiscono l'enzima interagendo con un sito diverso da quello dei nucleotidi trifosfati e da quello del template-primer. Tuttavia, la rapidita' con cui gli NNRTI selezionano mutanti farmaco resistenti rende improbabile un loro impiego da soli in terapia, per quanto diverse sperimentazioni in vivo ne abbiano evidenziato la scarsa tossicita'.

L'uso in associazione di un analogo di nucleoside

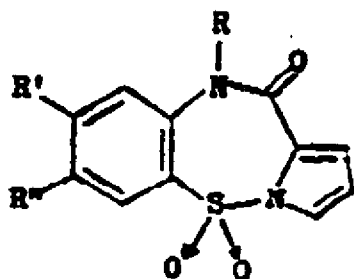
Rag. Franco Carboni



con un NNRTI e' gia' stato riportato da Chow et al., Nature 361,1993, che ne hanno pero' descritto l'inefficacia anti-HIV in colture a lungo termine.

SOMMARIO

La presente invenzione consente di superare gli inconvenienti della tecnica anteriore in quanto consente di ottenere l'estinzione della infezione da HIV non solo in seguito a trattamenti prolungati, ma anche in seguito a trattamenti di durata limitata, e quindi poco tossici, mediante impiego di opportune combinazioni di pirrolobenzotiadiazepine con un analogo di nucleoside. Dette pirrolobenzotiadiazepine hanno formula generale (I)



(I)

in cui R rappresenta un atomo di idrogeno o una catena alchilica lineare o ramificata, satura od insatura, ciclometilenica o ciclometilenaalchilica, ovvero un gruppo alcossicarbonilalchile ed R' e R'' rappresentano atomi di idrogeno o di alogeno. Detto analogo di nucleoside e' scelto nel

Rag. Franco Carboni



SRC.003

Notarbartolo & Gervasi s.r.l.

gruppo costituito da AZT, ddI, ddC, d4T o loro derivati fosfodiesteri o fosfotriesteri.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Al fine di illustrare l'utilita' delle combinazioni oggetto della presente invenzione nella terapia dell'AIDS vengono presentati, come esempio, i risultati di una sperimentazione relativa alla citotossicita' ed all'attivita' anti-HIV di un composto rappresentativo delle pirrolobenzotiadiazepine (BTDP) e di un composto rappresentativo della classe degli analoghi di nucleosidi, ovvero la 3'-azido-2',3'-dideossitimidina (AZT), impiegati singolarmente e in diverse combinazioni, Il composto BTDP impiegato nella sperimentazione corrisponde alla formula:

7-cloro-11-cheto(1 OH)-pirrolo[1,2-b][1,2,5] benzotiadiazepina 5,5-diossido. Risultati analoghi sono stati ottenuti con vari composti della domanda di brevetto italiano MI95A000811.

La valutazione della citotossicita' e dell'attivita' antivirale e' stata effettuata in cellule MT-4, linea di linfociti T4 permissivi per la replicazione del virus HIV-1. Le cellule sono state coltivate in RPMI 1640 addizionato di siero di vitello fetale (FCS) al 10%, penicillina 100 U/mL e streptomicina

Rag. Franco Carboni



RP

100 µg/mL. Le colture sono state incubate a 37 gradi C in atmosfera al 5% di CO₂ e controllate periodicamente per verificarne l'assenza di contaminazioni da micoplasmi. Il virus usato nei saggi di attivita' antivirale (HIV-1, strain III_B) e' stato ottenuto dal supernatante di cellule H9/III_B cronicamente infette. Le soluzioni stock sono state titolate in C8166 e mantenute a -80 gradi C fino al momento dell'uso.

VALUTAZIONE DELLA CITOTOSSICITA' A LUNGO TERMINE

Per la valutazione della citotossicita', 50 µl di RPMI contenenti 1×10^4 cellule MT-4 sono stati aggiunti, in multiplastre da 96 pozzetti, a 50 µL di RPMI contenenti o meno diluizioni scalari dei composti in esame, da soli ed in associazione. Le colture sono state quindi incubate a 37 gradi C. Ogni 3 o 4 giorni l'intera coltura e' stata risospesa in nuovo terreno, contenente le stesse concentrazioni di inibitori, in modo da riportare le cellule ad una densita' (1×10^5 /mL) tale da permetterne la crescita esponenziale. La vitalita' cellulare e' stata determinata con un metodo colorimetrico basato sull'uso di un sale di tetrazolio, il 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio-bromuro (MTT), che viene

Rag. Franco Carboni

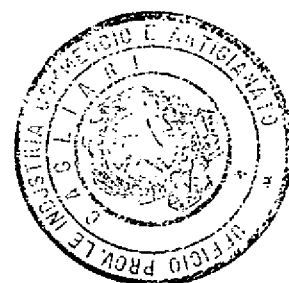


trasformato dall'enzima mitocondriale succinico-deidrogenasi in un prodotto di colore blu (formazano) la cui quantita', delle nostre condizioni sperimentali, risulta direttamente proporzionale al numero di cellule vitali.

VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA ANTI-HIV A LUNGO TERMINE

Per la valutazione dell'attivita' antivirale, sono state riprodotte in vitro due diverse condizioni, la prima con lo scopo di verificare la possibilita' di interrompere un processo di infezione acuta in atto, eventualmente estinguendo l'infezione e la seconda con lo scopo di individuare un trattamento atto ad impedire la diffusione dell'infezione da una cellula infetta a cellule sane bystander. Pertanto, cellule MT-4 seminate alla densita' di 1×10^6 /mL, sono state infettate per un'ora a 20 gradi C con 1×10^6 CCID₅₀ (1CCID₅₀ = 25-250 virus infettanti). Dopo rimozione dell'inoculum, le cellule sono state lavate per tre volte e quindi risospese ad una densita' di 2×10^5 /mL come tali o dopo diluizione 1:100 in cellule normali. 50 µl di RPMI contenenti 1×10^4 cellule MT-4 sono stati aggiunti, in multipiastre da 96 pozzetti, a 50 µL di RPMI contenenti o meno diluzioni scalari dei composti in esame, da soli o in associazione. Le colture sono

Rag. Franco Carboni

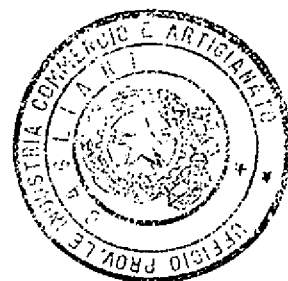


Notarbartolo & Gervasi s.r.l.

Eventualmente, dopo un determinato periodo di trattamento, specificato caso per caso, colture in duplicato sono state risospese in assenza degli inibitori e propagate fino al trentaduesimo giorno in terreno di coltura privo di inibitori (colture revertite).

Ogni quattro giorni alla fine dell'infezione, la valutazione dell'attivita' anti-HIV dei diversi inibitori, impiegati da soli o nelle diverse combinazioni, e' stata eseguita sulla base dei seguenti parametri: determinazione dei livelli di antigene virale p24; valutazione della protezione dallo sviluppo dell'effetto citopatico (ECP) virus-indotto; determinazione del titolo di virus infettante; ricerca di sequenze di DNA virale. I livelli di antigene p24 sono stati valutati mediante test immunoenzimatico. La protezione dallo sviluppo dell'ECP e' stata determinata con il metodo colorimetrico MTT descritto piu' sopra. La presenza

Rec. Finance Section



di acidi nucleici virali e' stata valutata mediante polymerase chain reaction (PCR) utilizzando primers specifici per i geni gag e pol di HIV-1 (strain III_B). I prodotti di amplificazione sono stati evidenziati su gel di agaroso al 2%.

VANTAGGI DELLA PROCEDURA IMPIEGATA

Sia nei saggi di citotossicità che in quelli di attività antivirale, dopo un primo trasferimento dell'intera coltura dal pozzetto di multipliastra da 96 pozzetti (volume della coltura 100 µL) al pozzetto di multipliastra da 24 pozzetti (volume della coltura 1 mL), ed un secondo trasferimento da quest'ultimo a fiasca Falcon da 50 mL (volume della coltura 10 mL), dal terzo passaggio in poi solo 1×10^6 cellule totali (risospese a 1×10^5 /mL) sono state trapiantate di fiasca in fiasca. Questa procedura consente di assicurare condizioni di densità ottimali per la crescita esponenziale delle cellule (10^4 cellule iniziali si moltiplicano fino a produrre, al dodicesimo giorno, 4.1×10^7 cellule) e di mantenere nella coltura tutte le cellule originariamente infettate per un periodo di tempo di dodici giorni.

ATTIVITA' BIOLOGICA

Citotossicità. La citotossicità a lungo termine di

Rag. Franco Carboni



un'elevata concentrazione di BTDP e di alcune dosi di AZT e' illustrato in figura 1. Come e' possibile notare, le massime concentrazioni non citotossiche (MNTD) di BTDP e AZT in seguito ad un trattamento prolungato per 32 giorni sono, rispettivamente, >40 μM e 2.5 μM . I due composti sono privi di citotossicita' anche quando vengono usati in combinazione per 32 giorni alle dosi di 40 μM (BTDP) e 2.5 μM (AZT) (risultati non mostrati).

Efficacia antivirale in colture a bassa densita' di cellule infette. In assenza di inibitori l'infezione da HIV si diffonde producendo, al quarto giorno dopo l'infezione, livelli di antigene p 24 superiori a 950 ng/mL (Fig. 2A) ed effetto citopatologico (ECP) con morte di tutte le cellule in coltura (Fig. 2B). In queste condizioni sperimentali, il trattamento con BTDP 10 μM , usato singolarmente, inibisce la moltiplicazione virale solo per i primi 4 giorni dopodiche' la moltiplicazione virale riprende e si ha innalzamento dei livelli di antigene p24 e sviluppo di ECP entro i successivi 4-8 giorni.

Al contrario, nelle colture trattate con BTDP 10 μM in associazione con AZT 0.16 μM la quantita' di antigene p24 decresce rapidamente e non e' piu' rilevabile per tutta la durata dell'esperimento. In

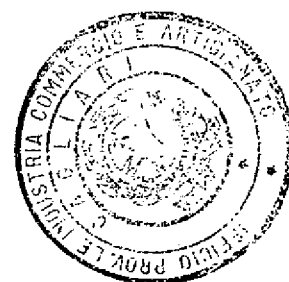
Rag. Franco Carboni



questo caso si ha protezione completa dallo sviluppo di ECP e le cellule si moltiplicano esponenzialmente come nei controlli non infetti. E' interessante notare che la sospensione del trattamento al dodicesimo giorno dopo l'infezione non determina una ripresa della moltiplicazione virale. Cio' e' testimoniato dall'assenza di antigene p24 (Fig. 2A), dal fatto che le cellule si mantengono vitali ed in grado di moltiplicarsi esponenzialmente (Fig. 2B) e dalla mancanza di virus infettanti. Identici risultati sono stati ottenuti con le seguenti associazioni: BTDP (0.6-40 μM) + AZT 0.32 μM ; BTDP (20 e 40 μM) + AZT 0.16 μM ; BTDP 40 μM + AZT 0.08 μM .

Nelle figure 3A e 3B e' possibile osservare che combinazioni di BTDP 5 μM con AZT 0.16 μM , sono efficaci nell'azzerare i livelli di p24 (Fig. 3A), nel proteggere le cellule infettate dallo sviluppo di ECP (Fig. 3B) e nel prevenire la comparsa di virus infettanti (dati non mostrati) a condizione di essere continuamente presenti nel terreno di coltura. Tuttavia, se il trattamento viene sospeso, si ha la ripresa della moltiplicazione virale con produzione di antigene p24, sviluppo di ECP e formazione di virus infettanti. Risultati del tutto

Rag. Marco Carboni



RP

simili a questo sono stati ottenuti anche con la combinazione BTDP 20 μM + AZT 0.08 μM .

I risultati in Figura 1-3 dimostrano pertanto che combinazioni non citotossiche di BTDP con AZT nelle concentrazioni soprariportate sono efficaci nell'inibire la moltiplicazione di HIV. All'interno di tali concentrazioni esistono anche combinazioni caratterizzate dalla capacita' di estinguere l'infezione da HIV.

Efficacia in colture ad alta densita' di cellule infette. In queste condizioni sperimentali il virus HIV-1 si moltiplica rapidamente nei controlli non trattati. Entro 2 giorni dall'infezione si raggiungono livelli di antigene p24 di 950 ng/mL (Fig.4A) e si osserva morte per ECP delle cellule in coltura (Fig.4B). In questo caso, neppure il trattamento con dosi elevate di BTDP (40 μM) previene la moltiplicazione virale con produzione di antigene p24 e sviluppo di ECP.

Al contrario, nelle colture trattate con AZT 2.5 μM la quantita' di antigene p24 decresce e si mantiene per tutta la durata dell'esperimento a livelli tremila volte inferiori a quelli dei controlli non trattati. In presenza di AZT 2.5 μM si ha anche protezione totale dallo sviluppo di ECP e le cellule

Rag. Franco Carboni



Handwritten signature or initials.

si moltiplicano esponenzialmente come nei controlli non infetti.

Tuttavia, la sospensione del trattamento anche a notevole distanza di tempo (ventesimo giorno) dall'infezione determina una ripresa della moltiplicazione virale come testimoniato dall'innalzamento dei livelli di p24 (Fig. 4A), dalla diminuzione della vitalita' cellulare per sviluppo di ECP (Fig. 4B) e dalla produzione di virus infettante con titolo pari a quello del controllo non trattato (3.5×10^5 /mL).

In presenza di combinazioni di BTDP 10 μ M con AZT 2.5 μ M, la quantita' di antigene p24 decresce rapidamente e non e' piu' rilevabile per tutta la durata dell'esperimento (Fig. 4a). Si ha inoltre protezione totale dallo sviluppo di ECP virus-indotto e le cellule si moltiplicano esponenzialmente come nei controlli non infetti (Fig. 4B). Tuttavia, al contrario di quanto accade con AZT 2.5 μ M, la sospensione del trattamento anche dopo soli 4 giorni **non** determina una ripresa della moltiplicazione virale. Cio' e' testimoniato dall'assenza di antigene p24, dal fatto che le cellule sono vitali ed in grado di moltiplicarsi esponenzialmente e dalla mancanza di virus

Rag. Franco Carboni



RP

infettanti.

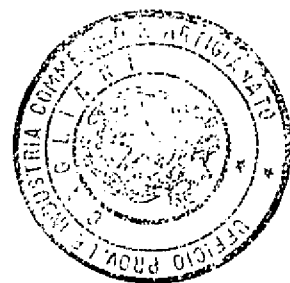
Pertanto, i risultati delle figg. 4A e 4B dimostrano che combinazioni non citotossiche di BTDP e AZT sono efficaci nell'estinguere l'infezione da HIV anche il seguito ad un trattamento di breve durata.

Cellule di alcuni campioni degli esperimenti delle Figg. 4A e 4B sono stati sottoposti a PCR per evidenziare l'eventuale presenza di sequenze di DNA virale. Come e' possibile notare nella Fig. 5, tali sequenze sono presenti per tutto l'arco dell'esperimento nelle cellule trattate con AZT 2.5 μ M. Nelle cellule trattate con la combinazione BTDP 10uM + AZT 2.5 μ M per 16 giorni, oppure in quelle trattate per soli 4 giorni e poi risospese in terreno di coltura privo di inibitori, le sequenze di DNA virale sono assenti, a testimonianza che la coltura e' stata sterilizzata.

Sulla base di quanto trovato si puo' dunque concludere quanto segue.

- Combinazioni BTDP + AZT sono in grado di estinguere l'infezione da HIV sia in colture con bassa che con elevata densita' di cellule infette, dimostrando pertanto la loro utilita' nella terapia di pazienti con AIDS conclamato, nel trattamento precoce di soggetti sieropositivi e nella profilassi

Mag. Franco Carboni



SP

dell'infezione primaria.

- Inoltre, combinazioni BTDP + AZT (quest'ultima a dosi pari ai massimi livelli ematici raggiungibili in terapia) sono in grado di estinguere l'infezione da HIV in colture ad elevata densita' di cellule infette in seguito ad un trattamento limitato nel tempo. In terapia cio' potrebbe riflettersi in trattamenti discontinui capaci di ridurre la tossicita' dei farmaci e la loro pressione selettiva nei confronti di mutanti farmaco resistenti.

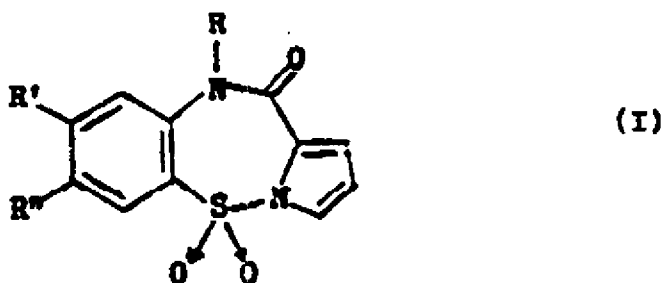
In particolare la dose da somministrare nella terapia e' tale da raggiungere una concentrazione ematica di BTDP 0.6-40 μM e di AZT 0.08-2.5 μM .

Rag. Franco Carboni



RIVENDICAZIONI

1. Impiego di combinazioni di pirrolobenzotiadiazepine (BTDP) con analoghi di nucleosidi per la preparazione di composizioni farmaceutiche atte alla terapia dell'AIDS in cui dette BTDP hanno la formula generale (I)



in cui R rappresenta un atomo di idrogeno o una catena alchilica lineare o ramificata, satura od insatura, ciclometilenica o ciclometilenalchilica, ovvero un gruppo alcossicarbonilalchile ed R' e R'' rappresentano atomi di idrogeno o di alogeno e detti analoghi di nucleosidi sono scelti nel gruppo costituito da AZT, d4T e loro derivati fosfodiesteri e fosfotriesteri.

2. Impiego secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che l'associazione comprende anche didesossi inosina (ddI) oppure didesossi citosina (ddC).

3. Impiego secondo le rivendicazioni 1 e 2,

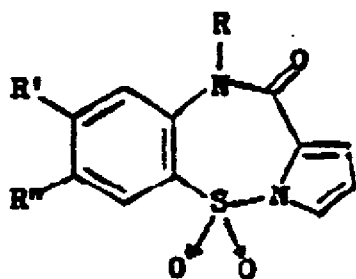
Rag. Franco Carboni



caratterizzato dal fatto che detta BTDP e' la 7-clo-ro-11-cheto(1 OH)-pirrolo [1,2-b][1,2,5]benzotiadiazepina-5,5-diossido.

4. Impiego secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che la dose consenta di raggiungere una concentrazione ematica di BTDP compresa tra 0.6 e 40 μM e una concentrazione ematica di inibitore nucleosidico compresa tra 0.08 e 2.5 μM .

5. Composizioni farmaceutiche atte alla terapia dell'AIDS costituite da combinazioni di pirrolobenzotiadiazepine (BTDP) con analoghi di nucleosidi in cui dette BTDP hanno la formula generale (I)



SRC.003

Notarbartolo & Gervasi s.r.l.

tuito da AZT, d4T e loro derivati fosfodiesteri e fosfotriesteri.

6. Composizioni secondo la rivendicazione 5, caratterizzate dal fatto che l'associazione comprende anche didesossi inosina (ddI) oppure didesossi citosina (ddC).

7. Composizioni secondo le rivendicazioni 5 e 6, caratterizzate dal fatto che detta BTDP e' la 7-clo-ro-11-cheto(1 OH)-pirrolo [1,2-b][1,2,5]benzotiadiazepina-5,5-diossido.

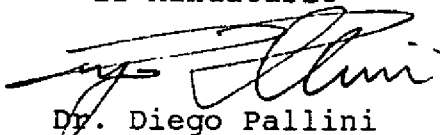
8. Composizioni secondo la rivendicazione 5, caratterizzate dal fatto che la dose consenta di raggiungere una concentrazione ematica di BTDP compresa tra 0.6 e 40 μ M e una concentrazione ematica di inibitore nucleosidico compresa tra 0.08 e 2.5 μ M.

(PIC/lm)

Cagliari, 11

p. SARC s.c.a.r.l.

il Mandatario



Dr. Diego Pallini

NOTARBARTOLO & GERVASI s.r.l.

Reg. F. 22. 28. 11. 71
Pallini



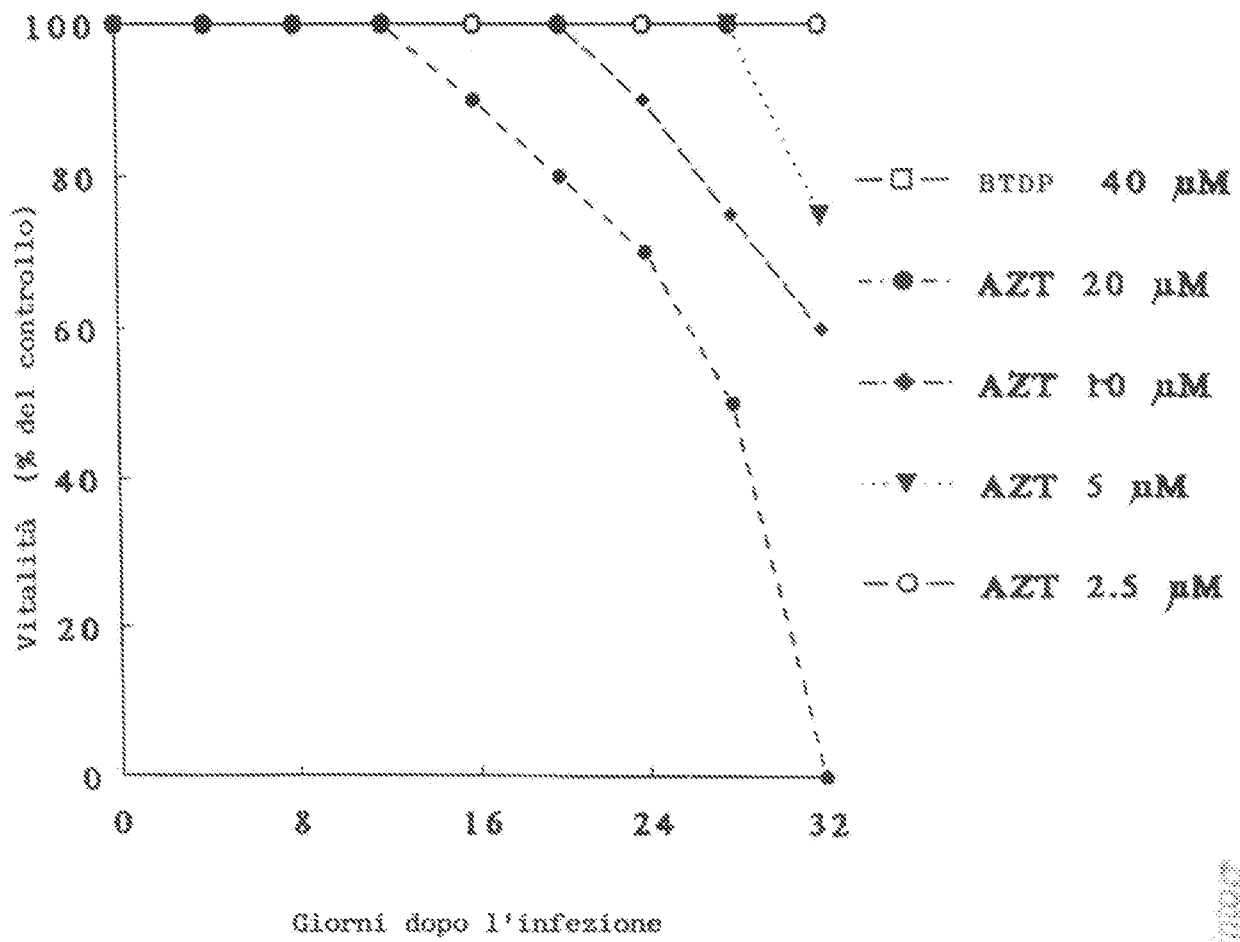
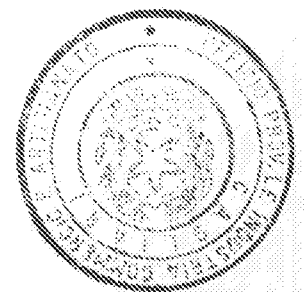
[Signature]

FIG.1

[Signature]
Prof. Lorenzina Pinotti

Chini

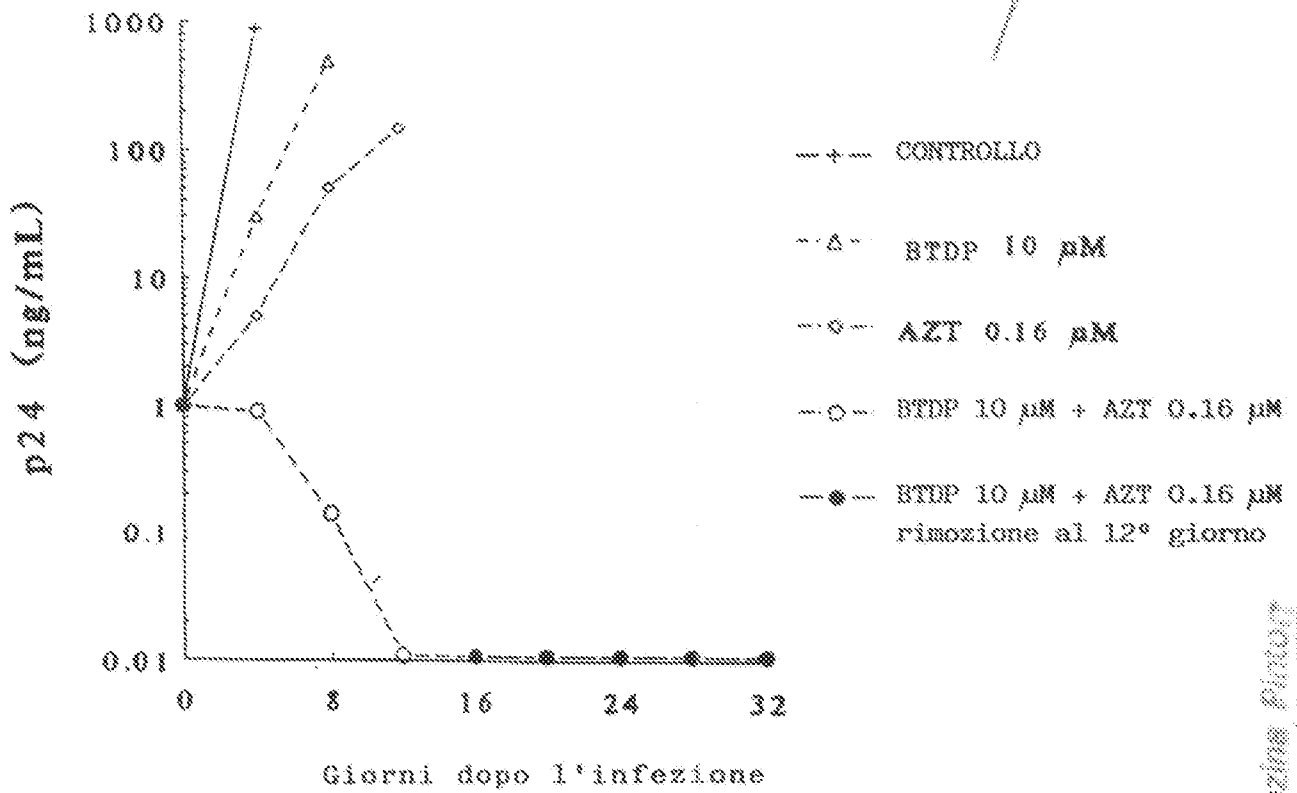


FIG. 2A

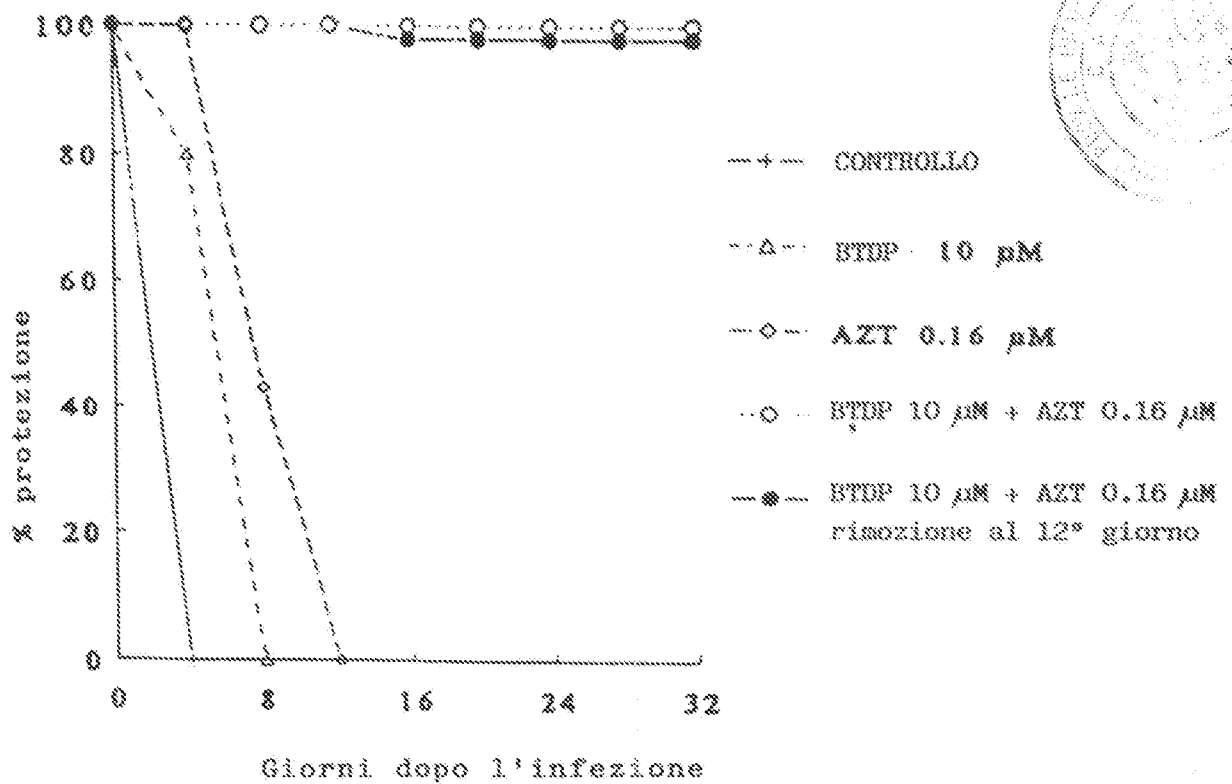


FIG. 2B

Correzione Pinotti
22/11/79



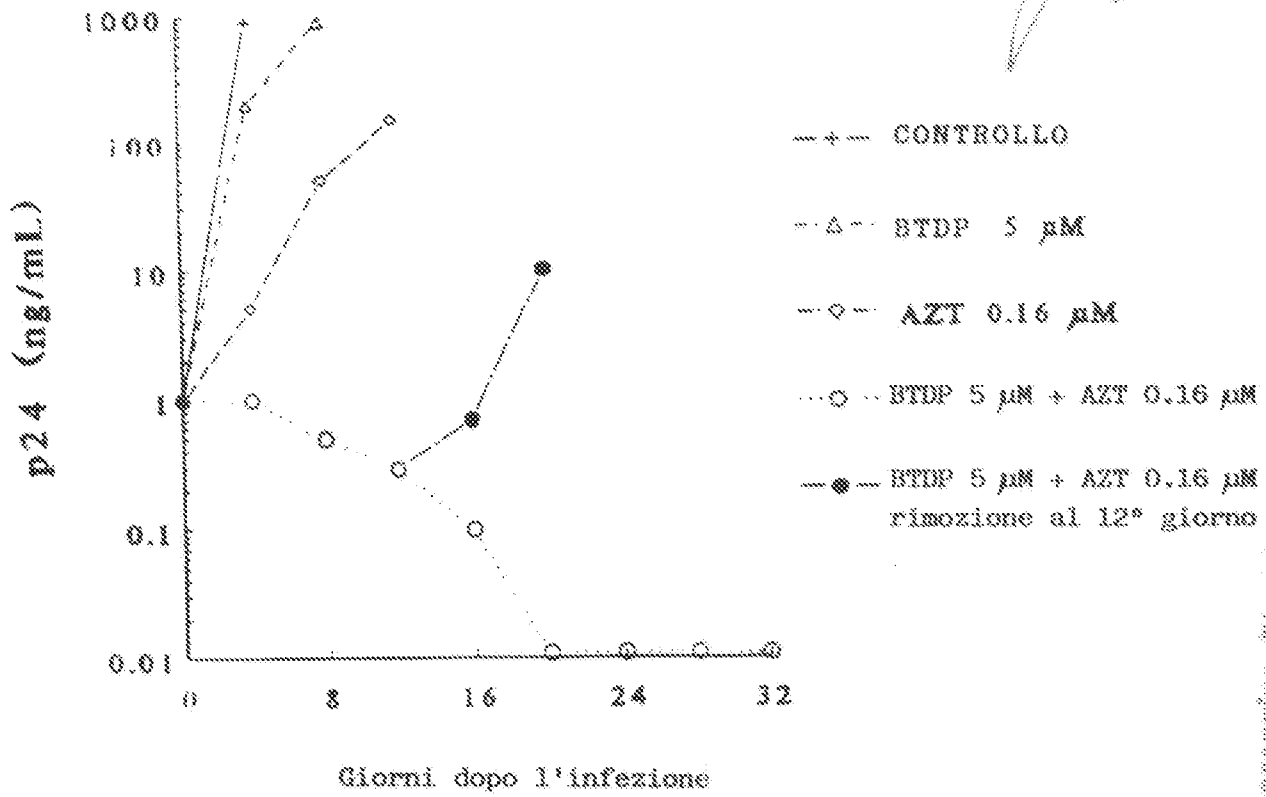


FIG.3A

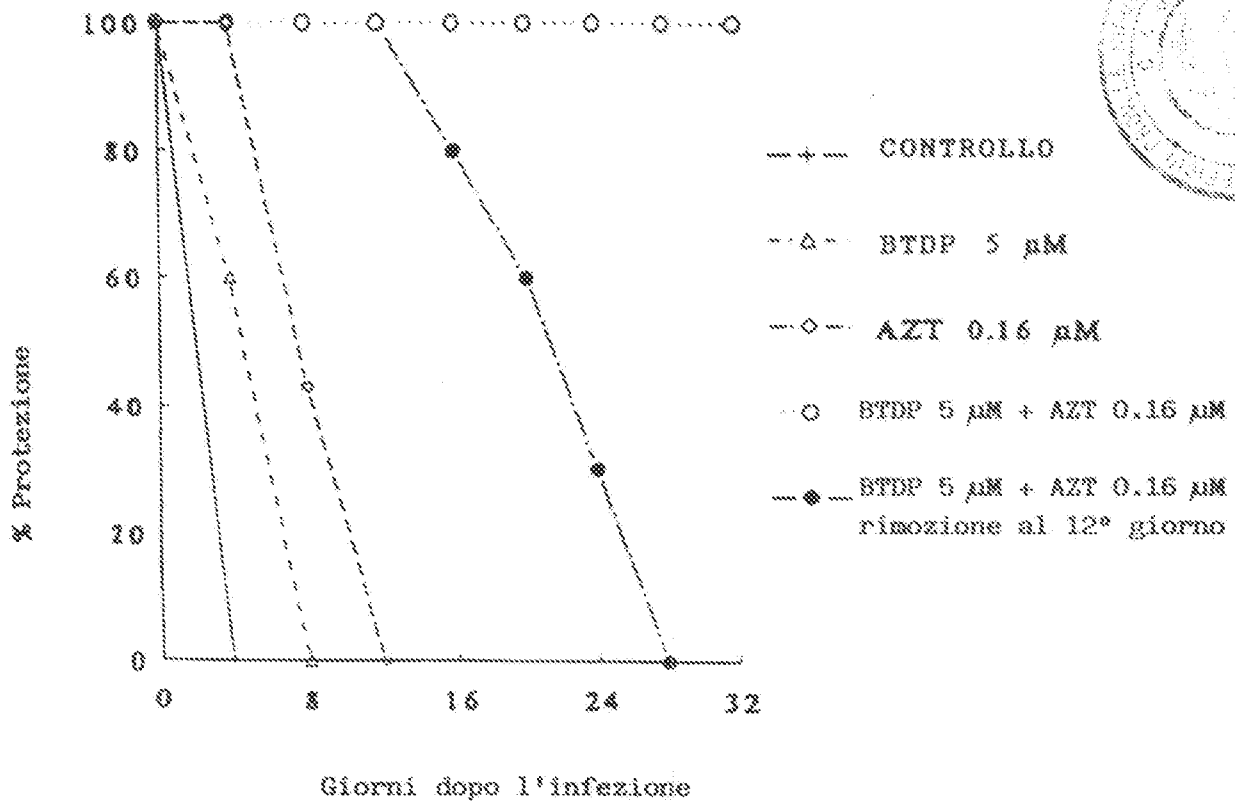
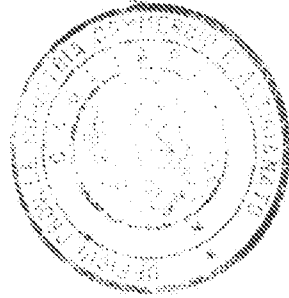


FIG.3E



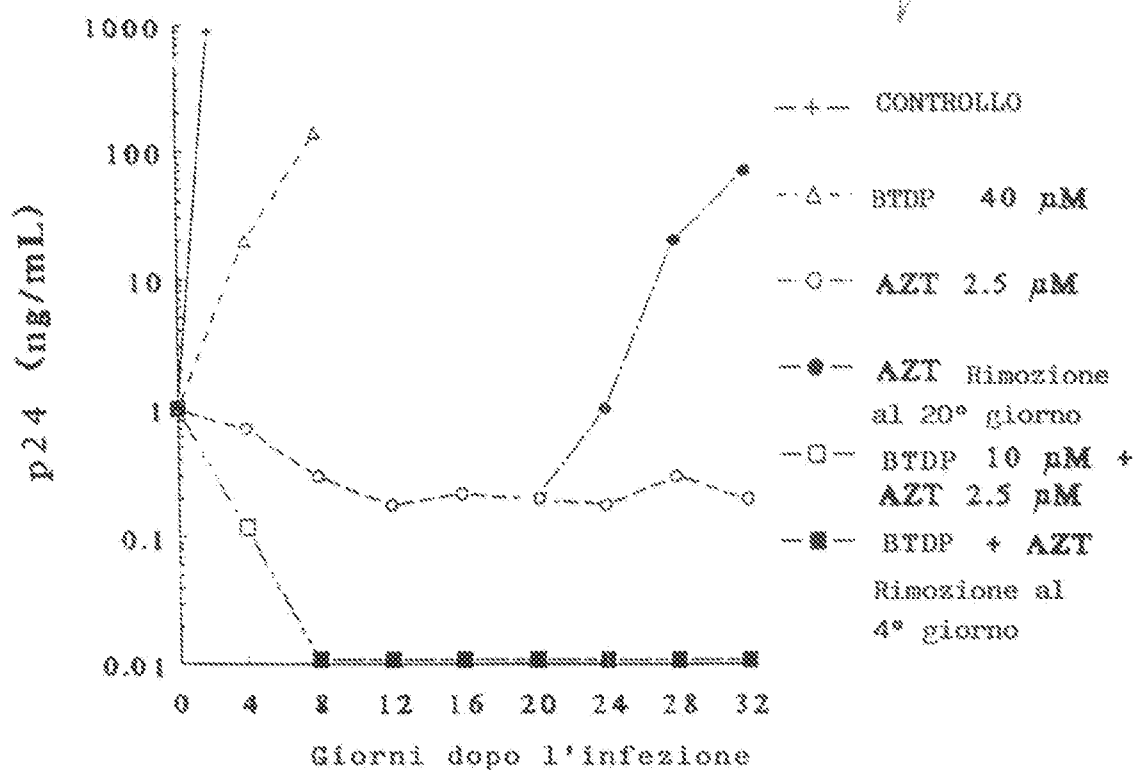


FIG.4 A

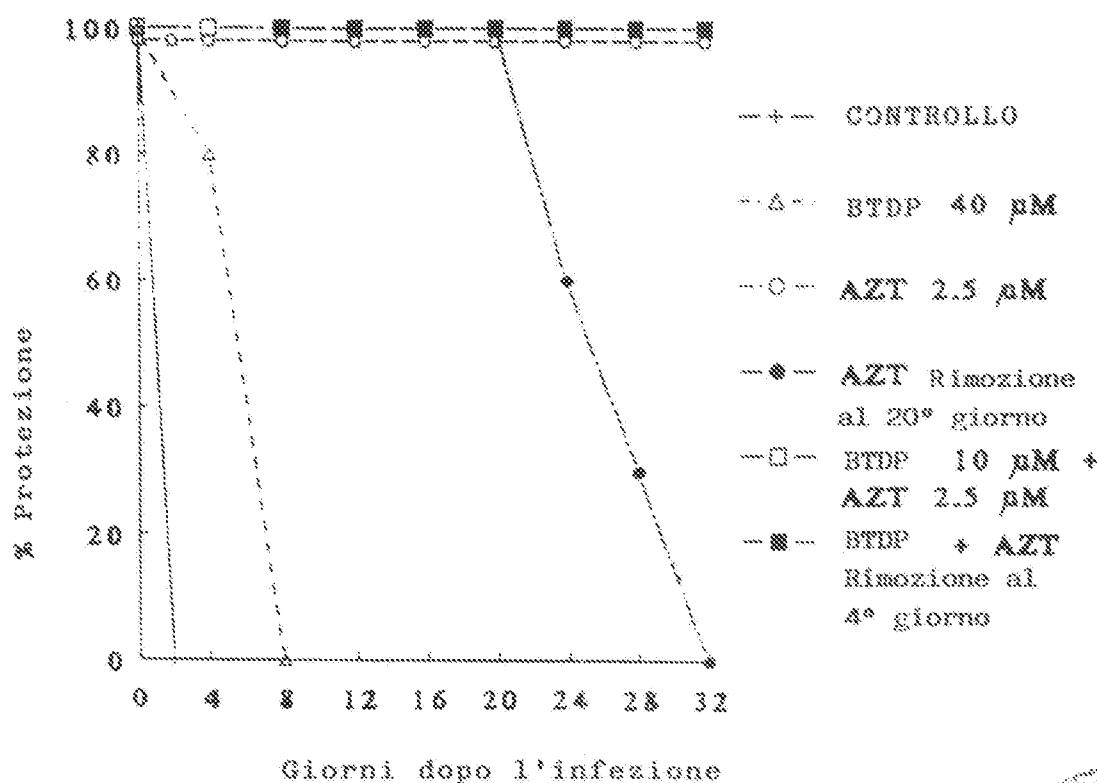
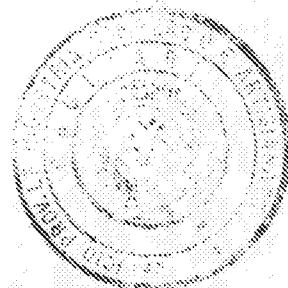
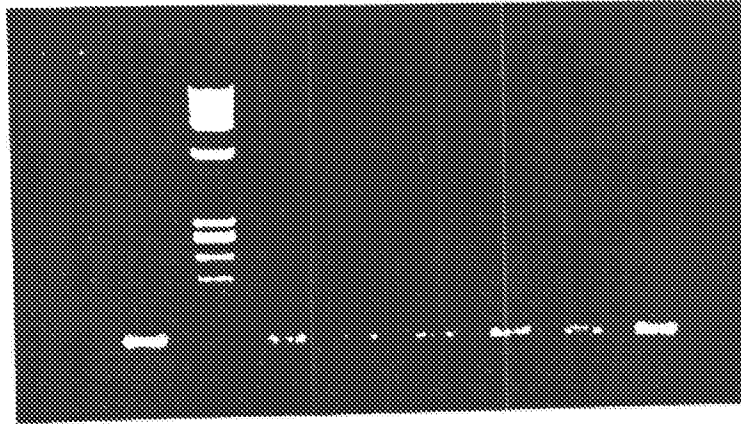


FIG.4 B

Reg. Com. Provinciale Piacenza



gag 114 bp

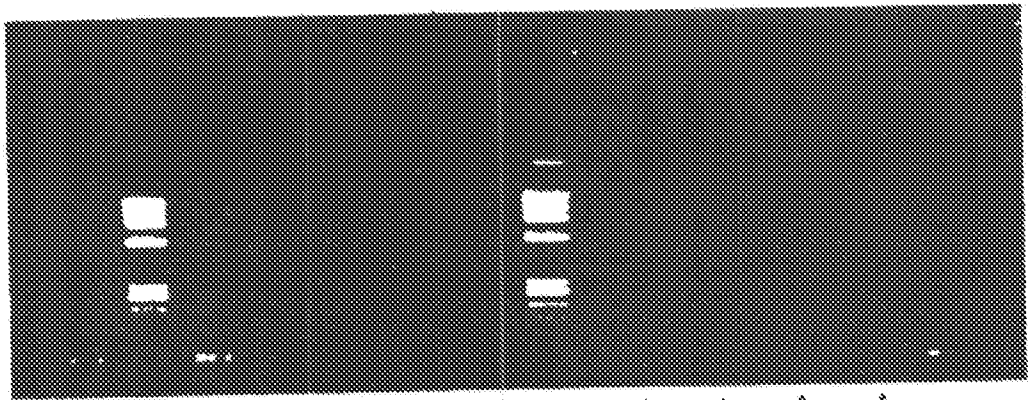


4 8 12 16 20 24

Giorni dopo l'infezione

AZT 2.5 μ M

gag 114 bp



4 8 12 16 20

giorni dopo l'infezione

4 8 12 16

giorni dopo la rimozione
del farmaco

PSTD 10 μ M

AZT 2.5 μ M

FIG.5

Reg. Tribunale di Milano
12/11/1991
P. L. M.

