



CONFEDERAZIONE SVIZZERA

UFFICIO FEDERALE DELLA PROPRIETÀ INTELLETTUALE

⑪ CH 654 208 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

⑲ Numero della domanda: 3155/81

⑳ Data di deposito: 14.05.1981

③① Priorità: 15.05.1980 IT 48692/80

㉔ Brevetto rilasciato il: 14.02.1986

④⑤ Fascicolo del
brevetto pubblicato il: 14.02.1986⑦③ Titolare/Titolari:
Sigma-Tau Industrie Farmaceutiche Riunite
S.p.A., Roma (IT)⑦② Inventore/Inventori:
Cavazza, Claudio, Roma (IT)⑦④ Mandatario:
A. Braun, Braun, Héritier, Eschmann AG,
Patentanwälte, Basel⑤④ **Composizione farmaceutica comprendente L-carnitina e/o L-acil carnitina per il trattamento terapeutico del diabete mellito a insorgenza giovanile.**

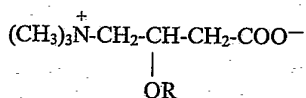
⑤⑦ La somministrazione orale o parenterale di una composizione farmaceutica comprendente L-carnitina o certe L-acil carnitine, tipicamente la L-propionil carnitina, o loro sali farmacologicamente accettabili, consente di diminuire notevolmente (dal 20 al 50% circa) la dose giornaliera di insulina che dovrebbe venir somministrata a pazienti affetti da diabete mellito a insorgenza giovanile, per normalizzarne la glicemia.

Inoltre, l'uso della L-carnitina e di tali acil carnitine inibiscono attivamente la chetoacidosi, evitando per tali pazienti il rischio del coma chetoacidotico.

RIVENDICAZIONI

1. Composizione farmaceutica somministrabile per via orale o parenterale per il trattamento terapeutico di pazienti insulinodipendenti affetti da diabete mellito a insorgenza giovanile, comprendente:

(a) una quantità di L-carnitina o di L-acil carnitina di formula generale:



in cui R è acetile, propionile, butirile o idrossibutirile o loro sale farmacologicamente accettabile, e

(b) un eccipiente farmacologicamente accettabile.

2. Composizione farmaceutica liquida secondo la rivendicazione 1 iniettabile sottocutaneamente, comprendente, per ogni ml di composizione:

(a) da 20 a 30 U di insulina;

(b) da 0,2 a 1 g di L-carnitina o quantità equivalente di acil-carnitina di formula generale, come data sopra o di loro sali farmacologicamente accettabili;

(c) un eccipiente liquido farmacologicamente accettabile.

3. Composizione farmaceutica liquida secondo la rivendicazione 1 iniettabile sottocutaneamente, comprendente, per ogni ml di composizione:

(a) da 20 a 30 U di insulina lenta;

(b) da 0,1 a 0,5 g di L-carnitina o quantità equivalente di un suo sale farmacologicamente accettabile;

(c) da 0,1 a 0,25 g di un acil-derivato della L-carnitina caratterizzato da un tempo di dimezzamento biologico di 6-12 ore;

(d) da 0,1 a 0,25 g di un acil-derivato della L-carnitina caratterizzato da un tempo di dimezzamento biologico di 12-24 ore.

La presente invenzione riguarda una composizione farmaceutica comprendente L-carnitina e/o L-acil carnitina per il trattamento terapeutico di pazienti affetti da diabete mellito a insorgenza giovanile.

È noto che, a seconda della gravità dello scompenso nella secrezione insulinica, il soggetto affetto da diabete mellito può venir fatto rientrare in una delle seguenti due categorie: quella dei pazienti propensi alla chetoacidosi e quella dei pazienti che non lo sono. Il soggetto propenso alla chetoacidosi è il diabetico affetto da diabete mellito a insorgenza giovanile (generalmente il diabete essendosi manifestato prima dei 25 anni d'età circa) ed è insulino-dipendente (per evitare appunto la chetoacidosi) per tutto il corso della sua vita. Si tratta evidentemente del diabetico più grave, la cui vita ed attività lavorative e sociali sono più fortemente condizionate dall'affezione di cui soffre. Questo tipo di paziente, oltre a dipendere totalmente dalla somministrazione giornaliera di insulina, deve costantemente guardarsi da due eventi che rappresentano gli effetti estremi contrapposti derivanti dallo scompenso nella secrezione insulinica di cui soffre: il coma chetoacidotico (che richiede l'immediata somministrazione di insulina) e lo shock insulinico (ipoglicemia) provocato da una eccessiva dose di insulina. Oltre al paziente stesso, anche le persone che lo frequentano assiduamente, devono venir addestrate a riconoscere tempestivamente i sintomi premonitori degli eventi sopramenzionati ed a fornire un appropriato, immediato trattamento, particolarmente in caso di ipoglicemia.

È altresì noto che nessuno dei diversi farmaci somministrabili oralmente (solfoniluree: tolbutamide, chlorpropamide, acetohexamide e tolazamide; biguanidi: fenoformin) che sono

stati sviluppati nell'ultima decade per trattare alcune forme lievi di diabete (la loro efficacia essendo infatti circoscritta al trattamento di un numero limitato di pazienti selezionati) può in alcun modo venire usato quale sostituto dell'insulina nel paziente propenso alla chetoacidosi. Sebbene i loro meccanismi d'azione non siano stati ancora completamente compresi, è stato tuttavia definitivamente chiarito che tali farmaci non sono forme orali di insulina. Inoltre, l'impossibilità di misurarne accuratamente il periodo di dimezzamento biologico, successivamente orale, rende la scelta della dose e i tempi di somministrazione incerti e in qualche misura casuali.

È pertanto sentita in modo evidente la necessità di reperire una sostanza, possibilmente somministrabile per via orale, atta a sostituire almeno parzialmente l'insulina e dotata di attività inibitrice la chetoacidosi nel trattamento terapeutico di pazienti affetti da diabete mellito a insorgenza giovanile e propensi alla chetoacidosi.

La crescente difficoltà, sentita a livello mondiale, nel reperire insulina, largamente dovuta alla perdurante incapacità di produrre su scala industriale per via sintetica tale essenziale ormone e il vantaggio che deriverebbe dal poter ridurre il dosaggio giornaliero di insulina con relativa diminuzione sia della frequenza con la quale il diabetico deve sottoporsi alle iniezioni di insulina sia del rischio di shock ipoglicemico sono, solo alcuni dei motivi che rendono pressante il reperimento di una tale sostanza.

Tutta la ricerca sviluppata fino ad oggi nel reperimento di un sostituto orale dell'insulina e culminata nell'individuazione di alcune solfoniluree e biguanidi (che, come già menzionato, sono tuttavia assolutamente inutilizzabili nel trattamento del diabetico giovanile chetoacidotico) è stata indirizzata verso i possibili inibitori dell'ossidazione degli acidi grassi e quindi verso i possibili inibitori della L-carnitina in particolare. Tale indirizzo è ben riassunto da S. Muntoni in «Inhibition of Fatty Acid Oxidation by Biguanides: Implications for Metabolic Physiopathology» tratto da ADVANCES IN LIPID RESEARCH, vol. 12, 311-377 (1974) Academic Press. Questo Autore, a pagina 367 e 368 della pubblicazione menzionata afferma:

«Le biguanidi agiscono fondamentalmente *inibendo l'ossidazione degli acidi grassi* nei principali tessuti utilizzatori, come la muscolatura striata e il fegato

L'inibizione dell'ossidazione degli acidi grassi e della formazione di Acetil-CoA induce quanto segue: aumento dell'ossidazione e del turnover del glucosio; inibizione della gluconeogenesi epatica a livello della piruvicodeidrogenasi; aumento nella utilizzazione periferica del glucosio e nella tolleranza ai carboidrati potenziamento dell'insulina endogena ed esogena. Gli effetti sull'insulinemia e sul metabolismo dell'acido lattico possono dipendere direttamente, e in parte indirettamente, dallo stesso meccanismo

Il tentativo di identificare un unico meccanismo capace inoltre di indurre questi effetti, conduce all'ipotesi di una più generale inibizione del trasporto degli acidi grassi da e verso i compartimenti cellulari, con risultanti conseguenze sia sull'ossidazione che sulla sintesi degli acidi grassi. Si può pertanto ritenere che *il sistema di trasporto che dipende dalla carnitina sia il bersaglio delle biguanidi*.

Tale approccio è stato ulteriormente ribadito da Sharon G. Boots et al. in «Synthesis and Biological Evaluation of Potential Hypoglycemic Agents I: Carnitine Analogs», Journal of Pharmaceutical Sciences, vol. 64, n. 12, December 1975, 1949-1952. Questi Autori affermano che:

«Un possibile approccio alla cura del diabete mellito potrebbe consistere nella sintesi di agenti capaci di diminuire l'elevata velocità di ossidazione degli acidi grassi e di aumentare l'ossidazione del glucosio».

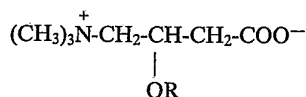
Dopo aver ricordato che il complesso acido grasso a lunga catena — CoA non può attraversare la membrana mitocon-

diale senza un adeguato sistema di trasporto che è dipendente dalla presenza di levo-carnitina e di carnitina acil trasferasi, questi Autori affermano che:

«Pertanto, lo scopo di questo studio consisteva nel concepire e sintetizzare analoghi della carnitina capaci di agire come inibitori di questo sistema di trasporto».

Infine, Bekaert e Deltour che in *Annales d'Endocrinologie*, vol. 18, 218-229 (1957) avevano illustrato gli effetti vantaggiosi del carnitato di carnitina (Bicarnesina) sulla riduzione delle dosi quotidiane di insulina nel trattamento di diabetici, in «Effet de la carnitine sur l'hyperlipidémie diabétique», *Clin. Chim.*, vol. 5 (1960), concludono che «l'effetto della carnitina sulla glicoregolazione è praticamente nullo, le dosi giornaliere necessarie d'insulina rimanendo identiche». La conclusione raggiunta da tali Autori è del resto in accordo con quanto da essi sostenuto in *Annales d'Endocrinologie*, loc. cit., e cioè che l'effetto vantaggioso del carnitato di carnitina è da attribuire all'azione parasimpaticometica di questa sostanza, effetto di cui la L-carnitina è, come noto, totalmente priva. Si veda ad esempio a tale proposito E. Strack et al. *Acta biol. med. germ.*, 35, 645-656 (1976).

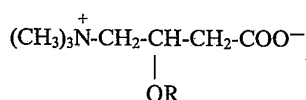
Sulla base del sopramenzionato stato della tecnica è pertanto sorprendente e non prevedibile che proprio la L-carnitina e alcuni derivati della L-carnitina, precisamente i composti di formula generale:



in cui R è acetile, propionile, butirile o idrossibutirile e i loro sali farmacologicamente accettabili, oralmente o parenteralmente somministrabili, possano sostituire, a parità di effetto ipoglicemizzante conseguito, dal 20 al 50% circa della dose giornaliera di insulina che sarebbe necessaria a conseguire un identico effetto ipoglicemizzante in assenza di L-carnitina o delle L-acil carnitine menzionate, dimostrandosi inoltre energici inibitori della chetoacidosi. Sia la L-carnitina che tutte tali L-acil carnitine sono infatti note per essere degli energici attivatori dell'ossidazione degli acidi grassi. A differenza delle solfoniluree e biguanidi la L-carnitina e le L-acil carnitine sopramenzionate e i loro sali farmacologicamente accettabili costituiscono un efficace sostituto dell'insulina nel trattamento di pazienti insulino-dipendenti in quanto affetti da diabete mellito a insorgenza giovanile, e proclivi alla chetoacidosi.

Costituisce pertanto oggetto della presente invenzione una composizione farmaceutica, somministrabile per via orale o parenterale, per il trattamento terapeutico di pazienti insulino-dipendenti affetti da diabete mellito a insorgenza giovanile, comprendente:

(1) una quantità di L-carnitina o di L-acil carnitina di formula generale:



in cui R è acetile, propionile, butirile o idrossibutirile o loro sali farmacologicamente accettabili, e

(2) un eccipiente farmacologicamente accettabile.

Generalmente si somministrerà una dose giornaliera compresa fra 5 e 50 mg di L-carnitina, o una quantità equivalente di L-acil carnitina o di un loro sale farmacologicamente accettabile, per kg di peso corporeo.

Fra le L-acil carnitine precedentemente menzionate la L-propionil carnitina risulta particolarmente preferita.

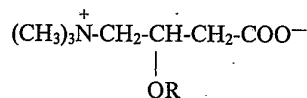
Una forma preferita di composizione farmaceutica secondo

l'invenzione è una composizione liquida, iniettabile sottocutaneamente, comprendente, per ogni ml di composizione:

(a) da 20 a 30 U di insulina;

(b) da 0,2 a 1 g di L-carnitina o quantità equivalente di

L-acil-carnitina di formula generale:



ove R è acetile, propionile, butirile, idrossibutirile o di loro sali farmacologicamente accettabili e

(c) un eccipiente liquido farmacologicamente accettabile.

Una forma particolarmente preferita di composizione farmaceutica secondo l'invenzione è una composizione liquida iniettabile sottocutaneamente comprendente, per ogni ml di composizione:

(a) da 20 a 30 U di insulina lenta;

(b) da 0,1 a 0,5 g di L-carnitina o quantità equivalente di

un suo sale farmacologicamente accettabile; +

(c) da 0,1 a 0,25 g di un acil-derivato delle L-carnitina caratterizzato da un tempo di dimezzamento biologico di 6-12 ore;

(d) da 0,1 a 0,25 g di un acil-derivato della L-carnitina caratterizzato da un tempo di dimezzamento biologico di 12-24 ore.

PROVE BIOLOGICHE

Vengono esemplificativamente riportati i risultati ottenuti con L-carnitina e con L-propionil carnitina.

Gli animali sottoposti agli esperimenti erano ratti resi diabetici mediante somministrazione di streptozotocina (65 mg/kg i.p.).

I risultati sono indicati nelle tabelle I, II, III, IV e nel diagramma allegato.

Più particolarmente:

— Nella tabella I sono indicate le variazioni dei livelli di glucosio ematico per effetto della somministrazione di (a) soluzione fisiologica, (b) insulina, (c) L-carnitina e (d) insulina + L-carnitina.

— Nella tabella II i risultati sono quelli ottenuti sostituendo alla L-carnitina la L-propionil carnitina. I risultati di queste prove dimostrano che la L-carnitina e la L-propionil carnitina non modificano la glicemia dei ratti diabetici, mentre invece potenziano in modo significativo l'azione ipoglicemizzante dell'insulina.

— La tabella III illustra l'effetto della L-carnitina nel potenziare l'azione dell'insulina nell'abbassare i corpi chetonici.

— La tabella IV riassume i risultati di un ulteriore esperimento che venne effettuato come segue:

ad un primo gruppo di 13 ratti resi diabetici con streptozotocina venne somministrata per 15 gg. L-carnitina, 250 mg/kg al giorno per os. in un'unica dose;

ad un secondo gruppo di 8 ratti resi diabetici con streptozotocina non venne somministrata L-carnitina. Tutti gli animali erano liberi di mangiare o di bere ad libitum. Ogni giorno vennero rilevati l'aumento del peso corporeo e il consumo di cibo e di acqua. Al 16° giorno vennero misurati glicemia, corpi chetonici totali e carnitina libera. I risultati vennero confrontati con quelli di un gruppo di 5 ratti sani non trattati aventi lo stesso peso corporeo degli animali trattati.

Dalla tabella IV risulta evidente il notevole effetto della L-carnitina nel diminuire il consumo di cibo e di acqua (che il trattamento con streptozotocina aveva precedentemente aumentato) e nel ridurre la glicemia e la chetonemia, oltre che — come atteso — nel normalizzare la carnitinemia.

— Nella figura sono riportate le curve glicemiche concernenti: un primo gruppo di ratti diabetici (Gruppo A) trattati

con una dose di insulina (0,25 U/100 g) manifestamente insufficiente a realizzare un abbassamento significativo del glucosio ematico; un secondo gruppo di ratti diabetici (Gruppo B) trattati con una dose di insulina (0,76 U/100 g) sufficiente a realizzare un abbassamento significativo del glucosio ematico; e un terzo gruppo di ratti diabetici (Gruppo C) trattati con la stessa dose insufficiente di insulina del Gruppo A + 25 mg/100 g di peso corporeo di L-carnitina (per os).

I risultati mostrano che la somministrazione di L-carnitina

potenzia l'azione ipoglicemizzante dell'insulina fino a superare il minimo di glicemia conseguito con una dose di sola insulina tre volte superiore.

Infatti, il valore del Gruppo C è significativo all'1% nei confronti del valore del Gruppo B ai tempi di 1 ora e 4 ore, e al 5% al tempo di 2 ore, mentre i valori dei Gruppi B e C sono sempre significativi all'1% verso il Gruppo A.

Inoltre, l'effetto ipoglicemizzante ottenuto in presenza di L-carnitina è più duraturo nel tempo, come mostrato dal minor coefficiente angolare del tratto di diagramma compreso fra i tempi 2 ore - 4 ore del Gruppo C rispetto al Gruppo B.

TABELLA I

Glucosio ematico (mg/100 ml) vs. somministrazione di fisiologia, insulina, L-carnitina e insulina + L-carnitina in ratti resi diabetici con streptozotocina (STZ)

	48 ore dopo STZ	giorni di trattamento				
		1	2	3	4	
Fisiologica	317 ± 8	324 ± 14	332 ± 17	294 ± 9	321 ± 13	n = 13
L-carnitina (250 mg/kg p.o. × 2)	306 ± 10	329 ± 12	308 ± 14	296 ± 15	275 ± 10	n = 17
Insulina (2U/100 g Lente Insulin s.c. × 2)	312 ± 11	175 ± 23	135 ± 21	157 ± 12	143 ± 18	n = 14
L-carnitina (250 mg/kg p.o. × 2) + Insulina (2U/100 g s.c. × 2)	302 ± 11	116 ± 19	99 ± 14	137 ± 14	118 ± 15	n = 16

TABELLA II

Glucosio ematico (mg/100 ml) vs. somministrazione di fisiologia, insulina, L-propionil carnitina e L-propionil carnitina + insulina in ratti resi diabetici con streptozotocina (STZ)

	48 ore dopo STZ	giorni di trattamento				
		1	2	3	4	
Fisiologica	317 ± 8	340 ± 12	322 ± 17	269 ± 9	299 ± 12	n = 13
L-propionil carnitina (250 mg/kg p.o. × 2)	306 ± 10	322 ± 14	298 ± 16	290 ± 16	270 ± 10	n = 17
Insulina (2U/100 g Lente Insulin s.c. × 2)	312 ± 11	160 ± 24	128 ± 20	130 ± 11	145 ± 19	n = 14
L-propionil carnitina (250 mg/kg p.o. × 2) + Insulina (2U/100 g s.c. × 2)	302 ± 11	110 ± 18	89 ± 16	110 ± 12	120 ± 16	n = 16

TABELLA III

Acetoacetato, β -idrossibutirrato (β -OH) e corpi chetonici totali (Totali) serici: v.s. somministrazione di fisiologica, insulina, L-carnitina e insulina + L-carnitina in ratti resi diabetici con streptozotocina

	Acetoacetato	β -OH	Totali
Fisiologica	83 ± 13	1371 ± 21	1454 ± 31
L-carnitina (250 mg/kg p.o. × 2)	68 ± 5	1353 ± 15	1422 ± 19
Insulina (2U/100 g Lente Insulin s.c. × 2)	40 ± 4	527 ± 10	567 ± 15
Insulina (2U/100 g s.c. × 2) + L-carnitina (250 mg/kg p.o. × 2)	21 ± 4▲	473 ± 8▲	494 ± 13▲

▲ = $P \leq 1\%$. N = 8 per gruppo. Gli animali vennero sacrificati e le misure effettuate al quinto giorno dall'inizio del trattamento.

TABELLA IV

Effetto della L-carnitina (250 mg/kg al giorno, per os) su alcuni parametri fisiologici e biochimici in ratti resi diabetici con streptozotocina

	Ratti resi diabetici con streptozotocina		ratti sani
	ratti non trattati con L-carnitina	ratti trattati con L-carnitina	valori di controllo
Peso corporeo (g)	230 ± 6 (8)	239 ± 10 (13)	357 ± 8 (5)
consumo di acqua (ml/giorno/ratto)	168 ± 6 (8)	126 ± 5 [▲] (13)	31,3 ± 0,6 (5)
consumo di cibo (g/giorno/ratto)	38,8 ± 0,9 (13)	34,7 ± 0,9 [▲] (13)	28,5 ± 0,5 (5)
glicemia (mg/dl)	359 ± 19 (8)	229 ± 23 (13)	72,4 ± 3,2 (5)
corpi chetonici totali (μ M)	747,6 ± 151,3 (8)	416,6 ± 81,0 [●] (13)	73,0 ± 7,12 (5)
carnitina libera (μ M)	22,50 ± 1,10 [▲] (8)	49,19 ± 4,90 [▲] (13)	35,05 ± 1,20 (5)

Numero degli animali fra parentesi

● p < 0,05 Δ p < 0,02 ▲ p < 0,001

PROVE CLINICHE

Sono state effettuate delle prove cliniche mantenendo sotto osservazione per 12 mesi un gruppo di trenta diabetici di età variante dai 22 ai 63 anni. Questi diabetici vennero sottoposti ad una dieta ispirata ai canoni classici e confacente le specifiche condizioni di età, peso ecc. Il numero delle calorie della dieta variava fra 2.000 e 3.000 / giorno a seconda del tipo di occupazione.

Per ciascuno dei pazienti, l'esame clinico, la misura del peso corporeo e l'esame delle urine venivano effettuati ogni due settimane, mentre l'esame del sangue veniva effettuato ogni 4-5 settimane. Per ciascuno dei pazienti sono stati studiati la glicemia, il colesterolo, i lipidi totali e i corpi chetonici.

A tutti i pazienti, che prima dell'inizio di queste prove cliniche erano trattati esclusivamente con insulina, venne ridotta la dose di insulina somministrata, somministrando invece per os una dose giornaliera di L-carnitina variante fra 400 e 600 mg.

Nel 70% dei casi si riscontrò che la somministrazione di L-carnitina consentiva di ridurre la dose giornaliera di insulina del 21-52% circa.

La chetonemia si mantenne nella norma anche in quei casi che in precedenza, con terapia esclusivamente insulinica, avevano dato luogo talvolta a cenni di chetoacidosi.

Sebbene non ci si voglia, nè sia necessario, vincolare ad alcuna interpretazione teorica dei meccanismi biochimici che sono alla base dell'attività terapeutica della L-carnitina o delle L-acil carnitine secondo l'invenzione, della loro capacità di sostituire almeno parzialmente l'insulina nel trattamento del diabete giovanile e della loro attività nell'inibire la formazione di corpi chetonici si può tuttavia postulare la seguente interpretazione che rende conto quanto meno dell'attività inibente la chetogenesi.

In relazione allo schema sottoindicato e facendo esemplificativamente riferimento alla L-propionil carnitina, questa è in grado di attraversare non mediata la membrana mitocondriale.

Nel mitocondrio la L-propionilcarnitina reagisce con il CoA per dare prionil-CoA + carnitina. Questa ultima può uscire dal mitocondrio per assumere la sua nota funzione di «carrier» dei radicali acilici degli acidi grassi liberi attraverso la membrana mitocondriale.

Il propionil-CoA viene trasformato in succinil-CoA che, in presenza di acetoacetato (AcAc) dà luogo alla formazione di AcAcCoA e succinato. Quest'ultimo viene trasformato in ossalacetato che a sua volta viene convertito in citrato, di cui è ben nota l'azione antichetogenica.

