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

UIBM

DOMANDA NUMERO	**101997900628991**
Data Deposito	**10/10/1997**
Data Pubblicazione	**10/04/1999**

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Titolo

USO DELLA FLUNARIZINA NELLA TERAPIA TOPICA DEL GLAUCOMA

RM 97 A 000613

DESCRIZIONE

a corredo di una domanda di brevetto per invenzione avente per titolo:

"Uso della flunarizina nella terapia topica del glaucoma"

a nome: MEDIVIS s.r.l.

Inventore: Giuseppe LISI

La presente invenzione concerne l'uso della flunarizina nella terapia topica del glaucoma. Più in particolare, l'invenzione riguarda l'utilizzazione di un principio attivo ad attività calcio-antagonista già noto e usato come vasodilatatore cerebrale e periferico, la flunarizina, come agente antiglaucoma per uso topico oftalmico.

Come è noto, il glaucoma è una malattia oftalmica la cui eziologia è tuttora poco chiara, che si manifesta di solito con un'elevazione progressiva della pressione intraoculare, e che porta a gravi difetti delle strutture dell'occhio, in particolare al danneggiamento della testa del nervo ottico e alla riduzione del campo visivo, fino a causare l'atrofia ottica. La patologia è generalmente collegata ad un insufficiente drenaggio dell'umore acqueo dall'occhio anche se altri fattori, come ad esempio la produzione di acqueo e la pressione delle vene episclerali, intervengono nella regolazione del tono endooculare.

Il razionale della terapia farmacologica attualmente impiegata è quello di abbassare la pressione intraoculare. I farmaci correntemente impiegati a questo scopo, suddivisi in classi a seconda del loro meccanismo d'azione, sono i beta-bloccanti (come timololo, betaxololo, levobunololo), i simpaticomimetici (come epinefrina e dipivefrina), i pa-

Ing. Barzanò & Zanardo
Roma s.p.a.

rasimpaticomimetici o miotici (come pilocarpina e acetilcolina) e gli inibitori dell'anidrasi carbonica (come acetazolammide e diclofenammide). Oltre a questi farmaci di uso consolidato, la ricerca di agenti dotati di minori effetti collaterali e di efficacia prolungata nel tempo ha portato a valutare, più recentemente, la possibilità di usare per il trattamento del glaucoma un'altra categoria di farmaci, noti come calcio-antagonisti, i quali sono correntemente usati come vasodilatatori e nel trattamento delle cardiopatie. In questo tipo di indicazioni, i calcio-antagonisti più diffusi sono, ad esempio, la nifedipina, il diltiazem e il verapamil.

Il ruolo del calcio nella dinamica dell'umor acqueo e nel controllo della pressione intraoculare non è stato ancora chiaramente definito, sebbene sia noto che la produzione e il deflusso dell'acqueo sono modulati anche dal calcio. Per quanto concerne la formazione dell'umor acqueo, innanzitutto è da considerare che la componente idrostatica proveniente dalla pressione arteriosa e dalla pressione dei vasi che alimentano il corpo ciliare è calcio-dipendente, come è confermato dalla nota azione vascolare sistemica dei calcio-antagonisti. Inoltre, la pressione osmotica legata alla secrezione ionica a livello dell'epitelio ciliare non pigmentato potrebbe essere modulata dal calcio, secondo quanto ipotizzato da Abelson e coll. (Abelson M.B., Gilbert C.M., Smith L.M., Sustained reduction of intraocular pressure in humans with the calcium channel blocker verapamil, Am. J. Ophthamol. 105; 155 (1988)).

Per quanto concerne il deflusso dell'acqueo, gli ioni calcio

Ing. Barzanò & Zanardo Roma s.p.a.

hanno un ruolo diretto nel modulare la pressione delle vene episclerali, e alcuni studi suggeriscono che il calcio influenza la capacità di deflusso, mantenendo l'integrità strutturale sia del trabecolato sia della parete esterna del canale di Schlemm.

Nonostante le indicazioni che precedono, numerosi studi sperimentali sia su modelli animali che clinici, relativi tanto a somministrazione sistemica che topica, hanno riportato risultati talvolta contrastanti in relazione all'attività dei calcio-antagonisti per la terapia del glaucoma. Ad esempio, Monica e coll. (Monica M.L., Hesse R.J., Messerli F.H., The effect of a calcium-channel blocking agent on intraocular pressure, Am. J. Ophthalmol. 96, 814 (1983)) hanno riportato che la somministrazione orale di nitrendipina a pazienti con moderata ipertensione ma tono endooculare normale riduceva leggermente quest'ultimo, mentre Beatty e coll. (Beatty J.F., Krupin T., Nichols P.F., Elevation of intraocular pressure by calcium-channel blockers, Arch. Ophthalmol. 102; 1072, (1984)) non hanno osservato alcun effetto dopo somministrazione orale di verapamil nei conigli, mentre con la somministrazione topica hanno rilevato persino un aumento della pressione intraoculare. In tempi più recenti, ad esempio, Payene e coll. (Payene, L.J., Slagle T.M., Cheeks L.T., Effect of calcium-channel blockers on intraocular pressure, Ophthalmic Res. 22; 337, (1990)) hanno dimostrato una riduzione della pressione intraoculare in seguito a somministrazione sistemica di verapamil o nifedipina nei conigli, ma non hanno osservato nessun effetto significativo dopo somministrazione topica degli stessi agenti, o di diltiazem.

Ing. Barzanò & Zanardo
Roma s.p.a.

In generale, comunque, almeno per quanto riguarda il verapamil, si può dire che la somministrazione di questo farmaco nell'uomo causa normalmente una diminuzione della pressione intraoculare. Una riduzione più consistente dopo somministrazione topica è spiegata, in particolare, da uno studio di Ettl e coll. (Ettl A., Daxer A., Hoffmann U., Calcium channel blockers in the management of low-tension and open-angle glaucoma, Am. J.Ophthalmol. 116; 778, (1993)), che hanno misurato, nell'occhio del coniglio, concentrazioni di verapamil nell'acqueo 200 volte più elevate rispetto a quelle ottenibili con la somministrazione sistemica.

Concordemente, l'uso del verapamil nel trattamento dell'ipertensione oculare è stato oggetto, da parte del primo autore citato in questa panoramica, della domanda di brevetto internazionale PCT No. WO 92/07563. Successivamente è stata pubblicata la domanda di brevetto internazionale PCT No. WO 96/03986, dello stesso autore, relativa al trattamento di una forma particolare di glaucoma, detto glaucoma a bassa tensione, in cui la pressione endooculare si mantiene quasi normale, nonostante siano presenti tutti gli altri sintomi di questa patologia. In quest'ultimo documento la proposta terapeutica è genericamente estesa a tutti i calcio-antagonisti, di cui numerosi rappresentanti sono citati in un elenco preliminare. Tuttavia, l'unico esempio di agente descritto nel testo e supportato da dati sperimentali è il verapamil.

Un altro calcio-antagonista di cui è stato specificamente proposto, in un documento brevettuale, l'uso per il trattamento dell'iper-

Ing. Barzanò & Zanardo
Roma s.p.a.

tensione oculare è il diltiazem (brevetto francese No. 2593395, pubblicato nel 1987), mentre un elenco di più di un centinaio di calcio-antagonisti è riportato nella domanda di brevetto internazionale PCT No. WO 93/23082, avente ad oggetto, sempre per il trattamento del glaucoma, un'associazione tra un agente atto a ridurre la pressione intraoculare (cioè un agente antiglaucoma convenzionale) e un calcio-antagonista. Nessun esempio specifico di associazione preferita, né alcun dato sperimentale riguardante l'attività dell'associazione, sono presentati nel testo.

Alcune verifiche sperimentali sul verapamil hanno inoltre permesso di accertare che l'uso oftalmico di questo agente provoca indesiderati ispessimenti (swelling) della cornea. (Green K., Cheeks L., Hull D.S., Effects of calcium channel blockers on rabbit corneal endothelial function, Curr. Eye Res. 13; 401-408, (1994)). Ciò è particolarmente problematico se si considera l'impiego per la terapia di una patologia cronica quale è appunto il glaucoma.

Nonostante l'intera classe dei calcio-antagonisti sia già stata oggetto di attenzione per il potenziale uso nel trattamento del glaucoma, non risulta sia mai stata evidenziata la particolare attività, per questo tipo di patologie, di uno specifico agente che rientra in tale classe, la flunarizina. È stato ora trovato, ed è oggetto della presente invenzione, che questo specifico calcio-antagonista, somministrato per via topica oculare, è in grado di ridurre la pressione intraoculare in maniera sorprendentemente più marcata degli altri calcio-antagonisti finora proposti e sperimentati per una possibile terapia del glaucoma.

Ing. Barzanò & Zanardo
Roma s.p.a.

Nell'ambito degli studi connessi alla presente invenzione, è stato anche scoperto che determinati recettori noti, denominati σ, sono localizzati a livello oculare, in particolare nel corpo ciliare e nell'iride, e che "ligandi" specifici, ad attività σ-agonista, riducono significativamente il tono oculare. Dato che si è trovato sperimentalmente che la flunarizina presenta un'attività σ-agonista di gran lunga superiore rispetto ad altri Ca-antagonisti, ciò potrebbe rendere conto della sua inaspettatamente maggiore efficacia come riduttore del tono oculare, con l'ipotesi che tale efficacia si esplichi secondo meccanismi d'azione almeno in parte diversi dagli altri calcio-antagonisti.

Al fine di identificare la presenza di siti recettoriali σ nell'occhio si è proceduto attraverso l'utilizzazione della tecnica del "binding recettoriale" eseguita su membrane cellulari ottenute dal complesso iride-corpo ciliare prelevati, dopo sacrificio, da conigli albini maschi del ceppo New Zealand. Il tessuto è stato omogenato in tampone e si è isolata una frazione, ricca di proteine della membrana cellulare, preparata per centrifugazione. La concentrazione delle proteine totali è stata determinata con il metodo di Lowery (Lowry, J. Biol. Chem. 193; 265 (1951)) Aliquote di detta frazione dell'omogenato contenenti 300 μg di proteine totali sono state incubate con quantità scalari di [^{3}H](+)-pentazocina (utilizzata solo sperimentalmente come ligando σ). La reazione è stata condotta a 37°C per 150 minuti e dopo filtrazione la radioattività rimasta sui filtri è stata misurata mediante spettrometria per scintillazione liquida. Sono stati determinati la costante apparente di dissociazione (Kd) ed il numero totale di recettori, e si è così osser-

Ing. Barzanò & Zanardo
Roma s.p.a.

vato che la [^{3}H](+)-pentazocina si lega in modo selettivo a siti recettoriali presenti nell'omogenato di iride-corpo ciliare del coniglio, confermando l'ipotesi che sono ivi presenti recettori σ. Questi possono essere classificati del tipo σ-1 in base alle attuali conoscenze scientifiche.

Esperimenti di "binding competitivo" eseguiti successivamente con una quantità costante di [^{3}H](+)-pentazocina e quantità scalari di (+)-N-allil-nor-metazocina (NANM, utilizzata solo sperimentalmente come ligando σ), hanno mostrato che quest'ultima spiazza il ligando radioattivo dai siti recettoriali. Si è anche osservato, analizzando il coefficiente di Hill, che la NANM interagisce con una sola classe di siti recettoriali σ.

Nel corso della stessa ricerca si è scoperto che prodotti σ-agonisti presentano attività anti-ipertensiva oculare. Infatti una formulazione all'1% di NANM è stata somministrata (50 μl) nel fornice congiuntivale dell'occhio destro di conigli maschi albini del ceppo New Zealand dopo aver misurato la pressione intraoculare (basale) e si è potuto rilevare, avendo nuovamente valutato il tono oculare a 60, 120, 180 e 240 minuti dopo l'instillazione, che questo si era ridotto in modo significativo 60 minuti dopo l'instillazione ($p<0,01$), in confronto alla formulazione contenente i soli eccipienti.

Infine, come già notato, gli studi di binding recettoriale condotti con la flunarizina (di cui alcuni sono presentati più avanti) hanno dimostrato che quest'ultima ha un'affinità sui recettori σ-1 che non è nemmeno paragonabile a quella mostrata dagli altri calcio-antagonisti presi in esame.

Ing. Barzanò & Zanardo
Roma s.p.a.

Un altro aspetto vantaggioso che distingue la flunarizina dagli altri calcio-antagonisti finora proposti per il trattamento topico del glaucoma, come si è ora accertato, è che questa non causa alcun fenomeno di swelling corneale.

Forma pertanto oggetto specifico della presente invenzione l'uso della flunarizina per la produzione di un preparato topico oftalmico per il trattamento e/o la prevenzione del glaucoma. In generale, la somministrazione topica della flunarizina può avvenire sotto forma di soluzione, di sospensione, di unguento o di pomata in un veicolo oftalmico tollerato dall'occhio e compatibile con il principio attivo. È anche possibile prevedere particolari forme di somministrazione oftalmiche a rilascio protratto, come inserti oculari erodibili, o sistemi "reservoir" a membrana polimerica, da disporre nel sacco congiuntivale.

La concentrazione di flunarizina in un veicolo oftalmico può variare da 10 µg/ml a 5 mg/ml e cioè dallo 0,001% allo 0,500% in peso. La concentrazione ottimale viene scelta innanzitutto funzione della dose da somministrare: nel caso dell'uso come collirio, ad esempio, una goccia dovrebbe contenere una quantità di flunarizina tale da risultare efficace di per sé o quando instillata due volte (due gocce). Altri criteri per la scelta della concentrazione sono la tollerabilità oculare (bisogna ricordare che il sacco congiuntivale, che è il contenitore della formulazione oftalmica instillata, ha una capienza limitata) e la stabilità del principio attivo. La concentrazione preferita per una formulazione in soluzione acquosa (collirio) è dello 0,050% in peso, e preferibilmente il prodotto è presente sotto forma del corrispondente clori-

Ing. Barzanò & Zanardo
Roma s.p.a.

drato (concentrazione ottimale in cloridrato: 0,052%).

Un veicolo impiegabile per un preparato in collirio può essere la semplice soluzione fisiologica allo 0,9% in peso di sodio cloruro: si tratta di una soluzione isotonica con le lacrime e, perciò, ben tollerata dall'occhio. Tuttavia, potranno essere impiegate anche soluzioni o sospensioni ipotoniche, in quanto è notorio che anche detti preparati possono risultare tollerati dai tessuti oculari.

Altri eccipienti possono essere introdotti al fine di tamponare le soluzioni o sospensioni, per rendere stabile il principio attivo e tollerato il preparato. In modo specifico, i tamponi dovrebbero portare il pH ai valori 4-8. Ad esempio, la soluzione salina di cui sopra può essere tamponata con uno qualsiasi dei tamponi ben noti nella tecnica farmaceutica per l'uso oftalmico, ad esempio tampone fosfato, o tampone trizma (tri-idrossimetil-amminometano), in maniera da avere un pH fisiologico, pari a 7,0-7,4, e può avere una osmolarità anch'essa fisiologica (295-305 mOsm/l). Ciò consente di ottenere una migliore tollerabilità oculare.

La tollerabilità può essere ancora migliorata mediante l'impiego di altri eccipienti quali il polisorbato 80 (o Tween 80), il destrano (ad es. il destrano 70), il polietilenglicole (ad es. PEG 400) ed altri prodotti similari. La formulazione può contenere anche agenti viscosizzanti quali metilcellulosa, polivinilalcole, glicosoamminoglicani, polivinilpirrolidone ed altri, con l'obiettivo di aumentare la biodisponibilità oculare, la stabilità e la tollerabilità del principio attivo.

La biodisponibilità oculare della flunarizina può essere ancora

Ing. Barzanò & Zanardo
Roma s.p.a.

migliorata mediante l'impiego di sostanze che aumentano la permeazione corneale del farmaco quali, ad esempio, il dimetilsolfossido, i taurocolati, i fosfolipidi di membrana, il benzalconio cloruro ed altri tensioattivi di impiego oftalmico (quali il disodiolaurilsulfosuccinato).

Infine, nelle formulazioni destinate al confezionamento in flaconi multidose si dovrà prevedere un agente conservante ad attività antimicrobica al fine di prevenire la contaminazione; tale agente può essere scelto tra quelli ben noti per questo uso nella tecnica farmaceutica.

Per prodotti da somministrare in sospensione si dovrà impiegare un agente quale la carbossimetilcellulosa o altri prodotti similari, mentre nel caso in cui si voglia impiegare la formulazione in unguento (gel) o pomata oftalmica la flunarizina dovrà essere veicolata con eccipienti quali polietilenglicoli, poliacrilati, polietilenossidi, acidi ed alcoli grassi oppure lanolina, paraffina ed altri prodotti simili.

La dose del principio attivo dell'invenzione, somministrato per via topica, può variare da circa 20 µg a circa 200 µg per occhio al giorno. La posologia dei preparati oftalmici a base di flunarizina dipenderà dalla dose giornaliera che sarà necessaria per avere l'effetto terapeutico e, naturalmente, dalla formulazione impiegata; le soluzioni o le sospensioni oftalmiche richiederanno da 1 a 4 instillazioni giornaliere, gli unguenti o le pomate da 1 a 2, gli inserti solidi a matrice polimerica, biodegradabili e non, una sola somministrazione.

La presente invenzione ha ulteriormente ad oggetto formulazioni che permettono la somministrazione di flunarizina per via topica

Ing. Barzanò & Zanardo
Roma s.p.a.

oftalmica, e specificamente composizioni oftalmiche per l'uso per il trattamento topico del glaucoma, comprendenti come principio attivo una quantità terapeuticamente efficace di flunarizina. Un gruppo di composizioni preferite comprende i seguenti ingredienti nelle quantità indicate:

flunarizina cloridrato	0,052 %
(equiv. a 0,050% di flunarizina)	
cloruro di sodio	0,10-0,80 %
tampone trizma	0,02-0,20 %
PEG 400	1,00-6,00 %
Tween 80	2,00-12,00 %
acqua p.p.i.	q.b. a 100 %

assieme ad eventuali altri eccipienti farmaceutici accettabili.

Alcune forme di realizzazione specifiche dell'invenzione vengono descritte a titolo meramente esemplificativo nel seguito, assieme ai risultati delle sperimentazioni effettuate sull'agente proposto e al confronto con altri calcio-antagonisti.

ESEMPIO

Soluzione oftalmica a base di flunarizina

Una formulazione particolarmente utile secondo l'invenzione, e le cui prestazioni sono state oggetto della sperimentazione presentata sommariamente nel seguito, ha la seguente composizione (le percentuali sono espresse in peso):

flunarizina cloridrato	0,052 %
(equiv. a 0,050% di flunarizina)	

Ing. Barzanò & Zanardo
Roma s.p.a.

cloruro di sodio	0,533 %
tampone trizma	0,066 %
PEG 400	2,500 %
Tween 80	5,00 %
acqua p.p.i.	q.b. a 100 %

La formulazione esemplificata è adatta per il confezionamento in flaconi monodose; nel caso si voglia adottare un confezionamento multidose si dovrà aggiungere un conservante (come ad esempio cloruro di benzalconio), al fine di mantenere la sterilità del preparato per tutta la durata del suo impiego.

Una soluzione isotonica, tamponata e viscosizzata secondo la formulazione sopra descritta, ma con concentrazioni variabili di principio attivo (da 0,01% a 0,1%), è denominata MEG 01 nel lavoro sperimentale i cui risultati sono esposti nel seguito. Alcuni di detti risultati sono anche illustrati nei diagrammi delle figure allegate, in cui:

la figura 1 mostra la riduzione pressoria intraoculare, in percentuale, ottenuta dopo instillazione dell'agente dell'invenzione negli occhi di conigli ipertesi, in confronto con quella ottenuta con l'instillazione di placebo e di altri calcio-antagonisti; e

la figura 2 mostra la riduzione pressoria intraoculare, in percentuale, ottenuta con l'instillazione, sempre in conigli ipertesi, dell'agente dell'invenzione a varie concentrazioni.

<u>Studi di farmacodinamica</u>

a. <u>Studio sui conigli normotesi</u>

Gli effetti del farmaco dell'invenzione sul tono oculare di conigli

Ing. Barzano' & Zanardo
Roma s.p.a.

normotesi, in confronto all'azione di un placebo e a quella di vari altri agenti calcio-antagonisti, sono stati valutati utilizzando conigli pigmentati del ceppo Blue di Vienna, di sesso femminile (forniti dalla Charles River Italiana, di Calco (CO)). L'età degli animali al momento di iniziare la sperimentazione era di 9 settimane, e il loro peso era di 2,0-2,5 kg.

La scelta di una specie con iride pigmentato è dovuta al fatto che questa rappresenta un modello attendibile per valutare eventuali modifiche del tono oculare causate dai prodotti in esame. Il ceppo prescelto è geneticamente definito, così da ridurre al minimo la variabilità delle caratteristiche biologiche tra un animale ed un altro.

Gli animali sono stati alloggiati in ambienti mantenuti in condizioni di temperatura ed umidità costanti e controllate, illuminati per 12 ore al giorno con luce artificiale e con ricambio dell'aria continuo. L'alimentazione consisteva in una dieta standard a composizione costante e nota, e sia questa che l'acqua erano disponibili ad libitum durante tutta la durata dell'esperimento. I conigli sono stati stabulati per 21 giorni prima di iniziare la sperimentazione in modo da permettere una sufficiente acclimatazione e valutarne adeguatamente lo stato di salute. Ciascun gruppo sperimentale era costituito da 4 animali, i quali sono stati assegnati ai gruppi di trattamento in modo "random".

Nel corso dell'esperimento sono stati somministrati ai diversi gruppi di animali, instillandoli nel fornice congiuntivale destro, 50 µl dei seguenti prodotti:

a) collirio MEG 01, allo 0,050% in peso di flunarizina;

b) soluzione placebo (veicolo del prodotto MEG 01);

Ing. Barzanò & Zanardo
Roma s.p.a.

c) collirio allo 0,056% in peso di verapamil nel veicolo di MEG 01;

d) collirio allo 0,051% in peso di diltiazem nel veicolo di MEG 01;

e) collirio allo 0,043% in peso di nifedipina nel veicolo di MEG 01.

Le concentrazioni in peso dei vari agenti in confronto sono calcolate in modo da corrispondere alla stessa concentrazione molare.

Il tono dell'occhio trattato è stato misurato, mediante tonometro ad applanazione (TonopenXL®, Mentor), 15 minuti prima dell'instillazione del collirio (tempo 0) e quindi 30, 60, 90, 120, 180 e 240 minuti dopo. Come anestetico locale, 5 minuti prima di eseguire ogni misurazione si sono instillati 25 µl di un collirio del commercio a base di ossibuprocaina cloridrato al 4% (Novesina®, Sandoz). Per la misurazione i conigli venivano posti in un'apposita gabbia che ne impedisce i movimenti improvvisi.

Per ogni animale e per ognuno dei tempi sopra indicati è stata calcolata e registrata la media di tre successive misurazioni, fatte a distanza di 1 minuto l'una dall'altra. I valori della pressione intraoculare ai vari tempi sono stati raffrontati con quanto registrato prima del trattamento ricorrendo al test "t" di Student. I confronti tra gruppi diversi sono stati fatti sottoponendo i dati all'analisi della varianza (ANOVA) e, dove permesso, al test "t" di Student per la comparazione di due gruppi sperimentali differenti. Statisticamente significativi sono stati considerati i valori di $p < 0,05$.

La tabella che segue mostra i valori del tono oculare rilevati su ciascuno degli animali trattati, nonché i valori medi per ogni gruppo di prova (± deviazione standard).

Ing. Barzanò & Zanardo Roma s.p.a.

TABELLA 1

Pressione intraoculare in conigli normotesi trattati con gli agenti in confronto

		Pressione intraoculare (mmHg) al tempo (min)						
Coniglio n.	Occhio	0	30	60	90	120	180	240
Collirio allo 0,050% in flunarizina (MEG 01)								
01	OD	17	15	14	15	15	15	17
02	OD	16	14	13	14	14	15	16
03	OD	14	13	12	12	14	14	16
04	OD	16	12	12	14	14	14	16
media±D.S.		15,7±1,2	13,5±1,3	12,7±0,95	13,7±1,2	14,2±0,5	14,5±0,5	16,2±0,5
Placebo								
05	OD	15	16	16	15	15	16	16
06	OD	16	15	14	16	16	17	17
07	OD	17	15	16	16	16	17	17
08	OD	15	15	16	16	16	15	17
media±D.S.		15,7±0,9	15,2±0,5	15,5±1,0	15,7±0,5	15,7±0,5	16,2±0,9	16,7±0,5
Collirio allo 0,056% in verapamil								
09	OD	17	16	15	15	16	16	17
10	OD	15	14	14	13	13	16	15
11	OD	16	17	15	15	16	17	17
12	OD	16	15	15	15	16	16	17
media±D.S.		16±0,8	15±1,3	14,7±0,5	14±1,0	15,7±0,5	16,2±0,5	16,5±1,0
Collirio allo 0,051% in diltiazem								
13	OD	15	14	14	14	15	15	16
14	OD	16	15	14	14	15	16	16
15	OD	18	17	17	16	16	17	17
16	OD	18	15	13	15	16	17	17
media±D.S.		16,7±1,5	15,2±1,2	14,7±0,9	14,7±0,9	15±0,5	16,2±0,95	16±0,6
Collirio allo 0,043% in nifedipina								
17	OD	16	15	14	16	16	17	17
18	OD	15	15	13	15	16	15	17
19	OD	14	13	13	15	16	15	14
20	OD	18	16	15	16	16	17	18
media±D.S.		15,7±1,7	14,7±1,2	13,7±0,9	15,5±0,6	16,0±1,15	16,5±1,7	16±0

Ing. Barano & Zanardo
Roma s.p.a.

Come si può rilevare dalla tabella che precede, il collirio MEG 01 (allo 0,050%) ha prodotto una significativa riduzione del tono oculare dopo un'ora dalla somministrazione, mentre un collirio costituito dal solo veicolo senza la flunarizina non ha causato alcuna significativa variazione della pressione intraoculare. In questo caso, i valori pressori determinati dopo la somministrazione del veicolo non sono statisticamente diversi dai dati registrati prima delle instillazioni (tempo 0: 15 minuti prima della somministrazione del collirio).

Inoltre, né il collirio a base di verapamil né quello a base di diltiazem, entrambi nel veicolo del MEG 01, hanno prodotto abbassamenti pressori rispetto al placebo. Riduzioni della pressione intraoculare si sono avute con la nifedipina, ma in misura molto inferiore a quelle ottenute con il MEG 01 all 0,050%.

b. Studio sui conigli ipertesi

Sono stati utilizzati conigli dello stesso tipo di quelli descritti nella sezione precedente, trattati preliminarmente nella stessa maniera. Le condizioni di stabulazione erano le stesse.

L'aumento sperimentale della pressione endooculare è stato indotto mediante la somministrazione di α-chimotripsina. L'iniezione di questo enzima in camera posteriore causa, un mese dopo la somministrazione, un effetto di ipertensione oculare nel coniglio. Tale modello sperimentale è ampiamente utilizzato, ed è stato adottato per valutare l'attività di vari agenti antiglaucomatosi.

Alla fine del periodo di quarantena i conigli sono stati anestetizzati somministrando per via intramuscolare chetamina cloridrato e

Ing. Barzanò & Zanardo
Roma s.p.a.

xylazina cloridrato (RBI). L'occhio destro veniva delicatamente spinto all'infuori dopo aver instillato 25 µl di collirio Novesina® a base di ossibuprocaina come anestetico; quindi si iniettava nella camera posteriore dell'occhio destro la α-chimotripsina soluzione sterile (SIGMA, Milano; 150 unità in un volume di 100 µl di soluzione fisiologica sterile) mediante un ago 30G sterile. Dopo la somministrazione dell'enzima, l'occhio è stato lavato abbondantemente con soluzione fisiologica sterile per allontanare eventuali tracce di α-chimotripsina che potrebbero danneggiare i tessuti oculari. Quindi si sono instillate 2 gocce di un collirio del commercio a base di antibiotici (Colbiocin®, SIFI S.p.A., contenente cloramfenicolo, rolitetraciclina, colistina metansulfonato). Il trattamento con il Colbiocin collirio è stato eseguito 3 volte al giorno (ore 8, 12 e 18) per una settimana dopo la somministrazione di α-chimotripsina. I conigli sono stati impiegati un mese dopo l'induzione dell'ipertono oculare con l'enzima.

Gli animali, suddivisi anche in questo caso in gruppi di 4, sono stati trattati instillando 50 µl di prodotto in esame nel fornice congiuntivale destro. In un primo esperimento i prodotti applicati erano gli stessi dell'esperimento precedente (collirio MEG 01 allo 0,050%, placebo, e colliri allo 0,056% in verapamil, allo 0,051% in diltiazem e allo 0,043% in nifedipina rispettivamente).

Il tono oculare dell'occhio trattato è stato misurato, con le stesse modalità che nelle prove precedenti, 15 minuti prima dell'instillazione del collirio e 30, 60, 90, 120, 180 e 240 minuti dopo. I valori rilevati sono stati analizzati statisticamente secondo i criteri già descrit-

Ing. Barzanò & Zanardo
Roma s.p.a.

ti.

Nella tabella che segue sono riportate sia le misure individuali di pressione intraoculare che le medie (± deviazione standard) relative a ciascun gruppo. I valori delle riduzioni pressorie medie, espressi in percentuale, sono anche tradotti graficamente nella figura 1.

(segue tabella)

Ing. Barzanò & Zanardo
Roma s.p.a.

TABELLA 2

Pressione intraoculare in conigli ipertesi trattati con gli agenti in confronto

		Pressione intraoculare (mmHg) al tempo (min)						
Coniglio n.	Occhio	0	30	60	90	120	180	240
Collirio allo 0,050% in flunarizina (MEG 01)								
21	OD	57	47	45	50	51	56	56
22	OD	46	38	37	38	39	44	45
23	OD	36	30	28	32	34	37	37
24	OD	52	43	41	43	45	51	51
media±D.S.		47,7±9,03	39,5±7,32	37,75±7,25	40,7±7,63	42,2±7,36	47,0±8,28	47,25±8,18
Placebo								
25	OD	57	56	57	58	56	57	57
26	OD	47	48	46	47	48	48	47
27	OD	41	42	43	42	41	42	43
28	OD	52	50	51	51	50	53	52
media±D.S.		49,25±6,84	49,0±5,77	49,25±6,13	49,5±6,75	48,75±6,18	50,0±6,48	49,75±6,07
Collirio allo 0,056% in verapamil								
29	OD	56	55	56	55	55	57	56
30	OD	47	48	49	46	47	46	48
31	OD	42	40	43	41	41	42	43
32	OD	51	52	52	50	51	50	51
media±D.S.		49,0±5,94	48,7±6,5	50,0±5,47	48,0±5,94	48,5±5,97	48,75±6,39	49,5±5,44
Collirio allo 0,051% in diltiazem								
33	OD	55	55	53	54	56	56	55
34	OD	52	53	51	52	52	51	52
35	OD	47	48	46	46	47	46	47
36	OD	42	42	40	41	43	43	41
media±D.S.		49,0±5,71	49,5±5,80	47,5±5,80	48,2±5,90	49,5±5,68	49,0±5,71	48,7±6,13
Collirio allo 0,043% in nifedipina								
37	OD	54	55	53	52	53	54	54
38	OD	50	52	50	50	49	48	49
39	OD	47	45	45	46	46	45	47
40	OD	41	39	39	38	40	41	42
media±D.S.		48,0±5,47	47,75±7,18	46,75±6,13	46,5±6,19	47,0±5,47	48,00±4,96	48,00±4,96

Ing. Bartano & Zanardo
Roma s.p.a.

La tabella 2 mostra che la somministrazione del solo veicolo non dà luogo ad alcuna significativa variazione del tono pressorio, mentre il MEG 01 (allo 0,050%) ha prodotto una riduzione del tono oculare che è notevolmente superiore a quella ottenibile con la somministrazione degli altri calcio-antagonisti provati. Infatti, come si può notare, i valori della pressione intraoculare di conigli ipertesi dopo trattamento con quantità equivalenti di verapamil, diltiazem e nifedipina in collirio, con lo stesso veicolo del MEG 01, non mostrano nessun decremento significativo.

In una seconda serie di prove, in cui sono state utilizzate identiche modalità operative, il collirio secondo l'invenzione è stato testato a concentrazioni diverse di flunarizina, 0,1% e 0,01% in peso di principio attivo, per confrontare la risposta ottenuta con quella già osservata per il collirio MEG 01 allo 0,05%. I risultati sono esposti nella tabella 3 che segue, e sono anche rappresentati graficamente (per i valori medi percentuali della riduzione pressoria) nel diagramma di figura 2.

(segue tabella)

Ing. Barzano' & Zanardo
Roma s.p.a.

TABELLA 3

Pressione intraoculare in conigli ipertesi trattati con flunarizina

		Pressione intraoculare (mmHg) al tempo (min)						
Coniglio n	Occhio	0	30	60	90	120	180	240
Collirio MEG 01 allo 0,010% di flunarizina								
41	OD	60	58	55	53	58	60	61
42	OD	65	61	59	60	62	64	65
43	OD	53	51	49	48	52	52	52
44	OD	52	50	48	49	51	50	52
media±D.S.		57,5±6,13	55,0±5,35	52,7±5,18	52,5±5,44	55,7±5,18	56,5±6,60	57,5±6,55
Collirio MEG 01 allo 0,050% di flunarizina								
21	OD	57	47	45	50	51	56	56
22	OD	46	38	37	38	39	44	45
23	OD	36	30	28	32	34	37	37
24	OD	52	43	41	43	45	51	51
media±D.S.		47,7±9,03	39,5±7,32	37,7±7,27	40,7±7,63	42,2±7,36	47,0±8,28	47,2±8,18
Collirio MEG 01 allo 0,100% di flunarizina								
45	OD	58	48	45	49	51	56	57
46	OD	48	40	38	41	43	47	49
47	OD	42	36	34	36	38	41	43
48	OD	51	45	40	46	48	50	50
media±D.S.		49,7±6,6	42,2±5,31	39,2±4,57	43,0±5,71	45,0±5,71	48,5±6,24	49,7±5,73

Ing. Barsanti & Zanardo
Roma s.p.a.

Dalla tabella 3 si può osservare che la percentuale più alta di riduzione della pressione intraoculare si è osservata con il collirio MEG 01 alla concentrazione in flunarizina di 0,05%, mentre la formulazione a concentrazione massima (0,1%) ha mostrato un effetto più protratto nel tempo. Ciò è mostrato in maniera più immediatamente apprezzabile nella figura 2.

Studi di tossicità

a. Valutazione dello spessore corneale

La valutazione dello spessore corneale è stata eseguita me-

diante ecografia con l'UBM System 840 della Humphrey Instruments (San Leandro, CA, USA). L'apparecchio è fornito di una sonda da 50 Mhz e permette di visualizzare delle immagini su un video con una risoluzione di ca. 504 e con un campo di osservazione di 5x5mm. Il software inserito permette di variare la profondità di focalizzazione del fascio di ultrasuoni, di catturare l'immagine variandone l'amplificazione.

Gli animali utilizzati per lo studio erano dello stesso tipo di quelli già descritti, trattati nella stessa maniera. L'esame è stato eseguito, previa anestetizzazione dell'animale (chetamina cloridrato e xylazina cloridrato), posizionando a contatto del bulbo oculare delle coppette riempite con un mezzo di accoppiamento (gel per ultrasuoni). I conigli hanno ricevuto nell'occhio destro una singola instillazione (50 µl) di ognuno degli agenti già utilizzati per gli studi di farmacodimanica: a) collirio MEG 01 allo 0,050% di flunarizina, c) collirio allo 0,056% di verapamil, d) collirio allo 0,051% di diltiazem, d) collirio allo 0,043% di nifedipina. Nell'occhio sinistro ricevevano un'instillazione di una stessa quantità di placebo (veicolo del MEG 01 senza principio attivo).

La seguente tabella 4 riporta lo spessore corneale rilevato su vari gruppi di 4 conigli ciascuno, prima dell'instillazione ed ad intervalli di tempo prefissati dopo l'instillazione.

(segue tabella)

Ing. Barzanò & Zanardo
Roma s.p.a.

TABELLA 4

Spessore corneale in conigli trattati topicamente con calcio-antagonisti

		Spessore corneale (mm) al tempo (min)			
Coniglio n.	Occhio	Basale	1 ora	2 ore	3 ore
OD: Collirio MEG 01 allo 0,050% in flunarizina - OS: Placebo					
49	OD	0,394	0,394	0,394	0,394
49	OS	0,394	0,394	0,394	0,394
50	OD	0,347	0,347	0,347	0,347
50	OS	0,347	0,347	0,347	0,347
51	OD	0,386	0,386	0,386	0,386
51	OS	0,386	0,386	0,386	0,386
52	OD	0,363	0,363	0,363	0,363
52	OS	0,363	0,363	0,363	0,363
OD: Collirio allo 0,056% in verapamil - OS: Placebo					
53	OD	0,356	0,376	0,385	0,383
53	OS	0,356	0,358	0,360	0,367
54	OD	0,384	0,398	0,406	0,402
54	OS	0,384	0,382	0,388	0,380
55	OD	0,372	0,387	0,400	0,402
55	OS	0,372	0,374	0,368	0,372
56	OD	0,392	0,401	0,494	0,410
56	OS	0,392	0,390	0,396	0,388
OD: Collirio allo 0,051% in diltiazem - OS: Placebo					
57	OD	0,377	0,380	0,382	0,384
57	OS	0,377	0,380	0,380	0,377
58	OD	0,389	0,392	0,394	0,396
58	OS	0,389	0,389	0,325	0,387
59	OD	0,396	0,400	0,400	0,400
59	OS	0,396	0,396	0,394	0,398
60	OD	0,358	0,362	0,364	0,364
60	OS	0,358	0,358	0,360	0,360
OD: Collirio allo 0,043% in nifedipina - OS: Placebo					
61	OD	0,375	0,380	0,380	0,380
61	OS	0,375	0,375	0,376	0,375
62	OD	0,372	0,380	0,378	0,378
62	OS	0,372	0,374	0,372	0,372
63	OD	0,396	0,398	0,400	0,400
63	OS	0,396	0,396	0,396	0,396
64	OD	0,384	0,388	0,389	0,390
64	OS	0,384	0,382	0,984	0,382

Ing. Barzanò & Zanardo
Roma s.p.a.

Come si potrà notare dai risultati che precedono, con l'uso del prodotto secondo l'invenzione non è stata riscontrata alcuna alterazione dello spessore corneale per tutta la durata della sperimentazione, mentre la soluzione oftalmica a base dello 0,056% di verapamil ha determinato incrementi di spessore corneale dell'ordine di 15-20 µm/ora. Nessun effetto significativo è stato notato per i colliri a base di diltiazem (piccoli incrementi) o di nifedipina.

b. Tollerabilità in acuto

Per valutare la tollerabilità per uso topico oftalmico del calcio-antagonista proposto secondo l'invenzione, i conigli (dello stesso tipo di quelli utilizzati per le sperimentazioni già descritte) sono stati trattati, dopo il periodo di acclimatazione iniziale, come segue: il primo giorno si sono praticate 12 instillazioni di 0,05 ml ciascuna del collirio MEG 01 (0,05%) a distanza di 30 minuti una dall'altra, nel fornice congiuntivale destro. L'occhio controlaterale è stato trattato con il placebo ed è servito come controllo.

Lo stato dei tessuti oculari è stato osservato seguendo il test di Draize modificato (Spampinato S., Marino A., Bucolo C., Canossa M., Bachetti T., Mangiafico S. Effect of sodium naproxen eye drops on rabbit ocular inflammation induced by sodium arachidonate, J. Ocular Pharm., 7 (2); 125-133, (1991)). Le osservazioni sono state eseguite ogni ora a partire dalla prima somministrazione per 7 ore, e poi 24, 48 e 72 ore dopo l'ultimo trattamento, assegnando punteggi arbitrari ai vari aspetti della congiuntiva palpebrale e bulbare, dell'iride e della cornea.

Non è stato osservato alcun arrossamento significativo della

Ing. Barzanò & Zanardo Roma s.p.a.

congiuntiva per tutto l'arco della sperimentazione sia negli occhi trattati con il collirio MEG 01 (0,05% sia in quelli trattati con il placebo, né è stato riscontrato alcun edema in alcuno degli occhi testati. Inoltre, non si è osservata alcuna alterazione a carico dell'iride in tutti gli occhi esaminati, e la presenza di materiale di spurgo si è mantenuta su livelli normali. Anche per quanto riguarda la cornea non è stato riscontrato alcun danno; soltanto in due occhi si è verificata una leggera disepitelizzarione.

I risultati ottenuti permettono di concludere che il collirio MEG 01 a base di flunarizina allo 0,05% è ben tollerato nell'occhio del coniglio dopo instillazione ripetuta nel fornice congiuntivale.

Studi di binding

La tecnica del binding recettoriale è stata eseguita su membrane cellulari ottenute dal complesso iride-corpo ciliare prelevato, dopo sacrificio, da conigli albini maschi del ceppo New Zealand (Charles River Italiana, di Calco (CO)). Il tessuto è stato omogenato in tampone e si è isolata la frazione P_2, ricca di proteine della membrana cellulare, preparata per centrifugazione secondo quanto descritto in letteratura (Mach R.H., Smith C.R., Childers S.R. Ibogaine posseses a sective affinity for sigma 2 receptors, Life Sci. 57(4); 57-62). La concentrazione di proteine totali è stata determinata con il metodo di Lowry.

Aliquote della frazione P_2 dell'omogenato contenenti rispettivamente 300 µg di proteine totali sono state incubate in provette di polipropilene contenenti quantità scalari dei calcio-antagonisti saggiati (flunarizina, verapamil, nifedipina e nimodipina) ed una quantità nota di

Ing. Barzanò & Zanardo Roma s.p.a.

^{3}H(+)-N-allil-nor-metazocina (SKF) (utilizzata sperimentalmente come ligando σ). Il legame non specifico è stato valutato in presenza di aloperidolo.

Tutte le prove sono state eseguite in duplicato. La reazione è stata condotta a 37°C per 150 minuti, seguita da una filtrazione con filtri WhatmannGF/B. La radioattività rimasta sui filtri è stata misurata mediante spettrometria per scintillazione liquida. La IC_{50} è stata calcolata, e i risultati ottenuti sono riportati nella tabella seguente.

TABELLA 5

Effetti di vari calcio-antagonisti sull'inibizione del binding con ^{3}H(+)-N-allil-nor-metazocina

Sostanza	IC_{50} (nM)
flunarizina	23,9
verapamil	> 10000
nifedipina	> 10000
nimodipina	> 10000
diltiazem	> 10000

I dati che precedono confermano quanto trovato nella ricerca che ha condotto alla presente invenzione, su cui si è già precedentemente discusso, e cioè che la flunarizina mostra un'affinità sui recettori σ-1, al contrario di quanto avviene per gli altri calcio-antagonisti più noti e studiati, come ad es. il verapamil, la nifedipina e il diltiazem. Ciò suggerisce che nel meccanismo responsabile della diminuzione della pressione intraoculare da parte della flunarizina siano coinvolti i recettori σ-1, e che sia questa particolarità ad essere responsabile della sorprendente maggiore attività della flunarizina come agente antiglau-

Ing. Barzanò & Zanardo Roma s.p.a.

coma per uso topico.

La presente invenzione è stata descritta con riferimento ad alcune sue forme di realizzazione specifiche, ma è da intendersi che variazioni o modifiche potranno essere ad essa apportate dagli esperti nel ramo senza per questo uscire dal relativo ambito di protezione.

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Marina Banchetti
(N° d'iscr. 453)

Marina Banchetti

Ing. Barzano' & Zanardo
Roma s.p.a.



RM 97 A 000613

RIVENDICAZIONI

1. Uso della flunarizina per la produzione di un preparato topico oftalmico per il trattamento e/o la prevenzione del glaucoma.

2. Uso secondo la rivendicazione 1, in cui detto preparato topico oftalmico è in forma di soluzione o di sospensione acquosa, di unguento o di pomata in un veicolo oftalmico farmaceuticamente accettabile, oppure di inserto oculare erodibile o di sistema "reservoir" a membrana polimerica da disporre nel sacco congiuntivale.

3. Uso secondo le rivendicazioni 1 o 2, in cui la concentrazione di flunarizina in detto preparato oftalmico è compresa tra lo 0,001% e lo 0,500% in peso.

4. Uso secondo la rivendicazione 3, in cui detta concentrazione è pari allo 0,05% in peso di flunarizina.

5. Uso secondo ognuna delle rivendicazioni precedenti in cui la flunarizina è presente in detto preparato nella forma del corrispondente cloridrato.

6. Uso secondo ognuna delle rivendicazioni 3-6, in cui detto preparato topico oftalmico è in forma di soluzione acquosa, e contiene, oltre a detta flunarizina, uno o più agenti regolatori della tonicità e uno o più tamponi.

7. Uso secondo la rivendicazione 6, in cui detto preparato topico oftalmico comprende inoltre uno o più agenti migliorativi della tollerabilità oculare scelto tra polisorbato 80 (o Tween 80), destrano, polietilenglicole.

8. Uso secondo le rivendicazioni 6 o 7 in cui detto preparato

Ing. Barzano' & Zanardo
Roma s.p.a.

topico oftalmico comprende inoltre uno o più agenti conservanti o antimicrobici.

9. Composizione oftalmica per l'uso per il trattamento topico del glaucoma, comprendente come principio attivo una quantità terapeuticamente efficace di flunarizina.

10. Composizione secondo la rivendicazione 9, comprendente una quantità di flunarizina compresa tra lo 0,001% e lo 0,500% in peso.

11. Composizione secondo la rivendicazione 10, comprendente i seguenti ingredienti nelle quantità indicate:

flunarizina cloridrato	0,052 %
(equiv. a 0,05% di flunarizina)	
cloruro di sodio	0,10-0,80 %
tampone trizma	0,02-0,20 %
PEG 400	1,00-6,00 %
Tween 80	2,00-12,00 %
acqua p.p.i.	q.b. a 100 %

assieme ad eventuali altri eccipienti farmaceuticamente accettabili.

12. Composizione secondo la rivendicazione 11, avente la seguente formulazione:

flunarizina cloridrato	0,052 %
(equiv. a 0,05% di flunarizina)	
cloruro di sodio	0,533 %
tampone trizma	0,066 %
PEG 400	2,500 %
Tween 80	5,00 %

Ing. Barzanò & Zanardo
Roma S.p.A.

acqua p.p.i. q.b. a 100 %.

13. Uso della flunarizina per la produzione di un preparato topico oftalmico per il trattamento del glaucoma e relative composizioni, secondo le rivendicazioni 1-12, sostanzialmente come sopra illustrato e descritto.

ROMA, 10 OTT. 1997

p.p. MEDIVIS s.r.l.

ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Marina Banchetti
(N° d'iscr. 463)

MB

Marina Banchetti

Ing. Barzano' & Zanardo
Roma s.p.a.

MINISTERO INDUSTRIA COMMERCIO E ARTIGIANATO
UFFICIO PROV. IND. COMM. E ART. ROMA

RM 97 A 000613

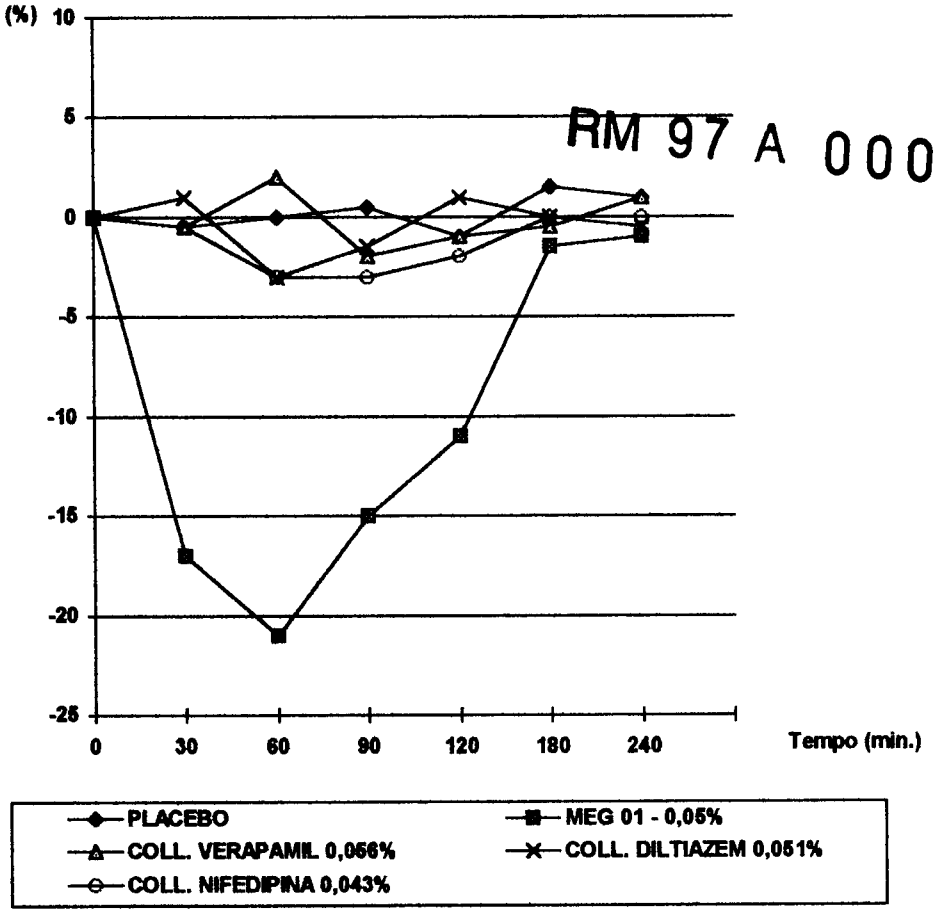


Fig. 1

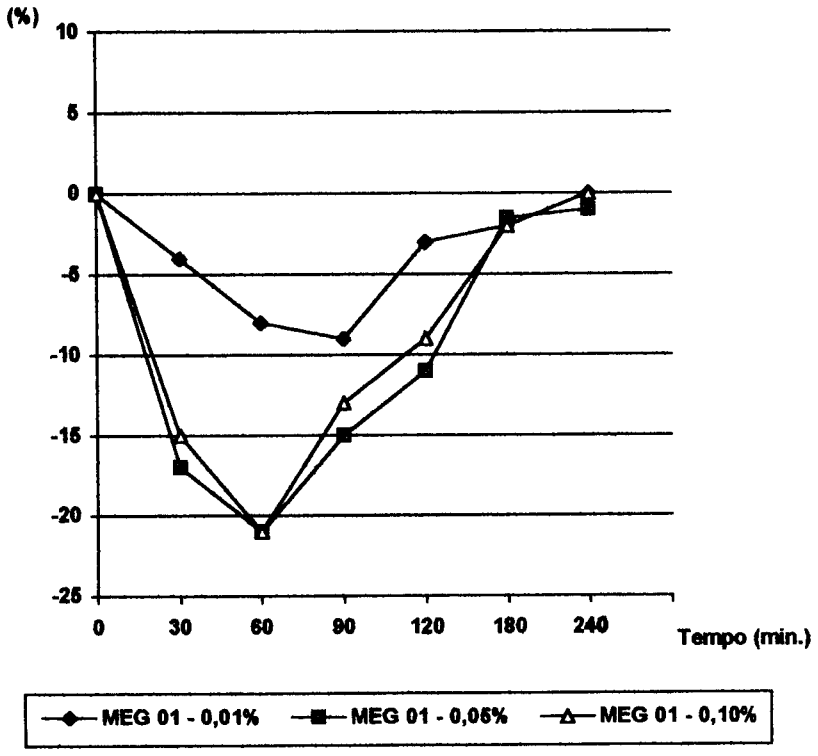


Fig. 2

p.p.: MEDIVIS S.r.l.
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Marina Banchetti