



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA NUMERO	101999900768646
Data Deposito	22/06/1999
Data Pubblicazione	22/12/2000

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Titolo

USO DELLA PROTEINA UK 114 PER INIBIRE IL RIGETTO DEI TRAPIANTI D'ORGANO.
--

5816 M Descrizione dell'invenzione industriale avente per titolo:

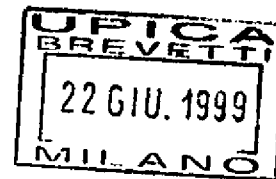
MAB/as "USO DELLA PROTEINA UK 114 PER INIBIRE IL RIGETTO DEI
TRAPIANTI D'ORGANO"

MI 99 A 001384

a nome : ZETESIS S.p.A.

con sede in: Milano

* *



La presente invenzione ha per oggetto l'uso della proteina UK 114 per ridurre o inibire il rigetto di trapianti d'organo, e per mantenere l'accettazione del trapianto stesso.

Attualmente la continua evoluzione delle tecniche chirurgiche, insieme allo sviluppo di farmaci immunosoppressivi relativamente selettivi e più efficaci, hanno comportato un aumento nella riuscita dei trapianti d'organo.

Tuttavia, nella pratica, il trapianto di organi come terapia risolutiva nel caso di insufficienze d'organo terminali presenta ancora il grave problema della reazione di rigetto, che viene affrontato mediante trattamento con farmaci immunosoppressivi: con la conseguenza che le infezioni diffuse sono ancora la principale causa di morte nei pazienti trapiantati. Inoltre la terapia immunosoppressiva non può mai essere completamente sospesa nemmeno dopo il superamento dell'eventuale crisi di rigetto, ma deve essere continuata come terapia di mantenimento per tutta la vita del paziente, sebbene a dosi relativamente modeste.

Il rigetto negli allotrapianti (tra individui geneticamente diversi di una stessa specie) può avvenire in base a una risposta immunitaria di tipo cellulo-mediata o umorale contro gli antigeni di istocompatibilità (HLA) presenti sulle membrane delle cellule del donatore.

La reazione immunitaria cellulo-mediata provoca la distruzione del trapianto entro giorni o mesi dall'intervento (**rigetto acuto**) ed è caratterizzata da progressiva infiltrazione di cellule mononucleate (macrofagi, linfociti e monociti) all'interno del tessuto trapiantato; se queste cellule individuano antigeni non propri, comportano l'attivazione dei linfociti T, che stimolano una risposta immunitaria, di tipo sia cellulare (cellule T) sia umorale (cellule B) che porta alla distruzione del trapianto. Questo tipo di rigetto cellulo-mediato può sovente essere contrastato con una forte terapia immunosoppressiva. In caso di risoluzione, difficilmente si verifica un nuovo episodio di rigetto acuto, e l'allotrapianto generalmente sopravvive per periodi prolungati.

Il ruolo degli anticorpi umorali nel rigetto si manifesta chiaramente quando il paziente sia stato presensibilizzato agli antigeni HLA presenti nel trapianto: in questi casi si verifica la distruzione dell'organo trapiantato nell'arco di poche ore o minuti dopo la rivascolarizzazione (**rigetto iperacuto**).

Il **rigetto cronico** è un deterioramento tardivo, graduale ma inesorabile, che si verifica in un periodo successivo al trapianto, che può andare da molti mesi a parecchi anni. I meccanismi immunologici alla base del rigetto cronico sono meno chiari. Il quadro istologico è diverso da quello del rigetto acuto, ed è caratterizzato da lesioni principalmente a carico dell'endotelio vascolare, dove la proliferazione estesa provoca la graduale occlusione del lume vascolare, ischemia e fibrosi del tessuto dell'organo trapiantato.

Il trattamento immunosoppressore per controllare il rigetto di organi si basa attualmente sull'uso di corticosteroidi, azatioprina (o ciclofosfamide in caso di intolleranza all'azatioprina) e ciclosporina, sovente in associazione tra

loro.

Tuttavia ognuno di questi farmaci comporta numerosi effetti collaterali indesiderati, che possono essere riassunti come segue:

- corticosteroidi: diabetogenicità, aumento del catabolismo delle proteine, atrofia della corteccia surrenalica, riduzione della risposta del tessuto connettivo alle lesioni, miopatie, osteoporosi, effetti sul sistema emopoietico e sul sistema nervoso);
- azatioprina: depressione del midollo osseo, epatite;
- ciclofosfamide: nefrotossicità;
- ciclosporina: nefrotossicità, epatotossicità, ipertensione refrattaria e aumento delle neoplasie.

Risulta evidente, pertanto, la necessità di una terapia alternativa che inibisca o limiti il rigetto di un organo o tessuto trapiantato, o che comunque aumenti la "accettazione" del trapianto da parte dell'organismo ricevente, che non comporti tutta la serie di effetti collaterali sopra indicati.

Si è ora trovato, e costituisce l'oggetto dell'invenzione, che la proteina avente peso molecolare pari circa a 14 kDa in SDS-PAGE ed ottenibile per estrazione da fegato di mammiferi con acido perclorico, descritta in WO 97/30154 e in WO 96/02567 e nota con il nome di UK 114, possiede la capacità di ridurre o inibire il rigetto in caso di allotrapianti d'organo e di mantenere l'accettazione del trapianto stesso, senza tuttavia provocare gli effetti collaterali tipici dei farmaci immunosoppressivi noti.

La proteina UK 114 agisce sul sistema immunitario, esercitando effetti pleiotropici probabilmente attraverso una modulazione della produzione di citochine da parte di cellule T e macrofagi.

Secondo l'invenzione, la proteina UK 114 di origine estrattiva o ricombinante sarà somministrata per via parenterale, per esempio per via intramuscolare, endovenosa, intraperitoneale, sottocutanea, o sublinguale.

Forme di formulazione preferite saranno forme iniettabili, come soluzioni o sospensioni, polveri sterili per la preparazione di soluzioni o sospensioni iniettabili; o forme solide quali compresse per la somministrazione sublinguale.

La proteina dell'invenzione potrà eventualmente essere somministrata in associazione con altri farmaci immunosoppressivi convenzionali, quali corticosteroidi, azatioprina, ciclofosfamide, ciclosporina, anche in combinazione tra loro.

La dose da somministrare dipenderà ovviamente da numerosi fattori, quali le caratteristiche individuali del paziente (peso, ecc.) così come il tipo di organo o tessuto trapiantato o in attesa di essere trapiantato. In generale, tuttavia, la quantità di UK 114 da somministrare varierà da 0,1 a 30 mg/kg/die per un periodo da 1 a 6 mesi dal trapianto. In seguito, per la terapia di mantenimento.

Le modalità di somministrazione, quali dosaggio, via di somministrazione, durata del trattamento d'attacco e di mantenimento, eventuale somministrazione di agenti immunosoppressivi o chemioterapici noti, contemporaneamente o separatamente, saranno definite dal clinico esperto.

Il seguente esempio illustra ulteriormente l'invenzione

Esempio

Trapianti di isole pancreatiche nel topo.

Tra 400 e 500 isole pancreatiche erano preparate da topi NOD euglicemici di 5-6 settimane di vita, ottenuti dalla Charles River (Calco, Italia), ed impiantate sotto la capsula renale di topi NOD femmine affette da diabete spontaneo di recente insorgenza (7-4 giorni) secondo la metodica descritta da Mellgren A. et al., in *Diabetologia*, 1986, 29:670. Questa metodica è in grado di ripristinare una condizione di normoglicemia nei topi NOD che è seguita dalla ricomparsa dell'iperglicemia entro 6-8 giorni, dovuta alla distruzione delle isole trapiantate (vedi Sandberg J.O. et al., *Clin. Exp. Immunol.*, 1997, 108:314).

Trattamento con UK 114

Cominciando due giorni prima del trapianto, e successivamente ogni giorno per tutta la durata dell'esperimento, tre gruppi di topi NOD diabetici di 2-25 settimane di vita (15 animali/gruppo) erano trattati intraperitonealmente con UK 114 alla dose di 30 o 60 µg/topo (in 0.1 o 0.2 ml) o con 0.2 ml di PBS. Negli animali la glicemia veniva misurata nei giorni 3, 6, 9, 12 e 14 dopo il trapianto da campioni di sangue prelevati dalla coda (ExacTech, Baxter Travenol, Deerfield, IL). Gli animali venivano considerati diabetici quando la glicemia superava 11,8 mmol/l dopo 6 ore digiuno.

Durante il corso dell'esperimento un animale del gruppo di controllo ed un altro del gruppo trattato con UK 114 a bassa dose morivano al giorno 2 e 3 dopo il trapianto e non venivano quindi considerati nel calcolo dei dati.

Al giorno 3 dello studio, 5/14 topi del gruppo di controllo trattati con PBS erano ancora normoglicemici, al giorno 6 un solo topo di questo gruppo era normoglicemico, e al giorno 9 tutti gli animali erano francamente iperglicemici con valori medi (SD) di glicemia di $16,2 \pm 3,2$ mmol/l, che erano

ulteriormente incrementati a $18,9 \pm 4,5$ al quattordicesimo giorno (Vedi tabella).

In netto contrasto, il trattamento con UK 114 preveniva la ricomparsa dell'iperglicemia nei topi NOD trapiantati in maniera dose dipendente. Negli animali trattati con 30 μg di UK 114, 12/14 animali erano normoglicemici al giorno 6 e 11 su 14 al giorno 9 e 14 (Vedi tabella). Nessuno dei 15 animali trattati con la dose più alta di UK 114 diveniva diabetico durante i 14 giorni successivi al trapianto (Vedi tabella).

Questi dati dimostrano che la somministrazione di UK 114 è in grado di prevenire, o comunque ritardare, il rigetto di isole pancreatiche in un ben noto modello animale e suggeriscono il potenziale uso del trattamento con UK 114 nella prevenzione del rigetto di trapianto di isole pancreatiche in pazienti con IDDM.

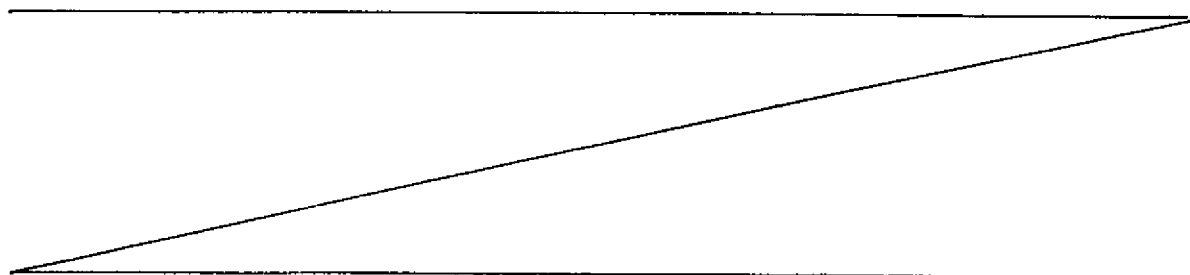
TABELLA

Giorni	3	6	9	14
PBS	9/14 diabetici ^a	13/14 diabetici ^d	14/14 diabetici ^d	14/14 diabetici ^d
UK 114 30 μg	2/14 diabetici ^b	3/14 diabetici ^c	3/14 diabetici ^e	3/14 diabetici ^e
UK 114 60 μg	0/15 diabetici ^c	0/15 diabetici ^f	0/15 diabetici ^f	0/15 diabetici ^f

b vs a, $p = 0,02$ con chi-quadro

c vs a, $p < 0,0001$ con chi-quadro

e, f, vs d, $p < 0,0001$ con chi-quadro.



RIVENDICAZIONI

1. Uso della proteina UK 114 per la preparazione di medicinali per ridurre o inibire il rigetto di trapianti d'organo e per mantenere l'accettazione del trapianto stesso.
2. Uso secondo la rivendicazione 1, per ridurre o inibire il rigetto di trapianti di cellule di Langerhans.
3. Proteina UK 114 come agente anti-rigetto.

Milano, 22 giugno 1999

Il Mandatario
(Minoja Fabrizio)
di Bianchetti • Bracco • Minoja S.r.l.

Fabrizio

