



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

UIBM

DOMANDA NUMERO	101990900128686
Data Deposito	29/06/1990
Data Pubblicazione	29/12/1991

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Titolo

POLYPEPTIDE CONTENENTE ZUCCHERI AD ATTIVITA' IMMUNOMODULANTE ED ANTITUMORALE PROCEDIMENTO PER IL SUO ISOLAMENTO E COMPOSIZIONI FARMACEUTICHE CHE LO CONTENGONO

D E S C R I Z I O N E

annessa a domanda di brevetto per INVENZIONE
INDUSTRIALE dal titolo:

"POLIPEPTIDE CONTENENTE ZUCCHERI AD ATTIVITA'
IMMUNOMODULANTE ED ANTITUMORALE, PROCEDIMENTO PER IL
SUO ISOLAMENTO E COMPOSIZIONI FARMACEUTICHE CHE LO
CONTENGONO"

Richiedenti: 1) Renata Maria Anna CAVALIERE ved.

VESELY di nazionalità italiana
residente a MILANO

2) Claudio DE SIMONE di nazionalità
italiana residente ad ARDEA (Roma)

Mandatari: Ing. Giuseppe Righetti, iscritto
all'Albo con il n. 7, Ing. Carlo Raoul
Ghioni, iscritto all'Albo con il n.
280, Ing. Martino Salvadori, iscritto
all'Albo con il n. 438, della BUGNION
S.p.A. - Via Carlo Farini 81 - Milano.

Depositata il: 29 GIU. 1990 al n.:

2081 CA/90

R I A S S U N T O

Viene descritto un nuovo polipeptide contenente
zuccheri che è stato isolato da un preparato di
natura glicolipoproteica ottenuto per elettrodialisi
di una sospensione in acqua di Streptococcus

thermophilus. Il preparato, sottoposto ad una corsa elettroforetica su gel di poliacrilamide al 12% e successiva colorazione con Coomassie blue e silver staining, ha evidenziato una frazione con peso molecolare compreso tra 12 e 75 Kda. Il composto ha dimostrato di possedere sorprendenti proprietà immunomodulanti ed antitumorali, e può essere quindi utilizzato con successo nella terapia e prevenzione delle malattie tumorali della specie più diversa.

D E S C R I Z I O N E

La presente invenzione ha per oggetto un nuovo polipeptide contenente zuccheri, il procedimento per il suo isolamento da un preparato ottenuto per elettrodialisi di una sospensione in acqua di Streptococcus thermophilus, e il suo impiego in composizioni farmaceutiche che lo contengono nella terapia e prevenzione di malattie tumorali o ad attività immunomodulante.

Da molti anni si è cercato di individuare sostanze di origine naturale con proprietà immunomodulanti. Inoltre l'uso di preparati batterici utilizzati per modificare o in qualche modo modulare la risposta immunitaria dell'ospite nei confronti di antigeni è ormai entrato nell'uso comune sotto forma di preparati vaccinici e/o adiuvanti.

Anche ben conosciuta è l'attività immunomodulante posseduta da costituenti della parete batterica o sostanze liberate da essi. In questo senso è risultato interessante studiare le proprietà dei batteri acido-lattici, le cui attività benefiche nel trattamento dei disturbi dell'apparato digerente e del tratto intestinale sono note da tempo.

Il primo a riferire su un'attività terapeutica dei prodotti caseari in genere sembra sia stato all'inizio del secolo H.H. Metchnikov. Egli scriveva che "Lactobacillus bulgaricus esercita la sua attività antiinfettiva non solo grazie all'acido lattico, ma anche attraverso una particolare sostanza prodotta da questo microorganismo". Gli studi sulle proprietà e sulla possibilità di isolare prodotti estremamente attivi dai derivati del latte si sono sviluppati con successi spesso discordi. Solo agli inizi degli anni '80 hanno però cominciato ad apparire resoconti approfonditi sui tentativi eseguiti da vari ricercatori di isolare sostanze ben definite che potessero essere utilizzate per la cura delle malattie tumorali. Ciò è stato facilitato ed aiutato anche dall'enorme impatto che lo yogurt, e i derivati del latte in genere, hanno avuto sulla alimentazione base mondiale.

Così A.D. Ayebo et al. descrivono in Dairy Science 64, 2318-2323, 1981, due metodi di frazionamento per separare componenti antitumorali dallo yogurt. In tale rapporto si ammette in particolare che l'attività antitumorale sembra dovuta ad un componente (o a componenti) con peso molecolare minore o uguale a 14.000, non legato presumibilmente ad un composto maggiore, in quanto può essere separato per dialisi.

I. Kato et al., Gann 72, 517-523, 1981, hanno descritto l'effetto di Lactobacillus casei sulla crescita di tumori allogenicici e singenicici nel topo. Le proprietà antitumorali di Lattobacilli e di prodotti caseari fermentati mediante Lattobacilli sono descritte da B.A. Friend et al. (Journal of Food Protection, 47, No. 9 717-723, 1984). Il ruolo terapeutico giocato da altri lattobacilli, quali ad esempio L. acidophilus, L. lactis, B. bifidum e S. faecium, è stato descritto da C.F. Fernandes et al. (Fems Microbiology Reviews 46, 343-356, 1987, e la letteratura lì citata). L'inibizione della crescita di tumori da parte di prodotti caseari è stata anche descritta da S. Tsuru et al. in J. Clin. Lab. Immunol. 25, 177-183, 1988. Viene in particolare affermato qui che formaggi e yogurt esercitano

effetti benefici sulla crescita di tumori murini trapiantati. Come lattobacilli si menzionano in particolare *Lactobacillus bulgaricus*.

Una sostanza antimicrobica ottenuta da *Lactobacillus reuteri* è descritta da T. Talarico et al. (*Antimicrobial agents and Chemotherapy* 33, 674-679, 1989). Dal EP-228861 è inoltre noto ottenere prodotti a base di cellule batteriche con attività antitumorale coltivando un microorganismo del genere *Streptococcus*, *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. In questo brevetto non viene in particolare menzionato *S. thermophilus*.

Il WO-86212039 descrive un vaccino contenente un antigene e un adiuvante comprendente cellule di *Streptococcus hemolyticus* che sono state trattate con penicillina.

Scopo della presente invenzione era ora quello di isolare da particolari batteri lattici una sostanza pura ed unitaria che presentasse elevata attività terapeutica e potesse essere utilizzata in preparati usuali come immunomodulante ed antitumorale. Poiché infatti in tutta la letteratura nota sull'argomento non si fa nessun accenno ad un composto ben definito, si voleva riuscire a comprendere se gli effetti terapeutici descritti fossero attribuibili

ad una sostanza unica o se invece derivassero piuttosto da una massa cellulare che agisce come tale e la cui scomposizione non fosse in alcun modo possibile.

Per raggiungere tale scopo, batteri liofilizzati e ricostituiti al momento con acqua (*S. thermophilus*) sono stati centrifugati ottenendo un surnatante ed un sedimento. Il surnatante viene scartato e il sedimento sottoposto ad elettrodialisi ottenendo nuovamente un surnatante ed un sedimento. Questo surnatante viene miscelato con proteasi e dializzato, per cui si recupera un liquido torbido che viene centrifugato fornendo un surnatante ed un sedimento. Dal surnatante si è riusciti ad isolare una sostanza (denominata in seguito per brevità CDS90) che si è rivelata dotata di eccezionali proprietà terapeutiche, in particolare come immunomodulante ed antitumorale. Allo scopo di determinarne la struttura, il campione liofilizzato, che si presenta come una polvere di colore marrone, è stato sottoposto a gas-cromatografia per analizzare il suo contenuto in zuccheri, ad analisi per il contenuto in aminoacidi, alla HPLC (high pressure liquid chromatography) e ad elettroforesi. E' stato anche eseguito un riconoscimento antigenico

da parte di anticorpi policlonali specifici ottenuti da conigli immunizzati con *S. thermophilus*.

Mentre i risultati della gas-cromatografia e dell'analisi degli aminoacidi sono riportati rispettivamente in Tabella 1 e 2, la HPLC ha evidenziato la presenza di due picchi principali a 220 e 280 nm (allegato 3) e l'elettroforesi ha permesso di individuare la presenza di bande glicolipoproteiche e con peso molecolare compreso tra 12 e 75 Kda.

Oggetto dell'invenzione è pertanto un nuovo polipeptide contenente zuccheri caratterizzato dal fatto di :

a) essere una polvere marroncina amorfa che alla termogravimetria presenta una graduale perdita di peso da 30°C e successivamente una più netta da 193°C a 225°C per poi continuare a degradarsi;

b) avere la seguente composizione degli aminoacidi (% in moli):

asparagina	8,511
treonina	5,202
serina	7,287
glutamina	21,040
prolina	10,063
glicina	3,359

alanina	5,189
cisteina 1/2	1,092
cisteina	0,476
valina	5,357
metionina solfossido	2,026
isoleucina	4,383
leucina	8,941
tirosina	3,375
fenilalanina	3,510
lisina	6,478
istidina	1,776
arginina	1,938

c) avere la seguente analisi del contenuto ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
in zuccheri (soluzione di base 5 mg/ml, solvente HCl
1N + acqua, colonna GF 3% SF2330):

fucosio	4,5
ribosio	6,0
xilosio	43,0
mannosio	2,2
galattosio	11,2
glucosio	8,5

d) avere uno spettro di assorbimento infrarosso in
KBr con valori caratteristici a 3297, 3106, 3064,
2961, 2930, 1653, 1540, 1448, 1398, 1243, 667, 620 e
570 cm^{-1} ;

e) avere uno spettro di assorbimento infrarosso in Nujol con valori caratteristici a 3386, 3299, 3064, 2952, 2924, 2854, 1652, 1544, 1460, 1376, 1308 e 721 cm^{-1}

f) avere un peso molecolare di 12-75 Kda;

g) presentare i seguenti valori alla microanalisi :

C% 47,71

H% 6,96

N% 12,30

Le condizioni per la HPLC che hanno evidenziato il preparato oggetto della presente invenzione sono state le seguenti :

Cromotografo : DIDNEX BIO LC

Colonna : Ion PAC S/N 33 a scambio ionico

Eluenti : a) TRIS 20 mM, pH 9,2,; b) TRIS 20mM + NaCl 1M

Gradienti : 100% di a), 0% di b)----0% a), 100% b) in 30 min., iso 100% b), 20 min.

Pressione : 800 psi

Flusso : 1 ml/min

Rivelatore : spettrofotometro UV canale 1 = λ 220nm;
canale 2 = λ 280 nm.

AUFS : 0,5-0,1, rispettivamente

Velocità carta : 0,5 cm/minuto. Il CDS90 (1-10 mcg/ml) è stato iniettato in volume pari a 25 μl .

Prima di essere sottoposto a corsa elettroforetica, il CDS90 è stato diluito 1:1 in una soluzione composta da 25 M TRIS-HCl pH 6,8, 10% sodio dodecilsolfato (SDS), 50% glicerolo, 5% mercaptoetanololo, 1 mg/ml blu di bromofenolo, e quindi portato alla temperatura di 100°C per 2-5 minuti. Il gel al 12% di acrilamide-bis-acrilamide ha la composizione seguente : 1 M TRIS-HCl pH 8,8, 0,25 M TRIS-HCl pH 6,8, 10% SDS in acqua, 50% glicerolo, 10% ammonio persolfato in acqua, N,N,N',N'-tetrametilendiamina, 1 ml per % di gel. dopo aver caricato i pozzetti nel gel, il CDS90 è stato fatto migrare applicando una corrente di 1 mA x cm² di gel per 60-120 minuti. Il tampone per la corsa elettroforetica ha un pH di 8,4 e la composizione seguente : TRIS 48 mM, glicina 39 mM, SDS 0,0375% (peso/vol) + 20% mercaptoetanololo, il tutto portato ad un volume di 1000 ml con acqua. Al termine della corsa elettroforetica si è provveduto alla colorazione con Coomassie blue e Silver staining, il che ha permesso di individuare le bande menzionate con peso molecolare compreso tra 12 e 75 Kda.

Come menzionato sopra, la fase iniziale della procedura utilizzata per ottenere il prodotto della

presente invenzione consiste nella separazione della componente batterica su batteri liofilizzati e ricostituiti al momento con acqua. La tecnica usata è stata l'elettrodialisi, metodica che sfrutta le caratteristiche fisico-chimiche delle proteine (carica elettrica e dimensioni), con conseguente migrazione in un campo elettrico, ottenendo la loro purificazione. Durante il procedimento il pH della miscela è stato costantemente controllato e mantenuto sul valore di 7 mediante trietilamina (TEM).

Al termine dell'elettrodialisi (tre giorni) sono stati ottenuti due campioni che sono stati centrifugati per venti minuti a 4000 rpm. Il surnatante ottenuto è stato raccolto e si è provveduto all'allontanamento di eventuali residui di DNA e RNA mediante l'aggiunta di proteasi (desossiribonucleasi da pancreas bovino, grade 2, disciolta in acqua, RNasi in 1mM MgCl₂). Il preparato è stato messo in una membrana semipermeabile per dialisi che ha consentito l'ulteriore separazione di molecole di piccole dimensioni con peso molecolare inferiore a 15000 Dalton trasportate passivamente durante l'elettrodialisi. La membrana è stata immersa in 500

ml di PBS + 0,51 MgCl₂ per un giorno. Il PBS è stato quindi rimosso e sostituito con acqua distillata e mantenuto in dialisi per tre giorni a 4°C. Il contenuto della membrana è stato quindi centrifugato fornendo un sedimento ed un surnatante; quest'ultimo raccolto e seccato ha fornito il polipeptide dell'invenzione.

Oggetto della presente invenzione è quindi anche un procedimento per preparare il polipeptide dell'invenzione, il quale è caratterizzato dal fatto che :

- a) si centrifugano batteri di *S. thermophilus* liofilizzati e ricostituiti al momento con acqua a dare un surnatante ed un sedimento,
- b) il sedimento viene sottoposto ad elettrodialisi a dare un nuovo sedimento ed un nuovo surnatante,
- c) il surnatante viene miscelato con proteasi e dializzato, e
- d) il prodotto della dialisi viene raccolto e centrifugato fornendo un surnatante dal quale si isola il prodotto dell'invenzione.

Il riconoscimento antigenico del polipeptide dell'invenzione è stato eseguito come segue.

1. Preparazione degli anticorpi policlonali.

Sono stati immunizzati 9 conigli iniettando loro per

via endovenosa 400 mcg di batteri liofilizzati (*S. thermophilus*) risospesi in 0,5 ml di FBS e 0,5 ml di adiuvante completo di Freund al giorno 0 e successivamente ad intervalli di 2-3 settimane. Gli animali sono stati sacrificati dopo 50-70 giorni ed il siero raccolto è stato congelato a -70°C prima di essere utilizzato nel test ELISA. L'antisiero ottenuto è stato denominato per brevità AS-DD90.

2. Riconoscimento antigenico del CDSD90 da parte del AS-DD90 mediante ELISA.

Una quantità nota (2 $\mu\text{g/ml}$) di CDSD90 in cloroformio-etanolo 1:9 è stata fatta aderire su un supporto di plastica per trenta minuti a temperatura ambiente e sotto agitazione continua (nel caso specifico i pozzetti delle piastre per ELISA). Si è poi proceduto a 3 lavaggi dei pozzetti con PBS. Ad ogni pozzetto è stato aggiunto l'antisiero (100 μl in diluizioni scalari fino a 5×10^{-6}). Dopo 60 minuti di incubazione su agitatore, ai pozzetti lavati 4 volte con PBS-Tween 20 (Tween 10% in PBS pH 7-7,5) è stato aggiunto un anticorpo specie-specifico coniugato con perossidasi (diluizione finale 1:5000) per 30 minuti a temperatura ambiente e sotto agitazione continua. Si sono poi eseguiti 4 lavaggi con PBS-Tween 20.

Dopo aver aggiunto 100 mcg di substrato, responsabile della colorazione in caso di reazione positiva, si sono eseguiti 5 lavaggi con PBS ed al termine della reazione con 40 mcg di acido solforico. L'intensità del colore, valutata come densità ottica allo spettrofotometro, è proporzionale alla quantità di anticorpi presenti. I risultati del test ELISA dimostrano che il siero dei conigli immunizzati con *S. thermophilus* contiene anticorpi in grado di riconoscere il CDS90 a 5×10^{-6} . Il prodotto oggetto dell'invenzione è quindi un prodotto derivato da *S. thermophilus*.

PARTE FARMACOLOGICA

1. Tossicità

A topi Balb/C e C57BL6 del peso di 20 g si inoculano per via i.p. D-galattosamina/HCl (D-Gal) e poi CDS90 a diverse concentrazioni. I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 5.

2. Pirogenicità

Per valutare l'eventuale pirogenicità del composto in oggetto si sono utilizzati conigli ai quali per via endovenosa viene inoculato CDS90 alle dosi di 10 e 100 µg/kg. La misurazione della temperatura corporea degli animali effettuata il giorno successivo ha dimostrato che il prodotto non è

pirogenico (vedere Tabella 6).

3. Colture linfocitarie murine

L'effetto del CDSD90 sulla proliferazione dei linfociti è stato valutato utilizzando milze prelevate da topi CH₃/nunu, CH₃/HeN, CH₃/HeJ e Balb/C. I linfociti ottenuti (4×10^6 /ml) sono stati posti in coltura in micropiastre a 96 pozzetti in presenza o meno di CDSD90 per 48 ore, a 37°C e in un'atmosfera con l'8% di CO₂. Trascorso questo tempo le cellule sono state marcate con timidina triziata (1 μ Ci) e dopo ulteriori 12 ore di incubazione, le cellule sono state raccolte e l'incorporazione di timidina è stata letta con un Beta-Counter (Tabella 7).

Il CDSD90 stimola la proliferazione linfocitaria nei topi Balb/C. Nei topi CH₃/nunu che sono privi di linfociti T, l'aumentata proliferazione linfocitaria in presenza di CDSD90 testimonia una stimolazione blastogenica a carico dei B linfociti. La proliferazione linfocitaria osservata nei topi CH₃/HeN (LPS sensibili) ed in quelli CH₃/HeJ (LPS resistenti) conferma che il CDSD90 è attivo in sistemi LPS sensibili e LPS resistenti.

4. Produzione di TNF α da parte dei macrofagi murini.

I macrofagi sono stati prelevati dal midollo osseo

di topi CH₃/HeJ (LPS resistenti) e CH₃/HeN (LPS sensibili). Le cellule sono state contaminate, sospese alla concentrazione di 5×10^5 /ml in terreno di Pluznik all'interno di buste di teflon e messe ad incubare per 10 giorni in un ambiente con l'8% di CO₂ ed alla temperatura di 37°C. Passato questo periodo i macrofagi sono stati centrifugati, lavati con EM (Eagle's Medium) e portati alla concentrazione di 2×10^7 /ml in EM addizionato con siero di vitello fetale (FCS) al 5%. I macrofagi sono stati quindi seminati in pozzetti da 1 ml (0,5 ml) con l'aggiunta di CDS90 in diluizioni scalari. Il tutto è stato messo nuovamente ad incubare per 3 ore alle condizioni descritte sopra. Al termine dell'incubazione il surnatante (denominato McsurCDS) è stato raccolto, centrifugato e congelato a -70°C prima di essere saggiato sulla linea cellulare tumorale L929 sensibile al TNF. Le cellule L929 alla concentrazione di 4×10^5 /ml (terreno : RPMI 1640 + 10% FCS + 2 mM glutamina + 100 U/ml penicillina + 100 µg/ml streptomycin) sono state seminate in micropiastre a 96 pozzetti nella misura di 100 µl/pozzetto. Le piastre sono state incubate per 3 ore in un'atmosfera con il 5% di CO₂ ed a 37°C. Al termine di questo periodo di tempo è

stata aggiunta actinomicina-D (1 µg/ml) + 50 mcl di surnatante (McsurCDS90) a diluizioni scalari. Le piastre sono state quindi incubate per 20 ore a 37°C in un'atmosfera con il 5% di CO₂. Dopo tre lavaggi con soluzione di Hank si sono aggiunti 50 µl di cristalvioletto (0,5% in metanolo e acqua 1:4 v/v) per 15 minuti a temperatura ambiente, facendo seguire da 100 µl di una soluzione composta da KH₂PO₄ 0,1 M ed etanolo (1:1 v/v). La densità ottica è stata misurata con uno spettrofotometro a 570 nm.

Il CDS90 induce una produzione di TNF da parte dei macrofagi ottenuti da topi CH₂/HeN e da quelli CH₂/HeJ. Il CDS90 è quindi attivo su sistemi LPS sensibili e LPS resistenti. Questo test esclude anche la possibilità che l'attività del CDS90 sia attribuibile ad endotossine o sostanze endotossino-simili che non agiscono in topi CH₂/HeJ (Tabella 8).

5. Attività antitumorale in vivo del CDS90

Cellule EL4 (linea cellulare del linfomatosarcoma murino) sono state iniettate per via intraperitoneale in topi del ceppo C57BL6 con 6-8 settimane di vita. Dopo circa una settimana si è proceduto al lavaggio peritoneale secondo le metodiche usuali.

Una volta ottenute le cellule, esse vengono lavate e

portate alla concentrazione di $2 \times 10^6/5$ ml in PBS. Le cellule alla concentrazione di $2 \times 10^6/0,05$ ml vengono inoculate per via sottocutanea a topi del ceppo C57BL6 che in circa 6 giorni hanno sviluppato il tumore. I topi sono stati suddivisi in 7 gruppi di 4 topi ciascuno (6 più il controllo) ed è stata loro inoculata la sostanza per via endovenosa a diverse concentrazioni (Tabella 9). I risultati ottenuti dimostrano che CDSD90 induce un effetto necrotizzante a livello dell'area tumorale.

6. Colture linfocitarie umane

Linfociti da sangue intero eparinato vengono separati su Lymphoprep. Il fondello viene portato poi alla concentrazione di $2 \times 10^6/ml$ in terreno RPMI 1640 + 10% FCS + 2 mM Gln + 10 $\mu g/ml$ di gentamicina. La sospensione cellulare viene posta in coltura (micropiastre a 96 pozzetti, 100 $\mu l/pozzetto$) in presenza di CDSD90 a diluizioni scalari, con o senza l'aggiunta di mitogeno (PHA). La coltura viene mantenuta per 48 ore a 37°C al 5% di CO₂. Trascorso questo tempo le cellule vengono raccolte, lavate in RPMI 1640 per 5 minuti a 200 g e risospese in PBS. Una volta risospese le cellule vengono messe ad incubare per 15 minuti con anticorpi monoclonali antiricettore per l'IL2,

antitransferrina ed anti-frammento Fc delle IgG, lavate una volta e risospese in formaldeide allo 0,5%. La sintesi del DNA viene valutata contando il numero di cellule in fase S. Le cellule vengono quindi lette al citofluorimetro (Tabella 10). Il CDS90 modula l'espressione dei recettori per l'IL2 e per il frammento Fc delle IgG, ma non di quelli per la transferrina. La percentuale di cellule in fase S viene modificata alla concentrazione di 0,1 µg/ml di CDS90.

7. Produzione di TNF α da parte dei macrofagi umani

Cellule mononucleate umane vengono poste ad incubare per 24 ore in presenza o meno di LPS o di CDS90 a diverse concentrazioni. I surnatanti vengono poi raccolti e la quantità di TNF alfa prodotti viene misurata con un metodo immunoenzimatico a sandwich in fase solida (Tabella 11). I risultati dimostrano che il CDS90 induce la produzione di TNF alfa da parte delle cellule mononucleate umane.

8. Limiting dilution

Linfociti responder vengono messi in coltura per 8 giorni in pozzetti per microtitolazione a fondo piatto, ad un gradiente di concentrazioni che variano da 12.000 cellule a 150 cellule per pozzetto (0,2 ml di RPMI + 10% FCS), in presenza di 50.000

cellule linfoide autologhe irradiate (4000 rads). I pozzetti contenenti soltanto cellule irradiate vengono usati come controllo. Per tutto il periodo della coltura ad ogni pozzetto si aggiunge CDSD90 (0,1 µg/ml). Per quantificare la produzione di Ig si utilizza il metodo ELISA. I valori della densità ottica vengono valutati mediante un Multiskan Titertek. I surnatanti vengono considerati positivi per la sintesi di Ig quando i valori della densità ottica sono più elevati della media +2 della D.S.. La frequenza di Ig secernenti precursori cellulari viene calcolata in base al numero dei pozzetti negativi a differenti concentrazioni cellulari testate e schematizzate in modo semilogaritmico. L'aggiunta di CDSD90 incrementa la frequenza dei precursori delle cellule Ig secernenti nel sangue periferico. Questi risultati preliminari suggeriscono che il CDSD90 facilita la differenziazione delle cellule B (Tabella 12).

9. CDSD90 e monociti umani

Il CDSD90 viene incubato per 30 minuti a diverse concentrazioni a 4°C ed a temperatura ambiente con monociti umani (1×10^6 cellule/ml). Le cellule vengono poi lavate ed analizzate al citofluorimetro per l'espressione degli antigeni di superficie

riconosciuti dagli anticorpi monoclonali LeuM3 e CR3 (Tabella 13). I risultati dimostrano che il CDSD90 modula l'espressione degli antigeni di membrana, del Forward e del Side Scatter dei monociti, fenomeno solitamente associato anche a modificazioni della funzionalità cellulare (ad esempio la fagocitosi e la produzione di monochine).

10. CDSD90 e polimorfonucleati umani

Il CDSD90 viene incubato per 30 minuti a diverse concentrazioni a 4°C ed a temperatura ambiente con polimorfonucleati umani (1×10^6 cellule/ml). Le cellule vengono quindi lavate ed analizzate al citofluorimetro per l'espressione degli antigeni di superficie riconosciuti dagli anticorpi monoclonali CD16 e CR3 (Tabella 14). I risultati dimostrano che il CDSD90 modula l'espressione degli antigeni di membrana dei PMN, fenomeno solitamente associato anche a modificazioni della funzionalità cellulare (ad esempio killing e fagocitosi).

11. Effetti antiproliferativi del CDSD90

Il CDSD90 a diverse concentrazioni viene incubato con cellule provenienti da 4 linee tumorali umane (2 dell'ovaio, OVCA 433 e OVRS 1000, e 2 della mammella, MDA e MCF-7). Le conte cellulari effettuate dopo 6 giorni dimostrano che il CDSD90 ha

un'attività antiproliferativa nei riguardi delle cellule menzionate (Tabella 15).

L'invenzione ha anche per oggetto l'impiego del composto dell'invenzione per regolare il sistema immunitario o nel trattamento dei tumori.

L'invenzione ha infine per oggetto composizioni farmaceutiche ad attività immunomodulanti ed antitumorale che contengono il composto dell'invenzione. Tale impiego può avvenire mediante le usuali vie di somministrazione, quale parenterale, orale, rettale, attraverso la pelle della mucosa e così via.

Nel caso di somministrazione parenterale il dosaggio, dipendente dal tipo della malattia, è di 0,01-500 mg/m² di superficie corporea/dose. In casi gravi esso può essere anche aumentato, in quanto sinora non si sono rilevate proprietà tossiche. In casi particolarmente gravi si raccomanda una somministrazione ripetuta alla settimana per un periodo di più settimane. causa dei particolari rapporti di riassorbimento nel caso di applicazione nasale si devono utilizzare dosaggi corrispondentemente elevati.

Per l'applicazione sottocutanea, endovenosa, nasale, intravescicale, intrapleurica, il composto

dell'invenzione viene portato in soluzione, sospensione o emulsione se lo si desidera con sostanze usuali allo scopo, quali solubilizzanti, emulsionanti o altri adiuvanti. Come solventi per il nuovo composto attivo si possono prendere ad esempio in considerazione : acqua, soluzioni saline fisiologiche o alcoli, ad esempio etanolo, propandiolo o glicerina, inoltre anche soluzioni zuccherine come le soluzioni di glucosio, mannite oppure anche una miscela di solventi diversi.

L'applicazione parenterale può avvenire ad esempio anche con dispositivi di dosaggio esterni o trapiantati, come ad esempio pompe automatiche o sotto forma di un'infusione continua.

Il composto dell'invenzione può essere anche somministrato sotto forma di un farmaco a rilascio ritardato. Nel caso di soluzioni iniettabili una simile attività ritardata può essere ad esempio ottenuta mediante soluzione o sospensione del medicamento in un veicolo oleoso, aggiunta di macromolecole aumentanti la viscosità che ritardano la diffusione del medicamento disciolto, assorbimento del farmaco su adatte molecole di supporto, ad esempio idrossido di alluminio, o impiegando sospensioni cristalline.

Per una forma di impiego orale il composto attivo viene mescolato con additivi usuali per questo scopo, come veicoli, stabilizzanti o diluenti inerti, e viene portato mediante metodi usuali in forme di somministrazione adatte, come compresse, pillole, capsule, sospensioni alcoliche o oleose o soluzioni acquose, alcoliche o oleose. Come veicoli o diluenti inerti si possono ad esempio utilizzare : gomma arabica, magnesio carbonato, potassio fosfato, lattosio, glucosio o amidi, in particolare amido di mais, lattosio, destrosio, saccarosio, mannite, sorbite, cellulosa, silice, talco, acido stearico e i suoi sali quali stearato di calcio e magnesio, polietilenglicole, polivinilpirrolidone, agar, acido alginico e così via. La preparazione può quindi avvenire come granulato secco o umido. Come veicoli o solventi oleosi si possono prendere in considerazione ad esempio gli oli vegetali o animali, quali olio di girasoli o olio di fegato di merluzzo.

Una soluzione acquosa sterile del composto dell'invenzione può contenere sostanze per avere isotonicità, ad esempio circa lo 0,9% di cloruro sodico o l'1,7% di glicerina, ed eventualmente anche conservanti quali l'acido idrossibenzoico o fenolo.

Il seguente esempio serve ad illustrare più dettagliatamente la presente invenzione.

ESEMPIO

Il prodotto oggetto dell'invenzione viene ottenuto centrifugando inizialmente batteri (*S. thermophilus*) liofilizzati e ricostituiti al momento con acqua. La centrifugazione avviene a 1000-2000 g per 20 minuti e fornisce un surnatante ed un sedimento. Il surnatante viene scartato, e il sedimento viene raccolto e sottoposto ad elettrodialisi per 72-96 ore (110V 30 mA, 0-15°C). Nella camera per l'elettrodialisi il pH della miscela va controllato e mantenuto costante sul valore di 7 mediante aggiunta di trietilamina (TEM). Terminata l'elettrodialisi, il contenuto della camera dell'apparecchio da elettrodialisi viene raccolto e centrifugato per 20 minuti a 1000-2000 giri, con separazione in un surnatante ed un sedimento. Il surnatante, miscelato con proteasi (DNasi da pancreas bovino disciolta in acqua, 1 mg per 10 ml di surnatante, e RNasi disciolta in acqua, 1 mg/ml di surnatante, con aggiunta di 1 mM MgCl₂) viene posto in un tubo da dialisi (permeabilità della membrana inferiore a 14-15 Kda).

Il tubo da dialisi viene poi immerso in soluzione

salina tamponata con fosfati (PBS) addizionata con $MgCl_2$ 1 M per 20-40 ore. Dopo sostituzione del PBS con acqua distillata, la dialisi viene proseguita a $4^{\circ}C$ per 72-96 ore. Il contenuto del tubo viene raccolto e centrifugato per 20 minuti a 1000-2000 g con separazione in un sedimento ed un surnatante. Quest'ultimo viene raccolto e portato a secchezza, fornendo una polvere di colore marroncino che viene sottoposta ad un esame termogravimetrico e alla calorimetria a scansione differenziale (DSC). Il prodotto presenta così alla termogravimetria una graduale perdita di peso da $30^{\circ}C$ e successivamente una più netta da $193^{\circ}C$ a $225^{\circ}C$ per poi continuare a degradarsi. Dal grafico DSC si osserva un picco endotermo di evaporazione dell'acqua da $30^{\circ}C$ a $120^{\circ}C$. e successivamente un picco esotermo di decomposizione da circa $190^{\circ}C$ a circa $250^{\circ}C$. L'analisi elementare ha fornito i valori seguenti (%).

C 47,71
H 6,96
N 12,30

R I V E N D I C A Z I O N I

1) Polipeptide contenente zuccheri ad attività immunomodulante ed antitumorale, caratterizzato dal

salina tamponata con fosfati (PBS) addizionata con $MgCl_2$ 1 M per 20-40 ore. Dopo sostituzione del PBS con acqua distillata, la dialisi viene proseguita a $4^{\circ}C$ per 72-96 ore. Il contenuto del tubo viene raccolto e centrifugato per 20 minuti a 1000-2000 g con separazione in un sedimento ed un surnatante. Quest'ultimo viene raccolto e portato a secchezza, fornendo una polvere di colore marroncino che viene sottoposta ad un esame termogravimetrico e alla calorimetria a scansione differenziale (DSC). Il prodotto presenta così alla termogravimetria una graduale perdita di peso da $30^{\circ}C$ e successivamente una più netta da $193^{\circ}C$ a $225^{\circ}C$ per poi continuare a degradarsi. Dal grafico DSC si osserva un picco endotermo di evaporazione dell'acqua da $30^{\circ}C$ a $120^{\circ}C$. e successivamente un picco esotermo di decomposizione da circa $190^{\circ}C$ a circa $250^{\circ}C$. L'analisi elementare ha fornito i valori seguenti (%).

C 47,71
H 6,96
N 12,30

R I V E N D I C A Z I O N I

1) Polipeptide contenente zuccheri ad attività immunomodulante ed antitumorale, caratterizzato dal

fatto di :

a) essere una polvere marroncina amorfa che alla termogravimetria presenta una graduale perdita di peso da 30°C e successivamente una più netta da 193°C a 225°C per poi continuare a degradarsi;

b) avere la seguente composizione degli aminoacidi (% in moli):

asparagina	8,511
treonina	5,202
serina	7,287
glutamina	21,040
prolina	10,063
glicina	3,359
alanina	5,189
cisteina 1/2	1,092
cisteina	0,476
valina	5,357
metionina solfossido	2,026
isoleucina	4,383
leucina	8,941
tirosina	3,375
fenilalanina	3,510
lisina	6,478
istidina	1,776
arginina	1,938

c) avere la seguente analisi del contenuto ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
in zuccheri (soluzione di base 5 mg/ml, solvente HCl
1N + acqua, colonna GP 3% SP2330):

fucosio	4,5
ribosio	6,0
xilosio	43,0
mannosio	2,2
galattosio	11,2
glucosio	8,5

d) avere uno spettro di assorbimento infrarosso in
KBr con valori caratteristici a 3297, 3106, 3064,
2961, 2930, 1653, 1540, 1448, 1398, 1243, 667, 620 e
570 cm^{-1} ;

e) avere uno spettro di assorbimento infrarosso in
Nujol con valori caratteristici a 3386, 3299, 3064,
2952, 2924, 2854, 1652, 1544, 1460, 1376, 1308 e 721
 cm^{-1}

f) avere un peso molecolare di 12-75 Kda;

g) presentare i seguenti valori alla microanalisi :

C% 47,71

H% 6,96

N% 12,30

2) Procedimento per la preparazione di un
polipeptide secondo la rivendicazione 1,
caratterizzato dal fatto che si sottopongono a

centrifugazione batteri liofilizzati e ricostituiti al momento con acqua di *S. thermophilus*, il surnatante ottenuto viene sottoposto ad elettrodialisi fornendo un nuovo surnatante che viene miscelato con proteasi e dializzato, per cui si recupera un liquido che viene centrifugato a dare un surnatante che per essiccamento fornisce il polipeptide dell'invenzione.

3) Procedimento secondo la rivendicazione 2, caratterizzato dal fatto che l'elettrodialisi avviene per 72-96 ore mantenendo il pH costante sul valore di 7 mediante aggiunta di trietilamina.

4) Procedimento secondo le rivendicazioni 2 e 3, caratterizzato dal fatto che la proteasi consiste di DNAsi da pancreas bovino e RNAsi.

5) Impiego del polipeptide della rivendicazione 1 in composizioni per la terapia e la prevenzione di malattie tumorali e come immunomodulanti.

6) Composizione ad attività immunomodulante e/o antitumorale, caratterizzata dal fatto che essa contiene il polipeptide dell'invenzione quale principio attivo assieme ad usuali adiuvanti o diluenti farmacologicamente inerti.

p.i. dei Sigg. Renata Maria Anna CAVALIERE ved. VESELY

Claudio DE SIMONE



IL MANDATARIO
Ing. Martino SALVADORI
iscritto all'Albo con il n. 432

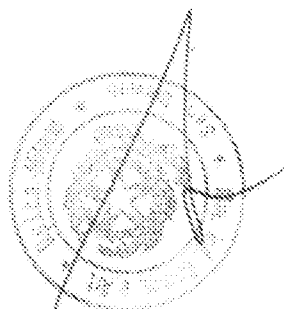
20818A/90

Allegato numero 1

CDSD90 - Analisi del contenuto in zuccheri (gas-cromatografia)

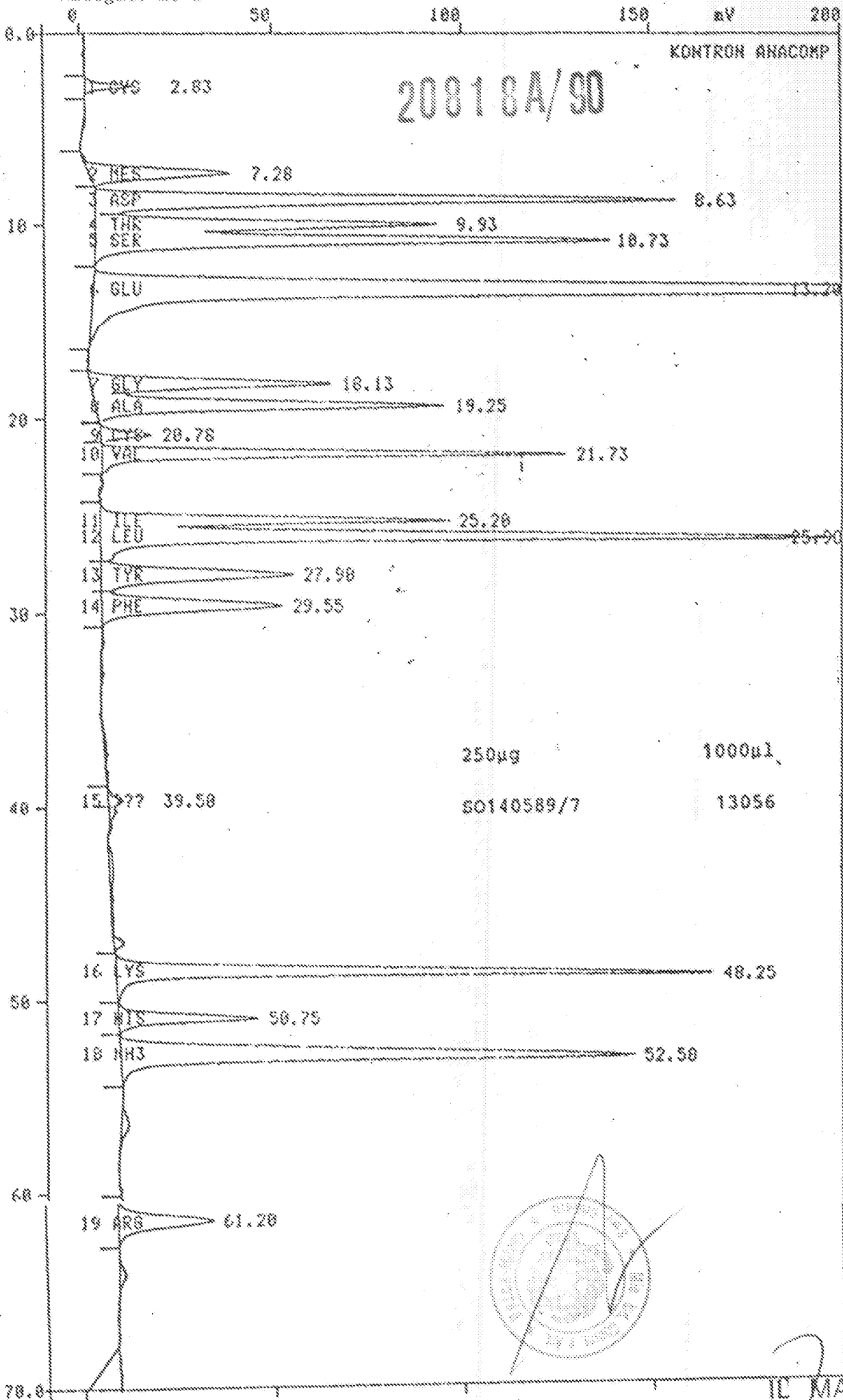
zucchero	contenuto (µg/mg)
Fucosio	4,3
Ribosio	6,0
Xilosio	43,0
Mannosio	2,2
Galattosio	11,2
Glucosio	8,5

Contenuto in zuccheri (sotto forma derivatizzata) del CDSD90. Soluzione di base: 5 mg/ml; solvente: 1N HCl + H₂O; colonna GP 3X SP2330)



IL MANDATARIO
Ing. Marino SALVADORI
iscritto all'Albo con il n. 438

Allegato n. 2

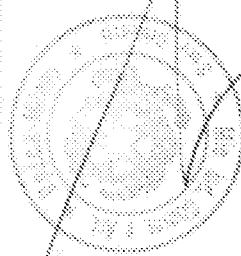


250µg

1000µl

SD140589/7

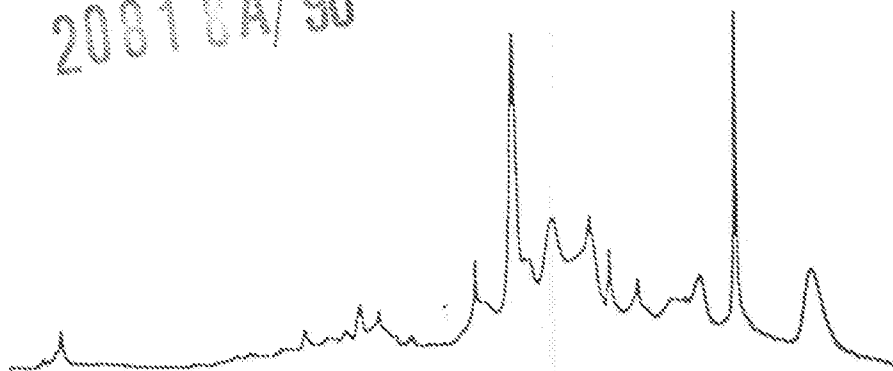
13056



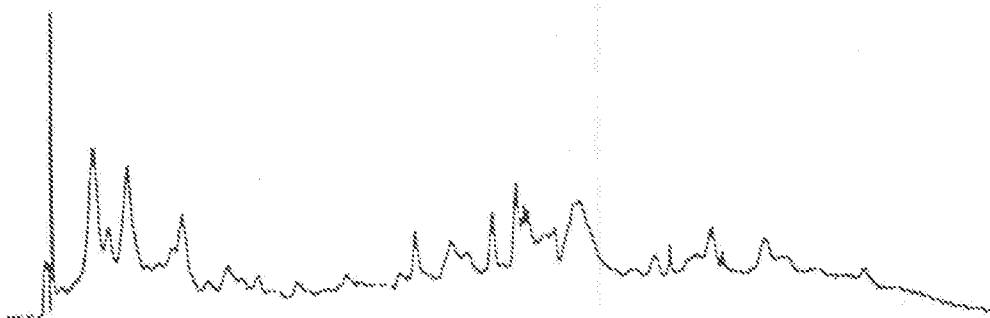
IC MANDATARIO
Ing. Martino SARADON
Iscrip. all'AIB n. 438

CDSD90 - HPLC (High Pressure Liquid Chromatography)

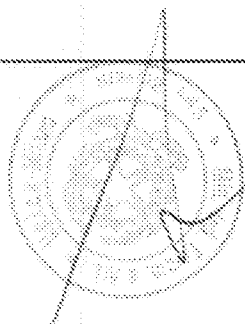
2081 SA/90



Channel A - λ 280, 25 μ l.



Channel A - λ 220, 25 μ l.



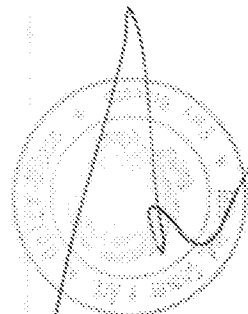
IL MANDATARIO
Ing. Marino SANZONI
Iscritto all'Albo dei C.C. n. 425

CDS90 - Test di tossicità

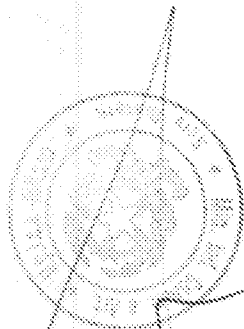
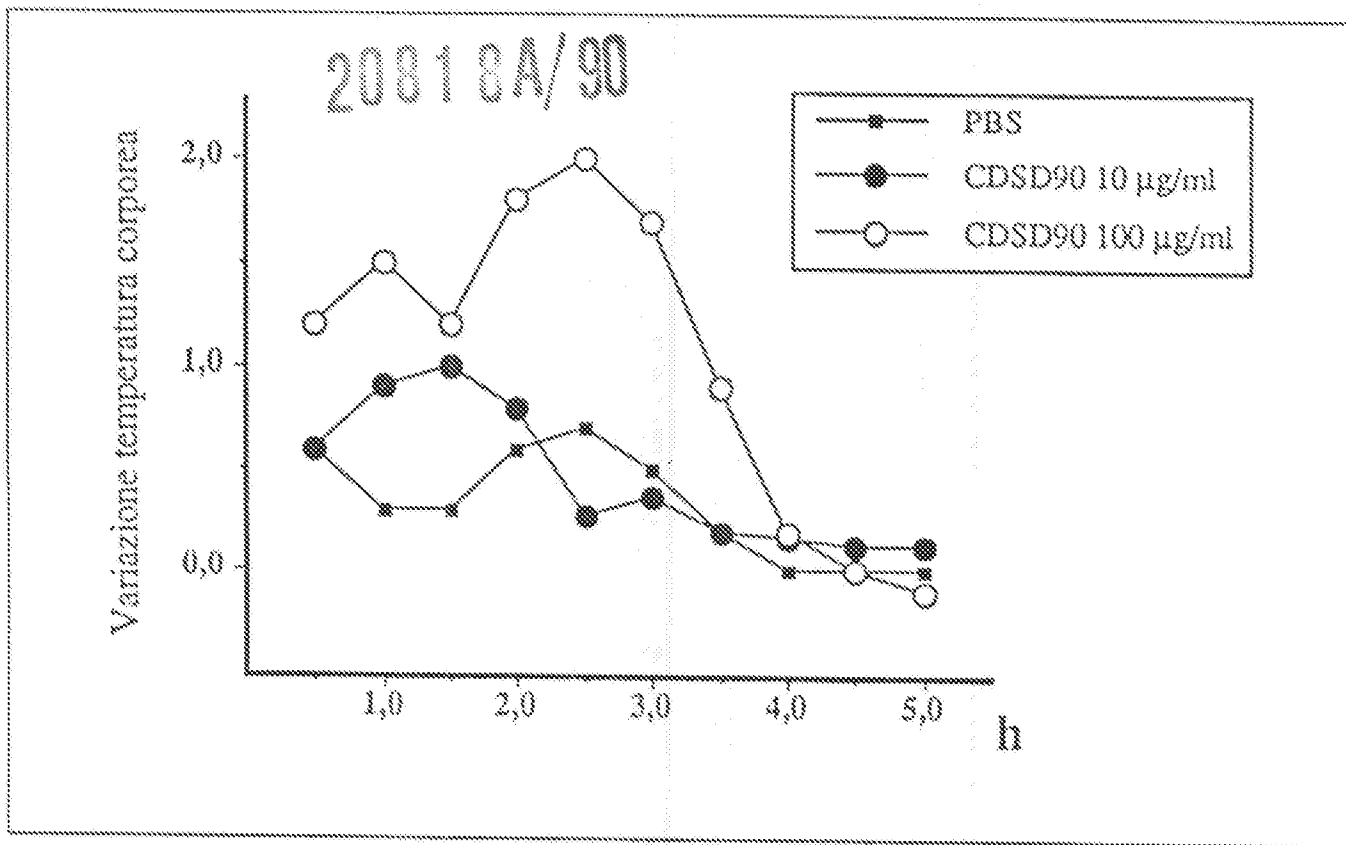
Controllo	1 topo	0,5 ml PBS + 20 µg D-Gal i.p.
CDS90	2 topi	0,5 ml PBS + 20 µg D-Gal i.p + 10 µg CDS90 i.p.
Controllo	1 topo	0,5 ml PBS + 20 µg D-Gal i.p.
CDS90	2 topi	0,5 ml PBS + 20 µg D-Gal i.p + 30 µg CDS90 i.p.
Controllo	1 topo	0,5 ml PBS + 20 µg D-Gal i.p.
CDS90	2 topi	0,5 ml PBS + 20 µg D-Gal i.p + 100 µg CDS90 i.p.

20818A/90

	CONTROLLO	CDS90
10 µg	0/1	0/2
30 µg	0/1	0/2
100 µg	0/1	0/2



IL MANDATARIO
 Ing. Marino SANADORI
 iscritto all'Albo Cos. il n. 438



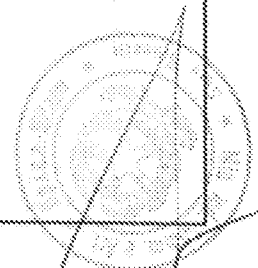
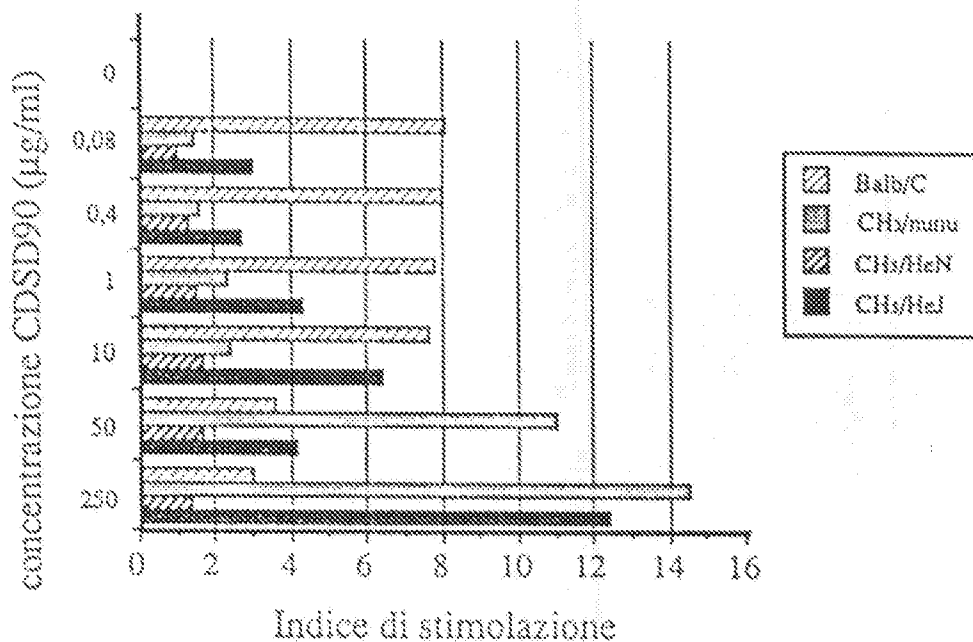
IL MANDATARIO
Ing. Marino SALVADORI
Iscritto all'Albo con il n. 4.

CDS90 - Proliferazione dei linfociti murini

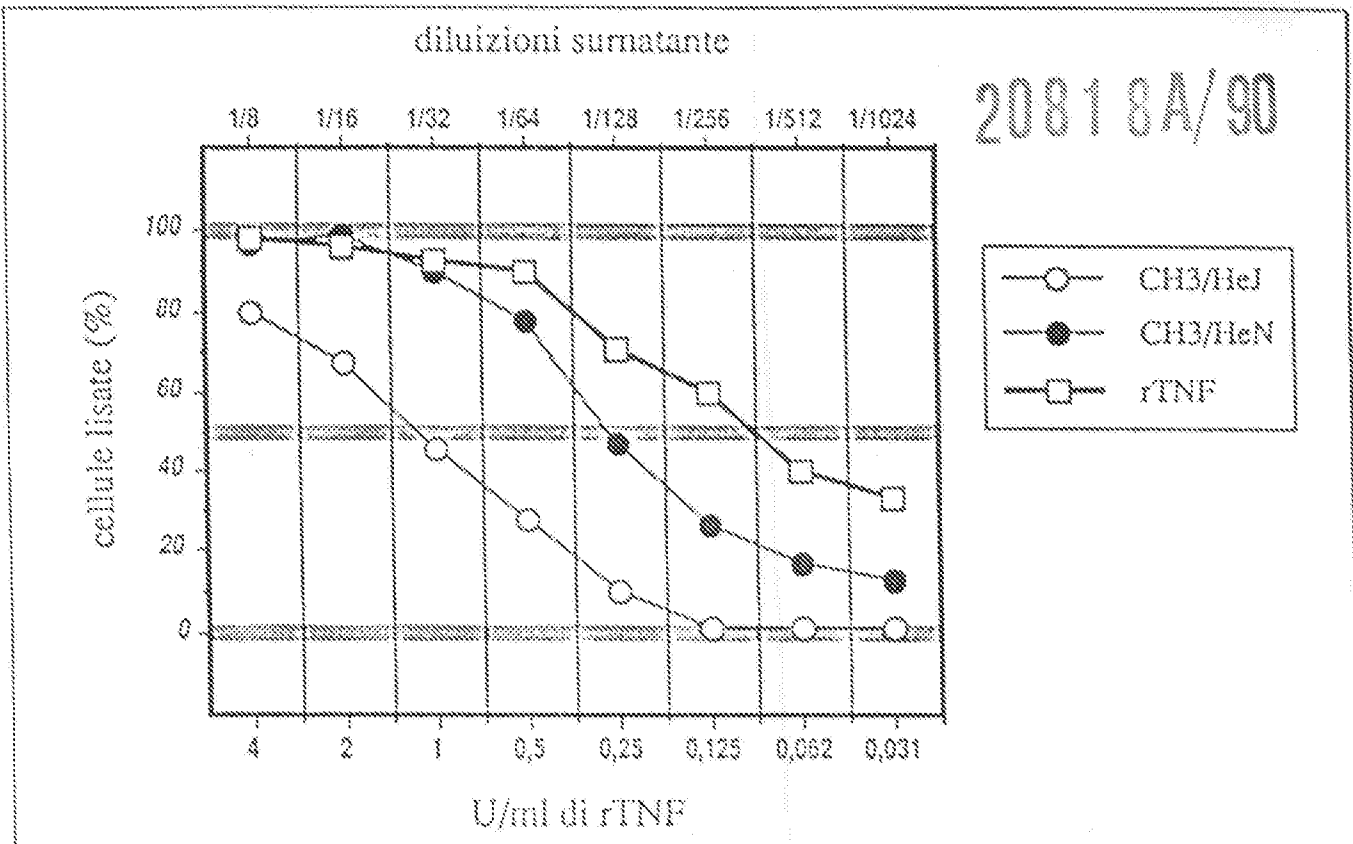
INDICE DI STIMOLAZIONE

20818A/90

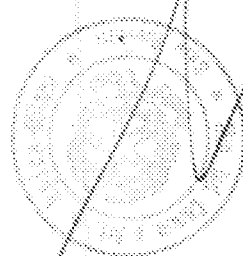
CDS90	CH3/HeJ	CH3/HeN	CH3/nunu	Balb/c
250 µg/ml	12,43	1,04	14,57	3,00
50 µg/ml	4,20	1,70	11,00	3,60
10 µg/ml	6,40	1,70	2,40	7,70
1 µg/ml	4,30	1,50	2,32	7,80
0,4 µg/ml	2,70	1,30	1,60	8,00
0,08 µg/ml	3,02	1,00	1,44	8,09
0 µg/ml	---	---	---	---



IL MANDATARIO
 Ing. Martino ALVAGNOLI
 iscritto all'Albo con il n. 336



Produzione di TNF da parte dei macrofagi ottenuti da topi CH₃/HeN e CH₃/HeJ trattati con CDS90; 8 diluizioni del surnatante partendo dalla concentrazione iniziale di 5 µg/ml di sostanza (rTNF = recombinant murine TNF).



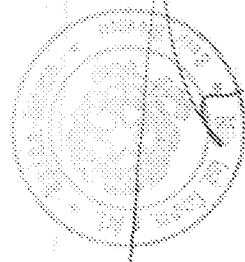
IL MANDATARIO
Ing. Massimo S. VADOLI
iscritto all'Albo con il n. 435

CDS90 - Attività antitumorale in vivo, nel topo

20818A/90

I Gruppo	Controllo	4 topi	0,2 ml PBS	e.v.
II Gruppo	CDS90	4 topi	50 µg/0,2 ml PBS	e.v.
III Gruppo	CDS90	4 topi	100 µg/0,2 ml PBS	e.v.
IV Gruppo	CDS90	4 topi	200 µg/0,2 ml PBS	e.v.
V Gruppo	CDS90	4 topi	400 µg/0,2 ml PBS	e.v.
VI Gruppo	CDS90	4 topi	1 mg/0,2 ml PBS	e.v.
VII Gruppo	CDS90	4 topi	2 mg/0,2 ml PBS	e.v.

				necrosi/topi
I Gruppo	Controllo	4 topi		0/4
II Gruppo	CDS90	4 topi		4/4
III Gruppo	CDS90	4 topi		4/4
IV Gruppo	CDS90	4 topi		3/4
V Gruppo	CDS90	4 topi		2/4
VI Gruppo	CDS90	4 topi		3/4
VII Gruppo	CDS90	4 topi		2/4



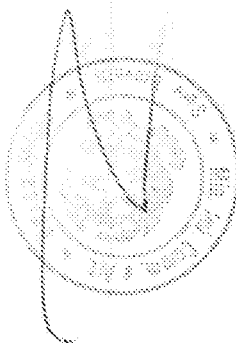
IL MANDATARIO
 Ing. Marino SANADORI
 iscritto all'A.A.G. con il n. 430

Sintesi del DNA ed espressione dei recettori su linfociti umani

valori percentuali	DNA Fase S	recettore transferrina	recettore IL-2	recettore Fc di IgG
Controllo	3	31	24	43
PHA	14	62	55	45
CDS90				
100 µg/ml	2	8	18	24
10 µg/ml	3	23	29	31
1 µg/ml	3	20	32	32
0,1 µg/ml	4	28	25	42
10 µg/ml + PHA	10	34	62	54

2081 BA/90

Coltura linfocitaria a 72 ore; linfociti umani di donatore sano.

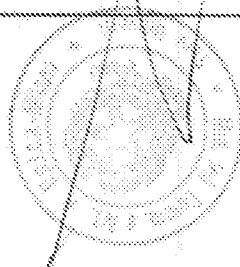
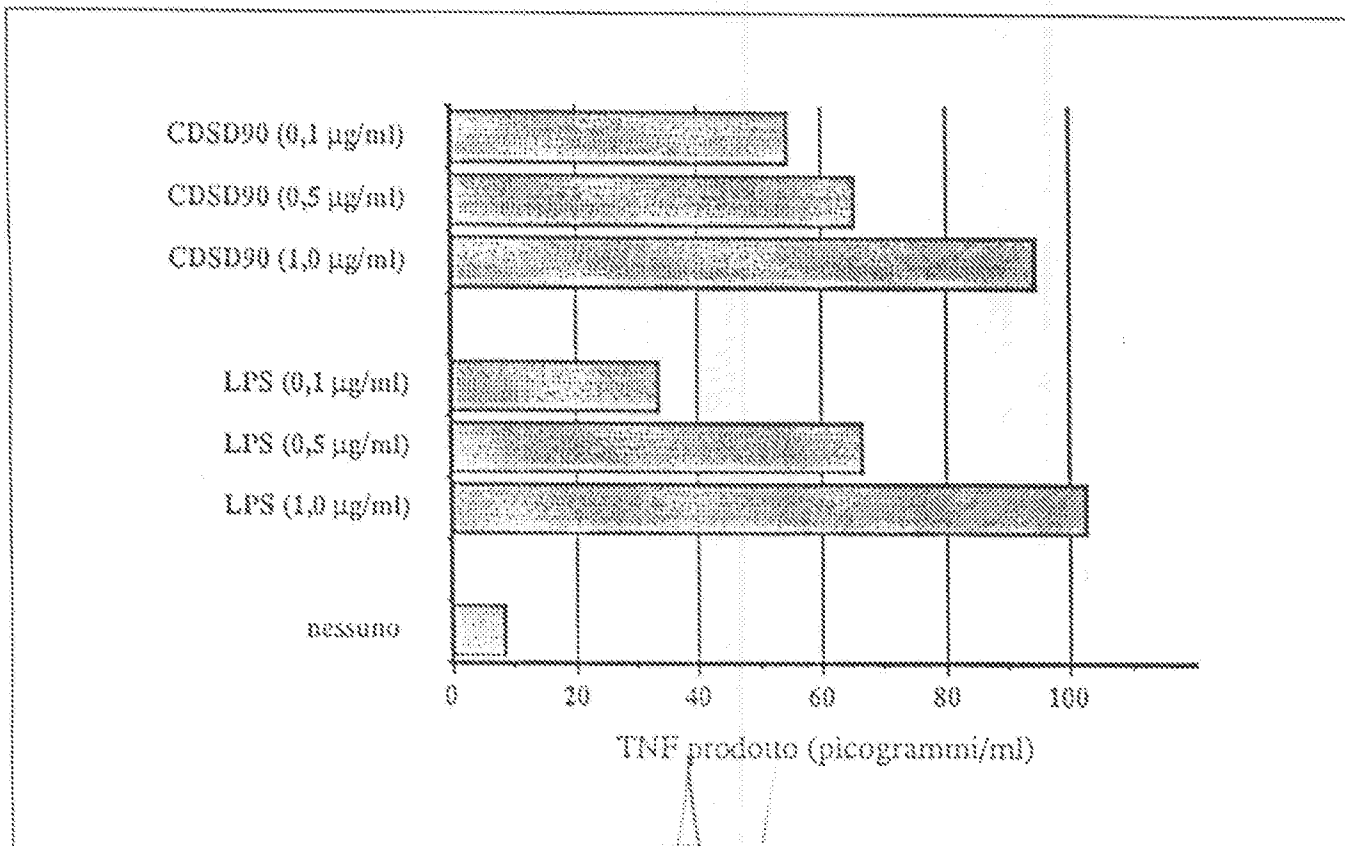


IL MANDATARIO
 Ing. Martino SAKALCZI
 Iscritto all'Albo con il n. 438

CDSD90 - Produzione di TNF umano da parte dei macrofagi

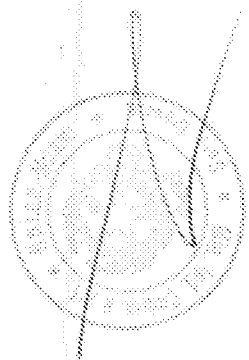
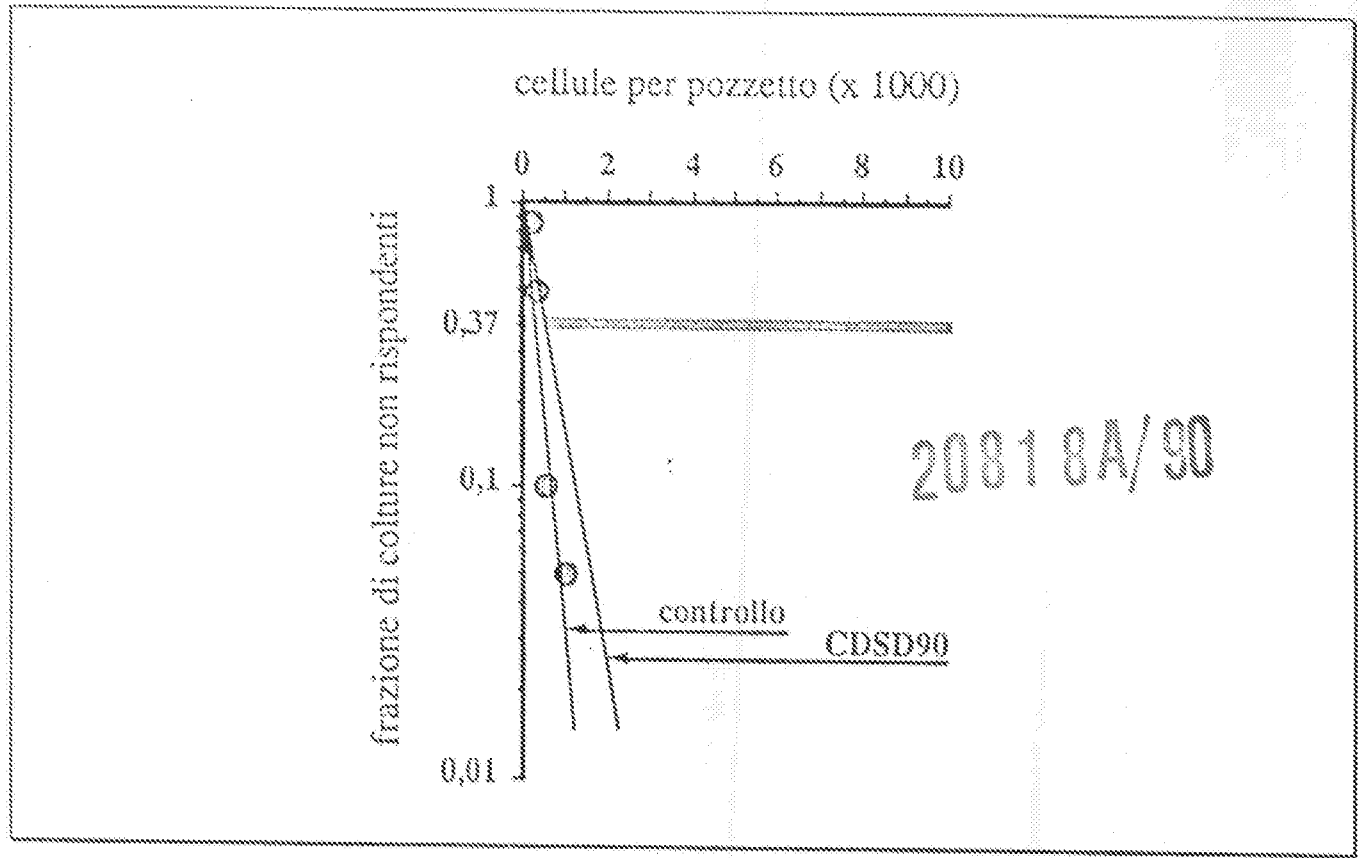
induttore	quantità utilizzata ($\mu\text{g/ml}$)	TNF alfa prodotto (picogrammi/ml)
nessuno	---	9 ± 2
LPS (<i>S. typhi</i>)	1,0	$103 \pm 23,6$
LPS (<i>S. typhi</i>)	0,5	$67 \pm 30,7$
LPS (<i>S. typhi</i>)	0,1	$34 \pm 16,3$
CDSD90	1,0	95 ± 35
CDSD90	0,5	66 ± 55
CDSD90	0,1	55 ± 27

2081 6A/90



IL MANDATARIO
 Ing. Martino SALVADORI
 iscritto all'Albo con n. 188

CDS90 - Limiting dilution



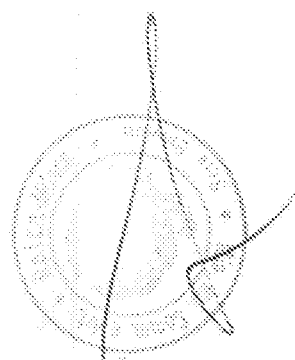
IL MANDATARIO
Ing. Marijo SALVADOR
Iscritto all'Albo con il n. 438

CSDS 90 - Monociti umani

CSDS90	LeuM3	Side Scatter	Forward Scatter
controllo	774,21	117,55	122,96
0,5	1025,91	126,85	123,70
5	1090,29	125,19	116,60
50	1010,43	126,46	114,80
500	822,24	130,22	110,23

20818A/90

CSDS90	CR3	Side Scatter	Forward Scatter
controllo	460,20	122,03	129,75
0,5	785,40	129,08	129,87
5	744,66	127,56	129,34
50	896,50	127,52	123,50
500	1051,40	129,84	121,80

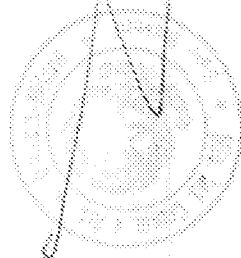


IL MANDATARIO
 Ing. Marino SALVADORI
 Iscritto all'Albo con il n. 437

2081 CA/90 CDS90 - Polimorfonucleati umani

CDS90 ($\mu\text{g/ml}$) 4 °C	FcR	CR ₃	CDS90 ($\mu\text{g/ml}$) TA	FcR	CR ₃
0	4,14	5,11	0	4,38	7,95
0,5	4,38	4,37	0,5	4,99	n.e.
5	4,37	3,38	5	4,49	6,20
50	n.e.	4,24	50	4,09	9,87
500	4,46	4,50	500	4,14	6,74

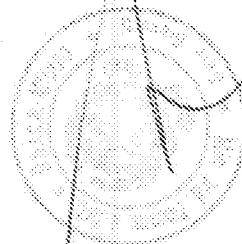
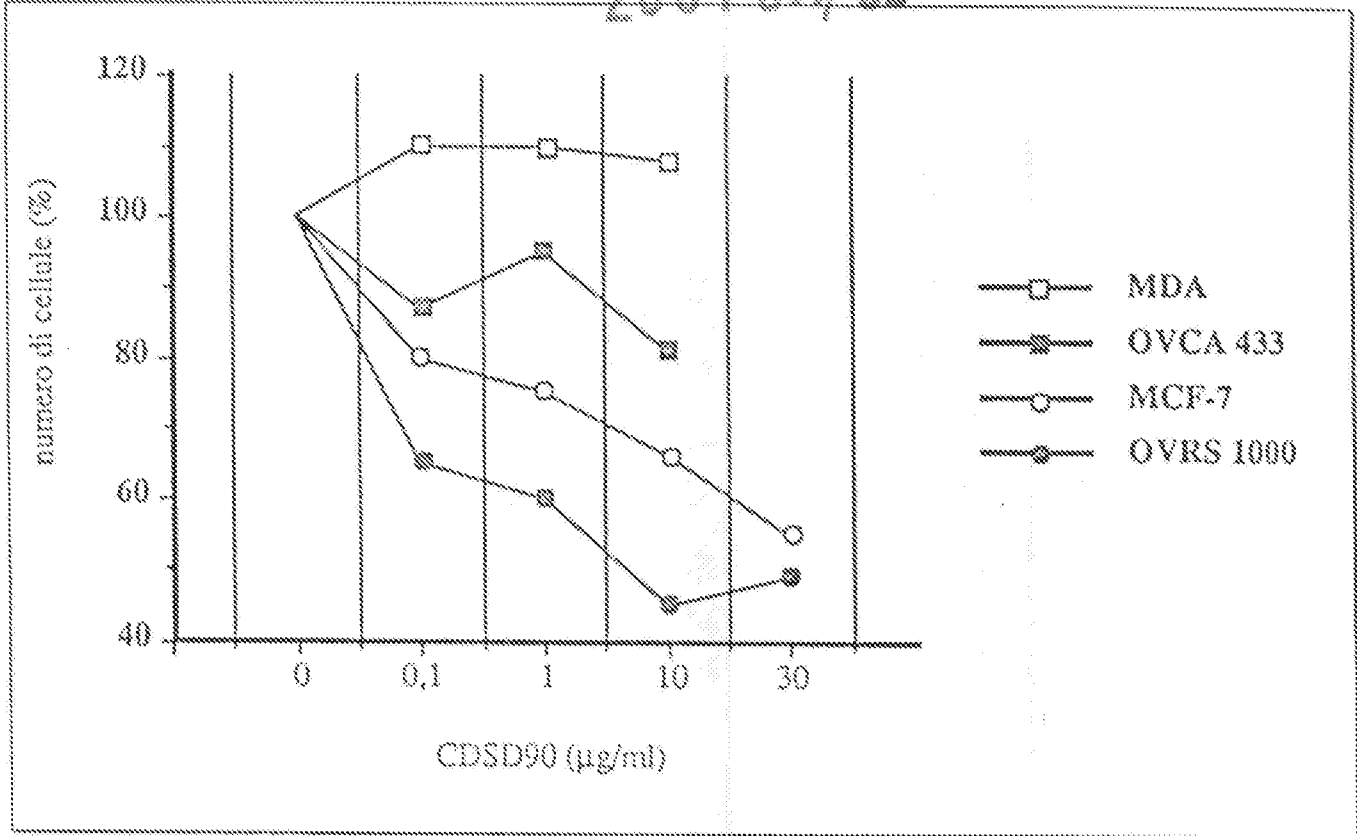
PMN umani incubati per 30 minuti con CDS90 a 0,5 - 5 - 50 - 500 $\mu\text{g/ml}$ (concentrazione finale); incubazione a 4 °C e a temperatura ambiente (TA). I valori sono espressi come canale medio del picco (n.e. = non eseguito).



IL MANDATARIO
 Ing. Martino SALVADORI
 iscritto all'Albo con il n. 438

Effetti antiproliferativi su cellule tumorali umane in vitro

2081 BA/90



IL MANDATARIO
Ing. **Martino SALVADORI**
iscritto all'Albo con n. 436