



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

UTBM

DOMANDA NUMERO	101983900000666
Data Deposito	06/09/1983
Data Pubblicazione	06/03/1985

Priorità	417.179
Nazione Priorità	US
Data Deposito Priorità	13-SEP-82

Titolo

METODO E COMPOSIZIONE PER IL TRATTAMENTO DI TUMORI

1306 M DESCRIZIONE dell'invenzione industriale dal titolo:

FM/sm "METODO E COMPOSIZIONE PER IL TRATTAMENTO DI TUMORI"

a nome: SIGMA TAU INDUSTRIE FARMACEUTICHE RIUNITE s.p.a.

a : Viale Shakespeare 47 - ROMA

di nazionalità italiana ed elettivamente domiciliata a
tutti gli effetti di legge presso i mandatarî Signori Giu-
seppe Bianchetti ed altri (vedi lettera d'incarico) dello
Studio Consulenza Brevettuale s.r.l. - Via Senato n.24 -
Milano

Inventore designato: Austin L. Shug

Depositata il **23 SET 1983** al n. **2 27 85 A / 83**

R I A S S U N T O

Si descrive un metodo per il trattamento di tumori con-
sistente nel somministrare composizioni farmaceutiche a ba-
se di L-carnitina eventualmente in associazione con cisteina
e/o acidi grassi a lunga catena.

DESCRIZIONE DELL'INVENZIONE

La presente invenzione si riferisce a un metodo e a compo-
sizioni per il trattamento di crescite tumorali.

Più specificamente la presente invenzione si riferisce a
un metodo e a composizioni che promuovono una riduzione nella
dimensione di crescite tumorali conclamate.

Più di 50 anni fa Otto Warburg scoprì che cellule tumorali

- maligne fermentano il glucosio ad acido lattico molto più rapidamente della maggior parte delle cellule normali, cioè esse dipendono dalla glicolisi per la loro fonte primaria di energia per la crescita (l'"effetto Warburg"). (O. Warburg, The Prime Cause and Prevention of Cancer, Triltsch, Wurzburg, Germania, 1967 pp. 6-16, Biochem. Z. 142, 317 (1923)).

Recentemente, Racker e coll. hanno dimostrato una elevata attività ATPasica ($\text{ATP} \longrightarrow \text{ADP} + \text{Pi}$) nel tessuto tumorale ed hanno proposto che l'elevata attività ATPasica sia richiesta per l'alta attività glicolitica delle cellule tumorali poichè l'idrolisi di ATP a ADP + Pi è nota costituire lo stadio determinante della velocità di reazione per l'utilizzazione del glucosio. (Racker, E. e Spector, M. Science 213, 303 (1981)). Pertanto, sebbene la scoperta di Racker e coll. supporti l'"effetto Warburg", non è ancora stata spiegata la ragione dell'elevata velocità di glicolisi aerobica nelle cellule tumorali.

Si è ora trovato che la crescita dei tumori può essere efficacemente combattuta somministrando ad un animale portatore di tumore quantità relativamente grandi di L-carnitina.

Si è inoltre trovato che la crescita di tumori maligni in vitro può anche essere inibita dalla presenza di L-carnitina.

Inoltre, si è trovato che se la L-carnitina è somministrata all'animale o impiegata in situazioni in vitro in combina

zione con cisteina l'inibizione e l'effettiva inversione della crescita e formazione tumorale è aumentata.

E' ben noto che la L-carnitina è normalmente sintetizzata nel fegato e nel rene umano da lisina e metionina; che essa è fornita al cuore, alla muscolatura scheletrica e ad altri tessuti attraverso la circolazione sanguigna; che la sua funzione principale è di facilitare l'ossidazione mitocondriale degli acidi grassi (Fritz, I.B. Physiol. Revs. 41, 52 (1961)). E' anche noto che la stimolazione dell'ossidazione degli acidi grassi da parte della carnitina è effettuata tramite l'azione congiunta degli enzimi carnitina transferasi I, il translocatore della carnitina, e carnitina transferasi II, poichè l'acil CoA non può superare la membrana interna mitocondriale (Bremer, J., Trends in Biochemical Science, 2, 207 (1977)).

Sebbene la seguente spiegazione teorica non sia da considerare limitativa, si è postulato che poichè le cellule tumorali richiedono una elevata velocità di glicolisi per la loro crescita, e che poichè la carnitina stimola la ossidazione degli acidi grassi, la somministrazione di elevati livelli di carnitina potrebbe costringere le cellule tumorali a utilizzare acidi grassi come una fonte di energia che potrebbe impedire la glicolisi e avere effetti dannosi su tali cellule. E' sembrato che il metabolismo degli acidi grassi stimolato da carnitina potrebbe essere delete-

rio in tre modi possibili.

1. Se vi è una diminuita stabilità a ossidare acidi grassi a CO_2 e H_2O , ma è presente una normale attività carnitina transferasica, un'aumentata attivazione degli acidi grassi porterebbe all'accumulo di acil carnitina a lunga catena e a CoA esteri di acidi grassi (come dimostrato avvenire nella ischemia - vedi Shug, A.L. e coll., Arch. Biochem. Biophys. 187, 25, 1978). E' stato dimostrato che tali prodotti inibiscono un numero di sistemi mitocondriali e potrebbero lisare le membrane mitocondriali e cellulari a causa della loro potente azione detergente. (Shug, A.L., Texas Reports on Bio. and Med. 39, 409 (1979); Powell, G. e coll., J. Biol. Chem. 256, 12740 (1981)).
2. Poichè l'attivazione di acidi grassi utilizza ATP e produce AMP + PPi + Acil CoA, l'attivazione degli acidi grassi stimolata da carnitina nelle cellule tumorali, dove l'ossidazione era rallentata, porterebbe a livelli diminuiti di ATP, diminuita formazione di ADP + Pi da ATPasi, e meno glicolisi.
3. L'ossidazione di acidi grassi stimolata da carnitina può essere benefica per cellule normali (Shug, A.L. e coll., Academic Press, NY, NY, Carnitine Biosynthesis, Metabolism and functions, pp. 321-340 (1980))

- stimolando il loro metabolismo produttore di energia e la produzione di più ATP, rendendo perciò disponibile più energia per la sintesi di sostanze antitumorali, per esempio interferon. Pertanto, anche grazie al noto aumento del flusso sanguigno verso i tessuti tumorali e all'aumentata captazione di substrati caratteristica delle cellule tumorali, la carnitina quando somministrata in elevato dosaggio, tenderebbe, in effetti, a colpire e distruggere le cellule tumorali.

Negli esempi seguenti la L-carnitina era amministrata come base libera (sale interno). Anche la D-carnitina era amministrata come base libera.

ESEMPIO 1

Si utilizzarono ratti femmina Sprague-Dawley che sviluppano spontaneamente un tumore mammario benigno, ben incapsulato (i tumori furono considerati essere classici fibroadenomi costituiti di spire e fasci di collagene denso). Si scelsero sei animali con tumori di varie dimensioni per ogni gruppo per essere sottoposti a trattamento. Tutti gli animali furono mantenuti a una dieta ad elevato tenore di grassi.

Ad un gruppo di sei animali si iniettarono 3 g/chilo di L-carnitina i.p. due volte al giorno. Un secondo gruppo di sei animali ricevette una simile dose di D-carnitina. Il terzo gruppo di sei animali ricevette 3 g/chilo di L-carnitina e 1 g/chilo di cisteina due volte al giorno. Le iniezioni in

ogni caso furono continuate per 25 giorni valutando la dimensione del tumore ai giorni 8, 15, 19, 22 e 25. Gli animali furono tenuti in osservazione per ulteriori 17 giorni e la dimensione dei tumori fu valutata al 36° e al 43° giorno. I risultati sono presentati nella seguente tabella.

TABELLA 1

Dimensione media del tumore: (pollici)

<u>Giorno</u>	<u>Controllo</u>	<u>L-carnitina</u>	<u>L-carnitina</u>
			<u>+ L-cisteina</u>
1	1,5	1,65	1,0
8	1,42	1,45	0,96
15	1,42	1,45	0,96
19	1,54	1,3	0,79
22	1,54	1,3	0,79
25	1,66	1,4	0,75

Variazione media del tumore:

0,16	(0,25)	(0,25)
------	--------	--------

Percentuale della variazione:

+0,66%	-15,15%	-25,0%
--------	---------	--------

Trattamento interrotto al giorno 25:

36	2,45	1,4	0,75
43	2,5	1,5	0,79

Variazione del tumore ai giorni 1-43:

1,0	(0,15)	(0,21)
-----	--------	--------

Percentuale di variazione:

+66,6%	-9,09%	-21,0%
--------	--------	--------

E' evidente dai dati sopra riportati che la carnitina quando somministrata da sola o in associazione con cisteina era efficace nel ridurre la dimensione del tumore.

Si deve anche notare che in seguito all'iniezione (i.p.)

- di 3 g/chilo di peso corporeo, si osservarono livelli plasmatici di L-carnitina maggiori di 15 mM. Poichè la vita media della carnitina nel plasma è di solamente circa 30 minuti, è evidente che concentrazioni di carnitina di 10 mM, come illustrato nei seguenti esempi, potrebbero essere di importanza clinica e particolarmente poichè nell'esempio 1 si somministrano ai ratti due iniezioni di carnitina a 3 g/chilo di peso corporeo per un lungo periodo di tempo senza effetti dannosi rilevabili.

ESEMPIO 2

L-carnitina e D-carnitina furono iniettate in ratti femmina Sprague-Dawley con il tumore mammario come nell'esempio 1. I ratti di controllo ricevettero iniezioni di una soluzione isotonica salina (0,15 molare). La L- e D-carnitina furono iniettate i.p. nelle quantità specificate nell'esempio 1 (la D-carnitina fu iniettata nella stessa quantità della L-carnitina). Le iniezioni furono continuate su base giornaliera per 28 giorni. La misura dei tumori fu effettuata esattamente prima di cominciare il regime di iniezioni e alla fine del periodo di 28 giorni con i risultati illustrati in tabella 2.

TABELLA 2

<u>Ratto</u>	<u>Dimensione del tumore</u>	
	<u>Originale</u>	<u>Giorno 28</u>
Controllo	3 x 2,5 in.	8,5 x 6,07 in.
Iniezione di L-carnitina	1,5 x 1,0 in. 2,2 x 2,5 in.	3,00 in.
Iniezione di D-carnitina	4,0 x 4,0 in.	6,57 in.

L'ispezione visuale dei fibroadenomi sezionati dai ratti trattati con L-carnitina rivelò che i tumori erano molto molli, di colore bruno e senza la crescita a forma lobulare sempre osservata nei fibroadenomi sezionati dai ratti controllo. Inoltre i fibroadenomi provenienti dai ratti trattati con L-carnitina risultarono avere livelli eccezionalmente elevati sia di carnitina libera che esterificata. Inoltre, l'esame patologico dei tumori da tali ratti trattati dimostrò che in tre ratti su quattro il tessuto tumorale era morto.

ESEMPIO 3

Si valutarono gli effetti di varie concentrazioni di L- e D-carnitina nei loro effetti sulla proliferazione della linea cellulare di cancro intestinale umano VACO 5 in cultura tissutale in accordo con procedimenti standard (Symposium - (book) Progress in Clinical and Biological Research, Vol. 48, "Cloning of Human Tumor Stem Cells", edito da S.E. Salmon, Publisher - Arthur R. Liss Inc., New York, pp. 332-338). La L- e D-carnitina furono aggiunte al mezzo di crescita fino ad ottenere le concentrazioni indicate in Tabella 3. I risultati sono illustrati in Tabella 3.

TABELLA 3

<u>Trattamento</u>	<u>Quantità della crescita*</u>	<u>Effetto</u>
Nessuno (controllo)	95	
L-carnitina 5 mM	26	73% inibizione
1 mM	40	58% "
0,1 mM	52	45% "
D-carnitina 5 mM	92	Nessuna inibiz.
1 mM	95	Nessuna inibiz.
0,1 mM	113	19% stimolazione

(*) La crescita è misurata dal numero di colonie che appaiono.

- E' anche stato trovato che in studi in vitro con cellule tumorali, la presenza di acidi grassi a lunga catena, per esempio palmitico, miristico, oleico, stearico, nel mezzo di crescita sembra aumentare l'effetto inibitorio di L-carnitina sulla proliferazione di cellule tumorali come è illustrato nei seguenti esempi.

ESEMPIO 4

Si preparò una singola sospensione cellulare di cellule SKCO₁, una linea di cellule di un tumore del colon; a porzioni di questa sospensione si aggiunsero le diverse concentrazioni sia di D- che di L-carnitina specificate nella Tabella 4. Le rispettive porzioni furono quindi piastrate su agar sofficie in bacinelle a pozzetto e incubate per permettere la crescita delle cellule. Tre pozzetti furono inoculati per ogni trattamento. I risultati furono calcolati contando le colonie cresciute in ogni pozzetto e facendo una media delle tre repliche. I risultati sono illustrati di seguito.

===

===

===

===

===

===

TABELLA 4

<u>Trattamento</u>	<u>Crescita media (N. di colonie)</u>	<u>% di controllo (N. di colonie in trattamento) (N. di colonie in controllo)</u>
1. Controllo	152	- -
2. 10 mM D-carnitina	294	183%
3. 1 mM D-carnitina	231	143%
4. 0,1 mM D-carnitina	245	152%
5. 10 mM L-carnitina	97	60%
6. 1 mM L-carnitina	190	118%
7. 0,1 mM L-carnitina	182	113%
8. Controllo	170	- -

La crescita media rappresenta la media dell'effettivo numero di colonie contato nei tre pozzetti di ogni trattamento. La % di crescita di controllo rappresenta quanta crescita si sia verificata nelle prove di trattamento con carnitina rispetto alle prove di controllo. Questa fu calcolata dividendo la crescita media di ogni trattamento per 161 (la crescita media dei due controlli).

E' evidente dai dati precedenti che la D-carnitina sembra stimolare la crescita a tutte le concentrazioni illustrate mentre la L-carnitina dimostra una diminuzione dipendente dalla concentrazione nell'efficienza di clonazione con quantità cre-

scenti di L-carnitina.

ESEMPIO 5

Si preparò una sospensione di cellule SKCO₁ come nello esempio 4.

Le diverse concentrazioni di L- e D-carnitina e acido palmitico e associazioni di L- e D-carnitina con acido palmitico specificate nella tabella 5 furono aggiunte a porzioni della sospensione cellulare e piastrate su agar soffice in bacinelle a pozzetto secondo la procedura dello esempio 4. I risultati ottenuti, espressi come percentuale di inibizione della crescita sulla media dei valori di controllo illustrata nella tabella 4, sono esposti nella tabella seguente.

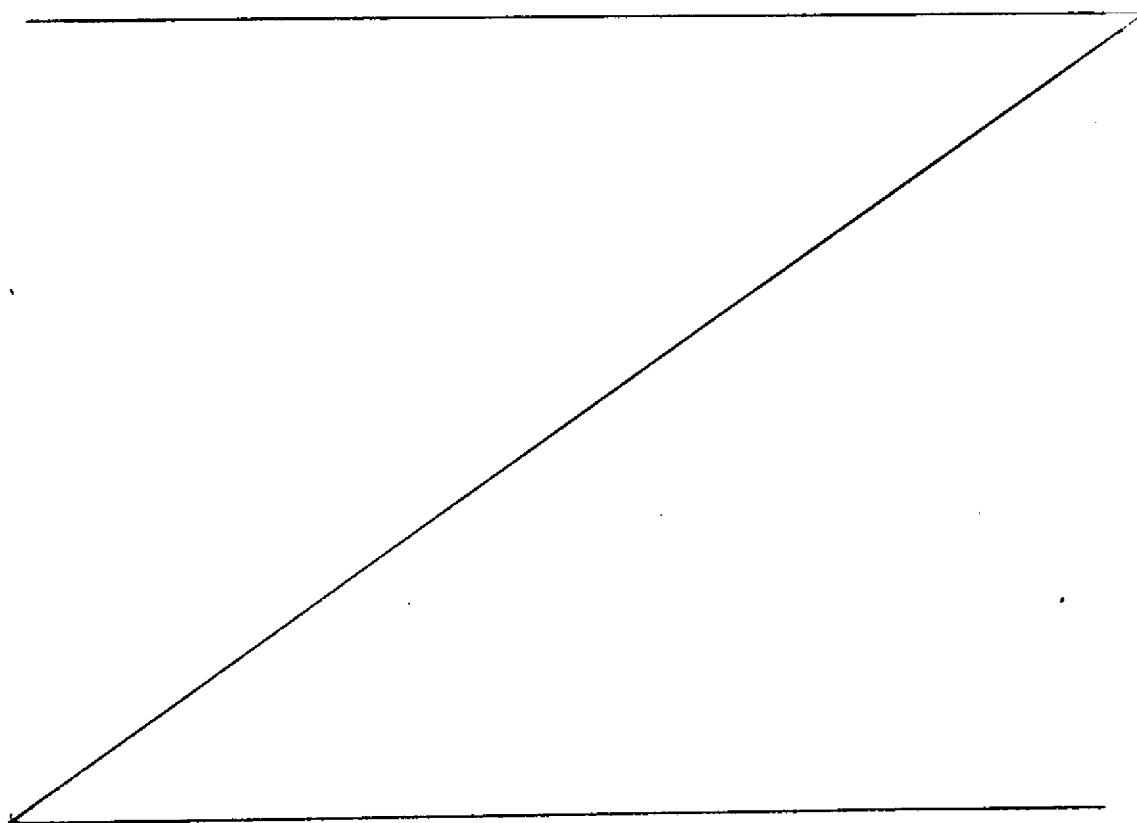


TABELLA 4

<u>Aggiunte alla sospensione cellulare</u>	<u>% di inibizione della crescita</u>
1. L-carnitina (10 mM)	30
2. L-carnitina (1 mM)	25
3. L-carnitina (0,1 mM)	10
4. L-carnitina (10 mM) + 0,01 mM di acido palmitico	(perdita delle piastre)
5. L-carnitina (1 mM) + 0,01 mM di acido palmitico	65
6. L-carnitina (0,1 mM) + 0,01 mM di acido palmitico	45
7. L-carnitina (0,01 mM) + 0,01 mM di acido palmitico	20
8. D-carnitina (10 mM)	leggera stimolazione della crescita
9. D-carnitina (1 mM)	0
10. D-carnitina (0,1 mM)	0
11. D-carnitina (10 mM) + 0,01 di acido palmitico	10
12. D-carnitina (1 mM) + 0,01 di acido palmitico	10
13. Acido palmitico (0,01 mM)	15
14. Acido palmitico (0,05 mM)	65

E' evidente dai dati precedenti che la L-carnitina dimostra un effetto antiproliferativo verso la linea cellulare di tumore del colon SKCO₁ e che tale effetto è aumentato dall'associazione della L-carnitina con acido palmitico.

Utilizzando la stessa linea cellulare dell'esempio 5, cellule tumorali furono iniettate subdermicamente in topi nudi (è ben noto nell'arte che tale iniezione provoca la crescita di lesioni della pelle nei topi nudi). Immediatamente dopo l'iniezione subdermica si iniettò nei topi di controllo soluzione salina mentre nei topi di prova si iniettò L-carnitina in una quantità pari a 3 g/chilo di peso cor-

poreo.

Si osservò che su quei topi trattati con l'iniezione salina le aspettate lesioni della pelle crebbero nel modo solito mentre quelli trattati con L-carnitina non mostrarono lesioni della pelle.

In generale, possono essere utilizzate con sicurezza quantità di carnitina da 1 a circa 5 grammi per chilo di peso di mammifero per lo scopo della presente invenzione e qualora si impieghi in associazione la cisteina, la quantità di cisteina può variare da circa 0,5 a circa 1,5 grammi per chilo di peso di mammifero. Quando si impieghi in associazione un acido grasso con L-carnitina si possono impiegare delle quantità che forniscano concentrazioni da circa 0,4 mM a circa 1,2 mM nel sangue dell'animale. Quantità di acido grasso in eccesso a quelle che forniscono concentrazioni superiori a 1,2 mM dovrebbero essere evitate a causa di potenziali effetti tossici che potrebbero essere associati con tali concentrazioni più elevate.

RIVENDICAZIONI

1. Metodo per il trattamento di tumori in mammiferi che comprende la somministrazione al mammifero di una quantità di L-carnitina inibente il tumore.
2. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui la L-carnitina è somministrata in associazione con cisteina.
3. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui la L-carniti-

na è somministrata in associazione con un acido grasso a lunga catena.

4. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui la L-carnitina è somministrata in associazione con cisteina e un acido grasso a lunga catena.

5. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui l'acido grasso a lunga catena è scelto fra gli acidi palmitico, miristico, oleico e stearico.

6. Metodo secondo la rivendicazione 4, in cui l'acido grasso a lunga catena è l'acido palmitico.

7. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui la carnitina è somministrata in una quantità da circa 1 grammo a circa 5 grammi per chilo del peso del mammifero.

8. Metodo secondo la rivendicazione 2, in cui si aggiunge cisteina in una quantità da circa 0,5 grammi a circa 1,5 grammi per chilo di peso di mammifero.

9. Metodo secondo la rivendicazione 3, in cui l'acido grasso a lunga catena è aggiunto in una quantità sufficiente per indurre un livello di acido grasso da circa 0,4 mM a circa 1,2 mM nel sangue del mammifero.

10. Una composizione antitumorale contenente L-carnitina.

11. Una composizione antitumorale comprendente in miscela L-carnitina e cisteina.

12. Una composizione antitumorale comprendente in miscela L-carnitina e un acido grasso a lunga catena.

- 13. La composizione antitumorale secondo la rivendicazione 11, in cui l'acido grasso a lunga catena è acido palmitico.

Milano,

6 SET. 1983

Fabrizio Minga
Studio Consulenza Brevettuale s.r.l.



UFFICIO BREVETTI

UTILITA' REGOLARE

Modulo PTO-436
(Rev. 8/78)

Serie No. 417179 (serie del 1979)		DATA BREVETTO		NUMERO BREVETTO		
Serie numero	Data deposito	Classe	Sottoclasse	Art.Unit.	ESAMINATORE	
06/417.179	09/13/82	424	916	GRUPPO 125	Friedman	

Per AUSTIN L. SHUG, MADISON, WI.

Richiedente

..DATA CONTINUATIVA.....
VERIFICA

.. DOMANDE ESTERE/PCT.....
VERIFICA

priorità estera rivendicata ☐ sì ☐ no
35 USC 119 condizione Met ☐ sì ☐ no

COME DEPOSITATO

→

PAESE	TAVOLE DISEGNI	RIVENDICAZIONI TOTALI	RIVENDICAZIONI INDIP.	TASSA FEELING RICEVUTA	NO. DI DOSSIER
WI	0	13	13	\$ 101.00	DI AGEN- ZIA

Verifica e accettazione: illeggibile

Indirizzo

HOWARD W. BREMER 1106 BROOKWOOD RD. MADISON, WI. 53711	THEODORE J. LONG P.O.Box 1507 122 W. Washington Ave. MADISON, WISCONSIN 53701
--	--

ASH

olo

METODO E COMPOSIZIONE PER IL TRATTAMENTO DI TUMORI

Con questo si certifica che i documenti annessi sono una copia autentica dei registri dell'Ufficio Brevetti e Marchi degli Stati Uniti della domanda così come originariamente depositata e identificata qui sopra.

Per autorizzazione dell'UFFICIALE ROGANTE DEI BREVETTI E MARCHI

Firma: G.V. Dorsey

Ufficiale attestante

Data: 1 settembre 1983

Sigillo rosso su nastro blu dell'Ufficio Brevetti Statunitense.

Timbro datato

13/9/1982

dell'Ufficio Postale
del Ministero statuni-
tense

417179

Descrizione

Metodo e composizione per il trattamento di tumori

Campo della tecnica

La presente invenzione si riferisce a un metodo e a composizioni per il trattamento di crescite tumorali.

Più specificamente la presente invenzione si riferisce a un metodo e a composizioni che promuovono una riduzione nella dimensione di crescite tumorali conclamate.

Riassunto dell'arte

~~Più di 50 anni fa~~ Otto Warburg scoprì che cellule tumorali

• maligne fermentano il glucosio ad acido lattico molto più rapidamente della maggior parte delle cellule normali, cioè esse dipendono dalla glicolisi per la loro fonte primaria di energia per la crescita (l'"effetto Warburg").

(O. Warburg, The Prime Cause and Prevention of Cancer, Triltsch, Wurzburg, Germania, 1967 pp. 6-16, Biochem. Z. 142, 317 (1923)).

Recentemente, Racker e coll. hanno dimostrato una elevata attività ATPasica ($ATP \rightarrow ADP + Pi$) nel tessuto tumorale ed hanno proposto che l'elevata attività ATPasica sia richiesta per l'alta attività glicolitica delle cellule tumorali poichè l'idrolisi di ATP a $ADP + Pi$ è nota costituire lo stadio determinante della velocità di reazione per l'utilizzazione del glucosio. (Racker, E. e Spector, M. Science 213, 303 (1981)). Pertanto, sebbene la scoperta di Racker e coll. supporti l'"effetto Warburg", non è ancora stata spiegata la ragione dell'elevata velocità di glicolisi aerobica nelle cellule tumorali.

DESCRIZIONE DELL'INVENZIONE

~~Si è ora trovato che la crescita dei tumori può essere ef-~~
ficacemente combattuta somministrando ad un animale portatore di tumore quantità relativamente grandi di L-carnitina.

Si è inoltre trovato che la crescita di tumori maligni in vitro può anche essere inibita dalla presenza di L-carnitina.

Inoltre, si è trovato che se la L-carnitina è somministrata all'animale o impiegata in situazioni in vitro in combina

09/15/82	417429	3 101	65.00CK
09/15/82	417179	3102	36.00CK

zione con cisteina l'inibizione e l'effettiva inversione della crescita e formazione tumorale è aumentata.

E' ben noto che la L-carnitina è normalmente sintetizzata nel fegato e nel rene umano da lisina e metionina; che essa è fornita al cuore, alla muscolatura scheletrica e ad altri tessuti attraverso la circolazione sanguigna; che la sua funzione principale è di facilitare l'ossidazione mitocondriale degli acidi grassi (Fritz, I.B. Physiol. Revs. 41, 52 (1961)). E' anche noto che la stimolazione dell'ossidazione degli acidi grassi da parte della carnitina è effettuata tramite l'azione congiunta degli enzimi carnitina transferasi I, il translocatore della carnitina, e carnitina transferasi II, poichè l'acil-CoA non può superare la membrana interna mitocondriale (Bremer, J., Trends in Biochemical Science, 2, 207 (1977)).

Sebbene la seguente spiegazione teorica non sia da considerare limitativa, si è postulato che poichè le cellule tumorali richiedono una elevata velocità di glicolisi per la loro crescita, e che poichè la carnitina stimola la ossidazione degli acidi grassi, la somministrazione di elevati livelli di carnitina potrebbe costringere le cellule tumorali a utilizzare acidi grassi come una fonte di energia che potrebbe impedire la glicolisi e avere effetti dannosi su tali cellule. E' sembrato che il metabolismo degli acidi grassi stimolato da carnitina potrebbe essere delete-

rio in tre modi possibili.

1. Se vi è una diminuita stabilità a ossidare acidi grassi a CO_2 e H_2O , ma è presente una normale attività carnitina transferasica, un'aumentata attivazione degli acidi grassi porterebbe all'accumulo di acil carnitina a lunga catena e a CoA esteri di acidi grassi (come dimostrato avvenire nella ischemia - vedi Shug, A.L. e coll., Arch. Biochem. Biophys. 187, 25, 1978). È stato dimostrato che tali prodotti inibiscono un numero di sistemi mitocondriali e potrebbero lisare le membrane mitocondriali e cellulari a causa della loro potente azione detergente. (Shug, A.L., Texas Reports on Bio. and Med. 39, 409 (1979); Powell, G. e coll., J. Biol. Chem. 256, 12740 (1981)).
2. Poiché l'attivazione di acidi grassi utilizza ATP e produce AMP + PPi + Acil CoA, l'attivazione degli acidi grassi stimolata da carnitina nelle cellule tumorali, dove l'ossidazione era rallentata, porterebbe a livelli diminuiti di ATP, diminuita formazione di ADP + Pi da ATPasi, e meno glicolisi.
3. L'ossidazione di acidi grassi stimolata da carnitina può essere benefica per cellule normali (Shug, A.L. e coll., Academic Press, NY, NY, Carnitine Biosynthesis, Metabolism and functions, pp. 321-340 (1980))

stimolando il loro metabolismo produttore di energia e la produzione di più ATP, rendendo perciò disponibile più energia per la sintesi di sostanze antitumorali, per esempio interferon. Pertanto, anche grazie al noto aumento del flusso sanguigno verso i tessuti tumorali e all'aumentata captazione di substrati caratteristica delle cellule tumorali, la carnitina quando somministrata in elevato dosaggio, tenderebbe, in effetti, a colpire e distruggere le cellule tumorali.

Negli esempi seguenti la L-carnitina era amministrata come base libera (sale interno). Anche la D-carnitina era amministrata come base libera.

ESEMPIO 1 Descrizione dettagliata dell'invenzione

Si utilizzarono ratti femmina Sprague-Dawley che sviluppano spontaneamente un tumore mammario benigno, ben incapsulato (i tumori furono considerati essere classici fibroadenomi costituiti di spire e fasci di collagene denso). Si scelsero sei animali con tumori di varie dimensioni per ogni gruppo per essere sottoposti a trattamento. Tutti gli animali furono mantenuti a una dieta ad elevato tenore di grassi.

Ad un gruppo di sei animali si iniettarono 3 g/chilo di L-carnitina i.p. due volte al giorno. Un secondo gruppo di sei animali ricevette una simile dose di D-carnitina. Il terzo gruppo di sei animali ricevette 3 g/chilo di L-carnitina e 1 g/chilo di cisteina due volte al giorno. Le iniezioni in

ogni caso furono continuate per 25 giorni valutando la dimensione del tumore ai giorni 8, 15, 19, 22 e 25. Gli animali furono tenuti in osservazione per ulteriori 17 giorni e la dimensione dei tumori fu valutata al 36° e al 43° giorno. I risultati sono presentati nella seguente tabella.

TABELLA 1

Dimensione media del tumore: (pollici)

<u>Giorno</u>	<u>Controllo</u>	<u>L-carnitina</u>	<u>L-carnitina + L-cisteina</u>
1	1,5	1,65	1,0
8	1,42	1,45	0,96
15	1,42	1,45	0,96
19	1,54	1,3	0,79
22	1,54	1,3	0,79
25	1,66	1,4	0,75
Variazione media del tumore:			
	0,16	(0,25)	(0,25)
Percentuale della variazione:			
	+0,66%	-15,15%	-25,0%
Trattamento interrotto al giorno 25:			
36	2,45	1,4	0,75
43	2,5	1,5	0,79
Variazione del tumore ai giorni 1-43:			
	1,0	(0,15)	(0,21)
Percentuale di variazione:			
	+66,6%	-9,09%	-21,0%

E' evidente dai dati sopra riportati che la carnitina quando somministrata da sola o in associazione con cisteina era efficace nel ridurre la dimensione del tumore.

Si deve anche notare che in seguito all'iniezione (i.p.)

di 3 g/chilo di peso corporeo, si osservarono livelli plasmatici di L-carnitina maggiori di 15 mM. Poichè la vita media della carnitina nel plasma è di solamente circa 30 minuti, è evidente che concentrazioni di carnitina di 10 mM, come illustrato nei seguenti esempi, potrebbero essere di importanza clinica e particolarmente poichè nell'esempio 1 si somministrarono ai ratti due iniezioni di carnitina a 3 g/chilo di peso corporeo per un lungo periodo di tempo senza effetti dannosi rilevabili.

ESEMPIO 2

L-carnitina e D-carnitina furono iniettate in ratti femmina Sprague-Dawley con il tumore mammario come nell'esempio 1. I ratti di controllo ricevettero iniezioni di una soluzione isotonica salina (0,15 molare). La L- e D-carnitina furono iniettate i.p. nelle quantità specificate nell'esempio 1 (la D-carnitina fu iniettata nella stessa quantità della L-carnitina). Le iniezioni furono continuate su base giornaliera per 28 giorni. La misura dei tumori fu effettuata esattamente prima di cominciare il regime di iniezioni e alla fine del periodo di 28 giorni con i risultati illustrati in tabella 2.

TABELLA 2

<u>Ratto</u>	<u>Dimensione del tumore</u>	
	<u>Originale</u>	<u>Giorno 28</u>
Controllo	3 x 2,5 in.	8,5 x 6,07 in.
Iniezione di L-carnitina	1,5 x 1,0 in. 2,2 x 2,5 in.	3,00 in.
Iniezione di D-carnitina	4,0 x 4,0 in.	6,57 in.

L'ispezione visuale dei fibroadenomi sezionati dai ratti trattati con L-carnitina rivelò che i tumori erano molto molli, di colore bruno e senza la crescita a forma lobulare sempre osservata nei fibroadenomi sezionati dai ratti controllo. Inoltre i fibroadenomi provenienti dai ratti trattati con L-carnitina risultarono avere livelli eccezionalmente elevati sia di carnitina libera che esterificata. Inoltre, l'esame patologico dei tumori da tali ratti trattati dimostrò che in tre ratti su quattro il tessuto tumorale era morto.

ESEMPIO 3

Si valutarono gli effetti di varie concentrazioni di L- e D-carnitina nei loro effetti sulla proliferazione della linea cellulare di cancro intestinale umano VACO 5 in cultura tissutale in accordo con procedimenti standard (Symposium - (book) Progress in Clinical and Biological Research, Vol. 48, "Cloning of Human Tumor Stem Cells", edito da S.E. Salmon, Publisher - Arthur R. Liss Inc., New York, pp. 332-338). La L- e D-carnitina furono aggiunte al mezzo di crescita fino ad ottenere le concentrazioni indicate in Tabella 3. I risultati sono illustrati in Tabella 3.

TABELLA 3

<u>Trattamento</u>	<u>Quantità della crescita*</u>	<u>Effetto</u>
Nessuno (controllo)	95	
L-carnitina 5 mM	26	73% inibizione
1 mM	40	58% "
0,1 mM	52	45% "
D-carnitina 5 mM	92	Nessuna inibiz.
1 mM	95	Nessuna inibiz.
0,1 mM	113	19% stimolazione

(*) La crescita è misurata dal numero di colonie che appaiono.

E' anche stato trovato che in studi in vitro con cellule tumorali, la presenza di acidi grassi a lunga catena, per esempio palmitico, miristico, oleico, stearico, nel mezzo di crescita sembra aumentare l'effetto inibitorio di L-carnitina sulla proliferazione di cellule tumorali come è illustrato nei seguenti esempi.

ESEMPIO 4

Si preparò una singola sospensione cellulare di cellule SKCO₁, una linea di cellule di un tumore del colon; a porzioni di questa sospensione si aggiunsero le diverse concentrazioni sia di D- che di L-carnitina specificate nella Tabella 4. Le rispettive porzioni furono quindi piastrate su agar sofficce in bacinelle a pozzetto e incubate per permettere la crescita delle cellule. Tre pozzetti furono inoculati per ogni trattamento. I risultati furono calcolati contando le colonie cresciute in ogni pozzetto e facendo una media delle tre repliche. I risultati sono illustrati di seguito.

===

===

===

===

===

===

TABELLA 4

<u>Trattamento</u>	<u>Crescita media (N. di colonie)</u>	<u>% di controllo (N. di colonie in trattamento) (N. di colonie in controllo)</u>
1. Controllo	152	- -
2. 10 mM D-carnitina	294	183%
3. 1 mM D-carnitina	231	143%
4. 0,1 mM D-carnitina	245	152%
5. 10 mM L-carnitina	97	60%
6. 1 mM L-carnitina	190	118%
7. 0,1 mM L-carnitina	182	113%
8. Controllo	170	- -

La crescita media rappresenta la media dell'effettivo numero di colonie contato nei tre pozzetti di ogni trattamento. La % di crescita di controllo rappresenta quanta crescita si sia verificata nelle prove di trattamento con carnitina rispetto alle prove di controllo. Questa fu calcolata dividendo la crescita media di ogni trattamento per 161 (la crescita media dei due controlli).

E' evidente dai dati precedenti che la D-carnitina sembra stimolare la crescita a tutte le concentrazioni illustrate mentre la L-carnitina dimostra una diminuzione dipendente dalla concentrazione nell'efficienza di clonazione con quantità cre-

scenti di L-carnitina.

ESEMPIO 5

Si preparò una sospensione di cellule SKCO₁ come nello esempio 4.

Le diverse concentrazioni di L- e D-carnitina e acido palmitico e associazioni di L- e D-carnitina con acido palmitico specificate nella tabella 5 furono aggiunte a porzioni della sospensione cellulare e piastrate su agar soffice in bacinelle a pozzetto secondo la procedura dello esempio 4. I risultati ottenuti, espressi come percentuale di inibizione della crescita sulla media dei valori di controllo illustrata nella tabella 4, sono esposti nella tabella seguente.

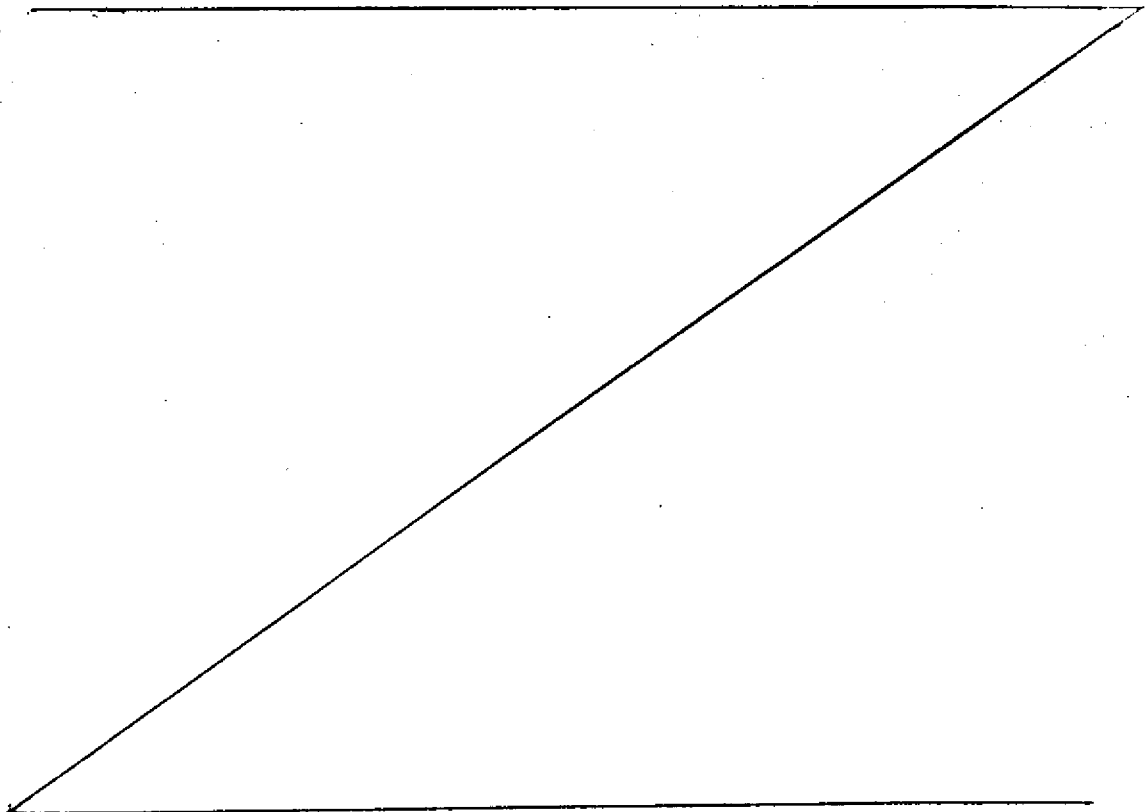


TABELLA 4

<u>Aggiunte alla sospensione cellulare</u>	<u>% di inibizione della crescita</u>
1. L-carnitina (10 mM)	30
2. L-carnitina (1 mM)	25
3. L-carnitina (0,1 mM)	10
4. L-carnitina (10 mM) + 0,01 mM di acido palmitico	(perdita delle piastre)
5. L-carnitina (1 mM) + 0,01 mM di acido palmitico	65
6. L-carnitina (0,1 mM) + 0,01 mM di acido palmitico	45
7. L-carnitina (0,01 mM) + 0,01 mM di acido palmitico	20
8. D-carnitina (10 mM)	leggera stimolazione della crescita
9. D-carnitina (1 mM)	0
10. D-carnitina (0,1 mM)	0
11. D-carnitina (10 mM) + 0,01 di acido palmitico	10
12. D-carnitina (1 mM) + 0,01 di acido palmitico	10
13. Acido palmitico (0,01 mM)	15
14. Acido palmitico (0,05 mM)	65

E' evidente dai dati precedenti che la L-carnitina dimostra un effetto antiproliferativo verso la linea cellulare di tumore del colon SKCO₁ e che tale effetto è aumentato dall'associazione della L-carnitina con acido palmitico.

Utilizzando la stessa linea cellulare dell'esempio 5, cellule tumorali furono iniettate subdermicamente in topi nudi (è ben noto nell'arte che tale iniezione provoca la crescita di lesioni della pelle nei topi nudi). Immediatamente dopo l'iniezione subdermica si iniettò nei topi di controllo soluzione salina mentre nei topi di prova si iniettò L-carnitina in una quantità pari a 3 g/chilo di peso cor-

poreo.

Si osservò che su quei topi trattati con l'iniezione salinale aspettate lesioni della pelle crebbero nel modo solito mentre quelli trattati con L-carnitina non mostrarono lesioni della pelle.

In generale, possono essere utilizzate con sicurezza quantità di carnitina da 1 a circa 5 grammi per chilo di peso di mammifero per lo scopo della presente invenzione e qualora si impieghi in associazione la cisteina, la quantità di cisteina può variare da circa 0,5 a circa 1,5 grammi per chilo di peso di mammifero. Quando si impieghi in associazione un acido grasso con L-carnitina si possono impiegare delle quantità che forniscano concentrazioni da circa 0,4 mM a circa 1,2 mM nel sangue dell'animale. Quantità di acido grasso in eccesso a quelle che forniscono concentrazioni superiori a 1,2 mM dovrebbero essere evitate a causa di potenziali effetti tossici che potrebbero essere associati con tali concentrazioni più elevate.

RIVENDICAZIONI

1. Metodo per il trattamento di tumori in mammiferi che comprende la somministrazione al mammifero di una quantità di L-carnitina inibente il tumore.
2. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui la L-carnitina è somministrata in associazione con cisteina.
3. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui la L-carniti-

na è somministrata in associazione con un acido grasso a lunga catena.

4. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui la L-carnitina è somministrata in associazione con cisteina e un acido grasso a lunga catena.

5. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui l'acido grasso a lunga catena è scelto fra gli acidi palmitico, miristico, oleico e stearico.

6. Metodo secondo la rivendicazione 4, in cui l'acido grasso a lunga catena è l'acido palmitico.

7. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui la carnitina è somministrata in una quantità da circa 1 grammo a circa 5 grammi per chilo del peso del mammifero.

8. Metodo secondo la rivendicazione 2, in cui si aggiunge cisteina in una quantità da circa 0,5 grammi a circa 1,5 grammi per chilo di peso di mammifero.

9. Metodo secondo la rivendicazione 3, in cui l'acido grasso a lunga catena è aggiunto in una quantità sufficiente per indurre un livello di acido grasso da circa 0,4 mM a circa 1,2 mM nel sangue del mammifero.

10. Una composizione antitumorale contenente L-carnitina.

11. Una composizione antitumorale comprendente in miscela L-carnitina e cisteina.

12. Una composizione antitumorale comprendente in miscela L-carnitina e un acido grasso a lunga catena.

13. La composizione antitumorale secondo la rivendicazione 11, in cui l'acido grasso a lunga catena è acido palmitico.

DICHIARAZIONE E LETTERA D'INCARICO

Come di seguito nominato inventore(i), essendo debitamente autorizzato (o incaricato), Io (noi) dichiaro e dico che: la mia(nostra) residenza(e), indirizzo (post office)(i) e cittadinanza(e) sono come dichiarati di seguito visino al mio(nostri) nome(i); che

Io(noi) credo veramente che sono(siamo) l'unico, primo e solò(soli) inventore(i) dell'invenzione intitolata:

METODO E COMPOSIZIONE PER IL TRATTAMENTO DI TUMORI
descritta e rivendicata nell'allegata descrizione; che

che non so e che non credo che questa invenzione sia mai stata conosciuta o usata negli Stati Uniti prima della mia invenzione della stessa, o brevettata o descritta in una qualsiasi pubblicazione stampata in un qualsiasi paese prima della mia invenzione, oppure più di un anno prima a questa domanda; o che fosse già in uso pubblico o in vendita negli Stati Uniti oltre un anno prima di questa domanda; dichiaro inoltre che questa mia invenzione non è stata brevettata mai in nessun paese fuori dagli

Stati Uniti in base ad una mia domanda depositata da me, dai miei rappresentanti legali o cessionari, da più di 12 mesi prima di questa domanda e che nessuna domanda di brevetto riguardante questa invenzione è mai stata presentata da me, dai miei rappresentanti legali o cessionari, eccetto quanto segue:

Io(noi) qui eleggo Howard W. Bremer, Registrazione No. 17653, mio(nostro) rappresentante con pieni poteri di sostituzione e revoca, per proseguire questa domanda e di transare tutti gli affari presso l'Ufficio Brevetti e Marchi connessi alla pratica. Indirizzare tutte le chiamate telefoniche a Howard W. Bremer, al telefono n. (608)271-4683. Indirizzare tutta la corrispondenza a Howard W. Bremer, 1106 Brookwood Road, Madison, Wisconsin 53711_____

Io(noi)dichiaro inoltre che tutte le dichiarazioni fatte qui sopra di mia(nostra) conoscenza sono vere e che tutte le informazioni in base a informazioni acquisite e alla credenza credo siano vere; e inoltre che queste dichiarazioni intenzionalmente false e simili cose sono punibili tramite multa o pena di incarcerazione, o entrambe, secondo la Sezione 1001 del Paragrafo 18 degli Stati Uniti d'America, e che tali dichiarazioni intenzionalmente false possono pregiudicare la validità della domanda o di un qualsiasi brevetto concesso sulla stessa.

- Nome completo dell'inventore Austin L. Shug

Firma dell'inventore*

Residenza 1201 Shorewood Blvd., Madison, WI 53705

Cittadinanza Stati Uniti d'America

Indirizzo ufficio postale 1201 Shorewood Blvd.

Madison, WI 53705

Data 7 settembre, 1982

Nome completo dell'inventore* firma: Austin L. SHug.

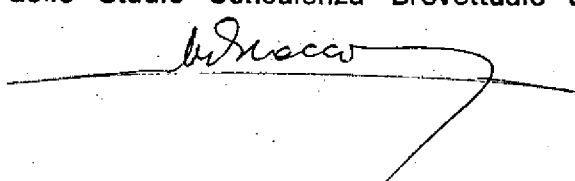
Per traduzione conforme.

Milano, **15 DIC. 1983**

Il Mandatario

(Rag. Mauro Bracco)

dello Studio Consulenza Brevettuale s.r.l.



Mauro Bracco

DOCUMENTAZIONE RILEGATA