



Ministero delle Imprese e del Made in Italy
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETÀ INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHE

UIBM

| | |
|-------------------------------------|------------------------|
| DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO | 101989900083194 |
| Data Deposito | 05/10/1989 |
| Data Pubblicazione | 05/04/1991 |

Classifiche IPC

Titolo

COMPOSTI TRIPEPTIDICI E LORO USO FARMACEUTICO COME IMMUNO-MODULATORI

SIB-88186

DESCRIZIONE dell'invenzione industriale dal titolo:
"COMPOSTI TRIPEPTIDICI E LORO USO FARMACEUTICO COME
IMMUNO-MODULATORI"

della ditta italiana POLIFARMA S.p.A.
con sede in R O M A

.....
RIASSUNTO

Composti di carattere peptidico presentanti una
sequenza di tre amminoacidi, particolarmente con PYR
e TRP come terminali, risultano essere attivi come
agenti immuno-modulatori.

DESCRIZIONE

La presente invenzione si riferisce a composti
di carattere peptidico che manifestano la capacità di
influenzare la risposta immunitaria di mammiferi.

I composti polipeptidici sono identificati dalla
seguente sequenza di amminoacidi:

A-X-B

in cui

A indica PYR, PRO, Z-PRO

B indica TRP, PHE, TYR, e

in cui X indica GLY, VAL, GLU, ASP, SER, ALA, ASN,
GLN, ILE, LEU, PRO, LYS e ARG.

48430A891

I composti sopra indicati, nonchè i loro sali ed esteri presentano una attività immunostimolante o immunodeprimente e sono quindi impiegabili in generale in terapia come immunomodulatori.

I composti di cui sopra sono formati in primo luogo da un nucleo tripeptidico PYR-X-TRP , dove X ha il significato sopra indicato, che rappresenta composti tripeptidici già noti dai brevetti italiani n°1.172.391 e 1.186.733.

Secondo la presente invenzione è stato trovato che anche tali composti tripeptidici presentano attività come agenti immuno-modulatori.

Nei brevetti sopra citati questi composti tripeptidici erano stati valutati come agenti antiipertensivi, oppure analgesici.

E' inoltre noto dalla medicina tradizionale che i veleni di serpenti hanno la proprietà di stimolare la risposta immunitaria degli animali e degli uomini colpiti. Questa caratteristica, che viene tutt'ora utilizzata allo scopo di produrre vaccini che consentano di attenuare i danni prodotti da avvelenamento, viene generalmente attribuita al fatto che nei veleni di serpenti sono presenti dei veri e propri mosaici di antigeni, capaci di stimolare risposte specifiche e aspecifiche nel sistema

immunitario dell'animale avvelenato. Per quanto riguarda le risposte specifiche, i veleni di serpente possiedono numerose tossine che stimolano la produzione di anticorpi ben caratterizzati.

La presente invenzione è invece diretta alla comprensione dei fattori presenti nei veleni di serpente che sono capaci di stimolare la risposta aspecifica di linfociti e macrofagi del sangue degli individui colpiti.

E' stato pertanto scoperto secondo la presente invenzione che alcuni piccoli peptidi, presenti nei veleni di crotali di viperidi, nonché loro derivati ottenuti per sintesi chimica, sono in grado di stimolare o deprimere la risposta immunitaria di cellule di mammiferi, e perciò potrebbero essere usati terapeuticamente ogni volta che il sistema immunitario risulta carente a causa di invecchiamento, infezioni croniche, tumori, AIDS, malattie virali e simili, oppure al contrario se ne vuole ridurre l'attività, per esempio nei trapianti d'organo.

Forma pertanto oggetto della presente invenzione l'uso farmaceutico come immuno-modulatori dei composti tripeptidici caratterizzati dalla sequenza di amminoacidi precedentemente riportata, nonché loro

semplici sali ed esteri.

QUADRO SPERIMENTALE

Viene illustrato qui di seguito il disegno sperimentale sviluppato a partire da una nutrita serie di veleni di serpente (crotalidi e viperidi) che, deproteinizzati, sono stati saggiati su linfociti T umani, stimolati con quattro diversi agenti. E' stata poi misurata l'entità della proliferazione cellulare indotta.

Come agenti stimolanti sono stati usati l'Interleukina 2 (fattore di crescita dei linfociti T), la fitoemoagglutinina (PHA, un mitogeno), la concavalina A (ConA, un altro mitogeno) ed una proteina derivante da micobatterio della tubercolosi (PPD, un antigene).

I veleni venivano quindi frazionati per cromatografia e le frazioni così ottenute venivano anche esse saggiate sui linfociti T, fino a che non si ottenevano dei peptidi cromatograficamente puri.

Tali peptidi sono stati impiegati per valutare la loro attività immunomodulante in correlazione ad un test di proliferazione di cellule mononucleate le cui modalità ed i cui risultati sono descritti qui di seguito.

Test di proliferazione di cellule mononucleate

Cellule mononucleate di sangue periferico umano (PBMC), fornito da volontari sani, sono state purificate secondo tecniche normalmente in uso nei laboratori di ematologia, e sono state infine sospese, alla concentrazione di 1.000.000/ml nel terreno RPMI 1640 (ditta Flow Laboratories), arricchito con 10% di siero umano inattivato al calore, 2 mM di glutamina e 40 mcg/ml di Gentalyn (ditta Shering Co.).

Le cellule vennero coltivate (100.000/pozzetto) in triplicato su piastre da 96 pozzetti a fondo piatto, per diversi giorni a seconda delle sostanze attivatrici usate (6 giorni per Interleukina 2 e PPD, 3 giorni per PHA e ConA), in 200 microlitri del terreno di sospensione, in incubatore a 37°C al 5% di CO₂. Nelle ultime 17 ore di coltura le cellule venivano marcate con 0,5 microCurie di timidina tritiata (TdR). Al termine del periodo di incubazione, la radioattività presente nelle cellule veniva raccolta su filtri di fibra di vetro. L'incorporazione di TdR era misurata in un contatore di radiazioni beta.

I risultati sono espressi come medie aritmetiche delle conte.

Sulle cellule così coltivate è stato valutato

l'effetto delle sostanze derivate da veleni di serpente.

L'effetto è stato valutato qualitativamente, esprimendo con +, ++ e +++ le sostanze che agivano come stimolatrici (dalle meno alle più efficaci), e con -, -- e --- le sostanze che inibivano la normale crescita cellulare. I composti inattivi sono stati espressi con =.

Quando le sostanze hanno mostrato un andamento bifasico con il diminuire della dose messa ad incubare (caso non infrequente per gli immunomodulatori), ciò è stato indicato separando con / gli effetti delle dosi più alte da quelli delle dosi più basse.

I risultati del test precedentemente descritto ottenuti valutando i veleni deproteinizati di serpente, o loro frazioni, sono espressi nella seguente tabella 1.

TABELLA 1

| VELENO | ATTIVATORE USATO | | | PPD |
|------------------------|------------------|---------|-------|-------|
| | Interl.2 | PHA | ConA | |
| Ankistr.Bilineatus | --- | = | | = |
| Ank.Cont.Mokason | -- | -/+++ | ---/+ | --/++ |
| Ank.Pisc.Piscivorus | --- | ---/+ | --- | --- |
| Bitis Gabonica | | --/+++ | -/+ | |
| Bothrops Jararaca | | -- | --- | |
| Bothrops Neuwedii | | - | -- | |
| Crotalus Atrox | | --/+ | --- | |
| Crot.Horr.Atricaudatus | --/+ | --/+ | | --- |
| Crot.Virid.Oreganus | --- | --- | --- | |
| Trimeres.Albolabris | ---/+ | -/+ | | --- |
| Vipera Ammodytes | -- | - | | --/+ |
| Ank.Bilin. fraz.1 | --- | --- | | --- |
| Ank.Bilin. fraz.2 | -/+ | | | -- |
| Ank.Bilin. fraz.3 | = | ---/+++ | | = |
| Ank.Bilin. fraz.4 | = | = | | = |

I risultati della tabella mostrano chiaramente che la maggior parte dei veleni deproteinizati sottoposti al test, agisce sopprimendo la risposta immunitaria delle cellule mononucleate umane. Appare chiaro inoltre che la progressiva purificazione dei veleni porta ad isolare composti ad effetto sempre più evidente sulla risposta immunitaria (attivazione o inibizione).

Fondamento sperimentale della presente invenzione

La prova sperimentale precedentemente illustrata mostra che i peptidi derivati direttamente dai veleni di serpente hanno una risposta immunitaria per lo più soppressiva ed inoltre di opposto segno al variare del dosaggio.

I composti della presente invenzione mostrano al contrario una chiara risposta in senso stimolante o inibente della attività immunologica dei linfociti T umani.

Il test precedentemente descritto è stato ripetuto impiegando al posto dei veleni ottenuti per cromatografia, peptidi sintetici secondo la presente invenzione.

E' stato sintetizzato un esapeptide PYR-LEU-TRP-MET-ASP-PHE il quale, accanto alla sequenza tripeptidica PYR-LEU-TRP, possiede la sequenza

terminale della colecistochinina. Questa sequenza sembra possedere specifici recettori su molti tipi di cellule, come descritto per esempio in Nature 284,33-38, 1980. Poichè studi struttura-attività effettuati su numerosi altri composti aventi il tripeptide MET-ASP-PHE hanno evidenziato che questo tripeptide è ininfluente per l'attività biologica, i test sono stati focalizzati sul composto PYR-LEU-TRP e su tripeptidi analoghi già sintetizzati in precedenza.

ESEMPIO 1

Test di proliferazione di cellule mononucleate

Utilizzando le stesse modalità usate nel test descritto in precedenza, una serie di composti a struttura peptidica secondo l'invenzione, nonché altri composti di controllo, vengono sottoposti al saggio per la loro attività immuno-modulante.

I risultati sono riportati nella seguente tabella 2:

TABELLA 2

| PEPTIDE | ATTIVATORE USATO | | |
|--|------------------|-----|------|
| | Interl.2 | PHA | PPD |
| PYR-LEU-TRP-PRO-ARG- -PRO-GLN-ILE-PRO-PRO | ++ | = | = |
| PYR-ASN-TRP | + | - | -/+ |
| PYR-LEU-TRP-MET-ASP-PHE | = | -- | +++ |
| PYR-LEU-TRP | +++ | | +++ |
| Z-PRO-LEU-TRP | +++ | | -/++ |
| PYR-GLY-PHE | +++ | | -/+ |
| Formil-MET-LEU-PHE | | | -/+ |
| Fosforamidon (Zucchero-LEU-TRP) | +++ | | +++ |
| Tuftsina (THR-LYS-PRO-ARG) | = | = | = |

I risultati della tabella 2 mostrano che i composti secondo l'invenzione sono buoni stimolatori della risposta immunologica, specialmente quando saggiati su cellule mononucleate umane in presenza di Interleukina 2 o di PPD.

Il confronto con Fosforamidon, un composto prodotto da funghi e usato in prove di inibizione di proteasi, indica che probabilmente il residuo C-terminale LEU-TRP è il responsabile dell'effetto immuno-potenziante, ma anche altri dipeptidi possono assolvere alla stessa funzione.

Una serie di prove sperimentali di conferma sulla risposta immunitaria in vitro e in vivo sono state effettuate con il composto PYR-LEU-TRP.

ESEMPIO 2

Effetto di PYR-LEU-TRP sulla risposta proliferativa di PBMC.

L'entità della risposta di cellule mononucleate del sangue periferico umano (PBMC) dopo stimolazione di PPD e del peptide PYR-LEU-TRP è stata valutata su 10 campioni diversi di sangue di volontari sani.

I risultati indicano che, usando l'antigene in dosi ottimali (10 mcg/ml) e il peptide in due dosi diverse (1 e 0,01 mcg/ml), la risposta proliferativa viene sempre potenziata, pur con una grande

variabilità interindividuale. Il valore medio di timidina tritiata incorporata dalle cellule subisce circa un raddoppio sia alla dose più alta che a quella più bassa.

ESEMPIO 3

Effetto di PYR-LEU-TRP su linfociti B

Partendo dal presupposto che l'effetto del peptide fosse dovuto alla stimolazione nella fase di presentazione dell'antigene, i linfociti B sono stati separati dai linfociti T e quindi sono stati incubati con il peptide prima della stimolazione con PPD.

Dopo lavaggio, i linfociti B sono stati messi in contatto con i linfociti T e la risposta è stata valutata attraverso il conteggio di timidina tritiata.

I risultati sono riportati nella seguente tabella 3.

TABELLA 3
Effetto su linfociti B

| mcg/piastra | Incorporazione di [³ H] TdR |
|-------------|--|
| 100 | 2.000 |
| 10 | 21.700 |
| 1 | 20.000 |
| 0,1 | 26.000 |

La tabella 3 mostra in modo evidente che il tripeptide presenta un forte effetto di stimolazione della risposta proliferativa tra la concentrazione di 1 e 10 mcg/piastra, mentre è inattivo all'esterno di questo intervallo di concentrazione.

ESEMPIO 4

Effetto di PYR-LEU-TRP in relazione al numero di linfociti

Poichè le malattie da deficienza di risposta immunitaria dipendono molto spesso dalla carenza di linfociti in grado di rispondere adeguatamente, il tripeptide PYR-LEU-TRP è stato saggiato su colture contenenti livelli molto diversi di linfociti.

I risultati ottenuti valutando l'incremento percentuale di timidina incorporata, hanno

evidenziato che il potenziamento della risposta immunitaria è molto più evidente quando i linfociti sono scarsi, mentre tende a zero per valori molto elevati di cellule. Ciò indica che il composto può avere un ruolo importante nei casi di deficienza linfocitaria.

ESEMPIO 5

Effetto di PYR-LEU TRP sui macrofagi

I risultati sono mostrati nella seguente tabella

4.

TABELLA 4

Effetto su macrofagi

| mcg/piastra | Incorporazione di [³ H] TdR |
|-------------|--|
| 100 | 9.600 |
| 10 | 7.600 |
| 1 | 14.900 |
| 0,1 | 9.150 |
| 0,01 | 6.700 |

I risultati indicano che, anche in questo caso, esiste un intervallo di concentrazione in cui il peptide è in grado di stimolare la risposta proliferativa, mentre all'esterno di questo

intervallo la risposta è assente. Si può perciò dire che il tripeptide è un immuno-modulatore.

ESEMPIO 6

Effetto di PYR-LEU-TRP sul rilascio di Interferon

Allo scopo di approfondire il meccanismo della stimolazione immunitaria, sono state fatte ricerche sulla quantità di Interferon gamma presente nei linfociti stimolati con 100 mcg/ml di PYR-LEU-TRP. Pur nella variabilità dei risultati ottenuti nelle diverse prove, il tripeptide ha dimostrato di indurre una produzione circa quadrupla di Interferon rispetto alle cellule non stimolate.

ESEMPIO 7

Confronto fra PYR-LEU-TRP e Interferon gamma

Allo scopo di approfondire il meccanismo di azione, l'effetto della tripeptide PYR-LEU-TRP è stato paragonato a quello dell'Interferon gamma per quanto riguarda la stimolazione della risposta proliferativa dei linfociti T dopo presentazione dei linfociti B trattati con PPD.

I risultati indicano che sia il tripeptide (usato alla dose di 10 mcg/ml) che il gamma Interferon (usato alla dose di 1000 u/ml) aumentano di circa due volte e mezza la risposta basale. Per di più i due composti non hanno effetto additivo, per

cui si può presumere che la risposta immunitaria sia stimolata dal tripeptide, almeno in parte, attraverso produzione di Interferon.

ESEMPIO 8

Prove in vivo con PYR-LEU-TRP

Il tripeptide PYR-LEU-TRP è stato sottoposto a prove iniziali in vivo, per confermarne l'attività immunopotenziante.

Un primo modello sperimentale, nel quale veniva principalmente valutata la funzionalità della componente B della risposta immune (immunizzazione con emazie di montone), ha dimostrato che il tripeptide, ai dosaggi di 100 e 500 mcg/topo/i.v., è in grado di stimolare in modo statisticamente significativo la risposta immune a un successivo "Challenge" con quantità subottimali di antigene. Se l'animale viene trattato con quantità ottimali di antigene (che portano già da sole ad una risposta immune ottimale), si osserva anche in questo caso un potenziamento della risposta immune a seguito di trattamento con il tripeptide, ma in questo caso l'incremento non raggiunge la significatività statistica.

In un secondo modello sperimentale, utilizzato per valutare la componente T della risposta immune

(infezione con bacillo Calmette-Guerin), è stato ugualmente evidenziato un significativo potenziamento della risposta immune in seguito a trattamento ripetuto con 100 mcg/topo di tripeptide. In questo caso la risposta di animali resi immunodepressi dal trattamento endovena dell'antigene, aumentava significativamente dopo somministrazione del tripeptide, che riportava i valori della risposta immune verso la normalità.

Questi risultati indicano che il peptide PYR-LEU-TRP è in grado di potenziare sia la componente B che quella T della risposta immune.

Analoghi risultati di attività immunomodulante presentano i tripeptidi della serie PYR-X-TRP dove X ha il significato sopra indicato, con o senza l'aggiunta della sequenza MET-ASP-PHE.

RIVENDICAZIONE

1. Uso di un composto tripeptidico di formula

A-X-B

in cui A indica PYR, PRO, Z-PRO,

B indica TRP, PHE, TYR

X indica GLY, VAL, GLU, ASP, SER, ALA, ASN, GLN, ILE, LEU, PRO, LYS e ARG

e loro sali ed esteri oppure di una composizione che contiene uno di detti composti, per la fabbricazione

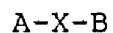
(infezione con bacillo Calmette-Guerin), è stato ugualmente evidenziato un significativo potenziamento della risposta immune in seguito a trattamento ripetuto con 100 mcg/topo di tripeptide. In questo caso la risposta di animali resi immunodepressi dal trattamento endovena dell'antigene, aumentava significativamente dopo somministrazione del tripeptide, che riportava i valori della risposta immune verso la normalità.

Questi risultati indicano che il peptide PYR-LEU-TRP è in grado di potenziare sia la componente B che quella T della risposta immune.

Analoghi risultati di attività immunomodulante presentano i tripeptidi della serie PYR-X-TRP dove X ha il significato sopra indicato, con o senza l'aggiunta della sequenza MET-ASP-PHE.

RIVENDICAZIONE

1. Uso di un composto tripeptidico di formula



in cui A indica PYR, PRO, Z-PRO,

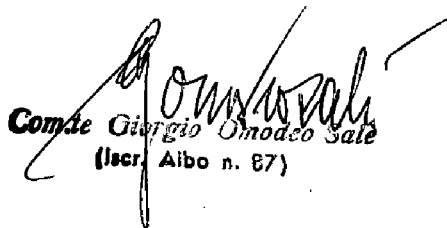
B indica TRP, PHE, TYR

X indica GLY, VAL, GLU, ASP, SER, ALA, ASN, GLN, ILE, LEU, PRO, LYS e ARG

e loro sali ed esteri oppure di una composizione che contiene uno di detti composti, per la fabbricazione

di un medicamento attivo come immuno-modulatore.

p.p. POLIFARMA S.p.A.


Conte Giorgio Onofredo Salè
(Iscr. Albo n. 87)

