



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

# UIBM

|                           |                        |
|---------------------------|------------------------|
| <b>DOMANDA NUMERO</b>     | <b>101990900146668</b> |
| <b>Data Deposito</b>      | <b>25/10/1990</b>      |
| <b>Data Pubblicazione</b> | <b>25/04/1992</b>      |

|                |               |                    |               |                    |
|----------------|---------------|--------------------|---------------|--------------------|
| <b>Sezione</b> | <b>Classe</b> | <b>Sottoclasse</b> | <b>Gruppo</b> | <b>Sottogruppo</b> |
| A              | 61            | K                  |               |                    |

Titolo

DERIVATI DI CORTICOSTEROIDI, PROCEDIMENTO PER LA LORO PREPARAZIONE E  
COMPOSIZIONI FARMACEUTICHE CHE LI CONTENGONO.

Descrizione dell'invenzione industriale a nome: LABORATORI BALDACCI

SPA. - A PISA 25 OTT. 1990

21880 A/90

\*\*\*\*\*

La presente invenzione riguarda nuovi derivati di corticosteroidi, in particolare quelli noti con i nomi di prednisolone e betametasone, un procedimento per la loro preparazione e le composizioni terapeutiche che li contengono quale ingrediente attivo.

I corticosteroidi come è noto inibiscono la produzione od il rilascio di mediatori prodotti dai macrofagi cui è attribuito un ruolo chiave nei meccanismi dell'infiammazione e nella risposta immunitaria (prostaglandine, leucotrieni interlenchina I, ecc.), (Schleimer R.P., Ann; Rev. Pharmacol. Toxicol., 25, 381, (1985)).

Poichè gli steroidi agiscono anche su altri sistemi cellulari coinvolti nei processi flogistici ed immunitari, è difficile valutare in che misura l'attività di questi farmaci sui macrofagi contribuisca ai loro effetti anti-infiammatori ed immunosoppressori. E' anche noto che la albumina, coniugata con piccole molecole viene assunta selettivamente dalle cellule del sistema macrofagico (Kruse H., Mc Master P.D., J, Exp. Med., 90, 425, (1949)).

D'altro canto esperimenti in vitro ed in vivo hanno mostrato che alcune tossine, come amanitina e falloidina, ed alcuni farmaci antivirali, come arabinoside citosina e fluorodeossiuridina, dopo coniugazione con albumina non hanno perso l'attività biologica che è stata esplicita selettivamente nei macrofagi. (Derenzini M. e coll., Lab. Invest., 29 150, (1973); Barbanti-Brodano G., Fiume L., Nature New Biology 243, 281, (1973); Barbanti-Brodano G., Derenzini M. Fiume L., Nature, 248, 63, (1974);

Balboni P.G. e coll., *Nature*, 264, 181 (1976).

E' stato ora trovato che alcuni corticosteroidi, in particolare prednisolone e betametasone, se coniugati con albumina umana, entrano specificamente nei macrofagi suggerendo che in alcune patologie possono esplicare i loro effetti terapeutici senza gli effetti collaterali caratteristici di questi farmaci, proprio in virtù della selettività di distribuzione cellulare dopo la somministrazione.

A sua volta il procedimento secondo la presente invenzione per la preparazione dei predetti coniugati prevede di effettuare la coniugazione tra albumina umana (HSA) e corticosteroide in forma di emisuccinato, preparato in modo di per se noto, seguendo il procedimento dell'anidride mista con uso di isobutil clorocarbonato come descritto da Erlanger B.F. e coll., *J. Biol. Chem.*, 228, 713, (1957), e determinando per via spettrofotometrica (Erlanger B.F., *ibidem*) sul coniugato risultante il rapporto molare tra corticosteroide ed HSA, rapporto che in tutte le preparazioni sperimentali è stato trovato compreso tra 15 e 19. Questo rapporto rimane invariato anche operando la liofilizzazione del coniugato ed il suo mantenimento a temperatura ambiente per un anno. La soluzione di coniugato a 37°C dopo 24 ore non mostra rilascio di corticosteroide libero, il che dimostra la stabilità del legame tra corticosteroide ed HSA; questo legame è con tutta probabilità un legame carboamidico tra il gruppo succinico del corticosteroide ed i gruppi amminici lisinici dalla proteina.

Per le prove farmacologiche i preparati di coniugato sono stati marcati con <sup>125</sup>I secondo la procedura di Fraker e Speck (Fraker P.J., Speck Jr. J. C., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80, 849, (1978)).

I macrofagi sono stati ottenuti da monociti umani isolati da sangue periferico

(Orlandi M. e coll. Prostaglandins Leukot. Med., 18, 205, (1985)) e posti in coltura per sei giorni in RPMI 1640 (Flow) contenente il 10% di siero umano del gruppo AB.

Fibroblasti della linea cellulare murina 3T3 sono stati coltivati in RPMI 1640 contenente il 10% di siero di feto bovino. Per la sperimentazione sulla penetrazione del coniugato, le cellule (macrofagi o fibroblasti) ( $4-6 \times 10^6$ ) sono state incubate in RPMI 1640 (senza siero) in presenza di 300 ng/ml PRDN- $(^{125}\text{I})\text{HSA}$  (attività specifica  $2.4 \times 10^6$  cpm/ug). Le cellule sono state raccolte al tempo 0 e dopo un'ora: dopo tre lavaggi con soluzione salina di fosfati tamponata (PBS), sono state dissolte con 2 ml di NaOH 6N e si è proceduto alla misurazione della loro radioattività e del loro contenuto di proteine.

Le concentrazioni di coniugato sono state calcolate dai valori di radioattività intracellulare che sono stati ottenuti sottraendo i cpm conteggiati al tempo 0 da quelli misurati dopo un'ora (tempo 1h). La produzione di prostaglandina  $\text{E}_2$  ( $\text{PGE}_2$ ) e di trombossano  $\text{A}_2$  ( $\text{TXA}_2$ ) è stata indotta nei macrofagi mediante aggiunta del 10% di siero di feto bovino al mezzo di coltura (Bartolini G. e coll., Biochim. Biophys. Acta, 876, 486, (1986)). Dopo 24 ore di incubazione sono stati determinati i valori di  $\text{PGE}_2$  e trombossano  $\text{B}_2$  (metabolita stabile del  $\text{TXA}_2$ ) nel mezzo di coltura mediante RIA (Orlandi, ibidem).

La tabella 1 mostra le concentrazioni di PRDN- $(^{125}\text{I})\text{HSA}$  nei macrofagi e nei fibroblasti coltivati per 1 ora in presenza del coniugato. In accordo con le risultanze di letteratura secondo le quali molecole di albumina modificate chimicamente entrano selettivamente nei macrofagi, è stato trovato che la

concentrazione di coniugato in queste cellule è molto più alta che nei fibroblasti.

TABELLA 1

Concentrazione di PRDN-(<sup>125</sup>I)HSA in macrofagi e fibroblasti coltivati

| Cellule     | PRDN-( <sup>125</sup> I)HSA |
|-------------|-----------------------------|
|             | (ng/mg proteine cellulari)  |
| Macrofagi   | 24.8 +/- 4.6 <sup>a</sup>   |
| Fibroblasti | 0.8 +/- 0.1                 |

a: valore medio dei risultati (+/- E.S.) di 4 esperimenti

Nella figura 1 allegata è mostrato che il coniugato PRDN-HSA inibisce la produzione di prostaglandina E<sub>2</sub> e di trombossano A<sub>2</sub> indotta nei macrofagi coltivati in vitro mediante aggiunta di siero di feto bovino fresco.

L'inibizione riguarda la sintesi di prostaglandine E<sub>2</sub>(\*) e di trombossano A<sub>2</sub>(o) nei macrofagi. Ciascun punto rappresenta i valori medi dei risultati di quattro esperimenti. Gli errori standard delle percentuali di inibizione nei diversi esperimenti variavano da +/-0.6 a +/- 5.9 a seconda delle diverse concentrazioni di coniugato. Ad una concentrazione del coniugato di 0,6  $\mu$ g/ml, corrispondente a 0,05  $\mu$ g/ml di PRDN (prednisolone) copulato, si ottiene una inibizione del 50% della produzione sia delle prostaglandine che del trombossano. Senza voler porre limiti indebiti alla presente invenzione, sembra plausibile attribuire l'attività del coniugato ad una cessione intracellulare del farmaco dal veicolo: questa ipotesi è confortata dal fatto che, come è noto, l'albumina dopo la penetrazione nei macrofagi penetra nei

lisosomi e che gli steroidi esplicano la loro attività dopo essersi legati ad un recettore citosolico. Appare quindi probabile che il coniugato PRDN-HSA si comporti come un agente lisosomotropico: il legame che unisce il farmaco all'albumina si rompe all'interno dei lisosomi ed il farmaco libero esercita la sua azione farmacologica dopo aver attraversato la membrana lisosomiale.

Questa selettività di penetrazione del coniugato nei macrofagi comporta come conseguenza che l'attività dello steroide si espliciti quindi soltanto a questo livello senza gli effetti collaterali usuali derivanti dalla penetrazione del farmaco in altri sistemi cellulari.

Venendo ora al coniugato di betametasone (BMT), esso è stato coniugato con HSA previa trasformazione nel suo emisuccinato. Questa preparazione viene qui di seguito descritta in quanto l'emisuccinato, a differenza di quello del prednisolone (PRDN), non è disponibile commercialmente.

BMT (0,5 mmoli), anidride succinica (4 mmoli) e 4-dimetilaminopiridina (0,17 mmoli) sono stati disciolti in 6 ml di piridina anidra e lasciati a temperatura ambiente. Dopo 24 ore la cromatografia su strato sottile su piastre di gel di silice (60F-254; Merck) con 2-propanolo-idrossido di ammonio concentrato-acqua (60:30:10 v/v) ha mostrato che praticamente tutto il BMT era stato convertito nel suo emisuccinato. A questo punto il pH della miscela di reazione è stato abbassato fino al valore di 1 con HCl per fare precipitare il BMT emisuccinato. Dopo 1 ora a 0-4°C la miscela è stata centrifugata e il supernatante è stato scartato. Il BMT emisuccinato è stato disciolto in 12 ml di acqua mediante aggiunta di  $\text{NaHCO}_3$  in polvere e quindi precipitato di nuovo con HCl, raccolto e seccato sotto vuoto (0,45 mmoli).

Il BMT emisuccinato è stato coniugato alla HSA seguendo la stessa procedura

utilizzata per preparare il coniugato con il PRDN emisuccinato. Il rapporto molare farmaco/HSA, determinato spettrofotometricamente, è risultato 15, 15 e 18 in tre diverse preparazioni.

Si è sperimentata l'azione del coniugato BMT-HSA sulla produzione di prostaglandine  $E_2$  indotta nei macrofagi attivati in vitro dall'aggiunta di siero fetale al 10%. Si è seguita la procedura usata per il coniugato PRDN-HSA. I risultati, esposti nella Fig. 2, hanno mostrato che anche il coniugato con il BMT blocca la formazione di  $PGE_2$ . Una inibizione del 50% è raggiunta da concentrazioni di BMT-HSA di 0.3-0.4  $\mu\text{g/ml}$  corrispondenti a 0.02-0.03  $\mu\text{g}$  di BMT/ml.

In esperimenti eseguiti sul ratto è stata confrontata la penetrazione in vivo del coniugato BMT-HSA nelle cellule parenchimali del fegato con quella nelle cellule sinusoidali dello stesso organo, le quali appartengono al sistema delle cellule macrofagiche (Van Furth et al., Bull Wld Hlth Org. 46,854 (1972)). Per questi esperimenti si è usata una preparazione di coniugato radioattivo ottenuta legando il BMT emisuccinato con HSA marcata mediante l'uso di formaldeide triziata secondo il metodo di Jentof e Darborn, e seguendo la procedura descritta in (Fiume et al. Cancer Drug Delivery 4, 11 (1987) (attività specifica  $1.2 \times 10^6$  dpm/mg). Il rapporto molare farmaco/proteina del coniugato radioattivo è risultato di 15. Gli esperimenti sono stati condotti esattamente come descritto in (Fiume et al., Cancer Drug Delivery 4, 11 (1987). I risultati, esposti nella Tabella 2, mostrano che la concentrazione del coniugato nelle cellule sinusoidali è circa cento volte superiore a quella nelle cellule parenchimali.

TABELLA 2

Distribuzione del coniugato BMT-albumina nelle cellule parenchimali e sinusoidali del fegato di ratto 30 minuti dopo la sua somministrazione

| Composto                | Dose<br>( $\mu\text{g/g}$ ) | Cellule parenchimali | Cellule sinusoidali |
|-------------------------|-----------------------------|----------------------|---------------------|
| BMT-[ $^3\text{H}$ ]RSA | 35                          | $1.3 \pm 0.3$        | $146.5 \pm 1.2$     |

Gli esperimenti sono stati condotti come descritto in Cancer Drug Delivery 4, 11 (1987).

I risultati sono stati calcolati dai valori di radioattività acido insolubile delle preparazioni cellulari. Essi sono stati espressi come percentuale del dpm iniettati  $\times 10^3/\text{mg}$  di proteine cellulari. I dati rappresentano la media ( $\pm$  l'errore standard) dei risultati ottenuti da 4 esperimenti.

#### RIVENDICAZIONI

1. Composto di corticoide ed albumina umana ad attività terapeutica.
2. Composti secondo la rivendicazione 1, caratterizzati dal fatto che detto corticosteroide è scelto tra prednisolone e betametazone ed il rapporto molare tra corticosteroide ed albumina umana è compreso tra 15 e 19.
3. Procedimento per la preparazione dei composti secondo le rivendicazioni 1 e/o 2, caratterizzato dal fatto che il corticosteroide, in forma di emisuccinato, viene fatto reagire con albumina umana con il metodo dell'anidride mista, impiegando isobutil clorocarbonato.
4. Composizioni farmaceutiche caratterizzate dal fatto che contiene quale ingrediente attivo, un coniugato secondo le rivendicazioni 1 e/o 2.



Distribuzione del coniugato BMT-albumina nelle cellule parenchimali e sinusoidali del fegato di ratto 30 minuti dopo la sua somministrazione

| Composto                | Dose<br>( $\mu\text{g/g}$ ) | Cellule parenchimali | Cellule sinusoidali |
|-------------------------|-----------------------------|----------------------|---------------------|
| BMT-[ $^3\text{H}$ ]RSA | 35                          | $1.3 \pm 0.3$        | $146.5 \pm 1.2$     |

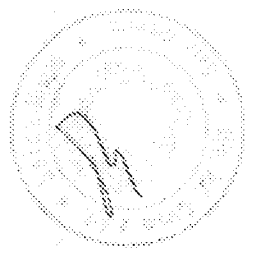
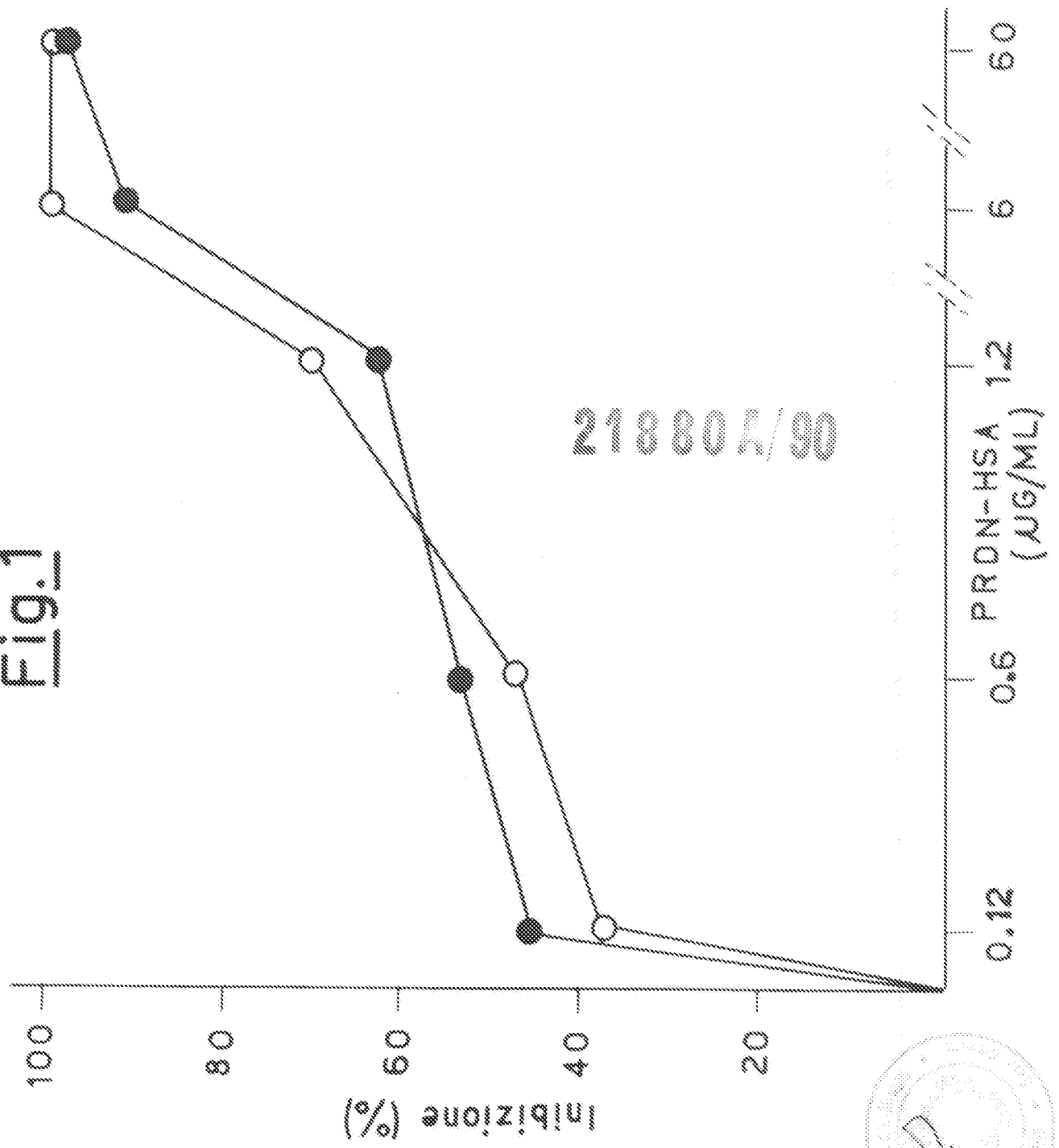
Gli esperimenti sono stati condotti come descritto in Cancer Drug Delivery 4, 11 (1987).

I risultati sono stati calcolati dai valori di radioattività acido insolubile delle preparazioni cellulari. Essi sono stati espressi come percentuale del dpm iniettati  $\times 10^3/\text{mg}$  di proteine cellulari. I dati rappresentano la media ( $\pm$  l'errore standard) dei risultati ottenuti da 4 esperimenti.

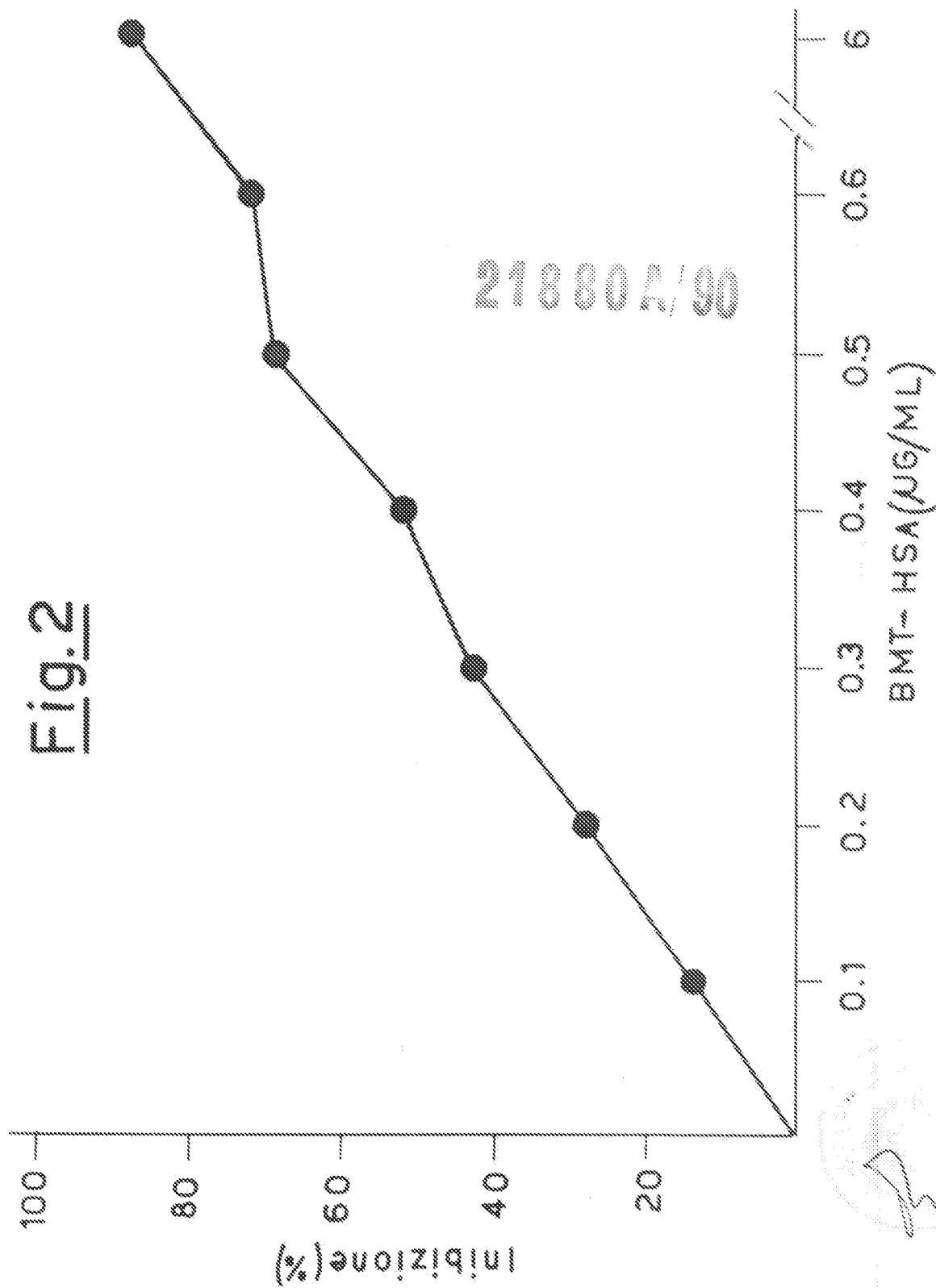
#### RIVENDICAZIONI

1. Composto di corticoide ed albumina umana ad attività terapeutica.
2. Composti secondo la rivendicazione 1, caratterizzati dal fatto che detto corticosteroide è scelto tra prednisolone e betametazone ed il rapporto molare tra corticosteroide ed albumina umana è compreso tra 15 e 19.
3. Procedimento per la preparazione dei composti secondo le rivendicazioni 1 e/o 2, caratterizzato dal fatto che il corticosteroide, in forma di emisuccinato, viene fatto reagire con albumina umana con il metodo dell'anidride mista, impiegando isobutil clorocarbonato.
4. Composizioni farmaceutiche caratterizzate dal fatto che contiene quale ingrediente attivo, un coniugato secondo le rivendicazioni 1 e/o 2.

Fig. 1



*[Signature]*  
Ing. Giuseppe [Name]  
P. [Name]



*[Signature]*  
Ing. Claudio G. Gatti