



CONFEDERAZIONE SVIZZERA
UFFICIO FEDERALE DELLA PROPRIETÀ INTELLETTUALE

⑪ CH 661 439 A5

⑤① Int. Cl.⁴: A 61 K 31/725

Brevetto d'invenzione rilasciato per la Svizzera ed il Liechtenstein
Trattato sui brevetti, del 22 dicembre 1978, fra la Svizzera ed il Liechtenstein

⑫ **FASCICOLO DEL BREVETTO** A5

⑲ Numero della domanda: 5024/84	⑦③ Titolare/Titolari: Italfarmaco S.p.A., Milano (IT)
⑳ Data di deposito: 19.10.1984	
③① Priorità: 25.10.1983 IT 23422/83	⑦② Inventore/Inventori: Sportoletti, Giancarlo, Milano (IT) Pagella, Piergiuseppe, Milano (IT) Cremonesi, Pietro, Milano (IT)
㉔ Brevetto rilasciato il: 31.07.1987	
④⑤ Fascicolo del brevetto pubblicato il: 31.07.1987	⑦④ Mandatario: Dipl.-Ing. W. Steudtner, Hegnau, Volketswil

⑤④ **Glicosaminoglicani modificati dotati di attività antitrombotica.**

⑤⑦ Si descrivono composizioni farmaceutiche ad attività antitrombotica contenenti come principio attivo derivati succinilati dell'eparina N-desolfatata.

RIVENDICAZIONI

1. Composizioni farmaceutiche ad attività antitrombotica, atte alla prevenzione e alla terapia dell'infarto cardiaco, dell'infarto cerebrale e della trombosi venosa, caratterizzate dal fatto che contengono, in qualità di principio attivo, derivati succinilati dell'eparina N-desolfatata contenenti meno del 10% dei gruppi N-solfato presenti nell'eparina di partenza, e più di 0,6 residui succinilici per residuo disaccaridico.

2. Composizioni farmaceutiche secondo la rivendicazione 1, caratterizzate dal fatto che i derivati succinilati contengono circa 1,2 residui succinilici per residuo disaccaridico.

3. Composizioni farmaceutiche secondo la rivendicazione 1, da somministrarsi per via endovenosa, parenterale o orale.

4. Composizioni farmaceutiche secondo le rivendicazioni 1-3, da somministrarsi in dosi comprese tra 0,5 e 300 mg/kg di peso corporeo.

5. Composizioni farmaceutiche secondo la rivendicazione 4, da somministrarsi in dosi comprese tra 5 e 30 mg/kg di peso corporeo.

La presente invenzione ha per oggetto composizioni farmaceutiche contenenti come principio attivo derivati glicosaminoglicanici modificati, quali agenti antitrombotici.

Il trombo (Thrombus) è un aggregato di piastrine e di leucociti polimorfonucleati in una rete di fibrina ed è ritenuto il punto cruciale dell'insorgenza di stati patologici gravissimi, quali lesioni vascolari note come infarto cardiaco, infarto cerebrale e trombosi venosa.

È necessario sottolineare come il trombo sia strutturalmente distinto da cosiddetto coagulo («hemostatic plug» o «clot»): infatti, mentre quest'ultimo si forma nel sito di lesione del vaso, il trombo vero e proprio si forma anche in circolo e non necessariamente a seguito di una lesione vascolare. La confusione tra tali aggregati ha ingenerato per lungo tempo l'errore di ritenere causa della formazione del trombo la semplice alterazione del sistema coagulativo (iper-coagulabilità) e quindi di considerare tale fenomeno prevenibile o curabile con anticoagulanti puri. Si deve distinguere, inoltre, la trombosi arteriosa («Arterial Thrombosis») da quella venosa («Venous Thrombosis»), per le conseguenze della formulazione del trombo stesso nelle arterie (dove si verifica stasi del flusso ematico e successiva produzione dell'infarto) e nelle vene (dove la rottura o l'allungamento del trombo e la sua embolizzazione a livello polmonare sono le principali cause di decesso).

Nella profilassi delle trombosi si usano sia antiaggreganti piastrinici, sia agenti fibrinolitici, che degradano la fibrina in peptidi solubili, sia agenti che lavorano come inibitori del o dei fattori che ingenerano la rete di fibrina. Tra tali fattori sono stati individuati la trombina e il fattore Xa (decimo attivato), componenti la cascata della coagulazione intrinseca. Uno dei più utilizzati inibitori dei due fattori sopra indicati è l'eparina.

La potenza antitrombotica di tale farmaco è, in genere, espressa in termini di attività anti-decimo attivato (Anti-Xa), nel senso che quanto maggiore è il suo valore specifico tanto maggiore è la capacità antitrombotica. Le eparine commerciali presentano tuttavia un'elevata attività anti-Xa associata ad un'elevata attività anticoagulante, in genere espressa in unità internazionali per mg (I.U./mg). Tale fatto induce non trascurabili effetti collaterali (formazione di ematomi al sito di inoculo, stati di ipocoagulabilità molto pericolosi, nell'uso prolungato di tali prodotti). Inoltre, come dimostrano le prove cliniche sinora eseguite, la prevenzione della trombosi venosa è certa, mentre per quella arteriosa si hanno dati molto discordanti.

Quindi l'utilizzo di un farmaco che presenti basse o nulle attività anti-coagulante e anti-Xa, ed eventualmente anche una certa attività fibrinolitica, sarebbe quanto mai auspicabile nella

prevenzione dei fatti trombotici sia venosi sia arteriosi. Per questo motivo la ricerca mondiale in tale settore è attualmente indirizzata nella messa a punto di frazioni epariniche (ottenute dall'eparina «in toto», che presenta una notevole polidispersione dei pesi molecolari, con o senza modifiche strutturali) aventi elevate potenze anti-Xa e ridotte attività anticoagulanti. (Inter alia: Holmer E. et Al.-Thrombos. res., V:25, 475, 1982).

Si è ora sorprendentemente trovato che derivati eparinici ottenuti per N-desolfatazione e successiva succinilazione mentre presentano ridottissima o nulla attività anticoagulante, ridotta o nulla attività anti-Xa e una soddisfacente attività lipasemica residua, rispetto all'eparina di partenza, manifestano in vivo un'elevata attività inibitrice la formazione del trombo, come descritto negli esempi sotto riportati che non intendono essere tuttavia limitativi della validità dell'invenzione.

Tale attività non è spiegabile, in intensità, sulla base dei valori residui (nulli o quasi) sia dell'attività anticoagulante che di quella anti-Xa, presentate dal composto in esame (0,2 U.I./mg e 2 U./mg, rispettivamente).

Accanto all'attività inibente la formazione del trombo sopra riportata, il prodotto presenta una certa attività fibrinolitica evidenziata, come sotto descritto, nel ratto in vivo tramite la valutazione degli F.D.P. (Fibrin Degradation Products), il tempo di lisi delle euglobuline, e nell'uomo mediante quest'ultimo test.

I derivati glicosaminoglicanici N-desolfatati e succinilati che vengono impiegati come principi attivi nelle composizioni secondo l'invenzione si ottengono idrolizzando l'eparina a caldo (di preferenza tra 70 e 100°C, per i tempi superiori a 3 ore) con acidi forti di normalità almeno pari a 0,1 N (di preferenza pari o superiore a 0,5 N) e succinilando poi il prodotto di idrolisi così ottenuto con anidride succinica a pH superiori a 7, il rapporto ponderale tra anidride succinica ed eparina idrolizzata essendo compreso tra 1:1 e 5:1.

In particolare, i derivati glicosaminoglicanici da usarsi nelle composizioni secondo l'invenzione contengono meno del 10% dei gruppi N-solfato presenti nell'eparina di partenza, e più di 0,6 residui succinilici (di preferenza circa 1,2 residui succinilici) per residuo disaccaridico.

Esempio

Preparazione

In un pallone da 3 litri, dotato di condensatore a bolle, agitatore meccanico e attrezzato per lavorare in flusso di azoto e in atmosfera inerte, sono posti 2 litri di acqua distillata e 200 g di sodio eparinato. Si dissolve il prodotto a temperatura ambiente sotto agitazione e quindi si adizionano 400 ml di HCl 2N.

Dopo aver degasato con azoto la soluzione limpida, e mantenendo l'atmosfera di azoto, si porta su bagno d'acqua bollente e si mantiene in tali condizioni per 6 h; si raffredda, quindi, a temperatura ambiente; poi, raffreddando con ghiaccio, si porta il pH a 8,5 per aggiunta di una soluzione saturata e fredda di sodio idrossido. Mantenendo la temperatura al valore iniziale di 5-10°C e il pH a circa 8 mediante aggiunta della soluzione di sodio idrossido, si addizionano 400 g di anidride succinica a porzioni successive. L'aggiunta finale deve portare il pH attorno al valore di 7,4-7,5. Si lascia la soluzione fredda in agitazione per 30' e quindi si addizionano 3 volumi di etanolo 95°; il precipitato formatosi (inizialmente oleoso, ma che, per riposo, diviene solido) è filtrato alla pompa ed essiccato all'aria. Si ridiscioglie quindi in 3 litri di acqua distillata e si dializza (in dializzatore, di cut-off nominale 600 daltons) contro acqua distillata, sino ad eliminazione del succinato di sodio. La soluzione finale è quindi liofilizzata. Si ottengono 200 g di prodotto in forma di aghi.

1) ATTIVITÀ ANTITROMBOTICA

1.1. Determinazione dell'attività

Il modello utilizzato è quello, comunemente riconosciuto, di Umetzo (Teruhiro Umetzo et AL.-Thrombosis and Haemostasis- Stuttg.-v. 39, 74, 1978).

Esso consiste nel creare nel ratto uno shunt tra carotide destra e vena giugulare sinistra mediante un tubicino di silicone, nel cui interno è sotteso un filo di Ethicon (seta intrecciata). Per la sua stessa presenza nel flusso ematico shintato, si crea intorno al filo un trombo che risulta massimo (in peso) in assenza di agenti antitrombotici e viene più o meno ridotto o annullato, in loro presenza, in funzione della loro potenza specifica o della dose.

Come sostanza di riferimento è stata assunta l'eparina (Standard interno: 155 U.I./mg di attività anticoagulante e 168 U./mg di attività anti-Xa, determinato con il test colorimetrico Hepachrom X Stago-Diagnostica Stago, Parigi, Francia).

Prodotto saggiato (riferito da qui in avanti come GGM): glicosaminoglicano succinilato sale di sodio, ad attività anticoagulante 0,2 U.I./mg e 2 U./mg di attività anti-Xa, determinata come sopra detto per l'eparina, ottenuto come descritto nell'esempio precedente, a partire dalla stessa eparina standard.

Animali usati: ratti albin Wistar, maschi, di 350 g circa, in anestesia uretanica (1,25 g/kg p.c. i.p.).

Corpo estraneo nella circolazione extracorporea: Ethicon, d.i. 2,5 mm, del peso di 6 mg.

Il prodotto saggiato o lo standard furono iniettati attraverso lo shunt immediatamente prima dell'inizio della circolazione extracorporea, nel volume di 1 ml/kg p.c. di soluzione fisiologica.

La durata della circolazione extracorporea fu di 15'.

Il trombo venne pesato subito dopo la rimozione del filo di seta dallo shunt, essendo il peso reale del trombo determinato sottraendo il peso del filo da quello totale.

Un gruppo di animali fu trattato con sola soluzione fisiologica, con rispetto dei volumi di somministrazione (1 ml/kg p.c.), al fine di ottenere il valore del peso medio del trombo in assenza di sostanze inibenti. In ogni animale trattato fu determinato il tempo di coagulazione, preso come parametro dell'influenza del trattamento sul sistema coagulativo.

I risultati ottenuti sono riportati nella tabella 1.

TABELLA 1

Trattamento (mg/kg)	Variazione % ^(*) formaz. tromb.	Dose efficace 50 (DE 50: mg/kg)
Fisiologica	—	
Eparina 0,062	29	
» » 0,125	43	
» » 0,250	67	0,14
» » 0,500	88	
» » 1,000	94	
GGM 12,50	29	
» 25,00	47	
» 50,00	69	
» 100,00	74	28,95
» 200,00	82	
» 400,00	89	

^(*) L'inibizione percentuale della formazione del trombo è valutata come diminuzione del peso del trombo ottenuto in confronto a quello ottenuto per sola somministrazione di

fisiologica. Valore medio del peso del trombo ottenuto sotto somministrazione di fisiologica (valore medio di 30 esperimenti): mg 101,93 + -6,38. Tempo di coagulazione: il tempo di coagulazione, dopo somministrazione di soluzione fisiologica, risultava mediamente di 144,14 + -6,21 secondi, mentre dopo trattamento con eparina variava in modo dose-dipendente sino a raggiungere il valore di 521,40 + -41,06 alla dose di 1 mg/kg mentre per somministrazione del GGM sino a 200 mg/kg restava intorno al valore basale per raggiungere il valore di 228,50 + -17,55 secondi a 400 mg/kg p.c.

I dati sopra riportati indicano chiaramente che l'attività antitrombotica del GGM non è connessa all'attività anticoagulante in termini di attivazione dell'antitrombina; dato inoltre il basso valore specifico in termini di attività anti-Xa essa non può nemmeno essere imputata ad un'attività diretta di inibizione del fattore Xa.

1.2. Durata dell'attività

Nelle stesse condizioni operative descritte nel precedente esempio, con gruppi di 6 ratti, furono somministrati eparina (77,5 U.I./kg p.c.) e GGM (115 mg/kg p.c.) in dosi equiattive come attività antitrombotica al tempo zero, a tempi sfasati prima dell'inizio della circolazione extracorporea, indicati nella tabella 2. Nella stessa tabella sono riportati i dati di inibizione percentuale ottenuti ai vari tempi.

TABELLA 2

Tempo inizio circ. extra-corp. dopo trattam. i.v. (min)	Inibizione percentuale trombo ^(*) per sommin. i.v.	
	Eparina	GGM
15	86,8	72,4
45	57,8	61,3
75	18,5	36,7
135	—	16,1

^(*) Peso medio del trombo su animali trattati solo con fisiologica (controlli): 92,98 + -5,69 mg.

2) ATTIVITÀ FIBRINOLITICA

2.1. Nel ratto

2.1.1. F.D.P. nel ratto in vivo, dopo somministrazione i.v.

Furono utilizzati ratti maschi Wistar, del peso di circa 220 g; la somministrazione fu effettuata i.v. nell'animale sveglio a 30', 60', 120' e 240' prima del sacrificio; come veicolo fu utilizzata acqua distillata, 1 ml/kg. Gli F.D.P. furono determinati sul plasma utilizzando il kit della Boehringer Mannheim, Staphylococcal Clumping Test. Il valore basale fu determinato dopo somministrazione di soluzione fisiologica (1 ml/kg p.c.). I risultati sono illustrati nella tabella 3.

TABELLA 3

Gruppo		F.D.P. In µg/ml					
		Tempo:	0'	30'	60'	120'	140'
Soluzione fisiolog.			0,250	0,400	0,268	0,351	0,555
GGM	1 mg/kg		=	0,527	0,541	0,562	0,530
GGM	10 mg/kg		=	1,000	1,138	0,968	0,609
GGM	30 mg/kg		=	1,500	1,475	0,612	0,625
GGM	100 mg/kg		=	0,350	0,625	4,435	1,262

2.1.2. Tempo di lisi delle euglobuline

Principio: la frazione euglobulinica del plasma contiene l'attivatore del plasminogeno, il plasminogeno ed il fibrinogeno. Si fa coagulare la frazione euglobulinica con trombina e si valuta il tempo necessario per la successiva lisi del coagulo, in presenza o assenza di GGM. Furono saggiati tre livelli di dose su plasma di ratto Wistar, utilizzando il kit Euglobulin Lysis Reagents-Dade Diagnostics-Aguada Puerto Rico.

Le dosi saggiate furono 25,50 e 100 µg di GGM, con caratteristiche uguali a quello sopra utilizzato.

I risultati ottenuti sono indicati nella tabella 4.

TABELLA 4

Dose (µg)	Tempo di lisi del coagulo (*) (in minuti primi)	Variazione % (risp. contr.)
GGM 25 µg	18'	-35
Controllo	28'	
GGM 50 µg	18'	-38
Controllo	29'	
GGM 100 µg	28'	-42
Controllo	48'	

(*) Valori medi, per ciascun dato, ottenuti per la dose e relativo controllo.

3. Nell'uomo

3.1. Tempo di lisi delle euglobuline

Fu impiegato plasma umano ottenuto da volontari sani.

Il test fu eseguito su plasma utilizzando l'Euglobulin Lysis Reagents kit della Dade Diagnostic-Aguada, Puerto Rico.

Furono saggiate le dosi di 25, 50 e 100 µg di GGM, con le caratteristiche uguali a quelle del prodotto sopra impiegato.

I risultati ottenuti sono indicati nella tabella 5.

TABELLA 5

Dosaggio	Tempo di lisi del coagulo (*) (in minuti primi)	Variazione % (risp. contr.)
GGM 25 µg	400	-13%
Controlli	459	
GGM 50 µg	100	-78%
Controlli	460	
GGM 100 µg	190	-59%
Controlli	470	

(*) Valori medi ottenuti per ogni dose su più volontari.

La presente invenzione si riferisce a composizioni farmaceutiche ad attività antitrombotica contenenti, come principio attivo, quantità predeterminate e terapeuticamente efficaci di almeno uno dei derivati glicosaminoglicanici precedentemente descritti, oltre che eventuali eccipienti di impiego convenzionale in tecnica farmaceutica. Esempi di tali composizioni farmaceutiche comprendono fiale per iniezioni intramuscolari o endovenose, compresse, confetti, capsule, ecc.