



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA NUMERO	102006901376902
Data Deposito	18/01/2006
Data Pubblicazione	18/07/2007

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Titolo

METODO PER ALIMENTARE L'EFFLUSSO DAL SISTEMA NERVOSO DI PEPTIDI AMILOIDEI.

DESCRIZIONE

Campo di applicazione

La presente invenzione si riferisce all'applicazione in campo farmacologico di molecole di struttura diidropiridinica, come ad esempio: nicardipina, felodipina, nifedipina, lercanidipina, amlodipina, clinidipina, efonidipina, benidipina, oxodipina, darodipina, isradipina, manidipina, lacidipina, mepirodipina, nimodipina, nisoldipina, pranidipina e ryodipina. La Richiedente ha, infatti, sorprendentemente scoperto che questi composti sono in grado, dopo somministrazione, non solo di inibire il processamento della proteina beta-amiloide ma anche di aumentare l'efflusso di questa proteina dal sistema nervoso centrale e di aumentare la sua concentrazione nel plasma favorendo così una riduzione dei depositi di beta-amiloide e trovando quindi applicazione nella cura o nella prevenzione di tutti quegli stati in cui si manifesta un aumento delle deposizioni di peptide beta-amiloide come nel caso del morbo di Alzheimer, di traumi cranici, dell'angiopatia cerebrale amiloidogenica, nell'encefalite spongiforme o nello scrapie.



A large, stylized handwritten signature in the bottom right corner of the page.

1

STATO DELL'ARTE

2 La malattia di Alzheimer è una patologia neurodegenerativa che risulta essere la
3 causa più frequente di demenza senile. Stime recenti indicano che nel mondo circa
4 18 milioni di persone sono affette da demenza, circa 700 mila in Italia. Da pochi
5 anni sono disponibili farmaci (donepezil, galantamina, rivastigmina, ecc.) la cui
6 efficacia è stata dimostrata in studi clinici e che sono in grado di migliorare
7 temporaneamente la sintomatologia negli stadi iniziali della malattia. Tuttavia non
8 esistono attualmente terapie in grado di arrestare la progressione della malattia. La
9 comparsa di placche senili nel parenchima cerebrale è una caratteristica
10 alterazione nella malattia di Alzheimer. Le placche senili sono costituite da
11 materiale proteinaceo depositato in sede extracellulare. Il peptide beta-amiloide
12 oltre a formare depositi insolubili, esercita un effetto neurotossico, sia direttamente,
13 mediante interazioni con specifici recettori di membrana, che indirettamente,
14 mediante l'interazione con cellule non neuronali, quali la microglia, stimolandone la
15 produzione di radicali liberi, eccitotossine e citochine. Le variabili che influenzano
16 la citopatologia associata a beta-amiloide sono numerose e comprendono: 1) la
17 lunghezza del peptide; 2) la quantità di peptide che si accumula; 3) il suo stato
18 chimico-fisico e l'aggregazione in fibrille; 4) l'interazione con altre proteine.
19 Numerose evidenze indicano che strategie farmacologiche volte alla riduzione
20 della produzione e/o accumulo di beta amiloide potrebbero quindi prevenire,
21 ritardare o revertire la progressione della malattia di Alzheimer (passate in
22 rassegna da Hardy and Selkoe, 2002)

23 L'identificazione della proteina precursore di beta-amiloide (APP), la cui proteolisi
24 dà origine a beta-amiloide, ha permesso di fare interessanti osservazioni sul suo
25 metabolismo. Fondamentale è la scoperta che il peptide beta-amiloide viene



1 costitutivamente prodotto e secreto come peptide solubile durante il normale
2 metabolismo cellulare. Esperimenti condotti su cellule modificate geneticamente
3 hanno dimostrato che l'espressione di forme di APP recanti mutazioni associate a
4 forme familiari della malattia di Alzheimer causa un aumento della secrezione di
5 frammenti amiloidogenici del peptide beta-amiloide, in particolare la forma 1-42.
6 Secondo uno schema ancora non completamente definito, la proteina APP è
7 oggetto dell'azione proteolitica sequenziale di due enzimi, descritti con il nome di
8 beta e gamma-secretasi che tagliando APP in due siti distinti producono 3
9 frammenti di APP incluso il peptide beta-amiloide. E' stato inoltre identificata una
10 metallo-protease detta alfa-secretasi, la cui azione si oppone alla formazione di
11 frammenti amiloidogenici poiché l'azione proteolitica è diretta verso un sito interno
12 alla sequenza del peptide beta-amiloide.

13 Il metabolismo di APP e la formazione di beta-amiloide possono essere modulati
14 farmacologicamente; ad esempio è stato dimostrato che inibitori degli enzimi beta-
15 e gamma-secretasi, riducono la formazione di beta-amiloide mentre l'attivazione
16 della protein-chinasi-C, un importante enzima fosforilante, aumenta la secrezione
17 di APP solubile e riduce la formazione di beta-amiloide. Queste osservazioni
18 hanno dato avvio ad una serie di studi sull'effetto di modulatori fisiologici e/o di
19 farmaci sul metabolismo di APP e sulla formazione di beta-amiloide, allo scopo di
20 disegnare possibili interventi terapeutici centrati sull'inibizione dei meccanismi di
21 produzione e accumulo di beta-amiloide (Selkoe, 2002). Recentemente è stato
22 riportato che sorprendentemente alcuni farmaci antinfiammatori non steroidei
23 (FANS) sono in grado di diminuire piu' o meno selettivamente la formazione di
24 beta-amiloide 1-42 senza alterare sostanzialmente la formazione di altre isoforme
25 (1-38, 1-40) del peptide stesso (Eriksen et al., 2003). E' interessante notare che



1 l'effetto di quei FANS in grado di inibire la produzione di beta-amiloide
2 (flurbiprofene, indometacina, ibuprofene) non è riconducibile alle loro proprietà
3 antinfiammatorie (Eriksen et al., 2003). Studi recenti indicherebbero invece che tali
4 farmaci agiscono come modulatori allosterici dell'attività gamma-secretasica,
5 l'enzima direttamente responsabile della formazione del peptide beta-amiloide.
6 Inoltre, esistono altri diversi approcci terapeutici che vedono coinvolto il
7 metabolismo e/o deposito di beta-amiloide quali ad esempio la vaccinazione,
8 l'utilizzo di sostanze in grado di interferire con la i depositi di questa proteina e
9 l'utilizzo di sostanze in grado di aumentare l'efflusso di beta amiloide dal sistema
10 nervoso centrale.

11



A large, stylized handwritten signature in black ink, located to the right of the official stamp.

1

SOMMARIO

2 La presente invenzione si riferisce all'applicazione farmacologica delle molecole
3 oggetto della presente invenzione per aumentare l'efflusso dal sistema nervoso
4 centrale di proteina amiloide al fine di prevenire, ritardare o revertire la
5 progressione del morbo di Alzheimer o altre patologie caratterizzate da anormale
6 deposizione di proteine amiloidee (ad es. traumi cranici, angiopatia cerebrale
7 amiloidogenica, encefalite spongiforme, scrapie). La Richiedente ha infatti
8 sorprendente scoperto che certe molecole a struttura diidropiridinica sebbene
9 siano in grado di inibire (Benjannet, rif. citato) a livello cellulare la
10 produzione/secrezione del peptide beta-amiloide, dopo somministrazione in vivo,
11 sono in grado di aumentarne significativamente i livelli plasmatici mediante
12 l'aumento dell'efflusso di questa proteina dal sistema nervoso centrale. Tali
13 esperimenti sono stati condotti sia in vitro che in vivo. In vitro, impiegando cellule di
14 neuroglioma o di neuroblastoma umano (H4) transfettate stabilmente con il gene
15 APP umano recante mutazioni associate alla malattia di Alzheimer (cellule
16 H4/APP), abbiamo osservato che in colture cellulari H4/APP le diidropiridine
17 oggetto del presente brevetto alle concentrazioni di 10 e 30 μ M, inducono una
18 drammatica e significativa inibizione dose-dipendente della secrezione delle varie
19 isoforme del peptide beta-amiloide, misurate mediante tecnica ELISA (Tab 1 e
20 Tab. 2). Inoltre i due stereoisomeri (+)-niguldipine e (-)-niguldipine, pur avendo un
21 profilo farmacologico molto diverso come calcio antagonisti, hanno il medesimo
22 effetto inibitorio sulla secrezione del peptide beta-amiloide. Al contrario, la
23 diidropiridina BayK 8644 non ha un effetto apprezzabile sulla secrezione di beta-
24 amiloide come del resto anche altri calcio antagonisti (vedi di seguito). È riportato
25 in letteratura che calcio antagonisti non diidropiridinici, quali ad esempio il diltiazem



1 e metossiverapamil, non mostrano un effetto significativo sulla secrezione di beta-
2 amiloide per concentrazioni comprese tra 3 e 30 μ M (Facchinetti et al., 2005).
3 L'effetto sul rilascio di beta-amiloide delle diidropiridine oggetto della presente
4 invenzione non è quindi riconducibile al loro noto effetto farmacologico di
5 antagonismo all'influsso di calcio in quanto non tutti i calcio-antagonisti, inclusi
6 alcuni diidropiridinici, hanno un effetto inibitorio sulla secrezione di beta-amiloide a
7 livello cellulare. Infine, esperimenti in vivo, condotti dalla Richiedente, su topi
8 transgenici TG2576 sovraesprimenti la proteina APP umana mutata hanno
9 dimostrato che la somministrazione delle molecole oggetto della presente
10 invenzione è in grado di aumentare l'efflusso di proteina amiloide dal sistema
11 nervoso centrale al circolo sistemico inducendo una rimozione di beta amiloide da
12 questi tessuti.

13 Più specificamente la presente invenzione individua delle molecole appartenenti
14 alla classe delle diidropiridine, quali ad esempio la nicardipina, la felodipina la
15 nifedipina e la manidipina in grado di ridurre prevalentemente i depositi del
16 peptide beta-amiloide aumentandone l'efflusso dal sistema nervoso centrale.

17 E' quindi oggetto della presente invenzione l'impiego di composti diidropiridinici in
18 grado di modulare il processo amiloidogenico e di indurre l'efflusso di beta-amiloide
19 dal sistema nervoso centrale e quindi utili nella cura o prevenzione del morbo di
20 Alzheimer o di altre patologie come ad esempio traumi cranici, angiopatia
21 cerebrale amiloidogenica, encefalite spongiforme, scrapie. La presente invenzione
22 si riferisce ai composti citati sia nelle loro forme stereoattive pure che nella forma
23 di miscela racemica. L'invenzione inoltre fornisce composizioni dei sovracitati
24 agenti in associazione con agenti farmacologici quali antiossidanti,
25 antinfiammatori, inibitori delle proteasi, e inibitori delle coline esterasi.



A large, stylized handwritten signature is located at the bottom right of the page.

1

2

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

3 Gli scopi ed i vantaggi dell'impiego medico terapeutico o paramedico di certe
4 diidropiridine, oggetto della presente invenzione, in stati patologici caratterizzati da
5 un abnorme deposizione extracellulare di proteina amiloide saranno meglio
6 compresi nel corso della seguente descrizione dettagliata. La Richiedente ha infatti
7 trovato che, il trattamento con i composti dell'invenzione, contrariamente ad altri
8 derivati diidropiridinici (es. BayK 8644), induce una significativa riduzione della
9 secrezione costitutiva della proteina beta-amiloide in una linea cellulare di origine
10 umana ingegnerizzata che esprime costitutivamente un isoforma del gene APP695
11 associata al morbo di Alzheimer. Tale effetto è probabilmente imputabile ad una
12 modulazione allosterica dell'azione proteasica della gamma secretasi e non è
13 riconducibile agli effetti farmacologici noti di tali molecole (inibizione dei canali al
14 calcio voltaggio-dipendenti). In questa invenzione riportiamo per la prima volta dati
15 che mostrano come le molecole diidropiridiniche oggetto della presente
16 invenzione, siano efficaci nel ridurre la secrezione del peptide beta-amiloide in
17 cellule umane in coltura.

18 Inoltre la richiedente ha trovato che, il trattamento sistemico di animali transgenici
19 TG2576 con gli stessi composti oggetto della presente invenzione induce già a tre
20 ore un aumento significativo dei livelli plasmatici della proteina beta-amiloide
21 indicando un aumentato efflusso di questa proteina dal sistema nervoso dove è
22 noto accumularsi in differenti stati patologici.

23 **Esempio 1:** Sono state usate colture cellulari di neuroglioma umano (H4)
24 stabilmente transfettate con un gene codificante per la forma umana della proteina
25 APP695 recante mutazioni associate al morbo di Alzheimer e sotto il controllo di



A large, stylized handwritten signature in black ink, located at the bottom right of the page.

1 un promotore costitutivamente attivo. Le cellule sono coltivate in un mezzo di
2 coltura composto da OPTI-MEM contenente 10% siero bovino fetale, igromicina
3 (0.2 mg/ml) e blasticidina (0.002 mg/ml). Il peptide beta-amiloide viene prodotto
4 dall'intervento sequenziale delle proteasi beta- e gamma-secretasi e viene secreto
5 dalle cellule nel mezzo extracellulare. La concentrazione di peptide nel mezzo
6 cellulare viene misurato mediante metodo immunoenzimatico (ELISA) grazie
7 all'uso di anticorpi selettivi anti beta-amiloide. I risultati ottenuti con le diverse
8 diidropiridine sono riportati in tabella 1.

9 Gli effetti inibitori sul rilascio di beta-amiloide di tali molecole non sono imputabile
10 ad un aspecifico effetto citotossico in quanto il saggio di vitalità cellulare (MTT)
11 indica che questo parametro non viene alterato dal trattamento con diidropiridine.
12 Sono stati anche esaminati gli effetti sulla secrezione di beta-amiloide delle 2
13 forme enantiomeriche della niguldipina (vedi tab. 1). Va qui rilevato che la
14 (-)-niguldipina è l'enantiomero inattivo per quanto riguarda l'effetto calcio
15 antagonista. Tuttavia, come evidenziato nella tabella 1, entrambi le forme
16 enantiomeriche, (-)-niguldipina e (+)-niguldipina, hanno un effetto inibitorio sulla
17 secrezione di beta-amiloide.

18 La diidropiridina BayK 8644, al contrario delle altre diidropiridine non sortisce alcun
19 effetto sulla secrezione di beta-amiloide nelle cellule H4/APP (tab. 1).

20 **Esempio 2.** I derivati nimodipina, nicardipina, sono stati somministrati via iniezione
21 intraperitoneale alla dose di 10 mg/kg in animali TG2576. Prima del trattamento e
22 dopo tre ore, da ogni animale è stato fatto un prelievo di sangue sul quale è stata
23 determinata la concentrazione mediante un metodo immunoenzimatico (ELISA)
24 che sfrutta anticorpi selettivi anti beta-amiloide. I risultati ottenuti (Tab. 2) indicano
25 che la somministrazione di questi derivati è in grado di aumentare l'efflusso di



1 beta-amiloide dal sistema nervoso centrale come riflesso dal vistoso aumento della
2 concentrazione plasmatica di beta-amiloide indotto da questi derivati.
3 I composti oggetto della presente invenzione possono quindi essere utilmente
4 impiegabili per la preparazione di composizioni farmaceutiche per il trattamento
5 terapeutico, da soli o in associazione con altri agenti terapeutici di elezione per lo
6 stato patologico specifico, come ad esempio antiossidanti, antinfiammatori, inibitori
7 delle proteasi, inibitori delle coline esterasi, antiepilettici, neurolettici, neurolettici
8 atipici, antidepressivi, dopaminergici, dopamino-agonisti, gaba-agonisti, per il
9 miglioramento della memoria, antinfiammatori/antidolorifici (es. oppioidi, salicilati,
10 pirazolici, indolici, arilntranilici, arilpropionici, arilacetici, oxicami,
11 piranocarbossilici, glucocorticoidi, anti-cox2, nimesulide e acetaminofene).
12 Le vie di somministrazione che possono essere usate per il trattamento preventivo
13 o terapeutico degli stati patologici secondo la presente invenzione possono essere
14 la via orale, parenterale, intramuscolare, sottocutanea, endovenosa, topica,
15 transdermica, rettale, sublinguale e nasale. I composti oggetto della presente
16 invenzione possono essere somministrati in composizioni farmaceutiche in
17 combinazione con eccipienti, disperdenti e diluenti noti o nuovi compatibili con gli
18 impieghi farmaceutici, al fine di ottenere una migliore veicolazione del principio
19 attivo al sito d'azione e di ottenere un effetto rapido, sostenuto o ritardato nel
20 tempo. Allo scopo quindi possono essere impiegate forme farmaceutiche a *fast*,
21 *sustained* o *slow release*. I dosaggi sono dipendenti dalla gravità della patologia e
22 della via di somministrazione scelta, come pure dallo stato (età, peso corporeo,
23 condizioni generali di salute) del paziente ed a scopo illustrativo ma non limitativo
24 della presente invenzione, possono essere compresi tra 0.1 mg/Kg di peso
25 corporeo e 50 mg/Kg di peso corporeo in somministrazioni giornaliere ripetute per



A large, stylized handwritten signature in black ink, located to the right of the official stamp.

1 un periodo compreso tra 2 e 16 settimane. Per la somministrazione orale possono
2 essere adatte composizioni sotto forma di polveri disperdibili, compresse, confetti,
3 capsule di gelatina molle o rigida, sospensioni; per la somministrazione
4 parenterale intramuscolo, sottocutanea, endovena o peridurale possono essere
5 adatte composizioni sotto forma di soluzioni acquose tamponate, sospensioni
6 oleose o polveri liofilizzate disperdibili in opportuno solvente al momento della
7 somministrazione; per la somministrazione topica transdermica, rettale, nasale o
8 sublinguale possono essere adatte composizioni in opportuni eccipienti o
9 disperdenti sotto forma di cerotti, supposte, ovuli, candele, aereosol o spray.

10



A large, stylized handwritten signature in the bottom right corner of the page.

RIVENDICAZIONI

1. Uso di composti diidropiridinici quali nicardipina, felodipina, nifedipina e manidipina, nifedipina, come principi attivi per ridurre i depositi di proteina amiloide nell'uomo o nell'animale affetti da stati o patologie amiloidogeniche.
2. Uso dei composti secondo la rivendicazione 1 siano essi nella forma di enantiomeri puri che di miscele racemiche.
3. Uso secondo la rivendicazione 2 per il trattamento di disordini o patologie degenerative del sistema nervoso dove queste patologie sono la demenza senile, la malattia di Alzheimer, l'amiloidosi dei nervi periferici, i traumi cranici, l'angiopatia cerebrale amiloidea, l'encefalite spongiforme o lo scrapie nell'uomo o nell'animale.
4. Uso secondo la rivendicazione 2 in cui detti composti sono somministrati ad una dose terapeuticamente efficace compresa tra 1 e 20 mg/die.
5. Uso secondo la rivendicazione 4 in cui tali dosi vengono somministrate periodicamente o per il resto della vita dei soggetti trattati.
6. Uso secondo la rivendicazione 2 in cui detti composti sono adatti per la somministrazione orale, parenterale, topica, transdermica, rettale, sublinguale e nasale.
7. Uso secondo la rivendicazione 6 in cui per la somministrazione orale dette composizioni sono sotto forma di polveri disperdibili, compresse, confetti, capsule di gelatina molle o rigida, sospensioni, emulsioni, soluzioni.
8. uso secondo la rivendicazione 6 in cui per la somministrazione parenterale intramuscolo, sottocutanea, endovena o peridurale dette composizioni sono sotto forma di soluzioni acquose tamponate, soluzioni o sospensioni oleose



A large, stylized handwritten signature in black ink, located at the bottom right of the page.

1 o polveri liofilizzate disperdibili in opportuno solvente al momento della
2 somministrazione.

3 9. uso secondo la rivendicazione 6 in cui per la somministrazione topica,
4 transdermica, rettale, nasale o sublinguale dette composizioni sono sotto
5 forma di cerotti, supposte, ovuli, candele, aerosol o spray, emulsioni,
6 sospensioni, soluzioni.
7



A large, stylized handwritten signature in the bottom right corner of the page.