



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

DOMANDA NUMERO	102001900915264
Data Deposito	12/03/2001
Data Pubblicazione	12/09/2002

Titolo

USO DI EPIGALLOCATECHIN-3-GALLATO O SUOI DERIVATI NELLA PROFILASSI E NEL TRATTAMENTO DELLE MALATTIE NEURODEGENERATIVE.

Classe Internazionale: **A61K 31/00**

Descrizione del trovato avente per titolo:

**"USO DI EPIGALLOCATECHIN-3-GALLATO O SUOI DERIVATI NELLA
PROFILASSI E NEL TRATTAMENTO DELLE MALATTIE
5 NEURODEGENERATIVE"**

a nome **Hisanori SUZUKI**a **37126 VERONA**dep. n. **VR2001A00031** del **12 MAR. 2001**

10

CAMPO DI APPLICAZIONE

La presente invenzione riguarda l'uso di un composto o suoi derivati nella profilassi e nel trattamento delle malattie neurodegenerative.

Le malattie neurodegenerative costituiscono un problema
15 rilevante a livello socio-economico e sanitario. Si possono
citare il morbo di Parkinson e il morbo di Alzheimer, che
sono le principali cause di demenza nella popolazione
americana ed europea, la sindrome di Creutzfeldt-Jacob
causata dal prione, e la malattia del sonno causata da
20 protozoi, tra cui il *Trypanosoma brucei rhodensiense* e il
Trypanosoma brucei gambiense. La malattia del sonno
rappresenta una delle cause principali della mortalità nella
popolazione africana.

I farmaci attualmente disponibili per il trattamento
25 delle malattie neurodegenerative non consentono di



realizzare terapie efficaci e pertanto il trattamento farmacologico di queste malattie è insoddisfacente.

Le malattie neurodegenerative sono causate dalla morte delle cellule nervose, come ad es. astrociti, astroglia e 5 neuroni. Questi processi degenerativi delle cellule nervose sono correlati all'azione dell'interferone- γ (IFN- γ) (Galimberti D. et al. (1999) Biochem. Biophys. Res. Comm. 263, 251-256; Hunot S. et al. (1999) J. Neurosci. 19 3440-3447; Blasko I. et al. (1999) FASEB J. 13 63-68; Suo Z. et 10 al. (1998) Brain Res. 807 110-117; Delgado et al. (1998) J. Leukoc. Biol. 63 740-745; Rossi F, Bianchini E. (1996) Biochem. Biophys. Res. Commun. 225 474-478; Medal et al (1995) Nature 374, 647-650) che mediante l'attivazione di un 15 fattore nucleare STAT1 (Signal transducers and activators of transcription 1), svolge le varie azioni pleiotropiche (Boehm, U. et al. (1997) Annu. Rev. Immunol. 15, 749-795; Kordula T. et al. (1998) J. Biol. Chem. 273 4112-4118; Kitamura Y. et al Neurosci. Lett. 237 17-20). Tra le diverse 20 azioni dell'interferone γ nella cellula è particolarmente importante la sua capacità di modulare l'espressione di un enzima, l'ossido nitrico sintasi inducibile (iNOS), che producendo grandi quantità di NO può indurre la morte delle cellule nervose. Questo spiega perché l'interferone γ sia una causa dell'insorgenza di patologie neuro degenerative.

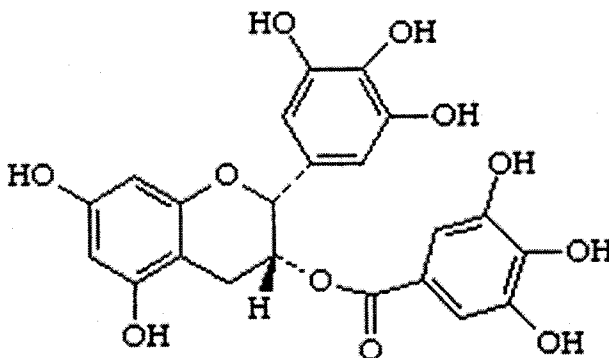
25 Era sentita l'esigenza di avere a disposizione farmaci



per la profilassi ed il trattamento delle malattie neurodegenerative, particolarmente efficaci nell'inibizione dell'attivazione dello STAT1.

Questo problema tecnico è stato risolto mediante l'impiego del composto epigallocatechin-3-gallato, o suoi derivati.

Costituisce pertanto un oggetto della presente invenzione l'uso nella profilassi e nel trattamento delle malattie neurodegenerative di composti della seguente formula (I), o suoi derivati:



(I)

L'attività dei composti di formula (I) nelle patologie neurodegenerative è stata dimostrata nella presente invenzione mediante un modello sperimentale in vitro, utilizzando cellule di glioblastoma umano U251. In questo esperimento è stato dimostrato che, ad esempio utilizzando come composto dell'invenzione epigallocatechin-3-gallato (EGCG), in concentrazione 5 μ M, i composti dell'invenzione



sono efficaci nel trattamento delle patologie neurodegenerative, infatti inibiscono il 50% dell'attivazione massimale di STAT1 indotta dall'interferone γ .

5 I composti dell'invenzione vengono utilizzati negli esperimenti in vitro (si vedano gli esempi) in genere in dosi comprese tra 1 e 50 μM , preferibilmente da 5 a 20 μM , in mezzo di coltura DME, completato con 10% v/v di siero di feto bovino.

10 E' stato trovato dal Richiedente che in generale l'inibizione di STAT1 avviene in modo dose dipendente.

L'azione inibitoria dei composti dell'invenzione nei processi neurodegenerativi sopra descritti non è attribuibile all'attività antiossidante, antiinfiammatoria o
15 antitumorale dei composti di formula (I). Infatti utilizzando cellule di glioblastoma umano U251 è stato dimostrato che utilizzando farmaci antiossidanti, antiinfiammatori o antitumorali, non sono in grado di inibire l'attivazione di STAT1 indotta dall'interferone γ (si
20 vedano gli esempi). Come farmaci ad attività antiossidante è stata utilizzata la vitamina C. Questo composto non è risultato attivo neanche alla dose 100 μM . Come composti antiinfiammatori è stato utilizzato un antiinfiammatorio steroideo, Idrocortisone. Anche questo composto non è
25 risultato attivo neanche alla dose 100 μM . E' stato



utilizzato anche un antiinfiammatorio non steroideo, Ibuprofen, che non è risultato attivo alla dose 400 μM . Come composto antitumorale è stato utilizzato il cisplatino, che non è risultato attivo alla dose 17 μM .

5 E' stato dimostrato dal Richiedente che per inibire l'attività di STAT1 la struttura dei composti di formula (I) è specifica: infatti né l'acido gallico né l'epigallocatechina, che sono i due componenti polifenolici di EGCG, posseggono attività inibente su STAT1.

10 L'epigallocatechin-3-gallato è disponibile sul mercato. Esso è il componente principale dell'estratto di tè verde, i metodi per l'isolamento sono indicati nel Merck Index 12a Ed. nella letteratura ivi citata.

Le formulazioni farmaceutiche contenenti i composti
15 dell'invenzione contengono gli usuali veicoli ed eccipienti. Possono essere nella forma compresse, capsule o in formulazioni adatte per la somministrazione parenterale.

Le dosi efficaci dei composti dell'invenzione sono
20 quelle tipiche, o inferiori, utilizzate in clinica per epigallocatechin-3-gallato.

Le formulazioni farmaceutiche contenenti i composti dell'invenzione si possono preparare con tecniche ben note all'esperto del ramo. Si veda ad es. il volume "Remington's Pharmaceutical Sciences 15th Ed."

25 L'attivazione del sistema STAT1 svolge un ruolo



rilevante anche in altre patologie quali ad esempio asma
(Guo F.H. et al. J. Immunol. 2000, 164(11) 6970-80; Sampath
e al., J. Clin. Invest. 1999, 103(9) 1353-61), diabete (Hill
N.J. et al., Diabetes 2000 49(10) 1744-7; Sekine N. et al. J.
5 Cell Physiol. 2000 184(1) 46-57), malattie cardiovascolari
(J. Biol. Chem. 2000 275 10002-8), obesità (Scarpace P.J et
al., Neuropharmacology 2000, 39(10) 1872-9; Velloso L.A. et
al. Cardiovasc. Res. 1998 272(26) 16216-23). I prodotti
dell'invenzione possono essere usati anche nella terapia di
10 queste patologie.

I seguenti esempi illustrano l'invenzione ma non ne
limitano lo scopo.

ESEMPIO 1

La linea cellulare di glioblastoma umano U251 è stata
15 coltivata, a 37°C, in mezzo di coltura DMEM 12-614 (Dulbecco's
modified eagle medium BioWhittaker Co.) completato con 10%
di siero del feto bovino. Il siero è stato eliminato 4 ore
prima del trattamento con l'interferone- γ (250 U/ml). La
concentrazione dell'epigallo catechin gallato (R = H,
20 indicato con EGCG) utilizzato era di 1 μ M in mezzo di
coltura DMEM.

L'attivazione dello STAT1 è stata misurata mediante
l'EMSA (electrophoretic mobility shift assay). 10 tg di
estratto nucleare (Osborn, L., Kunkel, S., and Nabel, G.J.
25 (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 2336-2340) sono stati



incubati a temperatura ambiente per 20 min con [³²P]-oligonucleotide a doppio filamento (5'-gtcgaCATTTCCCGTAAATCg-3') (Wagner, B.J., Hayes, T.E.f Hoban, C.J., and Cochran, B.H. (1990) *EMBO J.* 9, 4477-4484).

5 I prodotti sono stati frazionati mediante l'elettroforesi sul gel di poliacrilamide in condizioni non-denaturanti. L'intensità delle bande ritardate è stata misurata con Phosphorimager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA).

I risultati sono riportati nell'esempio 27.

10

ESEMPIO 2

E' stato ripetuto l'esempio 1 ma concentrazione di 2 µM in mezzo di coltura DMEM.

I risultati sono riportati nell'esempio 27.

ESEMPIO 3

15

E' stato ripetuto l'esempio 1 ma utilizzando la concentrazione di 5 µM in mezzo di coltura DMEM.

I risultati sono riportati nell'esempio 27.

ESEMPIO 4

20 E' stato ripetuto l'esempio 1 ma utilizzando la concentrazione di 10 µM in mezzo di coltura DMEM.

I risultati sono riportati nell'esempio 27.

ESEMPIO 5

E' stato ripetuto l'esempio 1 ma utilizzando la concentrazione di 20 µM in mezzo di coltura DMEM.

25

I risultati sono riportati nell'esempio 27.

**ESEMPIO 6**

E' stato ripetuto l'esempio 1 ma utilizzando la concentrazione di 50 μM in mezzo di coltura DMEM.

I risultati sono riportati nell'esempio 27.

5 ESEMPI 7-10 confronto con un composto antiossidante

In questi esempi è stata utilizzata come composto antiossidante di confronto la vitamina C in concentrazioni di 10 μM 20 μM , 50 μM e 100 μM in mezzo di coltura DME.

I risultati sono riportati nell'esempio 27.

10

ESEMPI 11-14**Confronto con un antiinfiammatorio steroideo**

In questi esempi è stata utilizzata come composto di confronto un antiinfiammatorio steroideo Idrocortisone in concentrazioni di 10 μM 20 μM , 50 μM e 100 aM in mezzo di
15 coltura DMEM.

I risultati sono riportati nell'esempio 27.

ESEMPI 15-19**confronto con un antiinfiammatorio non steroideo**

In questi esempi è stata utilizzata come composto di
20 confronto un antiinfiammatorio non-steroido ibuprofene in concentrazioni di 10 μM , 50 μM , 100 μM , 200 μM e 400 μM in mezzo di coltura DMEM.

I risultati sono riportati nell'esempio 27.

ESEMPI 20-23

25

confronto con un antitumorale



In questi esempi è stata utilizzato come composto di confronto il composto antitumorale cisplatino in concentrazioni di μM in mezzo di coltura DMEM.

I risultati sono riportati nell'esempio 27.

5

ESEMPIO 24 Confronto

Sono stati ripetuti gli esempi da 1 a 6 ma utilizzando come composto attivo al posto di EGCG, l'epigallocatechina, che è uno dei due componenti polifenolici di EGCG. I risultati sono riportati nell'esempio 27.

10

ESEMPIO 25 Confronto

Sono stati ripetuti gli esempi da 1 a 6 ma utilizzando come composto attivo al posto di EGCG, acido gallico, che è il secondo componente polifenolico di EGCG. I risultati sono riportati nell'esempio 27.

15

ESEMPIO 26 Confronto

E' stato ripetuto l'esempio 1 ma utilizzando invece di IFN-1 come attivatore dello STATi, Interleukina 6 (IL-6) che è un attivatore noto dello STAT3 e utilizzando linee cellulari umane HeLa (cellule di carcinoma cervicale umano); oppure linee cellulari di epatocarcinomaumano HepG2; oppure linee cellulari di carcinoma mammario umano MCF7.

20

Come composto da testare è stato utilizzato EGCG (50 μM) composto di formula (I) dell'invenzione.

ESEMPIO 27 Risultati

25

IFN- γ induce rapidamente una forte attivazione di STAT1

nella linea cellulare umana di glioblastoma U251.

Tutti i composti dell'invenzione e quelli di confronto vengono somministrati alla coltura delle cellule U251 mezz'ora prima del trattamento con IFN- γ .

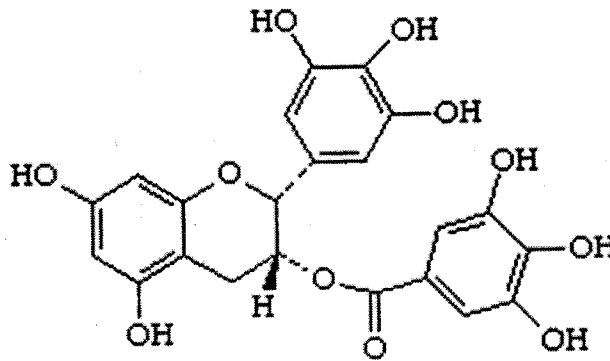




RIVENDICAZIONI

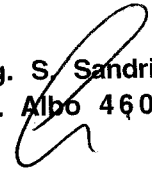
1. Uso, nella profilassi e nel trattamento delle malattie neuro degenerative di un composto epigallocatechin-3-gallato della seguente formula (I), o suoi derivati:

5



(I)

2. Uso secondo la rivendicazione 1, nella profilassi e nel trattamento specifico del morbo di Parkinson, del morbo di Alzheimer, della sindrome di Creutzfeldt-Jacob, della malattia del sonno causata da protozoi, tra cui il *Tripanosoma brucei rhodensiense* e il *Trypanosoma brucei gambiense*.
- 10
3. Uso secondo la rivendicazione 1, nella profilassi e nel trattamento specifico di asma, diabete, malattie cardiovascolari, obesità.
- 15
4. Uso secondo una delle rivendicazioni precedenti, per la inibizione dell'attivazione massimale di STAT1 (Signal transducers and activators of transcription 1) indotta dall'interferone γ .



5. Uso secondo una delle rivendicazioni precedenti, in cui il composto è prodotto nella forma compresse, capsule o in formulazioni adatte per la somministrazione parenterale.

5 6. Uso secondo una delle rivendicazioni precedenti, in cui le dosi efficaci del suddetto composto sono quelle tipiche, o inferiori, utilizzate in clinica per epigallocatechin-3-gallato.

10

IL MANDATARIOing. S. Sandri
N. Albo 460