



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	102022000015318
Data Deposito	21/07/2022
Data Pubblicazione	21/01/2024

Classifiche IPC

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	47	34

Titolo

USO DI ACIDO 5-AMINOLEVULINICO PER IL TRATTAMENTO DEI TUMORI PANCREATICI

DESCRIZIONE

Annessa a domanda di brevetto per INVENZIONE INDUSTRIALE avente per titolo:

“USO DI ACIDO 5-AMINOLEVULINICO PER IL TRATTAMENTO DEI TUMORI PANCREATICI”

CAMPO DELL'INVENZIONE

L'invenzione riguarda una formulazione a base di polossamero comprendente acido 5-aminolevulinico e/o suoi sali, come principio attivo, per l'uso nel trattamento del tumore del pancreas.

BACKGROUND DELL'INVENZIONE

La terapia fotodinamica (in breve PDT) è utilizzata per il trattamento di diverse patologie, tra le quali le patologie oncologiche. In campo oncologico la terapia fotodinamica è basata sull'assorbimento e/o ritenzione preferenziale di sostanze fotosensibili da parte di cellule tumorali. Le sostanze fotosensibili sono generalmente inerti ma sono in grado di stimolare la produzione di sostanze tossiche che possono causare danno o morte cellulare e quindi l'apoptosi delle cellule tumorali quando sono esposte a radiazione di una determinata lunghezza d'onda.

È noto l'uso di acido δ-aminolevulinico o acido 5-aminolevulinico (in breve 5-ALA) in combinazione con la terapia fotodinamica per trattare diverse tipologie di tumori. Gli effetti biologici desiderati della terapia derivano dalla interazione tra radiazione luminosa e protoporfirina-9 (PpIX) che è il prodotto della conversione metabolica di 5-ALA; questa molecola è un potente foto-sensibilizzatore mentre 5-ALA di per sé non interagisce con la radiazione luminosa.

La conversione di 5-ALA in PpIX avviene in maniera selettiva nelle cellule in cui il tasso metabolico è accelerato da condizioni patologiche (come nei

tumori o nelle displasie), dalla presenza di infiammazioni (come per acne o per stimolazioni meccaniche, ad esempio micro-punture) oppure negli organismi, quali i batteri, in cui il tasso metabolico è strutturalmente più elevato; questa è la base della selettività del trattamento.

- 5 La conversione di 5-ALA in PpIX avviene in maniera proporzionale al tempo di contatto (incubazione).

La PpIX mediante un processo fotochimico converte la radiazione luminosa in energia chimica; gli effetti biologici derivano dalla produzione di specie di ossigeno reattivo (Reactive Oxygen Species, in breve ROS) all'interno della cellula (o del batterio) in cui si è determinata una sufficiente concentrazione di PpIX. Se il tasso di produzione di ROS supera quello tollerabile si va incontro a fenomeni di apoptosi o di necrosi della cellula bersaglio ottenendo così l'azione terapeutica desiderata.

- L'uso di 5-ALA in combinazione con la PDT è stato descritto in Wang et al. 15 Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 31 (2020) 101876, una review che riassume i trattamenti dei tumori con la terapia PDT. La pubblicazione riporta in Tabella 1 i risultati dello studio pubblicato da Regula et al. in British Journal of Cancer, vol. 70, p. 248-254 (1994). In questo articolo, gli autori mostrano che la somministrazione sistemica 20 intravenosa o orale di 5-ALA combinata all'applicazione di luce a 630 nm determina una percentuale di sopravvivenza degli animali affetti da tumore al pancreas trattati con la terapia molto superiore rispetto al controllo. Inoltre, gli autori hanno registrato una necrosi tumorale fino a 8 mm.

- Un altro articolo di Bown et al., Gut 2002; 50: 549-557, descrive la 25 somministrazione di 5-ALA in combinazione con PDT ad un paziente affetto da tumore al pancreas. Gli autori riportano un'inefficacia del 5-ALA e la necessità di somministrare al paziente trattato con 5-ALA anche un secondo agente fotosensibilizzante per ottenere l'effetto terapeutico.

- Nonostante l'uso della terapia PDT sia già noto nel settore, permane 30 l'esigenza di mettere a disposizione terapie più efficaci per il trattamento del tumore al pancreas.

Sono già note formulazione di 5-ALA che si sono dimostrate efficaci nel trattamento topico di alcune patologie in combinazione con la PDT, grazie alle proprietà veicolanti dei polossameri.

In particolare, la domanda di brevetto EP3127557 descrive una
5 preparazione contenente 5-ALA e polossamero P407 utilizzabile nella terapia fotodinamica.

La domanda di brevetto WO2019123332 descrive una preparazione farmaceutica comprendente il 5-ALA ed un veicolo a base di una miscela di polossameri che presenta buone caratteristiche di adesività alla cute e/o
10 alla mucosa così da permanere sul sito di applicazione per un tempo sufficiente a rilasciare la sostanza attiva. Questa domanda di brevetto riguarda l'uso di questa preparazione nel trattamento di una patologia, come ad esempio il cancro del cavo orale, oppure per il trattamento di una lesione cutanea o della mucosa, mediante terapia fotodinamica.

15 WO2019123332 non descrive o suggerisce che tale formulazione possa essere efficace anche per il trattamento di altri tumori, come il tumore al pancreas.

SOMMARIO DELL'INVENZIONE

20 La presente invenzione riguarda l'uso di una formulazione farmaceutica comprendente 5-ALA ed un veicolo a base di una miscela di polossameri per il trattamento intralesionale di un tumore al pancreas in combinazione con una terapia fotodinamica, preferibilmente sottoponendo il 5-ALA ad una radiazione luminosa a lunghezza d'onda compresa tra 405 e 650 nm.

25 I polossameri sono copolimeri a tre blocchi di poli(ossido di etilene)-poli(ossido di propilene)-poli(ossido di etilene) (PEO-PPO-PEO), dove il blocco di PEO ha caratteristiche idrofile mentre il blocco di PPO ha caratteristiche idrofobiche. I polossameri hanno caratteristiche di mucoadesività e sono anche termoreversibili (o termosensibili) cioè
30 presentano una temperatura di transizione da soluzione a gel (sol-gel) che può essere regolata opportunamente in base alla loro preparazione.

Questo permette la permanenza 'in situ' della preparazione a seguito di un'applicazione intralesionale, facilitando un rilascio costante e graduale del principio attivo.

5 Come è noto, la protoporfirina-9, risultante dalla conversione metabolica di 5-ALA, è la sostanza sensibile alla radiazione luminosa. Pertanto, l'attivazione fotodinamica viene applicata preferibilmente dopo un tempo di incubazione compreso tra 45 e 240 minuti.

L'uso per il trattamento del tumore al pancreas prevede l'applicazione della formulazione sul tumore, ad esempio mediante iniezione
10 intralesionale, un tempo di incubazione di 1-9 ore, preferibilmente 2-8 ore, più preferibilmente 2-4 ore e successivamente l'applicazione di una radiazione luminosa a lunghezza d'onda compresa tra 405 e 650 nm. Il tempo di applicazione della luce è preferibilmente compreso tra 5 e 30 minuti.

15 Gli studi sperimentali in vitro condotti dalla Richiedente hanno mostrato risultati sorprendenti in termini di apoptosi delle cellule tumorali già dopo 24 ore dall'irraggiamento.

BREVE DESCRIZIONE DELLE FIGURE

20 La figura 1 mostra i risultati di vitalità cellulare delle cellule di adenocarcinoma duttale pancreatico CAPAN-2 dopo incubazione con diverse concentrazioni della formulazione di 5-ALA e polossameri per 4 ore e quindi sottoposte a irradiazione di luce (PDT). È possibile notare come la riduzione massima di vitalità cellulare si ottiene alla
25 concentrazione di 5-ALA di 0,92 mM (0,2%), nonostante la proliferazione cellulare sia bassa in tutte le concentrazioni;

La Figura 2 mostra i risultati dell'analisi dell'apoptosi ottenuti al citoflorimetro a seguito di trattamento delle cellule con 0,2% (0,92 mM) e 0,75% (3,45 mM) di una formulazione comprendente 5-ALA e
30 polossameri, PDT e annessina V-fluoresceina. Successivamente è stata eseguita la colorazione con isotiocianato (FITC)/ioduro di propidio (PI). I

risultati ottenuti mostrano una marcata apoptosi dopo il trattamento con 5-ALA-PDT, in particolare ad una concentrazione di 5-ALA pari a 3,45mM;

La Figura 3 mostra i risultati dell'analisi del ciclo cellulare delle Capan-2.

Le cellule sono state trattate con 0,2% (0,92mM) e 0,75% (3,45mM) di una

5 formulazione comprendente 5-ALA e polossameri e successivamente irradiate con PDT. In seguito, sono state fissate in etanolo freddo al 70% e mantenute a 4 °C per una notte. A questo punto, le cellule sono state sospese in 5 µg/mL di PI e 100 µg/mL di RNAsi. Da questa analisi non è stata evidenziata nessuna interferenza con il ciclo cellulare delle Capan-2
10 a dimostrazione del fatto che il meccanismo attraverso il quale il trattamento 5-ALA-PDT causa apoptosi e morte cellulare non interessa le fasi del ciclo cellulare (S e G2);

Le Figure 4A e 4B mostrano la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) da parte delle Capan-2 in due esperimenti indipendenti (A e B).

15 Dopo aver trattato le cellule come di consueto, sono state incubate con 2,5 µL di DCFDA a 37° per 1h. In seguito ad analisi al citofluorimetro, si nota come le cellule trattate con associazione di 5-ALA e PDT mostrano un'elevata produzione di ROS che poi sarà la causa della loro ridotta vitalità.

20 La Figura 4B mostra **in alto**: istogrammi relativi alla produzione dei ROS nei due esperimenti mostrati in Figura 4A mediati; **in basso**: stessi risultati visualizzati mediante programma GraphPAd.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

25 Con il termine "gel" s'intende un materiale colloidale bifasico elastico, costituito da un liquido disperso e inglobato nella fase solida. Il liquido riempie la struttura costituita dal solido, che a sua volta sfrutta la tensione superficiale del liquido per non collassare.

Con il termine "sistema sol-gel", s'intende una sospensione colloidale in
30 grado di solidificare formando un gel.

Con il termine "veicolo", s'intende una qualsiasi sostanza o miscela di sostanze inerte, cioè priva di attività farmacologica mescolabile con una sostanza attiva per poter utilizzare quest'ultima nella forma voluta facilitandone ad esempio la somministrazione e/o il rilascio, in particolare

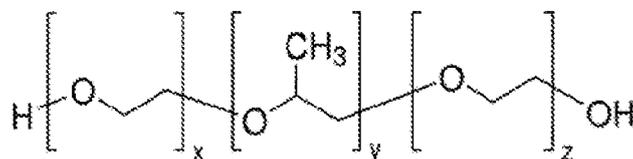
5 la somministrazione topica e/o rilascio topico.

Con il termine "veicolo termosensibile", s'intende un veicolo caratterizzato da sistema sol-gel in cui la transizione di stato avviene al di sopra di una determinata temperatura di transizione (temperatura di gelificazione); al di sotto di tale temperatura il sistema è liquido, al di sopra è solido e la

10 transizione è reversibile.

Con il termine "polossamero" s'intende un copolimero a tre blocchi costituito da un blocco centrale (idrofobico) di poli(ossido di propilene) (PPO) alle cui estremità sono collegati due blocchi (idrofili) di poli(ossido di etilene) (PEO) che ricade nella seguente formula generale:

15



20 Dato che è possibile modificare la lunghezza dei blocchi polimerici, esistono differenti polossameri con proprietà fisico-chimiche differenti, denominati con la lettera "P" seguita da tre cifre; le prime due cifre moltiplicate x 100 indicano la massa del componente PPO, mentre l'ultima

25 cifra moltiplicata x 10 indica la percentuale di PEO. Preferibilmente, la preparazione farmaceutica secondo l'invenzione comprende una miscela di polossameri P407 e P188, cioè di un polossamero con una massa molecolare di PPO pari a circa 4000 g/mol e 70% di contenuto di PEO (P407) e di un polossamero con massa molecolare di PPO pari a circa

30 1880 g/mol e 80% di contenuto di PEO (P188). In relazione alla suddetta formula generale, il polossamero P407 ha un valore di x e z pari a 101 e un valore di y pari a 56, cui corrisponde approssimativamente 70% di unità

di PEO e 30% di unità di PPO, mentre il polossamero P188 ha un valore di x e z pari a 80 e un valore di y pari a 27, cui corrisponde approssimativamente 80% di unità di PEO e 20% di unità di PPO. I polossamero sono noti anche con i loro nomi commerciali Synperonics®,
5 Pluronic®, Kolliphor®.

Con il termine "terapia fotodinamica/attivazione fotodinamica" si intende l'impiego combinato di una formulazione contenente un principio attivo e/o un suo metabolita fotosensibile, cioè in grado di interagire con una radiazione luminosa, ed una radiazione luminosa applicata alla
10 formulazione ad un'appropriata lunghezza d'onda.

Con il termine "applicazione intralesionale" si intende l'applicazione della formulazione dell'invenzione nel sito tumorale, cioè all'interno o in prossimità del tumore pancreatico.

Nella presente descrizione e nelle rivendicazioni annesse, salvo indicato
15 diversamente, le percentuali sono in peso sul peso complessivo della preparazione dell'invenzione.

Come indicato in precedenza, una formulazione a base di acido 5-aminolevulinico (5-ALA) e/o i suoi sali ed un veicolo a base di polossamero si è dimostrata particolarmente efficace nel trattamento di un tumore al
20 pancreas mediante applicazione topica e attivazione fotodinamica.

La formulazione comprende 5-ALA in concentrazione compresa tra 0,02% e 10%, preferibilmente tra 0,05% e 5%, più preferibilmente tra 0,05% e 1%, ancora più preferibilmente tra 0,05% e 0,75%.

Ad esempio, la concentrazione di 5-ALA è 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,3%,
25 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,75%, 0,8%, 0,9%, 1%, 1,5%, 2%, 3%, 4%, 5%.

I polossamero usati come veicoli sono come definiti sopra. In particolare, la preparazione farmaceutica secondo l'invenzione contiene un veicolo termosensibile comprendente da 19% a 24% in peso di polossamero 407 e da 4% a 8% in peso di polossamero 188.

30 Preferibilmente, il contenuto di polossamero 407 è compreso tra 21% e 23% e il contenuto di polossamero 188 è compreso fra 5% e 7%.

In tal modo, vantaggiosamente, la preparazione secondo l'invenzione presenta una temperatura di transizione sol-gel inferiore alla temperatura corporea (cioè inferiore a circa 37°C), consentendo con ciò l'applicazione della stessa allo stato liquido all'interno o in prossimità della massa tumorale da trattare, quale ad esempio il tumore al pancreas.

Allo stesso tempo, una volta inserita, la preparazione secondo l'invenzione gelifica velocemente in situ (in-situ thermosetting) permettendo il rilascio, ad esempio un rilascio prolungato, del 5-ALA o suoi sali nel volume da trattare per l'espletamento del trattamento terapeutico desiderato, in particolare mediante terapia fotodinamica.

Inoltre, è stato trovato che con la miscela dei suddetti polossameri, preferibilmente impiegati negli intervalli di rapporti indicati, la preparazione secondo l'invenzione presenta migliorate caratteristiche di adesività.

In tal modo, si ottiene anche una migliore efficacia di rilascio dell'ALA o suoi sali ed è anche possibile ridurre il contenuto di sostanza attiva nella composizione a parità di effetto terapeutico desiderato.

Preferibilmente, il tumore al pancreas è l'adenocarcinoma duttale pancreatico (PDAC), la forma più comune e aggressiva di tumore al pancreas e che presenta al momento scarse possibilità di risposta ai trattamenti medici. L'applicazione intralesionale prevede l'iniezione della formulazione in prossimità o nell'interno

del tumore da trattare, lasciandola in loco per un tempo di incubazione di 1-9 ore, preferibilmente 2-8 ore, più preferibilmente 2-4 ore. In particolare, il tempo di incubazione è 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 ore. In una forma di realizzazione il tempo di incubazione è 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8 ore, oppure è 2, 3 o 4 ore.

Trascorso il tempo di incubazione, la formulazione viene sottoposta ad una radiazione luminosa a lunghezza d'onda compresa tra 405 e 650 nm, preferibilmente compresa tra 600 e 650 nm.

Il tempo di irraggiamento è compreso tra 5 e 30 minuti, preferibilmente tra 5 e 20 minuti, più preferibilmente tra 5 e 10 minuti. In particolare, il tempo

di irraggiamento è 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 minuti, oppure 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 minuti.

I sali del 5-ALA sono preferibilmente sali di addizione acida scelti tra i sali con un acido farmaceuticamente accettabile avente un pKa inferiore a 5, preferibilmente un pKa inferiore a 4, e ancora più preferibilmente un pKa inferiore a 3. Esempi di acidi farmaceuticamente accettabili sono acidi inorganici come acido cloridrico, acido bromidrico, acido solforico, acido fosforico e in particolare acido nitrico, e acidi organici preferibilmente acido solfonico, derivati dell'acido solfonico, acidi arilici, aralchilici o naftilici.

La formulazione farmaceutica secondo l'invenzione oltre ad acqua può comprendere ulteriormente eccipienti e/o additivi accettabili farmaceuticamente nella misura in cui essi sono compatibili con la sostanza attiva, cioè nella misura in cui non sono influenzate negativamente le caratteristiche di stabilità e assorbimento o rilascio della sostanza attiva nonché le caratteristiche meccaniche reologiche e di adesività della preparazione.

Eccipienti adatti possono comprendere ad esempio sostanze inerti come lattosio, amido, stearato di magnesio, fosfato di calcio, mannitolo, silice colloidale, cellulosa microcristallina. Additivi adatti possono comprendere agenti diluenti, agenti emulsionanti, agenti umettanti, agenti conservanti.

Preferibilmente, il contenuto di ciascun eccipiente o additivo è compreso tra 0,1% e 1%, preferibilmente fra 0,1% e 0,5%.

Preferibilmente, la formulazione secondo l'invenzione comprende almeno un conservante in un contenuto compreso fra 0,1% e 0,5%.

Secondo una forma di realizzazione preferita, la formulazione secondo l'invenzione comprende sorbato di potassio e benzoato di sodio in qualità di conservanti, ciascuno di essi essendo presente in un contenuto compreso fra 0,1% e 0,5%.

Se appropriato, la formulazione secondo l'invenzione può comprendere inoltre agenti tamponanti quali ad esempio carbonati, fosfati, acetati per

regolare il pH ad un valore ottimale per l'utilizzazione di trattamento terapeutico sulla superficie da trattare.

L'invenzione riguarda anche un metodo di trattamento del tumore al pancreas che comprende l'applicazione intralesionale nel sito tumorale di

5 una formulazione farmaceutica comprendente 5-ALA o suoi sali ed un veicolo a base di polossameri, in quantità efficace, ad un paziente umano o animale, affetto da tumore al pancreas, seguita da un tempo di incubazione di 1-9 ore, preferibilmente 2-8 ore, più preferibilmente 2-4 ore. In particolare, il tempo di incubazione è 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 ore. In una
10 forma di realizzazione il tempo di incubazione è 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8 ore, oppure è 2, 3 o 4 ore.

Trascorso il tempo di incubazione, il metodo prevede di sottoporre la formulazione ad una radiazione luminosa a lunghezza d'onda compresa tra 405 e 650 nm, preferibilmente compresa tra 600 e 650 nm.

15 Il tempo di irraggiamento è compreso tra 5 e 30 minuti, preferibilmente tra 5 e 20 minuti, più preferibilmente tra 5 e 10 minuti. In particolare, il tempo di irraggiamento è 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 minuti, oppure 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 minuti.

20 La formulazione farmaceutica secondo l'invenzione può essere preparata mediante un procedimento che comprende le fasi di:

- sciogliere 5-ALA e/o un suo sale e opzionalmente almeno un eccipiente e/o almeno un additivo, in un solvente scelto fra acqua e un tampone acquoso precedentemente raffreddato ad una temperatura di 3-6°C, e
25 mantenuto sotto agitazione, ottenendo una soluzione;
- aggiungere polossamero 407 e polossamero 188 in quantità predeterminate singolarmente o in miscela a detta soluzione mantenuta sotto agitazione a detta temperatura;
- continuare ad agitare la soluzione fino alla completa dissoluzione dei
30 componenti.

Preferibilmente, l'almeno un additivo è costituito da sorbato di potassio e benzoato di sodio.

Materiali e metodi

Colture cellulari. Sono state utilizzate le linee cellulari di adenocarcinoma duttale pancreatico (PDAC) Capan-2. Le cellule sono state coltivate in terreno RPMI 1640 integrato con il 10% di siero bovino fetale (FBS) e poste in incubatore a 37°C e al 5% di CO₂.

Trattamento. L'acido-5-amminolevulinico (5-ALA) è un amminoacido non proteinogenico, precursore dell'eme. Dopo una serie di trasformazioni viene convertito in protoporfirina IX che è in grado di chelare il ferro in presenza dell'enzima ferrochelatasi e produrre eme. Nelle cellule tumorali si ha una ridotta funzionalità o totale assenza dell'enzima ferrochelatasi e ciò determina l'accumulo di protoporfirina IX, una sostanza fluorescente.

Le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti e trattate con una formulazione a base di polossameri contenente differenti concentrazioni di 5-ALA (da 0,23mM a 6,9mM, ovvero da 0,05% a 1,5%) per 4h. Al termine del tempo di trattamento, le cellule vengono irradiate per 7 minuti con una lampada laser a ioni He-Ne ad una lunghezza d'onda di 635 nm (terapia fotodinamica, PDT) e poi ulteriormente incubate per un tempo di 24h per consentire gli effetti intracellulari dati dall'accumulo della protoporfirina IX derivante dall'attivazione del profarmaco 5-ALA.

Vitalità cellulare (Saggio MTS). La valutazione della vitalità cellulare è stata effettuata attraverso il saggio colorimetrico MTS [3-(4,5-dimetiltiazolo-2-il)-5-(3-carbossimetossifenil)-2-(4-solfifenil)-2H-tetrazolio]. Attraverso questo saggio è possibile valutare il numero di cellule metabolicamente attive che permettono la formazione del formazano, un sale blu, ottenuto dalla reazione tra l'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi ed una soluzione colorata formata da un sale di tetrazolio ed un reagente chiamato PES (Phenazine EthoSulfate). La proliferazione cellulare è stata valutata mediante lettura spettrofotometrica misurando l'assorbanza ad una lunghezza d'onda di 490 nm (Fig. 1).

Saggio dell'apoptosi. Le cellule sono state colorate con una miscela di Annessina V coniugata con isotiocianato di fluoresceina, che si lega alla fosfatidilserina di membrana, e ioduro di propidio (PI), che si lega al DNA. Le cellule sono state seminate in piastre Petri da 66mm e trattate con

5 concentrazioni specifiche di 5-ALA (0,92mM e 3,45mM, pari rispettivamente allo 0,2% e 0,75%) per il tempo stabilito. Al termine del trattamento l'analisi quantitativa dell'apoptosi cellulare è stata eseguita utilizzando un citometro a flusso (Fig. 2).

Analisi del ciclo cellulare. Nell'analisi del ciclo cellulare, le cellule sono

10 state seminate in piastre Petri da 66mm e trattate con concentrazioni specifiche di 5-ALA (0,92mM e 3,45mM) per il tempo stabilito. Le cellule sono state raccolte, fissate in etanolo freddo al 70% e mantenute a 4°C per una notte. A questo punto, sono state sospese in 5 µg/mL di PI e 100 µg/mL di RNAsi. I profili del ciclo cellulare sono stati analizzati da un

15 citometro a flusso (Fig. 3).

Analisi delle specie reattive dell'ossigeno (ROS). La produzione di ROS è stata determinata monitorando l'aumento della fluorescenza verde di 6-carbossi-2',7'-diclorodidrofluoresceina diacetato (DCFDA), un

20 indicatore del numero di specie reattive dell'ossigeno presenti nelle cellule. Il DCFDA è permeabile alle cellule ed è scisso da esterasi non specifiche e ossidato da perossidi prodotti nelle cellule per formare 2',7'-diclorofluorescina fluorescente (DCF). L'intensità della fluorescenza DCF è proporzionale alla quantità di perossido prodotto nelle cellule. Dopo aver

25 seminato le cellule nelle piastre Petri da 66mm ed averle trattate con 5-ALA-PDT secondo le procedure sopra indicate, le cellule sono state ulteriormente incubate con 2,5 µL di DCFDA a 37°C per 1 ora. Successivamente, le cellule sono state lavate e risospese in 300 µL di PBS e analizzate per la fluorescenza DCF utilizzando un citometro a

flusso (Fig. 4).

30 **Analisi statistica.** Tutti i risultati analizzati nel saggio MTS sono espressi come media di determinazioni quintuplicate da quattro esperimenti

indipendenti. Nelle successive analisi, i risultati mostrati rappresentano la media di due esperimenti indipendenti. I risultati sono stati analizzati usando il T-test per calcolarne la significatività statistica (p-value)

5

Risultati

Per comprendere l'efficacia del trattamento combinato della formulazione comprendente 5-ALA e della terapia PDT, le cellule di adenocarcinoma pancreatico duttale Capan-2 sono state incubate per 4 ore con
10 formulazioni contenenti concentrazioni diverse di acido 5-aminolevulinico e successivamente irradiate per 7 minuti. I risultati ottenuti hanno mostrato una bassissima percentuale di vitalità cellulare in tutte le concentrazioni scelte che non è mai superiore al 3%, a dimostrazione dell'elevata efficienza di questo trattamento sulle cellule di adenocarcinoma
15 pancreatico duttale.

Per indagare gli effetti di citotossicità indotti dal farmaco e visualizzati mediante MTS, sono stati eseguiti diversi saggi funzionali per valutare l'apoptosi cellulare, le alterazioni del ciclo cellulare e la produzione di ROS.

20 Per quanto riguarda l'analisi dell'apoptosi, la colorazione dell'annexina-V nelle cellule trattate con due concentrazioni specifiche di 5-ALA (0,92 mM e 3,45 mM, pari rispettivamente allo 0.2% e 0.75%) è stata analizzata mediante citometria a flusso. Una significativa induzione di apoptosi cellulare è stata rilevata dopo il trattamento con 5-ALA-PDT per 4 ore ad
25 una concentrazione di 3,45mM, dove è stata notata una mortalità cellulare pari a circa il 40%. Successivamente, per comprendere quale fosse il meccanismo implicato nella ridotta vitalità cellulare, sono state analizzate le tre fasi del ciclo cellulare mediante l'utilizzo di Ioduro di Propidio e RNAsi. Da questa prima analisi però, non sono state riscontrate
30 interferenze con gli eventi del ciclo cellulare.

È stata poi indagata la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) che ha mostrato un numero elevatissimo di molecole di perossido di idrogeno ad entrambe le concentrazioni scelte rispetto ai controlli, determinando questo come meccanismo principale che causa l'elevata e
5 marcata mortalità cellulare. Infatti, mentre la percentuale di ROS nei controlli non supera mai il 7%, nelle cellule trattate si assiste ad un incremento delle specie reattive dell'ossigeno pari a 10 volte quella dei controlli (70%).

In ogni esperimento sono state utilizzate come controllo cellule Capan 2
10 non trattate con 5-ALA e cellule Capan 2 trattate con 5-ALA ma non irradiate con luce a 635 nm.

IL MANDATARIO

D.ssa Cristina Biggi

(Albo iscr. n. 1239 B)

RIVENDICAZIONI

1. Formulazione farmaceutica comprendente acido 5-amminolevulinico e/o suoi sali e un veicolo a base di polossamero per l'uso nel trattamento di un tumore al pancreas mediante applicazione intralesionale e irraggiamento con radiazione luminosa ad una lunghezza d'onda compresa tra 405 e 650 nm, preferibilmente tra 600 e 650 nm.
5
2. Formulazione farmaceutica per l'uso secondo la rivendicazione 1, in cui il 5-ALA è compreso tra 0,02% e 10%, preferibilmente tra 0,05% e 5%, più preferibilmente tra 0,05% e 1%, ancora più preferibilmente tra 0,05% e 0,75%.
10
3. Formulazione farmaceutica per l'uso secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui il polossamero è un copolimero a tre blocchi costituito da un blocco centrale idrofobico di poli(ossido di propilene) (PPO) alle cui estremità sono collegati due blocchi idrofili di poli(ossido di etilene) (PEO).
15
4. Formulazione farmaceutica per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni dalla 1 alla 3, in cui il polossamero comprende una miscela di polossameri P407 e P188, preferibilmente aventi, rispettivamente, una massa molecolare del blocco di PPO di circa 4000 g/mol e un contenuto di PEO di circa 70%, e una massa molecolare del blocco di PPO di circa 1800 g/mol e un contenuto di PEO di circa 80%.
20
5. Formulazione farmaceutica per l'uso secondo la rivendicazione 4, in cui il polossamero 407 è compreso in quantità da 19% a 24%, preferibilmente da 21% a 23% e il polossamero P188 è compreso in quantità da 4% a 8%, preferibilmente da 4% a 6%.
25
6. Formulazione farmaceutica per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni dalla 1 alla 5, in cui l'applicazione intralesionale è seguita da
30

2

un tempo di incubazione di 1-9 ore, preferibilmente 2-8 ore, più preferibilmente 2-4 ore, prima dell'irraggiamento con radiazione luminosa.

7. Formulazione farmaceutica per l'uso secondo una qualsiasi delle
5 rivendicazioni dalla 1 alla 6, in cui il tempo di irraggiamento è compreso tra 5 e 30 minuti, preferibilmente tra 5 e 20 minuti, più preferibilmente tra 5 e 10 minuti.

10

IL MANDATARIO
D.ssa Cristina Biggi
(Albo iscr. n. 1239 B)

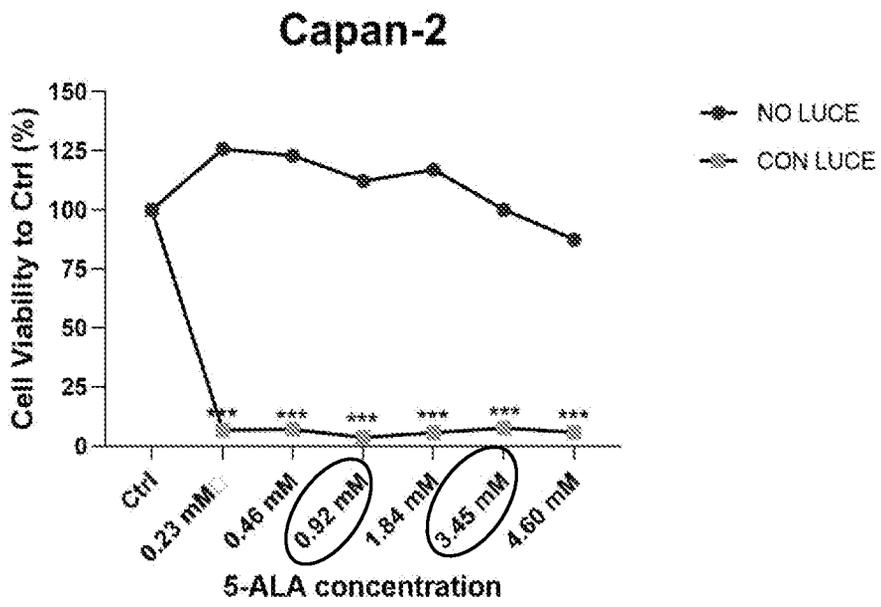
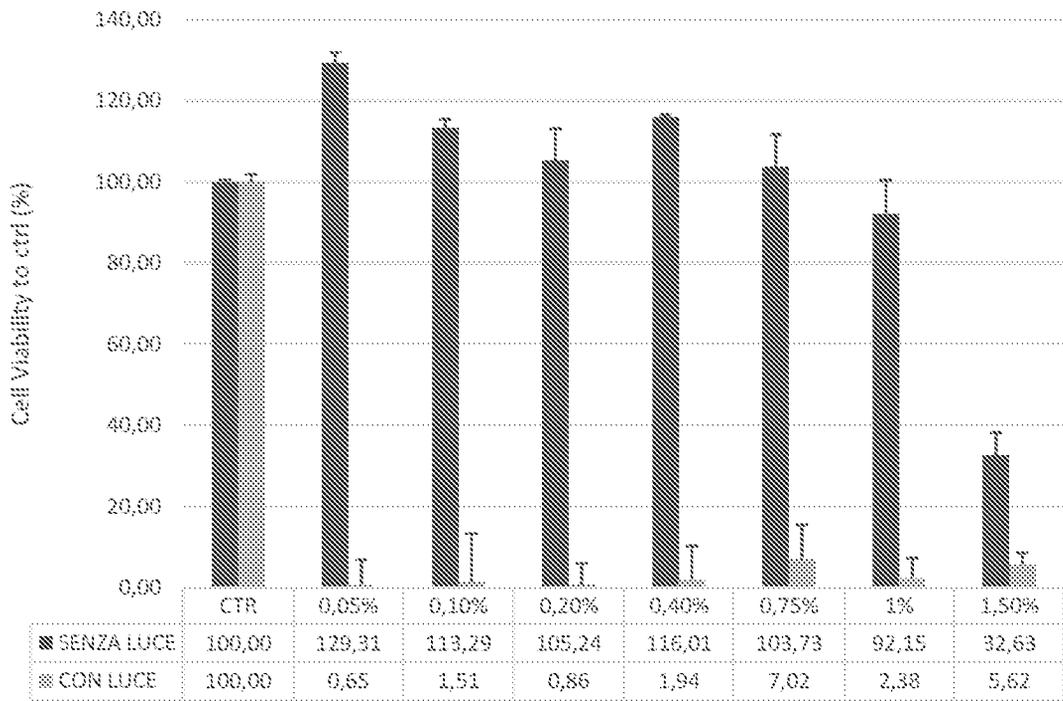


FIG. 1

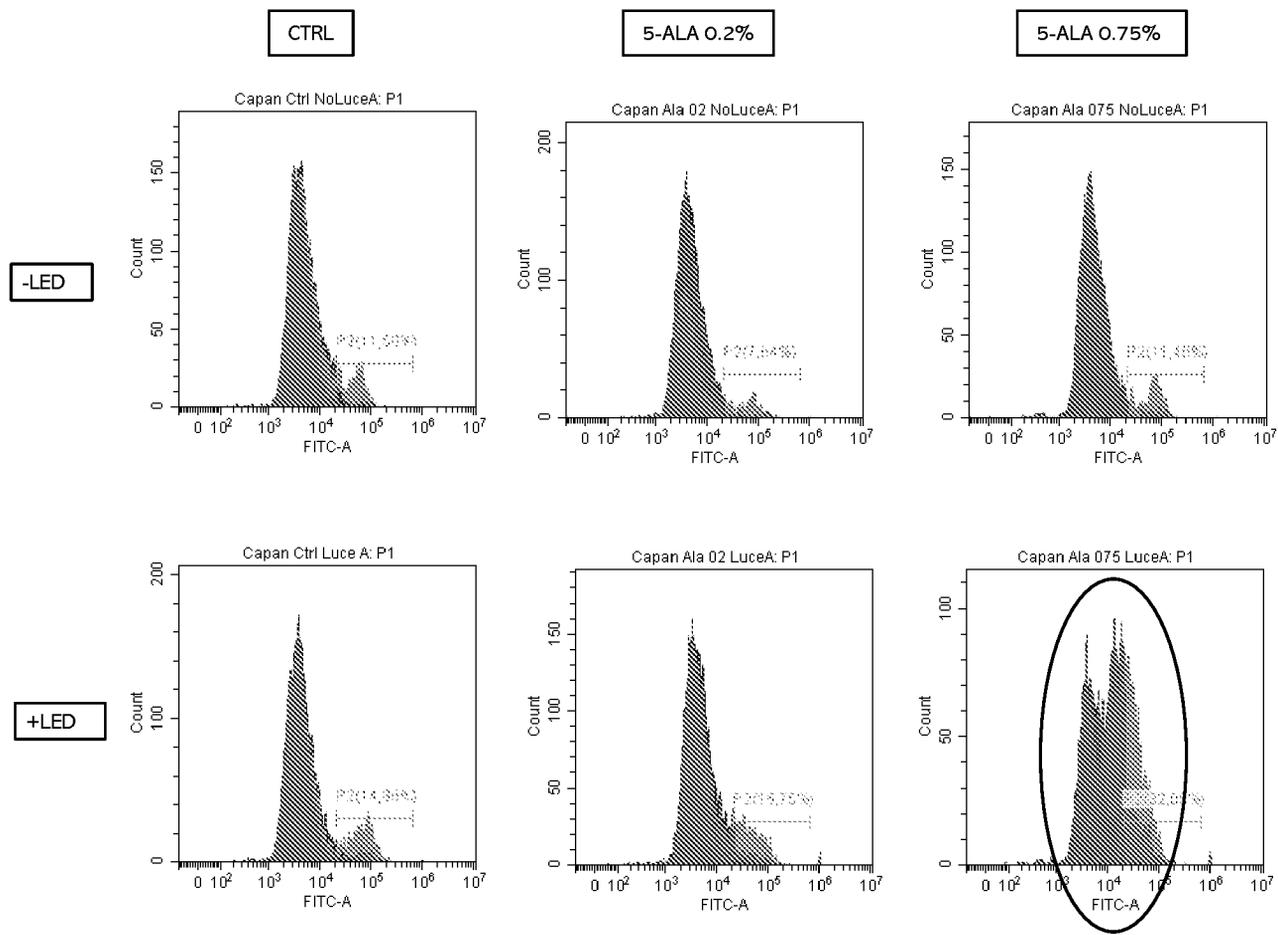
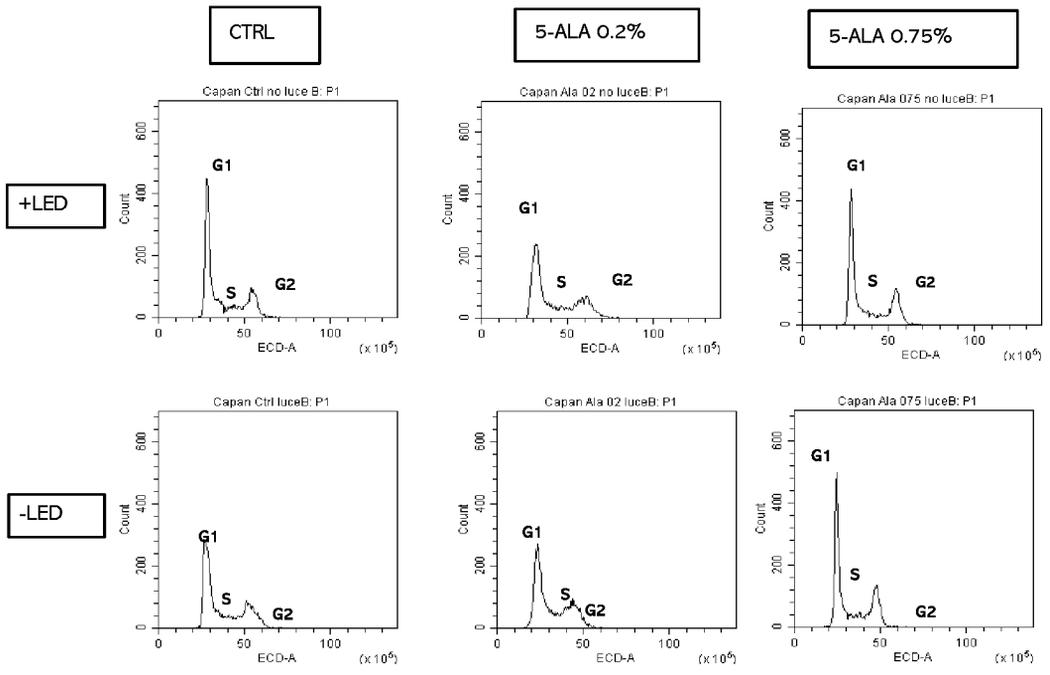
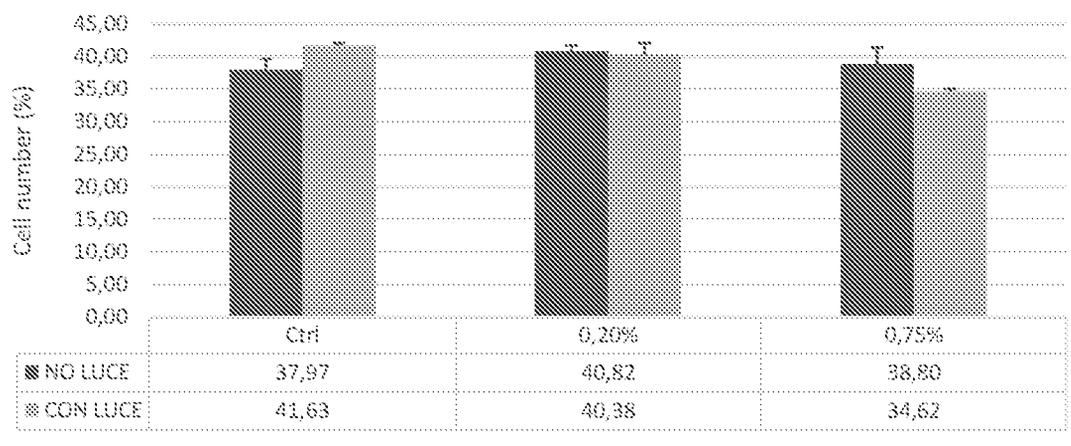


FIG. 2



S PHASE



G2 PHASE

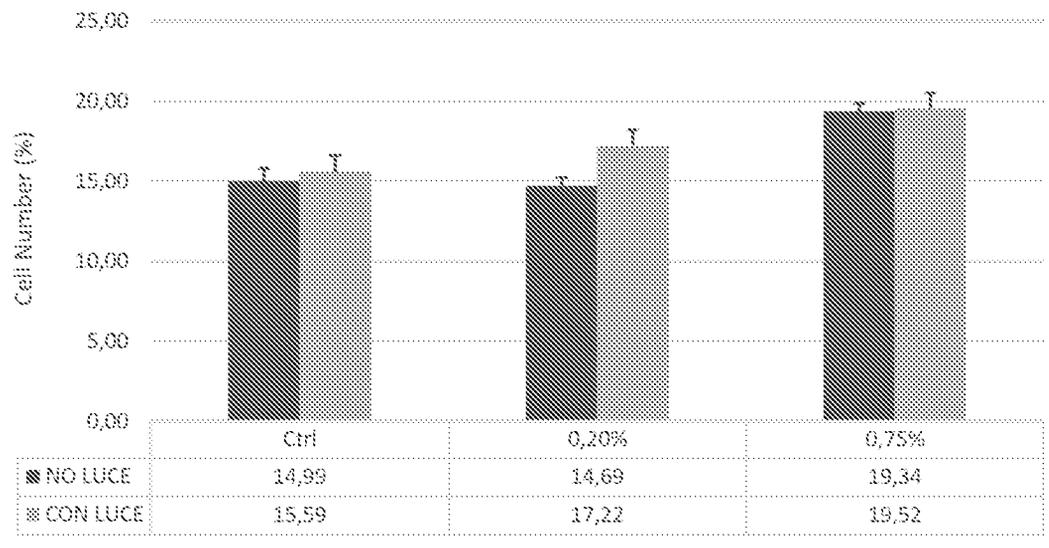
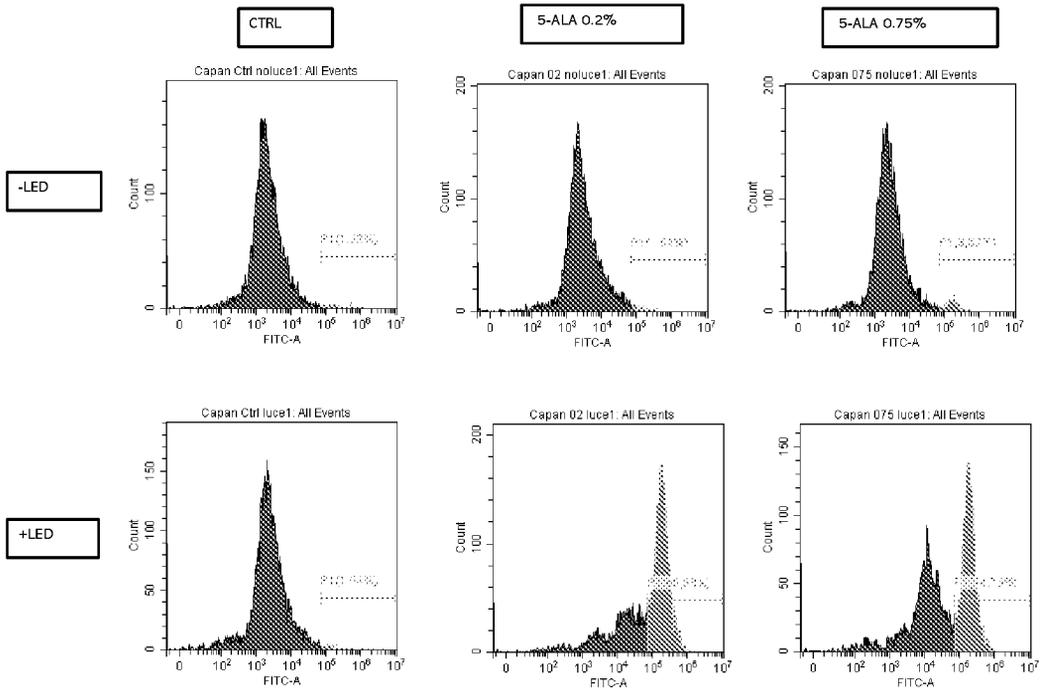


FIG. 3

Experiment A



Experiment B

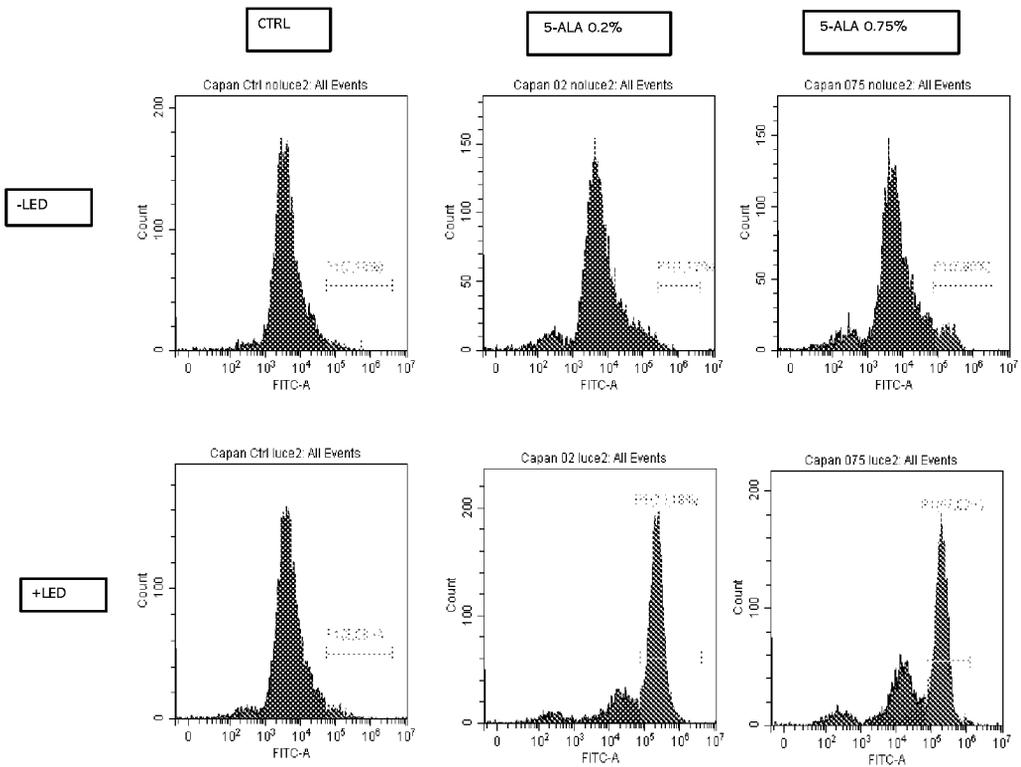


FIG. 4A

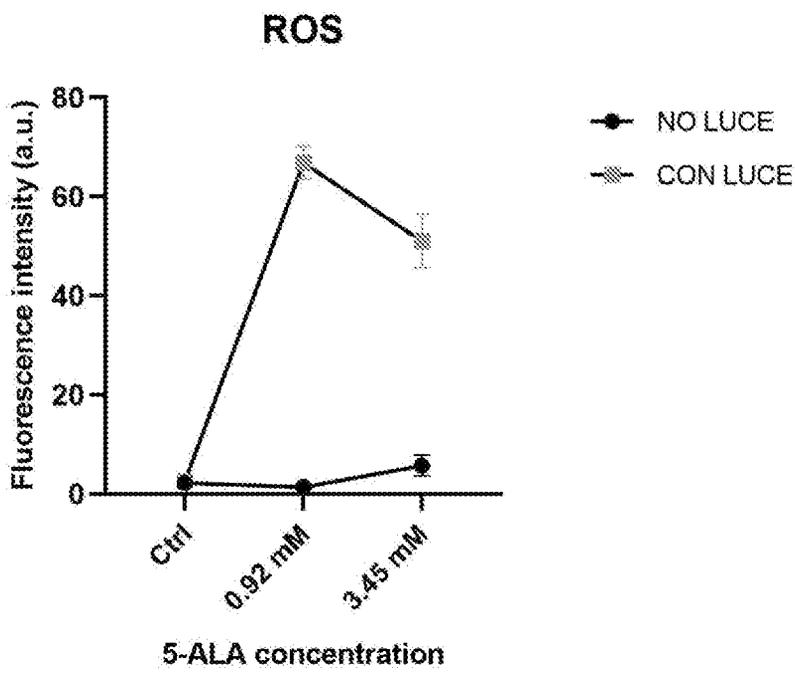
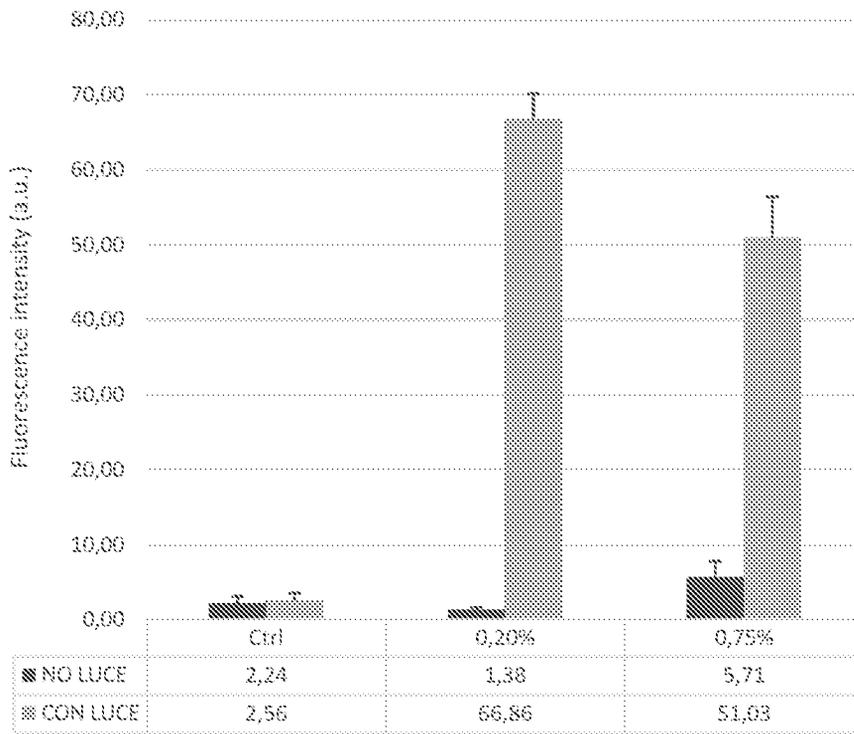


FIG. 4B